

Istruzioni per l'uso

Meningitis Bacterial ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS300ING

UDI 08033891486471



CRONOLOGIA REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aa)
04	Aggiornamento della confezione del prodotto PCR Mix tube (paragrafo "Materiali forniti con il prodotto") Aggiornamento del paragrafo "Altri prodotti richiesti"	08/09/25
03	Estensione dell'utilizzo del prodotto in combinazione con lo strumento ELITe BeGenius (cod. INT040) Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).	20/01/25
02	Aggiornamento della sezione "Limiti della procedura" Descrizione del valore di cut off dell'Internal Control (IC) già adottato nell'Assay Protocol del prodotto	11/05/23
00 — 01	Sviluppo di nuovi prodotti e modifiche correlate	-

NOTA

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

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	4
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	5
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	6
8 CAMPIONI E CONTROLLI	7
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	9
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	15
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	19
12 BIBLIOGRAFIA	27
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	27
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	28
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	30
16 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	31
Appendix A QUICK START GUIDE.....	32

1 USO PREVISTO

Il prodotto **Meningitis Bacterial ELITE MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR qualitativa multiplex degli acidi nucleici per la rilevazione e l'identificazione del DNA genomico di ***Neisseria meningitidis***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Haemophilus influenzae*** ed ***Haemophilus influenzae*** di tipo B in campioni clinici.

Il saggio è validato in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di liquido cerebrospinale (CSF) e sangue intero (WB) raccolto in EDTA.

Il prodotto è inteso come ausilio nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale e delle infezioni sistemiche da ***Neisseria meningitidis***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Haemophilus influenzae*** ed ***Haemophilus influenzae*** di tipo B.

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 consiste in una Real-Time PCR qualitativa che rileva ***Neisseria meningitidis***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Haemophilus influenzae*** ed ***Haemophilus influenzae*** di tipo B, isolati da campioni e amplificati utilizzando il reagente **HHV8 Q - PCR Mix**, che contiene primer e sonde con tecnologia ELITE MGB.

Le sonde ELITE MGB si attivano quando si ibridano con i relativi prodotti della PCR. **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** monitorano l'aumento della fluorescenza e calcolano i cicli di soglia (Ct) e le temperature di fusione (Tm).

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. Si noti che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di fusione.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit** fornisce il reagente **MB PCR Mix**, ossia una miscela PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene i primer e le sonde specifici per:

- il gene **ctrA** di *N. meningitidis* incapsulato, rilevato nel canale **Nmen**; la sonda è stabilizzata con MGB, inattivata con Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante AquaPhluor 593 (AP593),
- il gene **lytA** di *S. pneumoniae* incapsulato, rilevato nel canale **Spne**; la sonda è stabilizzata con MGB, inattivata con Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante FAM,
- il gene **fucK** di *H. influenzae*, rilevato nel canale **Hinf**; la sonda è stabilizzata con MGB, inattivata con Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante AquaPhluor 639 (AP639),
- il gene **bcsB** di *H. influenzae* di tipo B incapsulato, rilevato nel canale **HinfB**; la sonda è stabilizzata con MGB, inattivata con Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante AquaPhluor 525 (AP525),
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno (IC) esogeno, rilevata nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata con MGB, inattivata con Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante AquaPhluor 680 (AP680).

Il reagente **MB PCR Mix** contiene buffer, magnesio cloruro, trifosfati nucleotidi e DNA polimerasi ad attivazione termica ("hot-start").

Il prodotto **Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per effettuare **96 test** su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius (12 test per ciascun tubo)**, utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **Meningitis Bacterial 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
MB PCR Mix Cod. RTS300ING	Miscela di reagenti per Real-Time PCR in tubo con tappo NEUTRO	8 x 280 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 DNA del campione, il controllo interno di estrazione e inibizione, i controlli positivi e negativi di amplificazione e i materiali di consumo **non sono** inclusi in questo prodotto.

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

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030). ELITE InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva). MB ELITE_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Positive Control. MB ELITE_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Negative Control. MB ELITE_WB_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero. MB ELITE_CSF_200_100 Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di liquido cerebrospinale.	Meningitis Bacterial - ELITE Positive Control (EG SpA, cod. CTR300ING). CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTCPE). ELITE InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200). ELITE InGenius ed ELITE BeGenius Consumable Set (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITE InGenius ed ELITE BeGenius).
ELITE BeGenius (EG SpA, cod. INT040). ELITE BeGenius Software versione 2.3.0 (o successiva). MB ELITE_Be_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Positive Control. MB ELITE_Be_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Negative Control. MB ELITE_Be_WB_200_100 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero. MB ELITE_Be_CSF_200_100 , Assay Protocol con i 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/scongela-mento	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
MB PCR Mix	-20°C o inferiore (protetta dalla luce)	Un mese	Fino a sette	Fino a sette sessioni* indipendenti di tre ore ciascuna o fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di 3 ore ciascuna e il tempo necessario per avviare una terza sessione)

*con congelamento intermedio.

8 CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni e protocolli di analisi

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici 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
liquido cerebrospinale	Evitare la contaminazione con il sangue del paziente	≤3 giorni	≤3 giorni	≤1 mese	Lungo periodo
Sangue intero	EDTA	≤3 giorni	≤3 giorni	≤1 mese	Lungo periodo

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 IVD sono stati validati per l'uso specifico dei prodotti ELITE MGB Kit e gli strumenti **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 5 Assay Protocols per il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Referto	Caratteristiche
CSF	ELITE InGenius	MB ELITE_CSF_200_100	Positivo/ negativo	Volume estrazione in ingresso: Volume eluato estratto 200 µL: 100 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MB ELITE_Be_CSF_200_100		
Sangue intero	ELITE InGenius	MB ELITE_WB_200_100	Positivo/ negativo	Volume estrazione in ingresso: Volume eluato estratto 200 µL: 100 µL Controllo interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	MB ELITE_Be_WB_200_100		

NOTA

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

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

Se richiesto, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un **Extraction Tube** per ELITE InGenius; 200 µL di campione devono essere trasferiti in un **Sarstedt Tube da 2 mL** per ELITE BeGenius.

NOTA

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

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

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a “Sostanze potenzialmente interferenti” nella sezione **11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI** pagina 19.

Controlli di PCR

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

- Come controllo positivo, usare il prodotto Meningitis Bacterial – ELITE Positive Control (non fornito in dotazione in questo kit) con gli Assay Protocol MB ELITE_PC o MB ELITE_Be_PC.
- Per il controllo negativo, usare acqua per biologia molecolare (non fornita in dotazione in questo kit) con gli Assay Protocol MB ELITE_NC oppure MB ELITE_Be_NC.

NOTA

Gli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** consentono di generare e memorizzare la convalida dei controlli della PCR per ogni lotto di reagente per PCR. I risultati dei controlli per PCR scadono dopo **15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare il Positive Control e il Negative Control. I controlli per PCR devono essere rianalizzati ogni volta che si verifica uno degli eventi seguenti:

- viene utilizzato 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.

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 **Meningitis Bacterial 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 del Positive Control e del Negative Control (PCR only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati del campione
		3) 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 "Controls" della home page, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di **PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- scegliere il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia utente grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e 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 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **Meningitis Bacterial ELiTe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELiTe InGenius** per eseguire:

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

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare i tubi di **PCR Mix** necessari a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni tubo contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

Per impostare uno dei tre tipi di sessione, procedere come indicato di seguito, facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI.

Tabella 7

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction Tube precedentemente etichettato.	Scongelare gli Elution Tube contenenti gli acidi nucleici estratti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare i tubi del Positive Control 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 4 reazioni.
2	Scongelare 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.	Non applicabile	Preparare il Negative Control trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution Tube", fornito in dotazione con i materiali di consumo di ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".

Tabella 7 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
4	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.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
5	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
6	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provinci e controlli")	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provinci e controlli")	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provinci e controlli"). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
7	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" sia selezionato "PCR Only".
8	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Extraction Tube" o "Primary Tube" come posizione da cui caricare il campione.	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)".
9	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
10	Caricare la CPE e la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della CPE e della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni per ciascun tubo.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni per ciascun tubo.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni per ciascun tubo.
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
12	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.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	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 gli Elution Tubes con i campioni estratti.	Caricare la PCR Cassette e i tubi di Positive Control e Negative Control.
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
17	Premere "Start".	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

9.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

Lo strumento **ELiTe InGenius** utilizza il prodotto **Meningitis Bacterial ELiTe MGB Kit** per generare risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Positive Control e del Negative Control,
2. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
3. Refertazione dei risultati del campione

9.3.1 Validazione dell'amplificazione dei risultati del Positive Control e del Negative Control

Il programma **ELiTe InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target della reazioni del Positive Control e del Negative Control con i parametri degli Assay Protocol **ELiTe_PC** ed **ELiTe_NC**. I valori di Ct risultanti vengono utilizzati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del Positive Control e del Negative Control specifici del lotto di reagenti della PCR, vengono registrati nel database (Controls) e possono essere visualizzati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

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

I risultati dell'amplificazione del Positive Control e del Negative Control vengono utilizzati dal **software ELiTe InGenius** per impostare i "Control Charts" (grafici di controllo) monitorando le prestazioni della fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

S il risultato del Positive Control o del Negative Control 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 sessioni del Positive Control o del Negative Control.

NOTA

Se il risultato del Positive Control or Negative Control 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 controllo o i controlli che hanno fallito e i campioni devono essere ripetuti.

9.3.2 Validazione dei risultati dei campioni

Il programma **ELiTe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per i target (canali **Nmen**, **Spne**, **Hinf** e **HinfB**) e per il controllo interno (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocol **MB ELiTe_CSF_200_100** e **MB ELiTe_WB_200_100**.

I risultati vengono visualizzati sulla schermata "Results Display".

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

Tabella 8

1) Controllo positivo	Stato
MB Positive Control	APPROVATO
2) Controllo negativo	Stato
MB Negative Control	APPROVATO

I risultati dei campioni vengono interpretati automaticamente dal programma **ELiTe InGenius software** utilizzando i parametri degli Assay Protocol. I possibili messaggi relativi ai risultati sono elencati nella tabella sottostante.

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

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
Nmen: DNA detected. (Nmen:DNA Rilevato)	<i>N. meningitidis</i> DNA was detected in the sample. (Il DNA di <i>N. meningitidis</i> è stato rilevato nel campione)
Spne: DNA detected. (Spne:DNA Rilevato)	<i>S. pneumoniae</i> DNA was detected in the sample. (Il DNA di <i>S. pneumoniae</i> è stato rilevato nel campione)
Hinf: DNA detected. (Hinf:DNA Rilevato)	<i>H. influenzae</i> DNA was detected in the sample. (Il DNA di <i>H. influenzae</i> è stato rilevato nel campione)
HinfB: DNA detected. (HinfB:DNA Rilevato)	<i>H. influenzae</i> type B DNA was detected in the sample. (Il DNA di <i>H. influenzae</i> di tipo B è stato rilevato nel campione) N.B.: quando si rileva la presenza del DNA di <i>H. influenzae</i> di tipo B , si potrebbe rilevare anche la presenza del DNA di <i>H. influenzae</i> generico.
Nmen: DNA not detected or below LoD. (Nmen: DNA non Rilevato o minore di LoD)	<i>N. meningitidis</i> DNA was not detected in the sample. (Il DNA di <i>N. meningitidis</i> non è stato rilevato nel campione) Il campione è negativo per il DNA di <i>N. meningitidis</i> oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.

Tabella 9 (segue)

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
Spne: DNA not detected or below LoD. (Spne:DNA non Rilevato o minore di LoD)	S. pneumoniae DNA was not detected in the sample. (Il DNA di S. pneumoniae non è stato rilevato nel campione) Il campione è negativo per il DNA di S. pneumoniae oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
Hinf: DNA not detected or below LoD. (Hinf:DNA non Rilevato o minore di LoD)	H. influenzae DNA was not detected in the sample. (Il DNA di H. influenzae non è stato rilevato nel campione) Il campione è negativo per il DNA di H. influenzae oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
HinfB: DNA not detected or below LoD. (HinfB:DNA non Rilevato o minore di LoD)	H. influenzae DNA type B was not detected in the sample. (Il DNA di H. influenzae di tipo B non è stato rilevato nel campione) Il campione è negativo per il DNA di H. influenzae di tipo B oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample. (Invalido – Ripetere il campione)	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (dovuto per esempio a errata estrazione o effetto carryover sugli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che hanno riportato il risultato “Non valido - Ripetere il campione”: in questo caso, il DNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace, probabilmente per problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione o PCR (ad es. campionamento sbagliato, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Se rimane un volume sufficiente di eluato, è possibile ripetere l'analisi dell'eluato (tal quale o diluito) eseguendo un ciclo di amplificazione in modalità “PCR Only”. Se anche il secondo risultato non è valido, è necessario ripetere l'analisi del campione partendo dall'estrazione di un nuovo campione utilizzando la modalità “Extract + PCR” (vedere [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 28](#))

Se in un campione si rileva il DNA di *Haemophilus influenzae* di tipo B, talvolta potrebbe non essere possibile rilevare la presenza di DNA di *Haemophilus influenzae* generico per via della differente sensibilità delle due reazioni. Tuttavia, il campione è positivo per la presenza di DNA di *Haemophilus influenzae* di tipo B.

I campioni segnalati come “Xxx:DNA not detected or below the LoD” (Xxx:DNA non Rilevato o minore di LoD) sono idonei all'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA dei target. In questo caso, il campione può essere negativo per il DNA target oppure il DNA target è presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

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”.

9.3.3 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 ogni Track selezionato.
- Sia il “Sample Report” che il “Track Report” possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

10 PROCEDURA ELITE BeGenius

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

Tabella 10

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 del Positive Control e del Negative Control (PCR only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		2) Validazione dei risultati del campione
		3) 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 "Controls" della home page, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di **PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- scegliere il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia utente grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere "Campioni e controlli").

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

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

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

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
- Sessione del Positive Control e del Negative Control (PCR Only).

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

NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare i tubi di **PCR Mix** necessari a temperatura ambiente per 30 minuti. Ciascun tubo contiene un volume sufficiente per 12 test in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.

NOTA

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

Per impostare uno dei tre tipi di sessione, procedere come indicato di seguito, facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI:

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Sarstedt tube da 2 mL precedentemente etichettato.	Se necessario, scongelare gli Elution tube contenenti gli acidi nucleici estratti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare i tubi del Positive Control 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 4 reazioni.
2	Scongelare 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.	Non applicabile	Preparare il Negative Control trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution Tube", fornito in dotazione con i materiali di consumo di ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .
4	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.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzionarli sul tavolo di preparazione.
5	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR" .	Selezionare il "run mode": "PCR Only" .	Selezionare il "run mode": "PCR Only" .
6	Caricare i campioni nel "Sample Rack". Quando si caricano tubi secondari "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack".	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".	Caricare i tubi del Positive Control e del Negative Control nell'"Elution Rack".
7	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, inserire il "Sample ID" (SID) per ciascuna "Posizione" 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). Se necessario, per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume eluato).	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).
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Non applicabile	Non applicabile
10	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").	Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (vedere "Campioni e controlli").
11	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
	Nota: Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
12	Caricare le "Elution tubes" nell'"Elution Rack" (gli Elution tubes possono essere etichettati con il codice a barre per una miglior tracciabilità).	Non applicabile	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	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
15	Caricare la CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ciascun reagente PCR Mix e/o CPE, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni reagente della 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" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni reagente della 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.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	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.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i Tip Racks se necessario.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il " PCR Rack " con "PCR Cassette" nell'"Inventory Area" (area di carico).	Caricare il " PCR Rack " con "PCR Cassette" nell'"Inventory Area" (area di carico).	Caricare il " PCR Rack " con "PCR Cassette" nell'"Inventory Area" (area di carico).
21	Fare clic su "Next" per proseguire.	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	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start".	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

NOTA

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

10.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

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

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

NOTA

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

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

1. Validazione dei risultati del Positive Control e del Negative Control,
2. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
3. Refertazione dei risultati del campione

NOTA

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

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) del prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit è stato definito in associazione con i campioni di CSF e di sangue intero raccolti in EDTA e con il sistema ELITE InGenius.

Il LoD è stato calcolato analizzando un pannello di campioni di CSF e di sangue intero raccolti in EDTA inoculati con materiale di riferimento contenente *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *H. influenzae* di tipo B a un titolo conosciuto (fornito da un laboratorio esterno). Il LoD è stato ottenuto mediante analisi di regressione Probit dei dati come concentrazione corrispondente al 95% di probabilità di un risultato positivo.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 12 Limite di rilevabilità (microrganismi/mL) per i campioni di CSF e il sistema ELITE InGenius

Patogeno	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<i>N. meningitidis</i>	34	21	172
<i>S. pneumoniae</i>	34	22	134
<i>H. influenzae</i>	95	53	426
<i>H. influenzae</i> di tipo B	66	41	197

Tabella 13 Limite di rilevabilità (microrganismi/mL) per i campioni di sangue intero e il sistema ELITE InGenius

Patogeno	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<i>N. meningitidis</i>	56	37	130
<i>S. pneumoniae</i>	189	119	473
<i>H. influenzae</i>	172	112	400
<i>H. influenzae</i> di tipo B	77	50	186

Il valore LoD calcolato in associazione a WB e CSF è stato verificato sugli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius analizzando un pool di campioni di matrice addizionati con materiale di riferimento di ciascun agente patogeno alla concentrazione dichiarata.

Efficienza di rilevazione (inclusività)

L'efficienza di rilevazione del saggio per il gene *ctrA* di *N. meningitidis* incapsulato, il gene *lytA* di *S. pneumoniae* incapsulato, il gene *fucK* di *H. influenzae*, il gene *bcsB* di *H. influenzae* di tipo B incapsulato (inclusività) è stata valutata mediante il confronto delle sequenze con il database dei nucleotidi.

L'analisi delle regioni selezionate per l'ibridazione dei primer e delle sonde fluorescenti nell'allineamento delle sequenze disponibili nel database relativamente ai patogeni d'interesse ha evidenziato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

È stata verificata anche la rilevazione di ceppi di *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *H. influenzae* di tipo B mediante analisi del DNA genomico certificato di campioni clinici (forniti da un laboratorio esterno).

I campioni di DNA genomico certificato sono stati diluiti a un valore di Ct pari a circa 30 e analizzati in associazione con il sistema ELITE InGenius.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 14 Inclusività

Microrganismi	Campione	Positivi	Negativi
<i>N. meningitidis</i>	12 isolati clinici	12	0
<i>S. pneumoniae</i>	12 isolati clinici	12	0
<i>H. influenzae</i>	10 isolati clinici	10	0
<i>H. influenzae</i> di tipo B	12 isolati clinici	12	0

Marcatori potenzialmente interferenti

La potenziale cross-reattività con altri microrganismi involontari del saggio è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database dei nucleotidi ENA dell'ENBL-EBI.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri organismi procarioti ed eucarioti. Le regioni di ibridizzazione hanno evidenziato l'assenza di omologie significative e non hanno indicato potenziali interferenze.

La mancata crossreattività con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni di CSF e di sangue intero è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiali certificati (ATCC, Vircell, NIBSC e isolato clinico).

I campioni di DNA genomico di altri microrganismi sono stati analizzati in duplicato per ogni microrganismo potenzialmente crossreattivo in associazione con ELITE InGenius.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 15 Potenziale crossreattività

Microrganismo	Ceppo	Esito
<i>E. coli</i>	Isolato clinico	Nessuna crossreattività
<i>B. burgdorferi</i>	IRS	Nessuna crossreattività
<i>L. monocytogenes</i>	53 XXIII	Nessuna crossreattività
<i>S. agalactiae</i>	G19	Nessuna crossreattività
HSV1	McIntyre	Nessuna crossreattività
HSV2	G	Nessuna crossreattività
VZV	Ellen	Nessuna crossreattività
JCV	Standard internazionale	Nessuna crossreattività
BKV	Standard internazionale	Nessuna crossreattività
<i>T. gondii</i>	RH	Nessuna crossreattività
Enterovirus	Pesascek	Nessuna crossreattività

Tutti i microrganismi sono risultati negativi per i target quando analizzati mediante il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit.

La mancata interferenza da parte di altri microrganismi che si può riscontrare nei campioni di sangue intero e di CSF raccolti in campioni di EDTA è stata verificata anche mediante analisi di un pannello di materiali certificati (ATCC, Vircell, NIBSC e isolato clinico) inoculati con DNA certificato di *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* di tipo B fino a ottenere una concentrazione finale di circa 10 copie/reazione.

I campioni di DNA genomico di altri microrganismi inoculati con i target sono stati analizzati in duplicato per ogni microrganismo potenzialmente interferente in associazione con ELITE InGenius.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 16 Potenziale interferenza

Microrganismo	Ceppo	Esito
<i>E. coli</i>	Isolato clinico	Nessuna interferenza
<i>B. burgdorferi</i>	IRS	Nessuna interferenza
<i>L. monocytogenes</i>	53 XXIII	Nessuna interferenza
<i>S. agalactiae</i>	G19	Nessuna interferenza
HSV1	McIntyre	Nessuna interferenza
HSV2	G	Nessuna interferenza
VZV	Ellen	Nessuna interferenza
JCV	Standard internazionale	Nessuna interferenza
BKV	Standard internazionale	Nessuna interferenza
<i>T. gondii</i>	RH	Nessuna interferenza
Enterovirus	Pesascsek	Nessuna interferenza

Nessuno degli organismi ha interferito con l'amplificazione dei target quando analizzato con il saggio Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit.

Potenziale interferenza tra i target

La potenziale interferenza tra i target del saggio è stata valutata mediante un test di co-amplificazione di DNA plasmidico contenente le sequenze target di *N. meningitidis* in capsulato (gene *ctrA*), *S. pneumoniae* incapsulato (gene *lytA*), *H. influenzae* (gene *fucK*) e *H. influenzae* di tipo B incapsulato (gene *bcsB*).

Il pannello comprendeva campioni con DNA plasmidici per *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *H. influenzae* di tipo B ad alta concentrazione (10^5 copie/reazione) e altri patogeni d'interesse a bassi livelli di concentrazione (per esempio 10^3 , 10^2 , 10 copie/reazione).

Ciascuna condizione è stata analizzata in duplicato in associazione con ELITE InGenius.

La tabella sottostante riporta la concentrazione più bassa rilevabile in duplicato nella reazione di co-amplificazione (copie/reazione, c./rxn).

Tabella 17 Interferenza tra target

Target in test	Target interferente a $\sim 10^5$ copie/reazione			
	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i> tipo B
<i>N. meningitidis</i> rilevabile a	-	10 c./rxn	10 c./rxn	10^2 c./rxn
<i>S. pneumoniae</i> rilevabile a	10 c./rxn	-	10 c./rxn	10^2 c./rxn
<i>H. influenzae</i> rilevabile a	10^2 c./rxn	2×10^3 c./rxn	-	n.a.*
<i>H. influenzae</i> di tipo B rilevabile a	10 c./rxn	10 c./rxn	10^2 c./rxn	-

* non applicabile in quanto l'*H. influenzae* type B produce risultati positivi per l'*H. influenzae* generica.

Sostanze interferenti

Il saggio è stato utilizzato per analizzare un pannello di sostanze potenzialmente interferenti alle concentrazioni pertinenti con il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit. Le sostanze testate erano EDTA, rifampicina e ampicillina.

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni di CSF (**rifampicina e ampicillina**) e di sangue intero (EDTA) inoculati con ognuno dei materiali di riferimento contenenti *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *H. influenzae* di tipo B (forniti da un laboratorio esterno) alla concentrazione di 3 volte il LoD. I campioni sono stati analizzati in tre replicati su ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 18 Sostanze interferenti: % CV (riferimento + test)

Sostanza	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i> di tipo B	IC
Ampicillina	0,86	1,27	1,83	2,46	0,77
Rifampicina	1,14	1,28	1,36	2,75	0,81
EDTA	0,83	0,71	2,02	1,33	1,11

Tutti i campioni sono risultati positivi per il target d'interesse. Il Coefficiente di Variabilità (%CV) dei valori di *Ct* è risultato inferiore al 5%. Nessuna delle sostanze testate alle concentrazioni oggetto di studio ha mostrato di interferire con la rilevazione del target utilizzando il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit.

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio ottenuta è stata valutata sugli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolti in EDTA, inclusi un campione negativo e campioni positivi addizionati con i materiali di riferimento di ciascun target alla concentrazione di circa 3,5 volte il LoD.

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

Tabella 19 Ripetibilità intra-sessione con campioni di sangue intero su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	6	34,07	0,25	0,74	100%
<i>S. pneumoniae</i>	6	32,08	0,14	0,45	
<i>H. influenzae</i>	6	31,98	0,29	0,92	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	6	30,58	0,27	0,88	
Controllo interno	18	27,03	0,19	0,70	100%

Tabella 20 Ripetibilità intra-sessione con campioni di sangue intero su ELITE BeGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	6	34,28	0,29	0,83	100%
<i>S. pneumoniae</i>	6	31,83	0,17	0,53	
<i>H. influenzae</i>	6	32,41	0,12	0,37	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	6	31,30	0,25	0,80	
Controllo interno	18	28,88	0,69	2,40	100%

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

Tabella 21 Ripetibilità inter-sessione con campioni di sangue intero su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	12	34,03	0,19	0,56	100%
<i>S. pneumoniae</i>	12	32,13	0,14	0,43	
<i>H. influenzae</i>	12	31,87	0,25	0,78	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	12	30,56	0,22	0,73	
Controllo interno	36	27,13	0,23	0,86	100%

Tabella 22 Ripetibilità inter-sessione con campioni di sangue intero su ELITE BeGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	12	34,07	0,45	1,32	100%
<i>S. pneumoniae</i>	12	31,70	0,54	1,69	
<i>H. influenzae</i>	12	32,51	0,27	0,82	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	12	31,33	0,29	0,94	
Controllo interno	36	28,78	0,63	2,20	100%

Nel test di ripetibilità, il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit ha mostrato, per ciascun target, una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

Riproducibilità

La riproducibilità inter-lotto e inter-strumento dei risultati ottenuti con il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit in associazione con lo strumento ELITE InGenius è stata testata analizzando un pannello di campioni di liquido cerebrospinale e un pannello di campioni di sangue intero raccolti in EDTA. Ciascun pannello è stato arricchito con i materiali di riferimento di ciascun target a una concentrazione pari a circa 3 volte il LoD.

Le tabelle sottostanti riportano un esempio della riproducibilità inter-lotto (su tre lotti).

Tabella 23 Riproducibilità inter-lotto con campioni di CSF su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	18	37,18	0,52	1,41	100%
<i>S. pneumoniae</i>	18	36,41	0,72	1,98	
<i>H. influenzae</i>	18	38,23	0,64	1,68	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	18	35,59	0,48	1,36	
Controllo interno	71/72	27,93	0,95	3,40	98,6%

Tabella 24 Riproducibilità inter-lotto con campioni di sangue intero su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	18	36,81	0,39	1,05	100%
<i>S. pneumoniae</i>	18	34,40	0,30	0,88	
<i>H. influenzae</i>	18	38,38	0,56	1,45	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	18	35,72	0,61	1,72	
Controllo interno	71/72	28,96	0,55	1,91	98,6%

Le tabelle sottostanti riportano un esempio della riproducibilità inter-strumento (su tre strumenti).

Tabella 25 Riproducibilità inter-strumentale con campioni di CSF su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	18	37,24	0,53	1,41	100%
<i>S. pneumoniae</i>	18	36,78	0,95	2,59	
<i>H. influenzae</i>	18	38,32	0,57	1,49	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	18	35,70	0,55	1,53	
Controllo interno	72/72	28,55	1,11	3,90	100%

Tabella 26 Riproducibilità inter-strumento con campioni di sangue intero su ELITE InGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	18	36,95	0,58	1,57	100%
<i>S. pneumoniae</i>	18	34,44	0,45	1,29	
<i>H. influenzae</i>	18	38,55	0,61	1,59	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	18	35,48	0,54	1,51	
Controllo interno	72/72	29,36	1,04	3,54	100%

La riproducibilità inter-lotto e inter-strumento in associazione con ELITE BeGenius è stata valutata analizzando solo un pannello di sangue intero raccolto in EDTA, comprendente un campione negativo e campioni positivi addizionati con i materiali di riferimento di ciascun target a una concentrazione di circa 3-4 volte il LoD.

Le tabelle sottostanti riportano un esempio della riproducibilità inter-lotto (su due lotti).

Tabella 27 Riproducibilità inter-lotto con campioni di sangue intero su ELITE BeGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	12	34,07	0,36	1,07	100%
<i>S. pneumoniae</i>	12	31,75	0,30	0,94	
<i>H. influenzae</i>	12	32,53	0,21	0,63	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	12	31,27	0,23	0,73	
Controllo interno	36	28,59	0,62	2,15	100%

Le tabelle sottostanti riportano un esempio della riproducibilità inter-strumento (su due strumenti).

Tabella 28 Riproducibilità inter-strumento con campioni di sangue intero su ELITE BeGenius

Target	N	Media Ct	SD	%CV	% Concordanza
<i>N. meningitidis</i>	12	33,81	0,25	0,75	100%
<i>S. pneumoniae</i>	12	31,82	0,43	1,34	
<i>H. influenzae</i>	12	32,49	0,27	0,82	
<i>H. influenzae</i> di tipo B	12	31,37	0,28	0,89	
Controllo interno	36	28,15	0,39	1,39	100%

Nel test di riproducibilità, il prodotto Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit ha mostrato, per ciascun target, una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con ELITE InGenius analizzando campioni clinici di CSF e di sangue intero raccolti in EDTA. I campioni sono stati certificati positivi o arricchiti con materiali certificati di ciascun target.

Poiché ELITE BeGenius ha dimostrato prestazioni analitiche equivalenti a quelle di ELITE InGenius, si può ritenere che i risultati relativi alla sensibilità diagnostica ottenuti con ELITE InGenius siano applicabili anche a ELITE BeGenius.

I risultati sono riepilogati nelle tabelle seguenti.

Tabella 29 Sensibilità diagnostica con campioni di CSF

Campioni positivi/inoculati con CSF	N	Positivi	Negativi	Non valido	Sensibilità diagnostica in %
<i>N. meningitidis</i>	50	50	0	0	100%
<i>S. pneumoniae</i>	50	50	0	0	100%
<i>H. influenzae</i>	50	50	0	0	100%
<i>H. influenzae</i> di tipo B	20	20	0	0	100%

Tabella 30 Sensibilità diagnostica con campioni di sangue intero

Campioni positivi/inoculati con sangue intero	N	Positivi	Negativi	Non valido	Sensibilità diagnostica in %
<i>N. meningitidis</i>	50	50	0	0	100%
<i>S. pneumoniae</i>	57	57	0	0	100%
<i>H. influenzae</i>	50	48	2	0	96,0%
<i>H. influenzae</i> di tipo B	20	20	0	0	100%

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata in associazione con ELITE InGenius analizzando campioni clinici di CSF e di sangue intero raccolti in EDTA certificati come negativi per ciascun 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 nelle tabelle seguenti.

Tabella 31 Specificità diagnostica con campioni di CSF

Campioni di CSF negativi	N	Positivi	Negativi	Non valido	Specificità diagnostica in %
<i>N. meningitidis</i>	150	0	150	0	100%
<i>S. pneumoniae</i>	150	1	149	0	99,3%
<i>H. influenzae</i>	148	0	148	0	100%
<i>H. influenzae</i> di tipo B	150	0	150	0	100%

Tabella 32 Specificità con campioni di sangue intero

Campioni di sangue intero negativi	N	Positivi	Negativi	Non valido	Specificità diagnostica in %
<i>N. meningitidis</i>	153	0	153	0	100%
<i>S. pneumoniae</i>	149	4	145	0	97,3%
<i>H. influenzae</i>	151	3	148	0	98,0%
<i>H. influenzae</i> di tipo B	153	0	153	0	100%

Il valore di cut-off dell'Internal Control Ct (IC Ct) è impostato a 34 per CSF e sangue intero, in associazione con gli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius.

Solidità: risultati non validi ottenuti sui campioni clinici

La solidità del saggio, come valutazione dei risultati non validi ottenuti sui campioni alla prima analisi, è stata verificata analizzando i risultati ottenuti da campioni clinici di matrici differenti.

La percentuale di campioni non validi è stata verificata utilizzando i risultati delle prove di sensibilità e specificità diagnostica. I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 33

Campione	N	Risultato non valido	%
Campioni di CSF	321	0	0%
Campioni di sangue intero	326	11	3,4%

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 di Prodotto relativo a Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit, FTP RTS300ING.

12 BIBLIOGRAFIA

- F. Takenori Higa et al. (2013) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108: 246-247
- D. Llull et al. (2006) Journal Of Clinical Microbiology 44: 1250-1256
- D. Wroblewski et al. (2013) Molecular and Cellular Probes 27: 86-89
- K. L. Meyler et al. (2012) Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74: 356-362
- E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto esclusivamente con i seguenti campioni clinici: liquido cerebrospinale (CSF) e sangue intero raccolti in EDTA.

Non utilizzare questo prodotto con campioni contenenti eparina, perché l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

Attualmente non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: tampone nasofaringeo, aspirato nasofaringeo, espettorato, lavaggio bronco-alveolare (BAL), broncoaspirato (BA).

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.

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione; tuttavia, non si può escludere che il DNA target abbia un titolo inferiore al limite di rilevabilità del prodotto (vedere Caratteristiche prestazionali). In tal caso, il risultato potrebbe essere un falso negativo.

In caso di coinfezioni, la sensibilità a un target può essere influenzata dall'amplificazione di un secondo target (vedere [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

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.

Eventuali polimorfismi, inserzioni o delezioni all'interno della regione del DNA bersaglio coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target.

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

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi o errati. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente.

Tuttavia, tale rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato ponderato a fronte dei potenziali benefici per il paziente ed è stato ritenuto accettabile.

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 34

Reazione del Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Positive Control. Controllare i volumi della PCR Mix e del Positive Control.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore nel blocco freddo dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare la miscela PCR Mix per più di 3 sessioni indipendenti (7 ore ciascuna nel blocco freddo dell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non lasciare la miscela PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Degradazione della Positive Control.	Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Utilizzare una nuova aliquota di Positive Control.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 35

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

Tabella 36

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

Tabella 37

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

Tabella 38

Errore nel calcolo di Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con segnale di fluorescenza anomalo.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa, selezionare il Track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione, selezionare il Track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo come non valido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (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 39

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.	Pulire la micropipetta con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o con un detergente per DNA/RNA dopo aver pipettato ogni campione. Non utilizzare le pipette Pasteur. Utilizzare pipette del tipo a spostamento positivo oppure munirle di puntali con filtro per aerosol. Introdurre i campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato nella GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale del laboratorio.	Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o detergente per DNA/RNA. Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V. Utilizzare un nuovo tubo di PCR Mix e/o CPE.

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.



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



Identificazione unica del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso.



Contenuto.



Conservare al riparo dalla luce del sole.



Fabbricante.

16 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.

Appendix A Meningitis Bacterial ELiTe MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie ®



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione semplificata del manuale di istruzioni ufficiale. Prima dell'uso, consultare il documento completo all'indirizzo: www.elitechgroup.com

USO PREVISTO

Il prodotto **Meningitis Bacterial ELiTe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico in vitro destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR qualitativa multiplex degli acidi nucleici per la rilevazione e l'identificazione del DNA genomico di ***Neisseria meningitidis***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Haemophilus influenzae*** ed ***Haemophilus influenzae di tipo B*** in campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELiTe InGenius®** ed **ELiTe BeGenius®**, che sono sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di liquido cerebrospinale (CSF) e sangue intero (WB) raccolti in EDTA.

Il prodotto è inteso come ausilio nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale e delle infezioni sistemiche da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ed *Haemophilus influenzae* di tipo B.

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
<i>N. meningitidis</i>	ctrA	AP593	Nmen
<i>S. pneumoniae</i>	lytA	FAM	Spne
<i>H. influenzae</i>	fucK	AP639	Hinf
<i>H. influenzae</i> di tipo B	bcsB	AP525	HinfB
Controllo interno	IC2	AP680	IC

Matrice validata

- Sangue intero con EDTA
- CSF

Contenuto del Kit e prodotti correlati

Meningitis Bacterial ELITE MGB Kit Kit (RTS300ING)		Meningitis Bacterial - ELITE Positive Control (CTR300ING)	
 X 8		 X 3	
MB PCR Mix 8 tubi da 280 µL 12 reazioni per tubo 96 reazioni per kit 7 cicli di congelamento/scongelo per tubo		MB Positive Control 3 tubi da 160 µL 4 reazioni per tubo 12 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/scongelo	
Validità massima:	24 mesi	Validità massima:	24 mesi
Temperatura di conservazione	≤ -20°C	Temperatura di conservazione	≤ -20°C

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

› Strumento ELITE InGenius: INT030. › Strumento ELITE BeGenius: INT040. › ELITE InGenius SP 200: INT032SP200.	CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTRCPE) ELITE InGenius ed ELITE BeGenius Consumable Set (vedere le istruzioni per l'uso di ELITE InGenius ed ELITE BeGenius)
---	--

Protocollo di ELITE InGenius e ELITE BeGenius

› Volume del campione	200 µL	› Volume di eluato in PCR	20 µL
› Volume di CPE	10 µL	› Volume della PCR Mix	20 µL
› Volume eluizione totale	100 µL	› Frequenza dei controlli	15 giorni

Prestazioni di ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matrice	Target	Limite di rilevabilità	Sensibilità diagnostica	Specificità diagnostica
CSF	N. meningitidis	34	100% 50/50*	100% 150/150*
	S. pneumoniae	34	100% 50/50*	99,3% 149/150*
	H. influenzae	95	100% 50/50*	100% 148/148*
	H. influenzae di tipo B	66	100% 20/20*	100% 150/150*
WB	N. meningitidis	56	100% 50/50*	100% 153/153*
	S. pneumoniae	189	100% 57/57*	97,3% 145/149*
	H. influenzae	172	96% 48/50*	98% 148/151*
	H. influenzae di tipo B	77	100% 20/20*	100% 153/153*

*campioni confermati/campioni analizzati

Preparazione dei campioni

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

Tabella 40

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		16/26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
liquido cerebrospinale	Evitare la contaminazione con il sangue del paziente	≤3 giorni	≤3 giorni	≤1 mese	Lungo periodo
Sangue intero	EDTA	≤3 giorni	≤3 giorni	≤1 mese	Lungo periodo

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 solo PCR (PCR Only).

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITE InGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "CLOSED" .	2. Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". Nota: Entrambi devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongellare i tubi della PCR Mix . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.
--	--	--

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare il codice a barre con l'apposito lettore manuale, o digitare l'ID del campione
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: MB ELITE_CSF_200_100 oppure MB ELITE_WB_200_100	5. Selezionare il metodo "Extract + PCR" e la posizione del campione: Tubo di estrazione	6. Caricare la miscela PCR Mix nell'Inventory Block
7. Caricare la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITE InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	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, controlli)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", eluizione: "100 µL"	3. Scansionare il codice a barre con l'apposito lettore manuale, o digitare l'ID del campione
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: MB ELITE_PC o MB ELITE_NC o MB ELITE_CSF_200_100 oppure MB ELITE_WB_200_100	5. Selezionare il metodo "PCR Only" e impostare la posizione del campione "Elution Tube"	6. Caricare la miscela PCR Mix nell'Inventory Block
7. Caricare: rack 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

Procedure di ELITE BeGenius

L'interfaccia grafica utente (GUI) del programma 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 solo PCR (PCR Only).

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITE BeGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "CLOSED".	2. Verificare i controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". <u>Nota:</u> Entrambi devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongellare i tubi della PCR Mix . Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.
--	--	--

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

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	2. Inserire il "Sample Rack" contenente i campioni con il codice a barre nella "Cooler Unit". La scansione del codice a barre è già attiva	3. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluizione: "100 µL"
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: MB ELiTe_Be_CSF_200_100 oppure MB ELiTe_Be_WB_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 Tubes vuoti. Caricare i tubi nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	6. Caricare la PCR Mix nel Reagent/ 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 e i materiali di consumo richiesti per l'estrazione forniti in "ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set".	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, 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 i dati relativi a "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni). Per gli eluati: per ogni "Position" inserire i dati relativi a "Sample ID", "Sample matrix", "Extraction kit" ed "Extracted eluate vol." (volume eluato).
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: MB ELiTe_Be_PC o MB ELiTe_Be_NC o MB ELiTe_Be_CSF_200_100 oppure MB ELiTe_Be_WB_200_100	5. Caricare la PCR-Mix 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