

Istruzioni per l'uso

Coagulation ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTSD00ING

UDI 08033891486204

CE
0123

IVD

CRONOLOGIA REVISIONI

Rev.	Avviso di modifica	Data (gg/mm/aa)
09-R	Correzione di un errore di battitura nelle tabelle dei test di ripetibilità e riproducibilità e nel testo introduttivo ai test: la mutazione G1691A era stata erroneamente riportata come associata al FII invece che al FV, scambiandola con la mutazione G20210A.	09/03/26
08-R	Modifica del prodotto RTSD00ING per la rilevazione come singleplex per gli analiti FII, FV, MTHFR e duplex per FII-FV. Estensione fino a 60 giorni dell'uso dalla prima apertura. Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).	27/08/25
07-R	Aggiornamento per la conformità ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR). La composizione e le CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI del prodotto rimangono invariate.	20/08/24
05	Estensione dell'uso dello strumento ELITe BeGenius. Descrizione del valore di cut off CI già adottato nel protocollo di dosaggio del prodotto (sezione "Accordo diagnostico: conferma del genotipo del campione certificato")	30/03/23
04	Aggiornamento del valore CI Ct e dell'intervallo Tm del Fattore II e del Fattore V	24/05/22
03	Fornito condizioni di conservazione dei campioni più permissive, in linea con la letteratura disponibile e che non influiscono sulla sicurezza e sulle prestazioni del prodotto.	09/03/22
00-02	Sviluppo di nuovo prodotto e successive modifiche	—

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	8
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'UTILIZZATORE	31
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	31
Appendix A QUICK START GUIDE.....	32

1 USO PREVISTO

Il prodotto **Coagulation ELITE MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico in vitro destinato all'uso da parte di operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR qualitativo degli acidi nucleici per la discriminazione degli alleli dei seguenti tre loci:

- gene del Fattore V della coagulazione, polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) G1691A (Leiden),
- gene del Fattore II della coagulazione, SNP G20210A,
- gene 5,10-metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR), SNP C677T.

in singleplex, duplex (FII e FV) o triplex (FII, FV e MHTFR) in campioni di DNA genomico umano estratti da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione agli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati a partire da campioni di sangue intero umano raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella valutazione del rischio di trombosi venosa profonda in pazienti con sospetti disturbi della coagulazione e a rischio di trombosi venosa profonda.

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 Real-Time PCR qualitativa per la discriminazione degli alleli del gene del Fattore V della coagulazione, del polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) G1691A (Leiden), del gene del Fattore II della coagulazione, SNP G20210A e del gene della 5,10-metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR), SNP C677T, nel DNA isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente del saggio **52M PCR Mix**, 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). Al termine del ciclo di amplificazione, l'analisi della curva di fusione consente di identificare le temperature di fusione delle sonde e di rilevare la presenza di alleli wild type e/o mutati.

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 **Coagulation ELITE MGB Kit** fornisce il reagente del saggio **52M Q-PCR Mix**, una miscela per PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene primer e sonde specifici per:

- il gene del Fattore V della coagulazione, la regione SNP G1691A (Leiden), rilevata nel Canale FV; la sonda è stabilizzata da MGB®, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher® e marcata con il colorante AquaPhluor® 639 (AP639),
- il gene del Fattore II della coagulazione, la regione SNP G20210A, rilevata nel Canale FII; la sonda è stabilizzata da MGB, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher e marcata con il colorante FAM,
- il gene MTHFR, regione SNP C677T, rilevato nel Canale MTHFR; la sonda è stabilizzata da MGB, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher ed marcata con il colorante AquaPhluor® 593 (AP593),
- Internal Control (IC), basato sulla sequenza del gene dell'albumina umana, rilevato nel Canale IC; la sonda è stabilizzata da MGB, inattivata mediante Eclipse Dark Quencher e marcata con il colorante AquaPhluor 525 (AP525).

La miscela **52M PCR Mix** contiene inoltre buffer, magnesio cloruro, trifosfati nucleotidi e DNA polimerasi "hot-start".

Il **Coagulation ELITE MGB Kit** contiene reagenti sufficienti per **96 test** sugli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** (12 sessioni per ogni tubo), utilizzando 20 µL per reazione.

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
52M PCR Mix cod. RTSD00ING	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) 52M ELiTe_PC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control 52M ELiTe_NC , Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control 52M ELiTe_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FII_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FV_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_MTHFR_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FVFII_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero	Coagulation - ELiTe Positive Control (EG SpA, cod. CTRD00ING) ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, cod. INT032SP200) ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius Consumables (vedere ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius Istruzioni per l'uso)
ELiTe BeGenius (EG SpA, cod. INT040) ELiTe BeGenius Software versione 2.3.0 (o successiva) 52M ELiTe_Be_PC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Positive Control 52M ELiTe_Be_NC , Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Negative Control 52M ELiTe_Be_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FII_Be_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FV_Be_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_MTHFR_Be_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero 52M ELiTe_FVFII_Be_WB_200_200 , Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di Sangue Intero	

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	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
52M PCR Mix	-20 °C o inferiore (al riparo dalla luce)	60 giorni	fino a sette	fino a sette sessioni separate* di circa tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di circa 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare la terza sessione)

*con congelamento intermedio.

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni e protocolli di analisi

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue intero	EDTA	≤3 gg	≤7 gg	≤30 gg	≤1 anno

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorni.

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** ed **ELITe BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 5 Assay Protocol per Coagulation ELITe MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Sangue intero in EDTA	ELITe InGenius	52M ELITe_WB_200_200 52M ELITe_FII_WB_200_200 52M ELITe_FV_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_WB_200_200 52M ELITe_FVFII_WB_200_200	Wild type / eterozigote / omozigote	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di estrazione eluito: 200 µL Controllo interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	52M ELITe_Be_WB_200_200 52M ELITe_FII_Be_WB_200_200 52M ELITe_FV_Be_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELITe_FVFII_Be_WB_200_200	Wild type / eterozigote / omozigote	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di estrazione eluito: Controllo interno 200 µL: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

NOTA

Verificare se il tubo primario e il volume del campione sono compatibili con **ELITe InGenius** ed **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, si devono trasferire 200 µL di campione in un Extraction Tube (per **ELITe InGenius**) o in un Sarstedt Tube da 2 mL (per **ELITe BeGenius**).

NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell'**Extraction Tube** nel **Sarstedt Tube da 2 mL** potrebbe generare **contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni contenute nella sezione **AVVERTENZE E PRECAUZIONI** pagina 6.

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.

8.2 Controlli di PCR

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 **Coagulation - ELITE Positive Control** (non in dotazione con questo kit) con gli Assay Protocols **52M ELITE_PC** o **52M ELITE_Be_PC**.
- Per il Negative Control, utilizzare acqua di grado biologico molecolare (non in dotazione in questo kit) con gli Assay Protocols **52M ELITE_NC** o **52M 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 della PCR devono essere rianalizzati qualora si presenti uno dei seguenti eventi:

- 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** viene sottoposto a un importante intervento di manutenzione o assistenza.

8.3 Controlli di qualità

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

9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **Coagulation 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 **Coagulation ELiTe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELiTe InGenius** per eseguire:

- A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
- C. 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. Ciascun tubo è sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi e conservare 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 Tubes 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 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. 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".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 200 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 200 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 200 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
5	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provini e controlli")	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provini e controlli")	Selezionare l'Assay Protocol nella colonna "Assay" (vedere "Provini e controlli"). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".
7	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)".
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni 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 reazione per ogni 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 reazione per ogni tubo.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	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.	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.	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 gli Elution tubes con i campioni estratti.	Caricare la PCR Cassette e i tubi Positive Control e Negative Control.

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)
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	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 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.

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**. Il restante **Negative Control** deve essere gettato via.

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 **Coagulation 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

L'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 e Tm risultanti vengono utilizzati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del Positive Control e del Negative Control, specifici per i lotto di reagenti per PCR, vengono registrati nel database (Controls). Essi possono essere consultati 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 **FV**, **FII**, **MTHFR**) e per l'Internal Control (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocols **52M ELiTe_WB_200_200**, **52M ELiTe_FII_WB_200_200**, **52M ELiTe_FV_WB_200_200**, **52M ELiTe_MTHFR_WB_200_200** or **52M ELiTe_FVFI_WB_200_200**.

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) Positive Control	Stato
52M Positive Control	APPROVATO
2) Negative Control	Stato
52M Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dall'**ELiTe InGenius Software** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ciascun campione, il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi che specificano se gli alleli target sono stati discriminati, in base all'Assay Protocol selezionato (singleplex, duplex o triplex).

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
FV:Wild-type for Factor V (FV:Wild-type per il Fattore V)	Il campione ha un genotipo wild type per il locus del Fattore V SNP G1691A.
FV:Heterozygous for Factor V Leiden FV:Eterozigote per il Fattore V Leiden	Il campione ha un genotipo eterozigote mutato (Leiden) per il locus del Fattore V SNP G1691A.
FV:Homozygous for Factor V Leiden FV:Omozigote per il Fattore V Leiden	Il campione ha un genotipo omozigote mutato (Leiden) per il locus del Fattore V SNP G1691A.
FII:Wild-type for Factor II FII: Wild type per il Fattore V	Il campione ha un genotipo wild type per il locus del Fattore II SNP G20210A.
FII:Heterozygous for Factor II 20210A FII: Eterozigote per il Fattore II 20210A	Il campione ha un genotipo eterozigote mutato (20210A) per il locus del Fattore II SNP G20210A.
FII:Homozygous for Factor II 20210A FII: Omozigote per il Fattore II 20210A	Il campione ha un genotipo omozigote mutato (20210A) per il locus del Fattore II SNP G20210A.
MTHFR:Wild-type for MTHFR MTHFR: Wild type per MTHFR	Il campione ha un genotipo wild type per il locus MTHFR SNP C677T.
MTHFR:Heterozygous for MTHFR 677T MTHFR: Eterozigote per MTHFR 677T	Il campione ha un genotipo eterozigote mutato (677T) per il locus MTHFR SNP C677T.
MTHFR:Homozygous for MTHFR 677T MTHFR: Omozigote per MTHFR 677T	Il campione ha un genotipo omozigote mutato (677T) per il locus MTHFR SNP C677T.
IC:Valid Sample (IC: Campione valido)	Il campione ha un valore Ct dell'IC inferiore a 26,5 ed è valido.
Inconclusive-Retest Sample (Includente-Ripetere campione)	Risultato del saggio Inconcludente per problemi del campione.
Invalid-Retest Sample Non valido-Ripetere il test sul campione	Risultato del saggio non valido per un errore di Internal Control (dovuto ad es. a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che hanno riportato il risultato “Inconcludente-Ripetere il test sul campione”: non sono idonei per l'interpretazione dei risultati, poiché non è stato possibile rilevare la temperatura di fusione (T_m) degli alleli wild type e mutati. In questo caso, l'analisi della curva di dissociazione non è stata eseguita in modo efficiente a causa di problemi con il campione (trasferimento di inibitori nell'eluato o presenza di altri SNP interferenti), che potrebbero causare risultati errati.

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

Se ne rimane un volume sufficiente, l'eluato può essere ritestato (tal quale oppure diluito) mediante una sessione di amplificazione in modalità “PCR Only” (solo PCR). In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità “Extract + PCR” (estrazione + PCR), (vedere 14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 30 [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 28](#)).

NOTA

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

NOTA

Quando si approvano i risultati dell'analisi, verificare sempre l'esito dello strumento controllando i plot della curva di fusione nel report della sessione di lavoro. Le temperature di fusione (T_m) degli alleli wild type e/o mutati di ciascun gene sottoposto ad analisi devono corrispondere ai picchi mostrati nei plot della curva di fusione.

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 **Coagulation 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 Mixda** 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 **Coagulation 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:

Scongelerare i tubi di **PCR Mix** necessari a temperatura ambiente per 30 minuti. Ciascun tubo è sufficiente per 12 test in condizioni ottimali (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi e conservare 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.	Scongelerare a temperatura ambiente gli Elution Tube contenenti gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelerare i tubi del Positive Control a temperatura ambiente per 30 minuti. Ciascun tubo contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Agitare delicatamente, quindi 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" .	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" .
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR" .	Selezionare il "run mode": "PCR Only" .	Selezionare il "run mode": "PCR Only" .
5	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".
6	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) e l'Internal Control.	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.	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)
8	Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 200 µL.	Non applicabile	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").	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.	Fare clic su "Next" per proseguire.
	NOTA Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
11	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
12	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
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
14	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
15	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).	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).
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	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.
18	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
19	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).
20	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)
21	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
22	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
23	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 ± 10 °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 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.

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 **Coagulation 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

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del Coagulation ELiTe MGB Kit è stata definita su ELiTe InGenius (modalità PCR Only) e verificata su ELiTe BeGenius (modalità PCR Only) testando tre campioni (wild type, eterozigote e omozigote) in 4 repliche a circa 70 ng per ogni reazione con l'aggiunta di pannelli di DNA genomico umano certificati per il Fattore V e il Fattore II (reagente di riferimento dell'OMS Fattore V Leiden, gDNA umano, 1° pannello genetico internazionale, NIBSC, Regno Unito, codice 04/224, e reagente di riferimento dell'OMS Mutazione della protrombina G20210A, gDNA umano, 1° pannello genetico internazionale, NIBSC, Regno Unito, codice 05/130).

La sensibilità analitica di questo saggio consente di identificare la presenza di circa 20.000 molecole di DNA bersaglio (corrispondenti ai genomi di circa 10.000 cellule o circa 70 ng di DNA genomico umano) in 20 µL di DNA estratto nella reazione.

Efficienza della rilevazione (inclusività)

L'inclusività del saggio, in termini di efficienza di rivelazione dei geni del Fattore V, del Fattore II e MTHFR, è stata valutata mediante analisi in silico. L'analisi ha dimostrato un alto livello di conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, si prevede un'amplificazione e una rilevazione efficienti.

Le sonde fluorescenti consentono di rilevare gli alleli dei geni del Fattore V, del Fattore II e del MTHFR riportati nella tabella seguente. I limiti degli intervalli T_m correlati per ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius sono stati calcolati analizzando i dati ottenuti negli studi di verifica e convalida e gli intervalli T_m in uso sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 12

Gene	Allele rilevato	Intervallo T _m	
		ELiTe InGenius	ELiTe BeGenius
Fattore V	Allele 1691G (wild type)	53,0 °C – 57,0 °C	52,5 °C – 56,5 °C
	Allele 1691A (mutato, Leiden)	61,0 °C – 65,0 °C	59,5 °C – 63,5 °C
Fattore II	Allele 20210G (wild type)	56,0 °C – 61,0 °C	55,0 °C – 60,0 °C
	Allele 20210A (mutato)	64,0 °C – 69,0 °C	63,0 °C – 68,0 °C
MTHFR	Allele MTHFR 677C (wild type)	55,0 °C – 59,0 °C	54,0 °C – 58,0 °C
	Allele MTHFR 677T (mutato)	64,0 °C – 68,0 °C	63,0 °C – 67,0 °C

Specificità analitica

La specificità analitica di questo saggio, intesa come la capacità di non identificare come Fattore II mutato il gene SNP G20210A mutato per SNP C20209T, è stata verificata utilizzando un DNA plasmidico contenente l'amplicone del Fattore II con nucleotide wild type (G) nella posizione 20210 e nucleotide mutante (T) nella posizione 20209.

Inoltre, la specificità analitica è stata verificata per i seguenti SNP non comuni descritti nella letteratura scientifica. Si tratta di SNP rari che si trovano in prossimità degli SNP di interesse:

Tabella 13

Gene	SNP raro analizzato
Fattore V	G1689A, C1690T, A1692C, A1696G
Fattore II	A20207C, A20218G, T20219A, C20221T
MTHFR	C678A, G679A, C684G

La specificità analitica è stata verificata utilizzando DNA plasmidici contenenti la regione amplificata dei geni del Fattore V, del Fattore II e MTHFR con nucleotidi wild type negli SNP di interesse e nucleotidi mutanti negli SNP rari oggetto dell'analisi.

Campioni simulati contenenti circa 80.000 copie di DNA plasmidico sono stati testati in 6 repliche (e 24 repliche per SNP C20209T) su ELITE InGenius. Le repliche hanno dato risultati "inconcludenti" o correttamente determinati. Nessun campione mutato per gli SNP analizzati è stato classificato come eterozigote o omozigote mutato per gli SNP di interesse.

Gli SNP rari che ricadono nella regione di ibridazione della sonda possono interferire con il rilevamento dello SNP di interesse e potrebbero portare a un risultato "falso omozigote mutante" quando si verificano insieme alla mutazione dello SNP di interesse sull'altro allele.

Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale crossreattività con altri microrganismi indesiderati che potrebbero essere rilevati nei campioni clinici di sangue intero è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database dei nucleotidi. L'analisi non ha evidenziato omologie significative. Pertanto, non è prevista alcuna cross-reattività da parte di potenziali organismi interferenti.

Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione da parte di altri microrganismi indesiderati che potrebbero essere rilevati nei campioni clinici di sangue intero è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database dei nucleotidi.

L'analisi non ha evidenziato omologie significative. Pertanto, non è prevista alcuna cross-reattività da parte di potenziali organismi interferenti.

Sostanze interferenti

L'effetto delle sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando un campione di sangue intero raccolto in EDTA, eterozigote per i tre geni di interesse, addizionato con le seguenti sostanze potenzialmente interferenti a concentrazioni rilevanti.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 14

Campione	Genotipo FV het / FII het / MTHFR het	Esito
Control	3 / 3	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	3 / 3	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	Nessuna interferenza
Eparina	3 / 3	Nessuna interferenza
EDTA	3 / 3	Nessuna interferenza
Ibuprofen	3 / 3	Nessuna interferenza
Trigliceridi	3 / 3	Nessuna interferenza
Ampicillina	3 / 3	Nessuna interferenza
Bilirubina	3 / 3	Nessuna interferenza

Ripetibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione dei risultati ottenuti con il prodotto Coagulation ELITE MGB Kit, in combinazione con gli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius, è stata verificata analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, comprendente un campione con genotipo eterozigote per ciascun target (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A eterozigote (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

Un esempio di ripetibilità intra-sessione su ELITE InGenius è riportato nelle tabelle sottostanti.

Tabella 15 Ripetibilità intra-sessione su ELITE InGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	8	22,07	0,41
Eterozigote FV SNP G1691A		8	22,91	0,76
Eterozigote MTHFR SNP C677T		8	22,02	1,22

Tabella 16 Ripetibilità intra-sessione su ELITE InGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	8	58,19	0,207
	Fattore II mutato	8	65,66	0,051
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	8	55,18	0,048
	Fattore V mutato	8	62,31	0,120
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	8	56,73	0,183
	MTHFR mutato	8	65,90	0,169

Un esempio di ripetibilità inter-sessione su ELITE InGenius è riportato nelle tabelle sottostanti.

Tabella 17 Ripetibilità inter-sessione su ELITE InGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,12	1,12
Eterozigote FV SNP G1691A		16	22,91	0,75
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22,10	1,36

Tabella 18 Ripetibilità inter-sessione su ELITE InGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	58,18	0,182
	Fattore II mutato	16	65,78	0,258
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	55,18	0,064
	Fattore V mutato	16	62,31	0,116
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,73	0,211
	MTHFR mutato	16	65,96	0,257

Un esempio di ripetibilità intra-sessione su ELITE BeGenius è riportato nelle tabelle sottostanti.

Tabella 19 Ripetibilità intra-sessione su ELITE BeGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	8	22,35	1,90
Eterozigote FV SNP G1691A		8	22,95	2,20
Eterozigote MTHFR SNP C677T		8	22,40	1,28

Tabella 20 Ripetibilità intra-sessione su ELITE BeGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	8	57,64	0,392
	Fattore II mutato	8	65,21	0,150
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	8	54,84	0,120
	Fattore V mutato	8	61,56	0,242
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	8	56,29	0,174
	MTHFR mutato	8	65,30	0,116

Un esempio di ripetibilità inter-sessione su ELITE BeGenius è riportato nelle tabelle sottostanti.

Tabella 21 Ripetibilità inter-sessione su ELiTe BeGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,26	1,58
Eterozigote FV SNP G1691A		16	23,10	2,02
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22,45	1,75

Tabella 22 Ripetibilità inter-sessione su ELiTe BeGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	57,71	0,494
	Fattore II mutato	16	65,24	0,119
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	54,82	0,131
	Fattore V mutato	16	61,60	0,218
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,29	0,273
	MTHFR mutato	16	65,28	0,099

La ripetibilità in associazione ad ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius del prodotto Coagulation ELiTe MGB Kit ha mostrato una variabilità massima dei valori IC Ct e Target Tm come %CV inferiore al 5%.

Riproducibilità

La ripetibilità intra-sessione e inter-sessione dei risultati ottenuti con il prodotto Coagulation ELiTe MGB Kit in combinazione con ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius è stata verificata analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, comprendente un campione con genotipo eterozigote per ciascun target (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A eterozigote (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

La riproducibilità inter-lotto e inter-strumento dei risultati ottenuti con il prodotto Coagulation ELiTe MGB Kit in associazione con ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius è stata verificata analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA, comprendente un campione con genotipo eterozigote per ciascun target (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A eterozigote (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.

Tabella 23 Riproducibilità inter-lotto su ELiTe InGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,28	1,28
Eterozigote FV SNP G1691A		16	22,46	2,58
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23,14	1,47

Tabella 24 Riproducibilità inter-lotto su ELITE InGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	58,1	0,23
	Fattore II mutato	16	65,7	0,12
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	55,1	0,10
	Fattore V mutato	16	62,3	0,13
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,6	0,32
	MTHFR mutato	16	65,8	0,22

Tabella 25 Riproducibilità inter-strumento su ELITE InGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,38	1,53
Eterozigote FV SNP G1691A		16	22,45	2,34
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23,13	1,27

Tabella 26 Riproducibilità inter-strumento su ELITE InGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	58,1	0,27
	Fattore II mutato	16	65,6	0,12
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	55,1	0,21
	Fattore V mutato	16	62,2	0,16
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,6	0,35
	MTHFR mutato	16	65,7	0,28

Tabella 27 Riproducibilità inter-lotto su ELITE BeGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,42	1,72
Eterozigote FV SNP G1691A		16	22,60	1,99
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22,80	2,20

Tabella 28 Riproducibilità inter-lotto su ELITE BeGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	57,6	0,29
	Fattore II mutato	16	65,2	0,11
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	54,8	0,11
	Fattore V mutato	16	61,5	0,24
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,2	0,27
	MTHFR mutato	16	65,2	0,28

Tabella 29 Riproducibilità inter-strumento su ELITE BeGenius

Pannello campione	Acido	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	IC	16	22,51	1,60
Eterozigote FV SNP G1691A		16	22,63	1,68
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23,15	1,83

Tabella 30 Riproducibilità inter-strumento su ELITE BeGenius

Pannello campione	Allele	N	Tm media	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G20210A	Fattore II wild type	16	57,7	0,45
	Fattore II mutato	16	65,2	0,13
Eterozigote FV SNP G1691A	Fattore V wild type	16	54,8	0,16
	Fattore V mutato	16	61,6	0,23
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56,2	0,30
	MTHFR mutato	16	65,3	0,17

La riproducibilità in associazione ad ELITE InGenius ed ELITE BeGenius del prodotto Coagulation ELITE MGB Kit ha mostrato una variabilità massima dei valori IC Ct e Target Tm come %CV inferiore al 5%.

Robustezza: Test di contaminazione crociata

L'assenza di contaminazione crociata è stata verificata analizzando 6 repliche di campioni di sangue intero alternate a 6 repliche di acqua di grado biologico molecolare con il prodotto Coagulation ELITE MGB Kit su ELITE InGenius.

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Tabella 31

Campioni	N	Genotipo			IC
		FII het	MTHFR wt	FV wt	Ct < 26,5
Sangue intero con EDTA	30	30/30	30/30	30/30	30/30
Acqua per biologia molecolare	30	NA	NA	NA	0/30

Il saggio ha definito “non valido” qualsiasi campione di acqua testato che non presentava contaminazione crociata.

Concordanza diagnostico: conferma del genotipo del campione certificato

La concordanza diagnostica di questo saggio, intesa come la capacità di identificare correttamente il genotipo del campione certificato, è stata valutata effettuando analisi in associazione a ELiTe InGenius.

I risultati sono sintetizzati nelle tabelle seguenti.

Tabella 32

Genotipo campione: Fattore V G1691A	N	WT	Eteroz.	Omoz.	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild type	108	108	0	0	100%	100%
Eterozigote	57	0	57	0	100%	
Omozigote mutato	53	0	0	53	100%	

Nella discriminazione degli alleli del locus SNP G1691A del Fattore V, il saggio ha fornito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questo saggio, la concordanza diagnostica totale per il locus SNP G1691A del Fattore V è stata pari al 100%.

Tabella 33

Genotipo campione: Fattore II G20210A	N	WT	Eteroz.	Omoz.	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild type	160	160	0	0	100%	100%
Eterozigote	59	0	59	0	100%	
Omozigote mutato (simulato)	56	0	0	56	100%	

Nella discriminazione degli alleli del locus SNP G20210A del Fattore II, il saggio ha fornito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questo saggio, la concordanza diagnostica totale per il locus II G20210A del Fattore II è stata pari al 100%.

Tabella 34

Genotipo campione: MTHFR C677T	N	WT	Eteroz.	Omoz.	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild type	63	63	0	0	100%	100%
Eterozigote	136	0	136	0	100%	
Omozigote mutato	19	0	0	19	100%	
Omozigote mutato (simulato)	36	0	0	36		

Nella discriminazione degli alleli del locus MTHFR SNP C677T, il saggio ha fornito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questo test, la concordanza diagnostica totale per il locus MTHFR C677T è stata pari al 100%.

Poiché ELITe BeGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a ELITe InGenius, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, le prestazioni relative alla sensibilità diagnostica del saggio ottenute in associazione a ELITe InGenius sono applicabili anche a ELITe BeGenius.

Il valore di cut-off dell'Internal Control Ct (IC Ct) è impostato a 26,5 per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.

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 di "Coagulation ELITe MGB Kit", FTP RTSD00ING

12 BIBLIOGRAFIA

- Voorberg, J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 - 1536.
- Baker, R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162.
- Poort, S. R. et al. (1996) *Blood* 88: 3698 - 3703.
- Kluijtmans L. A. et al. (1996) *Am J Hum Genet* 58: 35 - 41.
- Cattaneo M. et al. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1662-1666

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto esclusivamente con campioni clinici di sangue intero raccolti in EDTA.

Non sono disponibili dati sulla prestazione del prodotto con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: saliva.

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.

Il metodo Real Time PCR utilizzato in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che lo rende sensibile alla contaminazione da campioni clinici, controlli positivi e da prodotti della PCR. La cross-contaminazione provoca false rilevazioni dell'allele target. 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 con rilevazioni false dell'allele target.

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 con mancata rilevazione dell'allele target ottenuto con questo prodotto indica che il DNA del target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto ([11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere inconcludente.

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.

Un risultato non valido o inconcludente ottenuto con questo prodotto significa che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA genomico del campione o le temperature di dissociazione degli alleli. In questo caso l'analisi del campione deve essere ripetuta con un possibile ritardo nell'ottenimento dei risultati.

Possibili polimorfismi nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target e portare a risultati non corretti.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri esami di laboratorio cui il paziente è stato sottoposto.

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 35

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 36

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.

Tabella 36 (segue)

Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
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 37

Reazione del campione non valida o inconcludente	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore nell'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.
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 38

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 39

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 40

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 diPCR Mix.

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 produttore 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.

Appendix A Coagulation ELITe MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie Genius



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 **Coagulation ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico in vitro destinato all'uso da parte di operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR qualitativo degli acidi nucleici per la discriminazione degli alleli dei seguenti tre loci:

- gene del Fattore V della coagulazione, polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) G1691A (Leiden),
- gene del Fattore II della coagulazione, SNP G20210A,
- gene 5,10-metilenetetraidrofolato riduttasi (MTHFR), SNP C677T.

in singleplex, duplex (FII e FV) o triplex (FII, FV e MTHFR) in campioni di DNA genomico umano estratti da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione agli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati a partire da campioni di sangue intero umano raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella valutazione del rischio di trombosi venosa profonda in pazienti con sospetti disturbi della coagulazione e a rischio di trombosi venosa profonda.

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 1	Fattore V, SNP G1691A (Leiden)	AP639	FV
Target 2	Fattore II, SNP G20210A	FAM	FII
Target 3	MTHFR, SNP C677T	AP593	MTHFR
Controllo interno	Gene della beta globina umana	AP525	IC

Matrice validata

- Sangue intero con EDTA

Contenuto del Kit e prodotti correlati

Coagulation ELITe MGB Kit (RTSD00ING)		Coagulation - ELITe Positive Control (CTRD00ING)	
 X 8		 X 3	
52M PCRMix 8 tubi da 280 µL 12 reazioni per tubo 96 reazioni per kit 7 cicli di congelamento/scongelo per tubo		52M Positive Control 3 tubi da 160 µL 4 reazioni per tubo 12 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/scongelo per tubo	
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.	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 - Volume eluizione totale	200 µL 200 µL	- Volume di eluato immesso nella PCR - Volume di PCR Mix - Frequenza dei controlli	20 µL 20 µL 15 giorni
--	------------------	--	-----------------------------

Prestazioni di ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Genotipo campione: Fattore V G1691A	Sensibilità analitica	Concordanza diagnostica
Wild type	70ng DNA/reazione	100%
Eterozigote	70ng DNA/reazione	100%
Omozigote mutato	70ng DNA/reazione	100%

Genotipo campione: Fattore II G20210A	Sensibilità analitica	Concordanza diagnostica
Wild type	70ng DNA/reazione	100%
Eterozigote	70ng DNA/reazione	100%
Omozigote mutato	70ng DNA/reazione	100%

Genotipo campione: MTHFR C677T	Sensibilità analitica	Concordanza diagnostica
Wild type	70ng DNA/reazione	100%
Eterozigote	70ng DNA/reazione	100%
Omozigote mutato	70ng DNA/reazione	100%

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 41

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue intero	EDTA	≤3 gg	≤7 gg	≤30 gg	≤1 anno

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorni.

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 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: "200 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: 52M ELITe_WB_200_200 52M ELITe_FII_WB_200_200 52M ELITe_FV_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_WB_200_200 52M ELITe_FVFII_WB_200_200	5. Selezionare il metodo "Extract + PCR" e la posizione del campione: Tubo di estrazione	6. Caricare la miscela PCR Mix e il controllo interno (IC) nell'Inventory Block
7. Caricare: La PCR Cassette, la Cartuccia di Estrazione, l'Elution tube, la Cassetta dei Puntali, i Rack delle "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, controlli)

1. Selezionare "Perform Run" sul touch screen	2. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluato: "200 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: 52M ELiTe_PC oppure 52M ELiTe_NC oppure 52M ELiTe_WB_200_200 52M ELiTe_FII_WB_200_200 52M ELiTe_FV_WB_200_200 52M ELiTe_MTHFR_WB_200_200 52M ELiTe_FVFI_WB_200_200	5. Selezionare la modalità "PCR Only" e impostare la posizione del campione: Elution Tube	6. Caricare la PCR Mix nell'Inventory Block
7. Caricare: il rack della PCR cassette e i rack degli Elution Tubes con gli acidi nucleici estratti	8. Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	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 controlli: Positive Control e Negative Control nel menu "Controls". <u>Nota</u> : Entrambi devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	3. Scongela 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 e fare clic sulla modalità di esecuzione «Extract+ PCR»	2. Inserire il Sample Rack con il codice a barre nella Cooler Unit. Il lettore di codici a barre è già attivo	3. Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluato: "200 µL"
4. Selezionare l'"Assay Protocol" di interesse: 52M ELiTe_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FII_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FV_Be_WB_200_200 52M ELiTe_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FVFI_Be_WB_200_200 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 e l'Internal Control nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il "PCR Rack" con la "PCR Cassette" e l'"Extraction Basket" 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, controlli)

1. Selezionare "Perform Run" (Esegui sessione) 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: 52M ELITe_Be_PC oppure 52M ELITe_Be_NC oppure 52M ELITe_Be_WB_200_200 52M ELITe_FII_Be_WB_200_200 52M ELITe_FV_Be_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELITe_FVFI_Be_WB_200_200	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