

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 REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aaaa)
08	Sostituzione della provetta da 2 mL 953-217 e del tappo bianco 953-223 con la provetta da 2 mL 953-065 per il componente PCR Mix. Aggiornamento della confezione della provetta per PCR Mix (paragrafo "Materiali inclusi nel prodotto") Aggiornamento del paragrafo "Altri prodotti richiesti". Aggiornamento del paragrafo "Avviso per l'utilizzatore" Aggiornamento del paragrafo "Avviso per l'acquirente: licenza limitata" Estensione fino a 60 giorni dell'uso dalla prima apertura. Aggiornamento del paragrafo "Simboli" con il simbolo "Consultare le istruzioni per l'uso"	09/09/2025
07	Introduzione dell'incertezza della curva standard, paragrafo 11.3 Aggiornamento della cross-reattività, paragrafo 11.5 Aggiornamento dell'inibizione, paragrafo 11.8	26/11/24
06	Conformità ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR). Modifica della formulazione/confezione del prodotto PCR-Mix per migliorarne l'usabilità: passaggio da tre componenti a due soli componenti (enzima RT e PCR Mix). Estensione dell'utilizzo del prodotto in combinazione con lo strumento ELITe BeGenius®, con plasma e matrici CSF. Aggiornamento del paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI. Sono stati condotti nuovi studi di valutazione. Sono state aggiornate le seguenti prestazioni: Stabilità dei campioni clinici; Limite di rilevabilità; Intervallo di misurazione lineare; Cross-reattività; Organismi e sostanze inibitori; Ripetibilità e riproducibilità. <div style="background-color: #0056b3; height: 20px; width: 100%;"></div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">I risultati relativi alla specificità diagnostica e alla sensibilità diagnostica del nuovo studio sono stati confermati.</div> Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).	18/10/2024
05	È stato modificato il numero di sessioni analitiche da eseguire in associazione con il sistema "ELITe InGenius".	10/05/2022
04	È stato modificato il numero di reazioni che possono essere eseguite in associazione con il sistema "ELITe InGenius".	26/02/2020
03	Correzioni formali	07/09/2018
02	Estensione dell'utilizzo del prodotto in combinazione con lo strumento ELITe InGenius®, con plasma e matrici CSF. Nuovo packaging: scatola di plastica invece che di cartone	09/05/2016
00 — 01	Sviluppo di nuovi prodotti e modifiche correlate	—

NOTA

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

<u>CODICE PRODOTTO</u>	<u>Numero di lotto</u>	<u>Data di scadenza</u>
RTS076PLD	U0624-154	31/12/2025
RTS076PLD	U1123-101	31/05/2025
RTS076PLD	U0823-002	28/02/2025

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

INDICE

1 USO PREVISTO	5
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	5
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	6
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO.....	6
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	6
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
8 CAMPIONI E CONTROLLI	8
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	10
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	18
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	23
12 BIBLIOGRAFIA.....	33
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	33
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	34
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	37
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE.....	38
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 saggio di trascrizione inversa e 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 con gli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, che sono sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni di plasma umano raccolto in EDTA e liquido cerebrospinale.

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

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

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una reazione di trascrizione inversa e Real-Time PCR (metodica one step) quantitativa per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione dell'RNA dell'Enterovirus isolato dai campioni clinici, utilizzando una miscela di reazione completa che contiene primer e sonde con tecnologia ELITE MGB.

Le sonde ELITE MGB vengono 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 dell'EV è calcolata sulla base di una curva di calibrazione memorizzata.

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

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

- **EV PCR Mix**, una miscela PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene primer e sonde specifici per:
 - **ENTEROVIRUS**, regione **5' UTR**, rilevato nel Canale **ENTEROVIRUS**; la sonda è stabilizzata da MGB, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante FAM.
 - Internal Control (**IC**), specifico per una regione di RNA genomico di fago MS2, rilevato nel Canale **IC**; la sonda è stabilizzata da MGB, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher e marcata con il fluoroforo AquaPhluor®525 (AP525).

La miscela **EV PCR Mix** che contiene anche buffer, magnesio cloruro, trifosfati nucleotidi e DNA polimerasi "hot-start". Ogni provetta contiene **600 µL** di soluzione ed è sufficiente per **24 test**, se si processano almeno 5 campioni per sessione.

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

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITE MGB Mix** contiene reagenti sufficienti per **96 test su ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL di **EV PCR Mix** e 0,3 µL di **RT EnzymeMix** per reazione.

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit** può essere utilizzato anche 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 trascrizione inversa e Real-Time PCR in tubo con tappo NEUTRO	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix cod. RTS003-RT	Enzimi per trascrittasi inversa in tubo con tappo con inserto NERO	2 x 20 µL	-

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti non talcati monouso in nitrile o simili.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (circa 5.000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (circa 13.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Tubi sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005).
- Tubi sterili da 0,5 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.730.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del campione, il controllo interno di estrazione e inibizione, i controlli positivi e negativi 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 dei campioni, sono richiesti i seguenti prodotti.

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva) EV ELITe _STD , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei calibratori EV ELITe _Be _PC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control. EV ELITe _NC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control EV ELITe _PL_200_100 , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di plasma EV ELITe _CSF_200_100 , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni del liquido cerebrospinale.	ENTEROVIRUS ELITe Standard (EG SpA, cod. STD076PLD) ENTEROVIRUS - ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR076PLD) CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTCRCPE) ELITe InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200) Materiali di consumo ELITe InGenius e ELITe BeGenius (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITe BeGenius Software versione 2.3.0. (o successiva) EV ELITe _Be _STD , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei calibratori EV ELITe _Be _PC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control. EV ELITe _Be _NC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control EV ELITe _Be _PL_200_100 , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di plasma EV ELITe _Be _CSF_200_100 , Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di liquido cerebrospinale	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

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

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

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

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

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

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

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

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

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelo
EV PCR Mix	-20 °C o inferiore (al riparo dalla luce)	60 giorni	Fino a cinque
RT EnzymeMix	-20 °C o inferiore	60 giorni	Fino a dieci cicli, fino a dieci minuti a 2/8 °C

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

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

Tabella 4

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

NR: non raccomandato.

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

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

Tabella 5 Assay Protocol per ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit

Campio- ne	Strumento	Trasferi- mento del campio- ne	Nome Assay Protocol	Referto	Caratteristiche
Plasma	ELITe InGenius	Non richiesto	EV ELITe_PL_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Internal Control: 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	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
CSF	ELITe InGenius	richiesto, in Extraction Tube	EV ELITe_CSF_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITe BeGenius	richiesto, in Sarstedt Tube di 2 mL	EV ELITe_Be_CSF_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

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

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell'**Extraction tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate ed attenersi a tutte le raccomandazioni indicate nella sezione "Avvertenze e Precauzioni".

Il volume del campione in un tubo primario varia in base al tipo di tubo caricato. Per ulteriori informazioni su come impostare ed eseguire la procedura di estrazione, consultare le istruzioni per l'uso del kit di estrazione o il manuale di **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**.

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

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

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

8.2 Calibratori e controlli per PCR

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

- Per la curva di calibrazione, utilizzare i quattro livelli del prodotto **ENTEROVIRUS ELITe Standard** (non fornito con questo kit) con gli Assay Protocol **EV8 ELITe_STD** o **EV ELITe_Be_STD**.

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

- Per il Positive Control utilizzare il prodotto **ENTEROVIRUS - ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit) con gli Assay Protocol **EV ELITe_PC** o **EV ELITe_Be_PC**.
- Per il Negative Control utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) con gli Assay Protocol **EV ELITe_NC** o **EV ELITe_Be_NC**.

NOTA

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

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

I risultati dei controlli per PCR scadono dopo **15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare i controlli positivo e negativo.

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

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

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITe InGenius

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

Tabella 6

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

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

9.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

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

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

1. Scongela le provette di **EV PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare con un vortex a bassa velocità per 10 secondi per tre volte, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

2. Prelevare le provette di **RT EnzymeMix** necessarie. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

3. Preparare un tubo da 2 mL (Sarstedt cod. 72.694.005, non fornito in questo kit) per la **miscela di reazione completa** ed etichettarlo utilizzando un pennarello indelebile.
4. Calcolare i volumi necessari di **EV PCR Mix** e **RT EnzymeMix** per preparare la **miscela di reazione completa** 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

5. Preparare la **miscela di reazione completa** trasferendo nel tubo da 2 mL etichettato i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare con il vortex a bassa velocità per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La **miscela di reazione completa** può essere utilizzata entro **7 ore** se mantenuta in un blocco freddo (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare la terza sessione). La miscela di reazione completa **non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

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

Tabella 8

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	<p>Identificare i campioni e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.</p> <p>Se richiesto, trasferire 200 μL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato.</p> <p>Scongelare le provette contenenti CPE necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.</p>	<p>Scongelare gli Elution Tube a temperatura ambiente contenenti gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.</p>
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".

Tabella 8 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un tracciato, "Track", e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un tracciato, "Track", e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare "PCR Only".
7	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Verificare che " Dilution factor " sia "1".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Verificare che " Dilution factor " sia "1".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare il CPE e la miscela di reazione completa nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la miscela di reazione completa nell'"Inventory Block" (area reagenti) facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ciascun tubo.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Caricare la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITE InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	Caricare la PCR Cassette e le provette di eluizione con i campioni estratti.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

Tabella 9

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
1	Scongelerare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelerare le provette di Positive Control a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Preparare il Negative Control trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito in dotazione con ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".	Nella schermata "Home", selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.

Tabella 9 (segue)

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
4	Per il Q-PCR Standard, assegnare il "Track", selezionare l'Assay Protocol (vedere "Campioni e controlli") nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto reagente e la data di scadenza.	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli"). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".
6	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".
7	Caricare la miscela di reazione completa nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	Caricare la miscela di reazione completa nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la PCR Cassette e le provette di Q-PCR Standard.	Caricare la PCR Cassette, il Positive Control e il Negative Control.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

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

NOTA

La **miscela di reazione completa** può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione. La miscela di reazione completa **non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

L'**EV Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

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

9.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

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

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

9.3.1 Validazione della curva di calibrazione

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

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente per PCR, vengono registrate nel database (Calibration) e possono essere visualizzate e approvate dagli utenti "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia GUI.

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

NOTA

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

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

L'**ELITE InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target delle reazioni del Positive Control e del Negative Control con i parametri degli Assay Protocol **EV ELITE_PC** e **EV ELITE_NC**. I valori di Ct risultanti sono convertiti in concentrazione e utilizzati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del Positive Control e del Negative Control, specifici per il lotto di reagenti della PCR, vengono registrati nel database (Controls) e possono essere visualizzati e approvati dagli utenti "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia GUI.

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

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

NOTA

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

NOTA

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

9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il programma **ELITE InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target (Canale **EV**) e per l'Internal Control (Canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocol **EV ELITE_PL_200_100** e **EV ELITE_CSF_200_100**. I valori di Ct risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati vengono visualizzati sulla schermata "Results Display".

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

Tabella 10

1) Curva di calibrazione	Stato
EV Q - PCR Standard	APPROVATO
2) Positive Control	Stato
EV - Positive Control	APPROVATO
3) Negative Control	Stato
EV - Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal programma con **ELITE InGenius software** usando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se l'RNA del patogeno è stato rilevato.

Tabella 11

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
EV:RNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL (EV:RNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL)	L' EV RNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella concentrazione indicata.
EV:RNA Detected, quantity below "LLOQ" copies/mL (EV:RNA Rilevato, quantità minore di "LLOQ" copie/mL)	L' EV RNA è stato rilevato nel campione, al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio.
EV:RNA Detected, quantity beyond "ULOQ" copies/mL (EV:RNA Rilevato, quantità maggiore di "ULOQ" copie/mL)	L' EV RNA è stato rilevato nel campione, oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio.
EV:RNA Not detected or below the "LoD" copies/mL (EV:RNA Non rilevato o minore di "LoD" copie/mL)	L' EV RNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per l'RNA target oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid-Retest Sample. (Invalido–Ripetere il campione)	Risultato del saggio non valido per un errore dell'Internal Control (dovuto per esempio a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni segnalati come "Invalid-Retest Sample" (Invalido–Ripetere il campione): in questo caso, l'RNA dell'Internal Control non è stato rilevato in maniera efficace, probabilmente per problemi nelle fasi di campionamento, estrazione, trascrizione inversa o PCR (ad es. campionamento sbagliato, degradazione o perdita di RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono essere all'origine di risultati errati.

Se ne rimane un volume sufficiente, l'eluato può essere nuovamente analizzato (tal quale oppure diluito) mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only" (solo PCR). In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere nuovamente analizzato partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità "Extract + PCR" (vedere 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 30 [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 34](#)).

I campioni segnalati come "EV:RNA Not Detected or below "LoD" copies/mL" (EV:RNA Non rilevato o minore di "LoD" copie/mL) sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'EV. In questo caso, il campione può essere negativo per il RNA dell'EV oppure l'RNA dell'EV è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 23](#)).

I campioni positivi per l'RNA dell'EV a una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità (e al limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, sono identificati nel report come "EV:RNA Detected, quantity below "LLOQ" copies/mL (EV:RNA rilevato, quantità minore di "LLOQ" copie/mL) (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 23](#)).

I campioni positivi per l'RNA dell'EV all'interno dell'intervallo di misurazione lineare (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 23](#)) sono rilevati e segnalati come "EV:RNA Detected, quantity equal to "XXX" copies / mL" (EV:RNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL).

I campioni positivi per l'RNA dell'EV in quantità maggiore del limite superiore di quantificazione sono segnalati come "EV:RNA Detected, quantity beyond "ULOQ" copies / mL" (EV:RNA Rilevato, quantità maggiore di "ULOQ" copie/mL) e non sono idonei per la quantificazione. Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e rianalizzato per ottenere risultati all'interno dell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

NOTA

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

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

9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

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

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

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

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

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l'uso del prodotto **ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe BeGenius** si articola in due 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 del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

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

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

10.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
- Sessione di calibrazione (PCR Only)

D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR only)

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

1. Scongelerare le provette di **EV PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per **24 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare con un vortex a bassa velocità per 10 secondi per tre volte, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

2. Prelevare le provette di **RT EnzymeMix** necessarie. Ciascun tubo è sufficiente per **48 test** in condizioni ottimali (5 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

3. Preparare un tubo da 2 mL (Sarstedt cod. 72.694.005, non fornito in questo kit) per la **miscela di reazione completa** ed etichettarlo utilizzando un pennarello indelebile.
4. Calcolare i volumi necessari di **EV PCR Mix** e **RT EnzymeMix** per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni (N) da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Tabella 13

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
$13 \leq N \leq 18$	$(N + 3) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 3) \times 0,3 \mu\text{L}$
$19 \leq N \leq 23$	$(N + 4) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 4) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 24$	580 μL	8,7 μL

5. Preparare la **miscela di reazione completa** trasferendo nel tubo da 2 mL etichettato i volumi calcolati dei due componenti. Mescolare con il vortex a bassa velocità per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

La **miscela di reazione completa** può essere utilizzata entro **7 ore** se mantenuta in un blocco freddo (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare la terza sessione). La miscela di reazione completa **non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

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

Tabella 14

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Sarstedt tube di 2 mL precedentemente etichettato. Scongellare i tubi di CPE necessari a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Ciascun tubo contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.	Se necessario, scongellare gli Elution tube contenenti gli acidi nucleici estratti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR" .	Selezionare il "run mode": "PCR Only" .
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano tubi secondari "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".
6	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano tubi secondari, contrassegnare "2 mL Tube". Se i tubi secondari non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Per ciascuna "Position" immettere il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume di eluato).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Non applicabile
9	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli "Elution Tube" nell'"Elution Rack" (gli Elution Tube possono essere etichettati con il codice a barre per una miglior tracciabilità).	Non applicabile
13	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".

Tabella 14 (segue)

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

Tabella 15

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
1	Scongellare le provette di Q-PCR Standard necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) per 30 minuti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongellare le provette di Positive Control a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Preparare il Negative Control trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito in dotazione con ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": PCR Only".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell'"Elution Rack".	Caricare le provette di Positive Control e di Negative Control nell'"Elution Rack".
6	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

Tabella 15 (segue)

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
8	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare l' Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
9	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
10	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la miscela di reazione completa nel "Reagent/Elution Rack".
11	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" nell'Inventory Area.
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
18	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della sessione, il campione estratto residuo che è rimasto negli **Elution tube** deve essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare di provocare fuoriuscite del campione estratto.

NOTA

La **miscela di reazione completa** può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione). Mescolare delicatamente, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione. La miscela di reazione completa **non può** essere conservata per essere riutilizzata.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

L'**EV Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

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

10.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

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

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

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

11.1 Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) del test è stato determinato con campioni di plasma raccolti in EDTA e campioni di liquido cerebrospinale (CSF) in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**.

Plasma raccolto in EDTA

Il LoD del test è stato determinato con campioni di plasma su **ELITe InGenius** inoculati con il materiale di riferimento Enterovirus 71 (ZeptoMetrix, Stati Uniti); sui risultati è stata eseguita un'analisi di regressione Probit e il LoD è stato definito come la concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di un risultato positivo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 16

Limite di rilevabilità (copie/mL) per campioni di plasma ed ELITe InGenius		
LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore
141	101	278

Il valore LoD calcolato è stato verificato analizzando un pool negativo di plasma raccolto in EDTA inoculato con materiale di riferimento certificato *Enterovirus* alla concentrazione dichiarata. I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target su entrambi gli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.

Liquido cerebrospinale (CSF):

Il LoD del test è stato determinato con campioni di CSF su ELITe InGenius inoculati con il materiale di riferimento Enterovirus 71 (ZeptoMetrix, Stati Uniti); sui risultati è stata eseguita un'analisi di regressione Probit e il LoD è stato definito come la concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di un risultato positivo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 17

Limite di rilevabilità (copie/mL) per campioni di CSF ed ELITe InGenius		
LoD	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore
490	304	1185

Il valore LoD calcolato è stato verificato analizzando un pool negativo di CSF inoculato con materiale di riferimento certificato Enterovirus alla concentrazione dichiarata. I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target su entrambi gli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.

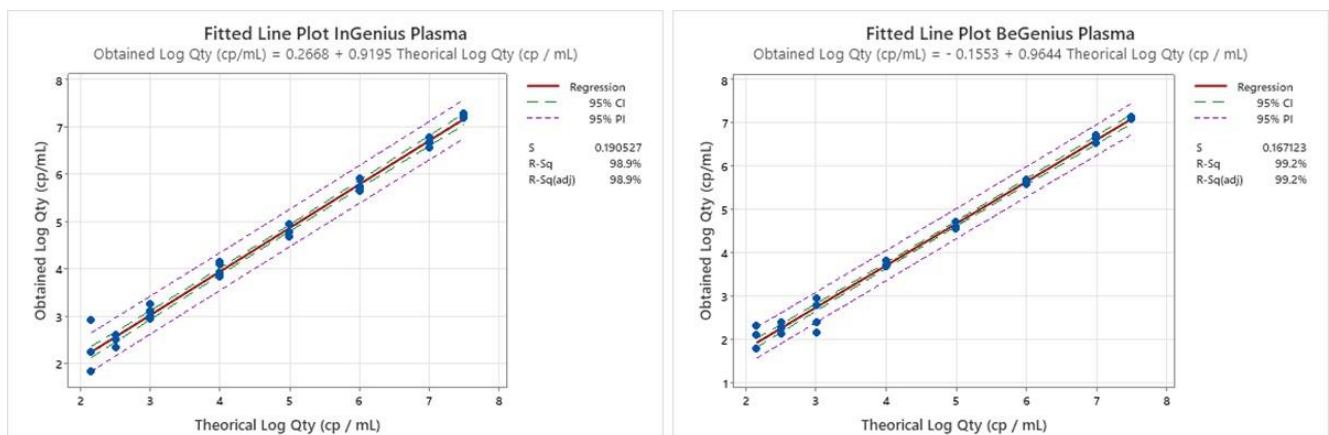
11.2 Intervallo di misurazione lineare

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

Plasma raccolto in EDTA

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit è stato determinato con campioni di plasma su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius utilizzando diluizioni di materiale di riferimento Enterovirus 71 (ZeptoMetrix, Stati Uniti); è stata eseguita una regressione lineare sui risultati ed è stato definito l'intervallo di misurazione lineare.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

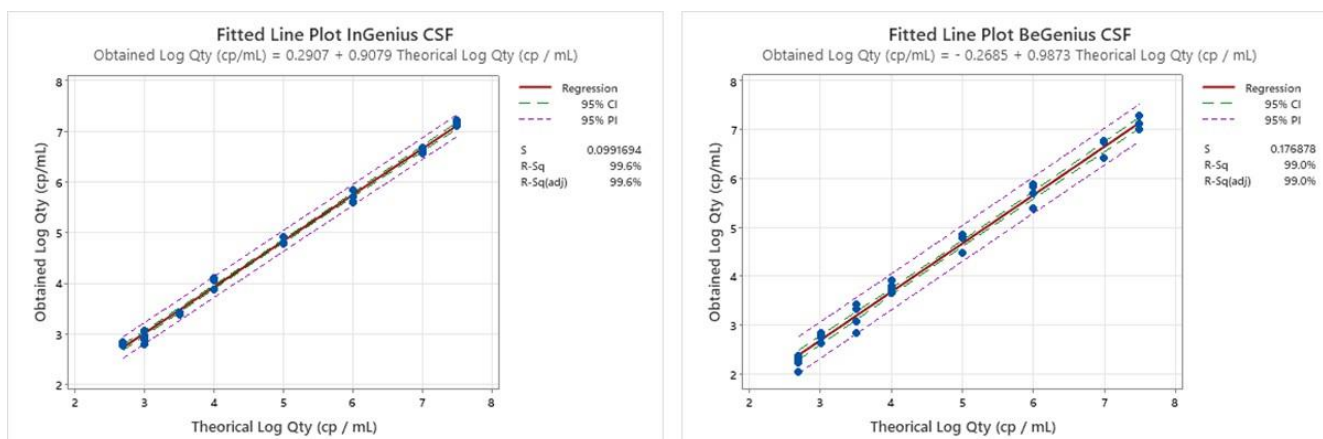
Tabella 18

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma in EDTA con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
141 copie/mL	31.622.777 copie/mL

CSF:

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit è stato determinato con campioni di plasma su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius utilizzando diluizioni di materiale di riferimento Enterovirus 71 (ZeptoMetrix, Stati Uniti); è stata eseguita una regressione lineare sui risultati ed è stato definito l'intervallo di misurazione lineare.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 19

Intervallo di misurazione lineare per campioni di CSF con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
490 copie/mL	31.622.777 copie/mL

11.3 Incertezza della curva dello standard

Il valore di incertezza della curva dello standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) delle quantificazioni di tutti i livelli e moltiplicando per il fattore di copertura $k = 2$ (incertezza combinata estesa) ed è pari a 0,1507 Log copie/reazione.

Tabella 20

Livelli della curva standard	Teorico	Misurata	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 della rilevazione su differenti genotipi

L'inclusività del saggio, come efficienza della rilevazione per differenti genotipi di Enterovirus, è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede una rilevazione efficiente dei seguenti genotipi di 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 Marcatori potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività del test con l'RNA genomico dell'ENTEROVIRUS e altri organismi non previsti, inclusi virus filogeneticamente vicini all'Enterovirus (Rhinovirus e Parechovirus), è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database di nucleotidi.

L'analisi su rinovirus e parechovirus ha dimostrato una specificità parziale. Non sono state rilevate omologie significative con le sequenze genomiche dei Parechovirus umani A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, mentre il prodotto ha mostrato una possibile reattività crociata con alcuni genotipi del Rhinovirus (ad eccezione del Rhinovirus B14).

L'analisi non ha evidenziato alcuna omologia significativa con altri organismi non intenzionali; pertanto, non è prevista alcuna cross-reattività.

La potenziale cross-reattività con altri microrganismi che potrebbero essere rilevati nei campioni clinici di plasma è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati e (ATCCNIBSC) ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 21

Campione	Pos./Rep.	Esito
HIV1	0 / 6	Nessuna cross-reattività
EBV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
EBV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HBV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HHV6	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HSV1	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HSV2	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HEV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Flu A	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
Flu B	0 / 6	Nessuna cross-reattività
PVB19	0 / 6	Nessuna cross-reattività
HCV	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Aspergillus fumigatus	0 / 6	Nessuna cross-reattività

Tabella 21 (segue)

Campione	Pos./Rep.	Esito
Staphylococcus aureus	0 / 6	Nessuna cross-reattività
Candida albicans	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 i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target EV quando analizzati utilizzando il prodotto ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.6 Marcatori potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione causata da altri microrganismi che potrebbero essere rilevati nei campioni clinici di plasma o CSF è stata valutata mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 22

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
HIV1	6 / 6	Nessuna interferenza
EBV	6 / 6	Nessuna interferenza
EBV	6 / 6	Nessuna interferenza
HBV	6 / 6	Nessuna interferenza
HHV6	6 / 6	Nessuna interferenza
HSV1	6 / 6	Nessuna interferenza
HSV2	6 / 6	Nessuna interferenza
HEV	6 / 6	Nessuna interferenza
Flu A	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
Flu B	6 / 6	Nessuna interferenza
PVB19	6 / 6	Nessuna interferenza
HCV	6 / 6	Nessuna interferenza
Aspergillus fumigatus	6 / 6	Nessuna interferenza
Staphylococcus aureus	5 / 6 *	Nessuna interferenza
Candida albicans	6 / 6	Nessuna interferenza
BKV	6 / 6	Nessuna interferenza

Tabella 22 (segue)

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
Rhinovirus B14	6 / 6	Nessuna interferenza
Parechovirus 1	6 / 6	Nessuna interferenza

Nota: a causa di un errore dell'operatore, un campione non è stato considerato nelle analisi perché risultato non valido. La dimensione minima del campione richiesta nell'analisi era 5, pertanto il campione non è stato rianalizzato.

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

11.7 Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività

Plasma raccolto in EDTA

La cross-reattività del saggio con sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 23

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
Plasma itterico	0/6	Nessuna cross-reattività
Plasma lipemico	0/6	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico H	0/6	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico M	0/6	Nessuna cross-reattività
Sangue emolitico L	0/6	Nessuna cross-reattività
Plasma in eparina	0/6	Nessuna cross-reattività
Plasma in EDTA	0/6	Nessuna cross-reattività
Ampicillina	0/6	Nessuna cross-reattività
Cefedoxime	0/6	Nessuna cross-reattività
Azitromicina	0/5*	Nessuna cross-reattività
Ganciclovir	0/5*	Nessuna cross-reattività
Ribavirina	0/6	Nessuna cross-reattività
Abacavir solfato	0/6	Nessuna cross-reattività
Cidofovir	0/6	Nessuna cross-reattività
Ciclosporina A	0/6	Nessuna cross-reattività
Bactrim	0/6	Nessuna cross-reattività
Ciprofloxacina	0/6	Nessuna cross-reattività

Nota: a causa di un errore dell'operatore, un campione non è stato considerato nelle analisi perché risultato non valido. La dimensione minima del campione richiesta nell'analisi era 5, pertanto il campione non è stato rianalizzato.

Il test ha dimostrato che tutte le sostanze analizzate non creano cross-reattività con l'amplificazione del target EV utilizzando ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

CSF:

La cross-reattività del saggio con una sostanza potenzialmente interferente che potrebbe essere presente nei campioni clinici di CSF è stata valutata mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 24

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
5% sangue intero	0/6	Nessuna cross-reattività

Il test ha dimostrato che il sangue intero non crea cross-reattività con l'amplificazione del target EV utilizzando ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.8 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

Plasma raccolto in EDTA

L'inibizione mediante sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 25

Campione	EV Pos. / Rep.	Esito
Plasma itterico	6/6	Nessuna interferenza
Plasma lipemico	6/6	Nessuna interferenza
Sangue emolitico H	6/6	Nessuna interferenza
Sangue emolitico M	6/6	Nessuna interferenza
Sangue emolitico L	6/6	Nessuna interferenza
Plasma in eparina	3/6	Campione non valido
Plasma in EDTA	6/6	Nessuna interferenza
Ampicillina	6/6	Nessuna interferenza
Cefedoxime	6/6	Nessuna interferenza
Azitromicina	6/6	Nessuna interferenza
Ganciclovir	6/6	Nessuna interferenza
Ribavirina	6/6	Nessuna interferenza
Abacavir solfato	6/6	Nessuna interferenza
Cidofovir	6/6	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	6/6	Nessuna interferenza
Bactrim	6/6	Nessuna interferenza
Ciprofloxacina	6/6	Nessuna interferenza

Il test ha dimostrato che tutte le sostanze, ad eccezione dell'eparina, non inibiscono la rilevazione e la quantificazione del target EV utilizzando ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire il saggio. Tuttavia, a causa del mancato risultato dell'Internal Control (IC Ct > 35), questi campioni sono risultati "Non validi" anziché falsi "Negativi".

CSF:

L'inibizione mediante una sostanza potenzialmente interferente che potrebbe essere presente nei campioni clinici di CSF è stata valutata mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 26

Campione	EV Pos. / Rep.	Bias di quantificazione	Esito
5% sangue intero	6/6	0,0653	Nessuna interferenza

Il test ha dimostrato che il sangue intero non inibisce la rilevazione del target EV e la quantificazione utilizzando ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit.

11.9 Ripetibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione del dosaggio è stata valutata sugli strumenti ELITe InGenius e ELITe BeGenius analizzando un pannello di campioni di plasma, inclusi un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per EV (Zeptomatrix, US).

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

Tabella 27

Ripetibilità intra-sessione con ELITe InGenius (Day1)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit								
Negativi	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 con ELITe BeGenius (Day1)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit U0722-018 (LP1) - Day 1								
Negativi	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 (in due giorni) è illustrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 29

Ripetibilità inter-sessione con ELiTe InGenius (Day1 + Day2)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELiTe MGB Kit								
Negativi	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 con ELITe BeGenius (Day1 + Day2)								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit U0722-018 (LP1) - Day 1 - 2								
Negativi	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 il target e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.10 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius analizzando un pannello di campioni di plasma, inclusi un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per EV (Zeptometrix, US).

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-strumento.

Tabella 31

Riproducibilità inter-strumento con ELITe InGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
Negativi	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 con ELITe BeGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
Negativi	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%			

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

Tabella 33

Riproducibilità inter-lotto con ELITe InGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	Internal Control		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
Negativi	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 con ELITe BeGenius								
Campione	N	ENTEROVIRUS			diagnostica totale	IC		
		Ct media	SD	%CV		Ct media	SD	%CV
Negativi	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 correttamente tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

11.11 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione con ELITe InGenius analizzando campioni clinici di plasma in EDTA e di CSF certificati come negativi per il target. Poiché ELITe BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITe InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 35

Negativo per RNA dell'EV	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Plasma raccolto in provette con EDTA	50	0	50	100%
CSF	50	0	50	100%

La specificità diagnostica del prodotto ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit in associazione a campioni di plasma in EDTA e di CSF in questo test è stata pari al 100%.

Il valore di cut-off dell'IC Ct è fissato a 35 per entrambe le matrici.

11.12 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del test, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con ELITE InGenius analizzando campioni clinici di plasma in EDTA e di CSF inoculati con diversi materiali di riferimento. Poiché ELITE BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITE InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è applicabile anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 36

Positivizzato per RNA dell'EV	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Plasma raccolto in provette con EDTA	64	64	0	100%
CSF	64	64	0	100%

La sensibilità diagnostica del prodotto ENTEROVIRUS ELITE MGB Kit in associazione a campioni di plasma in EDTA e di CSF in questo test è stata pari al 100%.

NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico ENTEROVIRUS ELITE MGB® Kit, FTP 076PLD.

12 BIBLIOGRAFIA

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

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

C. N. Kotton et al. (2024) Transplantation **00**: 00 - 00.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: Plasma raccolto in EDTA e CSF.

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

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

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 cross-contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è progettato per limitare le cross-contaminazioni. Comunque, questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

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

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

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

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

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela di reazione completa e dell'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falso-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 del target non è stato rilevato nell'RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (vedere "Caratteristiche delle prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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

Possibili polimorfismi, inserimenti 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 in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e gli esiti degli esami di laboratorio pertinenti.

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

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 37

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa, di Q-PCR Standard e del Positive Control. Controllare i volumi della miscela di reazione completa, dei Q-PCR standard e del Positive Control.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.

Tabella 37 (segue)

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare il prodotto RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nell'unità refrigerata). Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Utilizzare nuove aliquote dei Q-PCR Standard o del Positive Control.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 38

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del Negative Control. Controllare i volumi della miscela di reazione completa e del Negative Control.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei Rack, dell'Inventory Block o della Cooler Unit.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 39

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa, dell'Internal Control e del campione. Controllare i volumi della miscela di reazione completa, dell'Internal Control e del campione.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.

Tabella 39 (segue)

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerante dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare il prodotto RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota del Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti nel campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only". Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 40

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma T _m differente rispetto a quello di altri campioni e degli standard o del Positive Control.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere la reazione di amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 41

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

Tabella 42

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

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



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



Identificazione unica del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S.p.A., produttore del presente dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

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

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

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

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

Il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea. MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, the ELITe MGB® logo, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup nell'Unione Europea.

Appendix A ENTEROVIRUS ELITe MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie ®



ATTENZIONE

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

USO PREVISTO

Il prodotto **ENTEROVIRUS ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di trascrizione inversa e 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 con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, che sono sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la trascrizione inversa, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni di plasma umano raccolto in EDTA e liquido cerebrospinale.

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

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



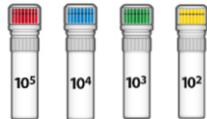

Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Regione 5' UTR di EV	FAM	DV3
Internal Control	Gene della proteina A del fago MS2	AP525	IC

Matrici validate

- Plasma raccolto in provette con EDTA
- Liquido cerebrospinale (CSF)

Contenuto del Kit e prodotti correlati

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 provette da 600 µL 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelo	RT Enzyme Mix 2 provette da 20 µL 96 reazioni per kit 10 cicli di congelamento/ scongelo	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set di 4 provette da 160 µL 4 cicli di congelamento/ scongelo	Positive Control pronto per l'uso 2 provette da 160 µL 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/ scongelo
Validità massima: 18 mesi Temperatura di conservazione: -20 °C		Validità massima: 24 mesi Temperatura di conservazione: -20 °C	Validità massima: 24 mesi Temperatura di conservazione: -20 °C

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

<ul style="list-style-type: none"> Strumento ELITe InGenius: INT030. Strumento ELITe BeGenius: INT040. ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. ELITe InGenius SP1000: INT033SP1000 	<ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTCPE <p>ELITe InGenius ed ELITe BeGenius Consumable Set (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius).</p>
--	---

Protocollo ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Tabella 43

› Volume di estrazione in ingresso › Volume di CPE › Volume di estrazione dell'eluizione › Volume del campione di PCR in ingresso	200 µL 10 µL 100 µL 10 µL	› Volume della PCR Mix › Frequenza dei controlli › Frequenza di calibrazione › Unità di risultati quantitativi	20 µL 15 giorni 60 giorni Copie/mL
--	------------------------------------	---	---

Prestazioni di ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matrice	Limite di rilevabilità	Sensibilità	Specificità
Plasma raccolto in provette con EDTA	141 copie/mL	100% <i>64 campioni analizzati</i>	100% <i>50 campioni analizzati</i>
CSF	490 copie/mL	100% <i>64 campioni analizzati</i>	100% <i>50 campioni analizzati</i>

Preparazione dei campioni

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

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

NR: non raccomandato.

Procedure di ELITe InGenius

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

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITe InGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "CLOSED" .	2. Verificare i calibratori: Q-PCR Standard nel menu "Calibration". Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongellare la PCR Mix (proteggere dalla luce) e i tubi CTRCPE . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec. Tenere la RT EnzymeMix in ghiaccio o nel blocco freddo.
4. Preparare la miscela di reazione completa.		
Numero di campioni (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Mescolare delicatamente con il vortex.
Centrifugare per 5 secondi.
Conservare la miscela di reazione completa in ghiaccio. Non esporre alla luce diretta.
Procedura 1 - Sessione completa: Extract + PCR (ad es. campioni)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen.	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL".	3. Scansionare i codici a barre con l'apposito lettore manuale, o digitare l'ID del campione
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: EV ELITe_PL_200_100 ed EV ELITe_CSF_200_100	5. Selezionare il metodo "Extract + PCR" e la posizione del campione "Extraction Tube".	6. Caricare la miscela di reazione completa nell'Inventory Block.
7. Caricare: rack per cassette PCR, cartucce per estrazione, Elution Tube, cassette per puntali, Extraction Tube.	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA

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

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

Da 1 a 4. Seguire la Procedura 1 descritta sopra (selezionare gli Assay Protocol: EV ELITe_PC ed EV ELITe_NC oppure EV ELITe_STD)	5. Selezionare il metodo "PCR Only" e impostare la posizione del campione "Elution Tube".	6. Caricare la miscela di reazione completa nell'Inventory Block.
7. Caricare: Il Rack delle PCR Cassette e il Rack delle "Elution tube" con i campioni di DNA estratti da analizzare	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

Procedure di ELITe BeGenius

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

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITe BeGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "CLOSED" .	2. Verificare i calibratori: Q-PCR Standard nel menu "Calibration". Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". Nota: tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongela la PCR Mix (proteggere dalla luce) e i tubi CTRCPE . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec. Tenere la RT EnzymeMix in ghiaccio o nel blocco freddo.
4. Preparare la miscela di reazione completa:		
Numero di campioni (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0,3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL
5. Mescolare delicatamente con il vortex. Centrifugare per 5 secondi. Conservare la miscela di reazione completa in ghiaccio. Non esporre alla luce diretta.		

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	2. Inserire il "Sample Rack" contenente i campioni con il codice a barre nella "Cooler Unit". La scansione del codice a barre è già attiva	3. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluizione: "100 µL"
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: (EV ELITe_Be_PL_200_100 oppure EV ELITe_Be_CSF_200_100) Nota: se si esegue una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 2 a 4	5. Stampare le etichette per identificare con il codice a barre gli Elution Tube vuoti. Caricare i tubi nell'Elution Rack e inserirli nella Cooler Unit.	6. Caricare la miscela di reazione completa e l'Internal Control nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" e l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	9. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA

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

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

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



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