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

AVVERTENZA del 14/11/2023

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«High Risk HPV ELITe Panel»
Ref. RTK402ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Aggiornamento della descrizione della matrice*

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

NOTA BENE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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

High Risk HPV ELITe Panel

reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK402ING CE **IVD** **-20° C**

INDICE

USO PREVISTO pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO pag. 2
DESCRIZIONE DEL KIT pag. 2
MATERIALE INCLUSO NEL KIT pag. 2
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL KIT pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI pag. 3

ELITE INGENIUS®
CAMPIONI E CONTROLLI pag. 5
PROCEDURA pag. 6
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pag. 12

7500, 7500 Fast Real-Time PCR System / CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD
CAMPIONI E CONTROLLI pag. 14
PROCEDURA pag. 14
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pag. 20

BIBLIOGRAFIA pag. 20
LIMITI DELLA PROCEDURA pag. 21
PROBLEMI E SOLUZIONI pag. 22
LEGENDA DEI SIMBOLI pag. 24
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA pag. 25
CONTATTI pag. 25

USO PREVISTO

Il prodotto **«High Risk HPV ELITe Panel»** è un saggio qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici con modalità multiplex per la rilevazione e la differenziazione del DNA di **14 tipi di papilloma virus umano ad alto rischio su campioni di DNA estratto da campioni cervico-vaginali raccolti in tampone UTM e da cellule provenienti da campioni cervico-vaginali raccolti in tampone UTM.**

Il test identifica specificamente i tipi HPV16 e HPV18, rilevando al contempo gli altri tipi ad alto rischio (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

Il prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro come ausilio nella diagnosi di infezioni da HPV, insieme ai dati clinici e ad altri referti di laboratorio del paziente.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di amplificazione Real Time con modalità multiplex con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza.

Differenti reazioni di amplificazione si eseguono in ciascun pozzetto partendo dal DNA estratto da ciascun campione oggetto di analisi, allo scopo di amplificare i target HPV-HR:

- HPV16, rilevato da una sonda specifica individuata dallo strumento Real Time nel canale per FAM,
- HPV18, rilevato da una sonda specifica individuata dallo strumento Real Time nel canale per JPE/HEX
- HR-HPV (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), rilevato da una sonda specifica individuata dallo strumento real time nel canale per Texas red/Cal fluor red 610.

Il kit amplifica anche un controllo interno endogeno basato sul gene ABL, individuato dallo strumento Real Time nel canale per Cy5/Quasar 670.

Il DNA del target specifico è amplificato da primer forward e reverse e dalla Taq polimerasi. Nella PCR Real Time, il prodotto amplificato viene rilevato mediante un colorante fluorescente. Il metodo utilizza una sonda basata su DNA che presenta ad un'estremità un reporter fluorescente e all'altra un quencher di fluorescenza. La prossimità tra il reporter e il quencher impedisce l'emissione della fluorescenza; l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi degrada la sonda, allontanando in questo modo il reporter dal quencher, con conseguente emissione della fluorescenza che viene rilevata.

L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dallo strumento.

Il saggio è stato validato sui sistemi riportati su questo manuale d'istruzioni.

DESCRIZIONE DEL KIT

Il prodotto **«High Risk HPV ELITe Panel»** fornisce i seguenti componenti:

- **HR-HPV Reaction Mix**

Miscela di enzima e buffer per l'amplificazione della regione specifica del papilloma virus umano, aliquotata in tre provette (tappo GIALLO). La miscela fornisce uracil-DNA glicosilasi (UNG) per impedire una contaminazione crociata.
Ogni provetta contiene 550 µl di soluzione sufficienti per **32 test** in associazione con **ELITe InGenius**, se si eseguono 4 sessioni, e **33 test** in associazione con altri sistemi.

- **HR-HPV Probe Mix**

Miscela di primer/sonda specifici per HPV e per il controllo interno, aliquotata in tre provette (tappo ROSSO).
Ogni provetta contiene 320 µl di soluzione sufficienti per **32 test** in associazione con **ELITe InGenius**, se si eseguono 4 sessioni, e **33 test** in associazione con altri sistemi.

- **HR-HPV Positive Control**

Soluzione di plasmidi per HPV in soluzione stabilizzante, aliquotata in due provette (tappo BLU).
Ogni provetta contiene 100 µl di soluzione sufficienti per **4 sessioni** (modalità "Extract + PCR") in associazione con **ELITe InGenius** e **10 sessioni** in associazione con altri sistemi validati.

Il prodotto è sufficiente per **96 test in associazione con «ELITe InGenius»**, inclusi i controlli.

Il prodotto è sufficiente per **100 test in associazione con altri sistemi**, inclusi i controlli.

MATERIALE INCLUSO NEL KIT

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
HR-HPV Reaction Mix	Miscela di enzima **tappo GIALLO**	**3 x 550 µl**	-
HR-HPV Probe Mix	Miscela di primer e sonde **tappo ROSSO**	**3 x 320 µl**	-
HR-HPV Positive Control	Plasmidi per i target **tappo BLU**	**2 x 100 µl**	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL KIT

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Agitatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000-14.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- Acqua per biologia molecolare.
- Provetta Sarstedt da 2,0 ml con tappo a vite corrugato (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc) o CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD (Bio-Rad Laboratories, Inc.) calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica del DNA, l'amplificazione real-time e l'interpretazione dei risultati dei campioni, si richiedono lo strumento **«ELITe InGenius»** (ELITechGroup S.p.A., cod. INT030) e i seguenti protocolli analitici specifici (ELITechGroup S.p.A).

- parametri per il controllo positivo di amplificazione **«HR-HPV ELITe_PC»**,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione **«HR-HPV ELITe_NC»**,
- parametri per i campioni di tamponi da analizzare **«HR-HPV ELITe_CS_200_100»**.

Con lo strumento **«ELITe InGenius»** si richiedono i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione **«ELITe InGenius® SP 200»** (ELITechGroup S.p.A., cod. INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici **«ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set»** (ELITechGroup S.p.A, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione **«ELITe InGenius® PCR Cassette»** (ELITechGroup S.p.A, cod. INT035PCR),
- puntali **«300 µl Filter tips Axygen»** (Axygen BioScience Inc., CA, cod. TF-350-L-R-S),
- contenitori **«ELITe InGenius® Waste Box»** (ELITechGroup S.p.A, cod. F2102-000).

Per l'estrazione manuale del DNA dai campioni da analizzare, si raccomanda l'uso del prodotto commercializzato QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germania, cat. n. 51304) per l'estrazione del DNA da campioni cellulari e non cellulari.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System, si consiglia l'impiego del prodotto generico **«Q - PCR Microplates»** (ELITechGroup S.p.A., cod. RTSACC01), micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time, o prodotti equivalenti.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento CFX96™ Dx System, si consiglia l'impiego del prodotto generico **«Hard-Shell 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/clear»** (Bio-Rad, code HSP9601), e «**MICROSEAL B ADHES SEAL,100/PK»** (Bio-Rad, code MSB1001) fogli adesivi per l'amplificazione real time, o prodotti equivalenti.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio al 3 % per almeno 30 minuti oppure trattato in autoclave a 121° C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.
Non pipettare a bocca alcuna soluzione.
Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.
Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.
Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.
Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.
Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.
Rispettare la data di scadenza del prodotto.
Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, richiedono personale competente e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

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

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

Quando la sessione di estrazione/amplificazione viene allestita con lo strumento integrato, è necessario fare uso di appositi camici, guanti e strumenti.

I campioni devono essere dedicati esclusivamente a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Provette contenenti campioni diversi non devono mai essere aperte contemporaneamente. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA e RNA.

I reagenti devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. I reagenti necessari per l'amplificazione devono essere preparati in modo da essere utilizzati in una singola sessione. Le pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA e RNA.

I prodotti di amplificazione devono essere manipolati in modo da limitarne al massimo la dispersione nell'ambiente per evitare la possibilità di contaminazioni. Le pipette utilizzate per manipolare i prodotti di amplificazione devono essere dedicate solo a questo uso.

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

- **HR-HPV Reaction Mix**

La **HR-HPV Reaction Mix** deve essere conservata a -20° C.
La **HR-HPV Reaction Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **dieci volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

- **HR-HPV Probe Mix**

La **HR-HPV Probe Mix** deve essere conservata al buio a -20°C.
La **HR-HPV Probe Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **dieci volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

- **HR-HPV Positive Control**

La **HR-HPV Positive Control** deve essere conservata a -20° C.
La **HR-HPV Positive Control** può essere congelata e scongelata per un massimo di **dieci volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

ELITe InGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Campioni cervicali raccolti in tampone UTM

Raccogliere i campioni cervico-vaginali per l'estrazione del DNA in un tampone UTM e identificarli secondo quanto disposto dalle linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (+18/+25° C) per un massimo di due giorni o a +2/+8° C per un massimo di due giorni.

I campioni cervico-vaginali possono essere congelati e conservati a -20° C per un massimo di due mesi oppure a -70° C per due anni. Evitare cicli di congelamento/scongelamento. Il congelamento può indurre la precipitazione degli inibitori, la lisi cellulare e la degradazione degli acidi nucleici dei patogeni.

Per effettuare l'analisi con questo prodotto è necessario trasferire 0,2 ml di campione risospeso nel "**Sonication tube**" fornito con **«ELITe InGenius SP 200 Consumable Set»**.

Sostanze interferenti

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

Controlli di amplificazione

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

- per il controllo positivo utilizzare il reagente **HR-HPV Positive Control** (in dotazione con questo kit) in associazione con il protocollo **HR-HPV ELITe_PC**,
- per il controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo **HR-HPV ELITe_NC**.

Nota bene: Il sistema **ELITe InGenius** richiede risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.
I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione utilizzato.
Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:

- s'inizia un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- i risultati delle analisi dei controlli della qualità (v. paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- lo strumento **ELITe InGenius** deve essere sottoposto a un importante intervento di manutenzione.

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento certificato.

High Risk HPV ELITe Panel
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK402ING

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto «**High Risk HPV ELITe Panel**» con il sistema **ELITe InGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- verificare che i controlli di amplificazione (HR-HPV Positive Control e Negative Control) siano processati, in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto, e che i risultati siano approvati e non scaduti (Status). In assenza di risultati dei controlli di amplificazione approvati o validi, generarli come descritto nei paragrafi seguenti:
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando il protocollo del saggio fornito da ELITechGroup S.p.A. Questo protocollo IVD è stato validato specificamente con i prodotti ELITe MGB Kit, le matrici e lo strumento **ELITe InGenius**.

La tabella sottostante descrive il protocollo del saggio disponibile per il prodotto **«High Risk HPV ELITe Panel»**:

Protocollo del saggio per il prodotto High Risk HPV ELITe Panel			
Nome	**Matrice**	**Esito**	**Caratteristiche**
HR-HPV ELITe_CS_200_100	Cervico-vaginale	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µl Volume Estratto dell'Eluato: 100 µl Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µl Volume iniziale PCR del campione: 5 µl

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

Impostazione della sessione

Il prodotto **High Risk HPV ELITe Panel** in associazione a **ELITe InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

A. Corsa integrata (Extract + PCR)
B. Corsa di amplificazione (PCR only)
D. Corsa di amplificazione con il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only)

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

Nota bene: il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei tre tipi di corsa sono descritte di seguito.

A. Corsa integrata

Prima di iniziare la sessione, è importante procedere come segue:

1. Se necessario, scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli".
2. Scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti la miscela HR-HPV Reaction Mix (tappo GIALLO) necessarie per la sessione, tenendo presente che il contenuto di ciascuna è sufficiente per 32 reazioni. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per isolarne il contenuto e collocarle su ghiaccio.

3. Scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti la miscela HR-HPV Probe Mix (tappo ROSSO) necessarie per la sessione, tenendo presente che il contenuto di ciascuna è sufficiente per 32 reazioni. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per isolarne il contenuto e collocarle su ghiaccio.

Nota bene: Scongelare la miscela HR-HPV Probe Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

4. Preparare una provetta da 2 ml con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non in dotazione con il kit) per la miscela di reazione completa HR-HPV PCR Mix e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un pennarello a inchiostro permanente,

5. Calcolare i volumi dei due componenti in dotazione con il kit necessari per preparare la miscela di reazione completa HR-HPV PCR Mix in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Nota bene: Per calcolare i volumi dei due componenti è necessario definire il numero di campioni (N) da analizzare nell'ambito della sessione e seguire le indicazioni della tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
1 ≤ N ≤ 4	(N+1) x 12,5 µl	(N+1) x 7,5 µl
5 ≤ N ≤ 8	(N+2) x 12,5 µl	(N+2) x 7,5 µl
9 ≤ N ≤ 12	(N+3) x 12,5 µl	(N+3) x 7,5 µl

6. Preparare la miscela di reazione completa HR-HPV PCR Mix aggiungendo all'apposita provetta da 2 ml i volumi calcolati dei due componenti.

Nota bene: Preparare la miscela di reazione completa immediatamente prima di caricarla nello strumento.

Nota bene: la miscela di reazione completa **non** può essere conservata, è stabile per due sessioni consecutive (nello stesso giorno in cui viene ricostituita la miscela di reazione), se caricata nello strumento (Inventory Area), ma è importante mescolarla tra una sessione e l'altra.

Nota bene: Nel prelevare il liquido dalla provetta fare attenzione a non immergere completamente il puntale nel liquido al fine di non sprecare il materiale e ottenere volumi precisi; quest'operazione deve essere eseguita molto lentamente per prevenire la formazione di bolle d'aria; strofinare il puntale contro il bordo del recipiente per eliminare il liquido in eccesso depositato sulla superficie esterna prima dell'erogazione; sostituire i puntali dopo ogni fase del pipettamento.

7. Mescolare delicatamente mediante agitatore la provetta, centrifugarla per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarla quindi su ghiaccio;

Per preparare una sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

8. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
9. Verificare che "Extraction Input Volume" sia di 200 µl e che "Extracted Elute Volume" sia di 100 µl.
10. Per ogni "Track" d'interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
11. Nella colonna "Assay" selezionare il protocollo analitico da utilizzare (HR-HPV ELITe_CS_200_100).
12. Verificare che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
13. Nella colonna "Sample Position" selezionare la posizione da cui caricare il campione e selezionare quindi "Sonication Tube". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
14. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela HR-HPV PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
15. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
16. Caricare le cassette PCR, le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
17. Chiudere lo sportello dello strumento.
18. Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITe InGenius** consente all'operatore di visualizzare,

approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presenta nella provetta di eluizione, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e i materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a non provocare la dispersione dei prodotti di reazione.

B. Sessione di amplificazione

1. Scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti i campioni estratti. Mescolare delicatamente mediante agitatore la provetta, centrifugarla per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarla quindi su ghiaccio.
2. Preparare la miscela di reazione completa HR-HPV PCR Mix in volume sufficiente per la sessione, come descritto nel paragrafo A. Sessione integrata (dal punto 2 al punto 7; non scongelare il controllo Interno:).

Per preparare la sessione di amplificazione partendo dagli acidi nucleici estratti, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
4. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia di 100 µl.
5. Per ogni "Track" d'interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre.
6. Nella colonna "Assay" selezionare il protocollo analitico da utilizzare (es. HR-HPV ELITe_CS_200_100).
7. Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only" (solo PCR).
8. Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela HR-HPV PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le cassette PCR e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la sessione.

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

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo nella provetta di eluizione, tapparlo e conservarlo a -20 °C.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e i materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a non provocare la dispersione dei prodotti di reazione.

C. Sessione di amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

1. Preparare la miscela di reazione completa HR-HPV PCR Mix in volume sufficiente per la sessione, come descritto nel paragrafo A. Sessione integrata (dal punto 2 al punto 7).
2. Scongelare a temperatura ambiente (+18/25° C) le provette contenenti il prodotto HR-HPV Positive Control. Mescolare mediante agitatore le provette per 10 secondi, centrifugarle per 5 secondi per favorire la separazione del precipitato e collocarle quindi su ghiaccio.
3. Trasferire almeno 50 µl di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, in dotazione con ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.

Per preparare la sessione di amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo procedere come segue, come risulta dalla GUI:

4. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
5. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia di 100 µl.
6. Nella colonna "Assay", all'interno della traccia d'interesse, selezionare il protocollo analitico da utilizzare.
7. Per il Controllo Positivo, selezionare nella colonna "Assay" HR-HPV ELITe_PC e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di HR-HPV Positive Control.
8. Per il Controllo Negativo, selezionare nella colonna "Assay" HR-HPV ELITe_NC, e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
9. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Block" selezionato caricare la miscela HR-HPV PCR Mix seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Caricare le "PCR Cassette", la provetta contenente il prodotto HR-HPV Positive Control e quella contenente l'acqua per biologia molecolare (HR-HPV Negative Control) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la sessione.

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

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il controllo positivo residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C. Attenzione a non provocare la dispersione del controllo positivo. Smaltire il controllo negativo residuo.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e i materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a non provocare la dispersione dei prodotti di reazione.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione/ controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli**.**

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

Il sistema **ELITe InGenius** genera i risultati con il prodotto **High Risk HPV ELITe Panel** tramite la seguente procedura:

A. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
B. Validazione dei risultati del campione
C. Refertazione dei risultati del campione.

A. Validazione dei risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo e il Controllo Negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde dei geni target ("g16", "g18" e "HR") nella reazione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nei protocolli analitici "HR-HPV ELITe_PC" e "HR-HPV ELITe_NC".

I risultati delle sessioni di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati relativi al controllo positivo e negativo, specifici per il lotto di reagente di amplificazione, scadranno **dopo 15 giorni**.

I risultati delle sessioni di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento 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: Se il risultato della reazione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, le reazioni di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo devono essere ripetute.

Nota: Se il controllo positivo o il controllo negativo è processato insieme ai campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde dei geni target ("g16", "g18" e "HR") e dalla sonda specifica per il controllo interno ("IC") nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio HR-HPV ELITe_CS_200_100.

Nota: Prima di analizzare ogni campione, verificare che i controlli di amplificazione siano stati processati con il lotto del reagente di amplificazione da impiegare per il test e approvare e convalidare i risultati. La disponibilità di risultati dei controlli di amplificazione "Approved" (Status) è indicata nella finestra "Controls" della GUI. In mancanza di tali risultati, generarli come descritto in precedenza.

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").
La sessione del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le due condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Controllo positivo	**Status**
HR-HPV Positive Control	APPROVATO
2) Controllo negativo	**Status**
HR-HPV Negative Control	APPROVATO

Per ogni campione, il risultato del saggio viene interpretato automaticamente dal sistema secondo quanto stabilito dall'algoritmo del programma **ELITe® InGenius software** e dai parametri del protocollo di saggio.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto. Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se sono stati rilevati i DNA dei patogeni.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
g16: DNA Detected	Il **DNA di HPV16 è stato rilevato** nel campione.
g18: DNA Detected	Il **DNA di HPV18 è stato rilevato** nel campione.
HR: DNA Detected	Il **DNA di HR-HPV è stato rilevato** nel campione.
g16: DNA Not Detected or below the LoD	Il **DNA di HPV16 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è valido e negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
g18: DNA Not Detected or below the LoD	Il **DNA di HPV18 non è stato rilevato** nel campione. Il campione è valido e negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
HR: DNA Not Detected or below the LoD	Il **DNA di HR-HPV non è stato rilevato** nel campione. Il campione è valido e negativo per questo patogeno oppure la concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	**Risultato del saggio non valido** causa errore del controllo interno per errata estrazione, effetto carry-over sugli inibitori (o errato campionamento quando è stato utilizzato il controllo interno endogeno). Il test deve essere ripetuto.

I campioni segnalati con "Invalid - Retest Sample" dal programma **ELITe InGenius software** non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato. In tal caso, il DNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degrado del DNA, perdita di DNA durante l'estrazione o effetto carryover degli inibitori nell'eluato) che possono essere all'origine di risultati errati.

Nota: quando con i tamponi cervico-vaginali si usa il controllo interno endogeno, tenere conto del fatto che il numero di cellule del campione potrebbe non essere sufficiente per via di un errato campionamento.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR".

I campioni segnalati con "g16 DNA Not Detected or below the LoD", "g18 DNA Not Detected or below the LoD", "HR-HPV DNA Not Detected or below the LoD" sono utilizzabili ai fini dell'analisi, ma non è stato possibile rilevare i DNA target. In tal caso non si può escludere che il DNA target sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri referti di laboratorio relativi al paziente.

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

C. Refertazione dei risultati del campione

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

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

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

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

High Risk HPV ELITe Panel
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA
REF RTK402ING

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevabilità (LoD)

La sensibilità analitica di questo saggio, espressa come limite di rilevazione(LoD), permette di rilevare la presenza di circa 10 copie in 5 µl di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.
La sensibilità analitica del saggio, espressa come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione a varie concentrazioni

Ripetibilità

La ripetibilità, intesa come imprecisione intra-sessione, di questo saggio in associazione con il sistema ELITe InGenius è stata verificata su 3 replicati del Controllo positivo, testati mediante PCR nella stessa sessione (1sessione/strumento, con un campione in 3 replicati/sessione). Il test è stato eseguito su quattro diversi strumenti.

I risultati sotto forma di valori di Ct per ciascun target sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità (CV%), ottenendo in tal modo la ripetibilità come imprecisione intra-sessione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Ripetibilità intra-sessione										
campione	sessioni	Target g16			Target g18			Target HR		
		Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%
PC	strumento 1	19,83	0,11	0,53	20,61	0,21	1,01	21,66	0,08	0,37
PC	strumento 2	19,15	0,03	0,16	20,14	0,05	0,26	20,96	0,05	0,23
PC	strumento 3	19,25	0,08	0,40	20,58	0,02	0,10	21,20	0,05	0,24
PC	strumento 4	20,02	0,13	0,63	21,72	0,23	1,04	22,26	0,18	0,81

La ripetibilità di questo saggio, sotto forma di CV% intra-sessione, non ha superato il 2% per tutti i target.

La ripetibilità, intesa come imprecisione inter-sessione, di questo saggio in associazione con il sistema ELITe InGenius è stata verificata su 3 replicati del Controllo positivo, testati mediante PCR dallo stesso operatore, lotto di reagente, strumento, nello stesso ambiente e in 2 giorni diversi (1sessione/giorno per 2 giorni, con un campione in 3 replicati/sessione). Il test è stato eseguito in due diversi laboratori.

I risultati sotto forma di valori di Ct per ciascun target sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità (CV%), ottenendo in tal modo la ripetibilità come imprecisione inter-sessione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Ripetibilità inter-sessione										
campione	sessioni	Target g16			Target g18			Target HR		
		Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%
PC	sessione 1 + sessione 2	19,49	0,38	1,94	20,38	0,29	1,43	21,31	0,39	1,81
PC	sessione 3 + sessione 4	19,91	0,22	1,10	21,56	0,25	1,15	22,24	0,20	0,88

La ripetibilità di questo saggio, sotto forma di CV% inter-sessione, non ha superato il 2% per tutti i target.

Riproducibilità

La riproducibilità, sotto forma di variabilità "Instrument to Instrument" (strumento-strumento), di questo saggio in associazione con il sistema ELITe InGenius è stata verificata su 6 replicati del Controllo positivo, testati mediante PCR con lo stesso lotto di reagente, operatori diversi, in due diversi laboratori, in giorni diversi, con 2 diversi strumenti. (2 sessioni/ strumento, per 2 strumenti, con un campione in 3 replicati/sessione).

I risultati sotto forma di valori di Ct per ciascun target sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità (CV%), ottenendo in tal modo la riproducibilità come imprecisione inter-strumenti.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Riproducibilità Inter - strumenti									
campione	Target g16			Target g18			Target HR		
	Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%	Ct media	SD	CV%
PC	19,85	0,17	0,84	20,99	0,55	2,62	21,82	0,33	1,49

La riproducibilità di questo saggio, sotto forma di CV% inter-strumenti, non ha superato il 3% per tutti i target.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata testando:
- 143 campioni cervicali negativi per HPV16,
- 151 campioni cervicali negativi per HPV18,
- 92 campioni cervicali negativi per HR-HPV

I campioni, precedentemente testati con una metodica di amplificazione Real Time MFDS certificata (OmniPlex-HPV, Genematrix, Korea), sono stati testati con questo saggio in associazione con ELITe InGenius system in modalità "Extract + PCR".
I risultati, dopo risoluzione degli invalidi e dei discrepanti, sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
campioni cervicali negativi per HPV16	143	0	143	0
campioni cervicali negativi per HPV18	151	0	151	0
campioni cervicali negativi per HR-HPV	92	1	91	0

In queste prove un campione cervicale ha dato un risultato positivo discrepante. Questo risultato può essere spiegato dal basso titolo di patogeno che potrebbe essere al di sotto del limite di rilevabilità del metodo di riferimento.
La specificità diagnostica del saggio in queste prove è risultata uguale a 100% for HPV16, uguale a 100% for HPV18 e uguale a 98.9 % per HR-HPV.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 35 valido per ciascuna matrice validata.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata testando:
- 29 campioni cervicali positivi per HPV16,
- 21 campioni cervicali positivi per HPV18,
- 76 campioni cervicali positivi per HR-HPV

I campioni, precedentemente testati con una metodica di amplificazione Real Time MFDS certificata (OmniPlex-HPV, Genematrix, Korea), sono stati testati con questo saggio in associazione con ELITe InGenius system in modalità "Extract + PCR".
I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
campioni cervicali positivi per HPV16	29	29	0	0
campioni cervicali positivi per HPV18	21	21	0	0
campioni cervicali positivi per HR-HPV	76	76	0	0

La sensibilità diagnostica del saggio in queste prove è risultata uguale al 100 % per tutti i target.

7500, 7500 Fast Real-Time PCR System
CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Campioni cervicali

Identificare i campioni cervico-vaginali raccolti in tampone UTM per l'estrazione del DNA secondo quanto disposto dalle linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (+18/+25° C) per un massimo di due giorni o a +2/+8° C per un massimo di due giorni.
I campioni cervico-vaginali possono essere congelati e conservati a -20° C per un massimo di due mesi oppure a -70° C per due anni. Evitare cicli di congelamento/scongelamento. Il congelamento può indurre la precipitazione degli inibitori, la lisi cellulare e la degradazione degli acidi nucleici dei patogeni.

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA su campioni cervicali mediante il prodotto **QIAamp DNA Mini Kit**, seguire attentamente il manuale di istruzioni per l'uso.

Sostanze interferenti

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

Controlli di amplificazione

È obbligatorio validare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una per il controllo positivo.
- come controllo positivo utilizzare il reagente **HR-HPV Positive Control** (in dotazione con questo kit)
- come controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit)

Controlli di qualità

Si raccomanda di validare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione di estrazione e amplificazione utilizzando un campione testato negativo e uno testato positivo o un materiale di riferimento calibrato.

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time
(da eseguire nell'area di amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione)

Se si utilizza lo strumento **7500, 7500 Fast Real-Time PCR System**.

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer, avviare il software dedicato;
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *g16* con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "g16"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *g18* con il "reporter" = "JOE" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "g18"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *HR* con il "reporter" = "Texas Red" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "HR"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda controllo interno con il "reporter" = "Cy5" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC".

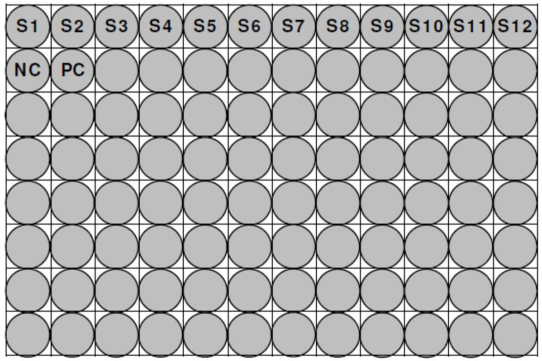
Se si utilizza lo strumento **CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD**.

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer, avviare il software
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *g16* con il "reporter" = "FAM" e chiamarlo "g16"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *g18* con il "reporter" = "JOE" e chiamarlo "g18"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda *HR* con il "reporter" = "Cal fluor red 610" e

chiamarlo "HR"
- impostare il "detector" (Detector Manager) per la sonda controllo interno con il "reporter" = "Quasar 670" e chiamarlo "IC";

Riportare questi dati sul **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso oppure stampare le impostazioni della micropiastra. Attenersi rigorosamente al **Piano di lavoro** durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

Si riporta di seguito, a titolo esemplificativo, come può essere organizzata l'analisi qualitativa di 12 campioni



Legenda: S1 - **S12**: Campioni da analizzare; **NC**: controllo negativo di amplificazione; **PC**: controllo positivo di amplificazione.

Con l'ausilio della documentazione fornita con lo strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:
- aggiungere alla fase di amplificazione (Add Step) una fase di **allungamento a 72° C**;

Ciclo termico				
Fase		**Temperature**	**Durata**	**Ciclo**
1	Decontaminazione	50° C	2 min.	1 ciclo
2	Denaturazione iniziale	95° C	10 min.	1 ciclo
3	Denaturazione	95° C	15 sec.	45 cicli
	Annealing	54° C	60 sec.	
	Elongation	72° C	30 sec.	

*Impostazione dello strumento; per 7500, 7500 Fast -selezionare ON per la raccolta dati per CFX-selezionare 'Add plate Read to Step'.

Allestimento della amplificazione
(da effettuare nell'area di estrazione/allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione, è necessario:
- scongelare le provette contenenti i campioni da analizzare. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e collocarle su ghiaccio,
- scongelare a temperatura ambiente le provette contenenti la miscela **HR-HPV Reaction Mix** occorrenti per la sessione, tenendo presente che ogni provetta è sufficiente per **32 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e quindi collocarle su ghiaccio;
- scongelare a temperatura ambiente le provette contenenti la miscela **HR-HPV Probe Mix** occorrenti per la sessione, tenendo presente che ogni provetta è sufficiente per preparare **32 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e quindi collocarle su ghiaccio;
- scongelare a temperatura ambiente la provetta contenente **HR-HPV Positive Control**. Agitare

delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e quindi collocarle su ghiaccio;
- prendere l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata durante la sessione, avendo cura di indossare guanti senza polvere e facendo attenzione a non danneggiare i pozzetti.
- prendere la **l'Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzata durante la sessione, avendo cura di indossare guanti senza polvere e facendo attenzione a non danneggiarla,
- preparare una provetta da 2 ml contenente acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo prodotto) per la miscela di reazione completa **HR-HPV PCR Mix** e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un marcatore permanente,
- calcolare i volumi dei due componenti in dotazione con il kit necessari per preparare la miscela di reazione completa **HR-HPV PCR Mix** in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Nota: Per calcolare i volumi dei due componenti è necessario definire il numero di reazioni (N) della sessione contando il numero dei campioni da analizzare, un controllo positivo e un controllo negativo più almeno una reazione per avere un margine di sicurezza.

Numero di campioni (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
N	(N+1) x 12,5 µl	(N+1) x 7,5 µl

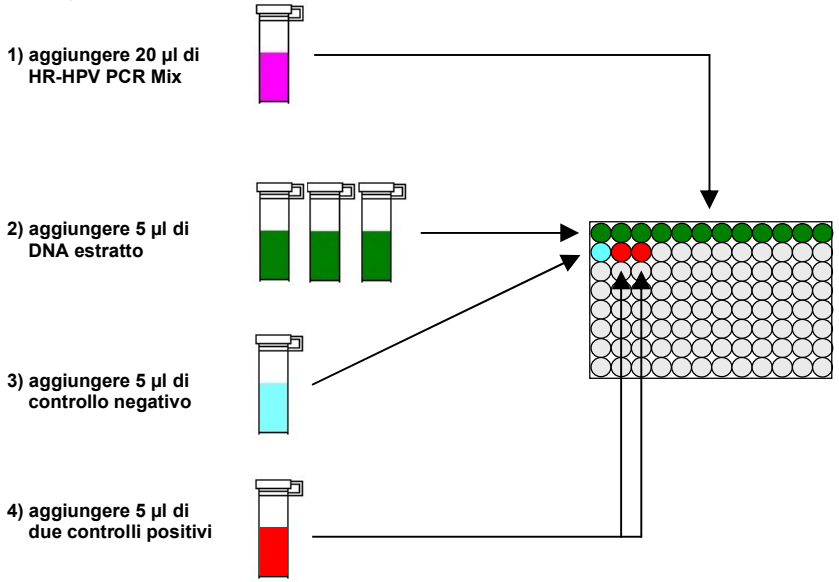
- Preparare la miscela di reazione completa **HR-HPV PCR Mix** aggiungendo all'apposita provetta i volumi calcolati dei due componenti.
- Mescolare pipettando facendo attenzione a non formare bolle d'aria.

Allestire le reazioni come descritto di seguito.

1. Con l'ausilio di una pipetta, trasferire accuratamente **20 µl** di **HR-HPV PCR Mix** sul fondo dei pozzetti della **Amplification microplate**, come descritto nel **Piano di lavoro**. Attenzione a non formare bolle d'aria.
2. Con l'ausilio di una pipetta, trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **5 µl** di **DNA estratto** del primo campione nel pozzetto corrispondente della **Amplification microplate**, come precedentemente descritto nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando il **DNA estratto** tre volte nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria. Ripetere la procedura con gli altri campioni di **DNA estratto**.
3. Con l'ausilio di una pipetta, trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **5 µl** di **acqua per biologia molecolare** (non in dotazione con il prodotto) nel pozzetto della **Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione, come precedentemente descritto nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il Controllo negativo pipettando l'**acqua per biologia molecolare** tre volte nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
4. Con l'ausilio di una pipetta, trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **5 µl** di **HR-HPV Positive Control** nel pozzetto corrispondente della **Amplification microplate**, come precedentemente descritto nel **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando il prodotto **HR-HPV Positive Control** tre volte nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
5. Coprire accuratamente la **Amplification microplate** con l'apposita **l'Amplification Sealing Sheet**.
6. Trasferire la **Amplification microplate** nel thermal cycler per real time nell'area di amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico di amplificazione, salvando l'impostazione della sessione con un nome di file univoco e riconoscibile.

Nota: Alla fine del ciclo termico, rimuovere dallo strumento la **Amplification microplate** contenente i prodotti di reazione e smaltirla facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Per evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione, non rimuovere **dalla Amplification microplate la l'Amplification Sealing Sheet**.

La figura sottostante illustra sinteticamente l'allestimento della reazione di amplificazione.



Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalle sonde specifiche per i target ("g16.", "g18", "HR") e dalla sonda specifica per il controllo interno ("IC") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Nota: L'analisi dei dati si esegue con il software di sistema dello strumento e nel rispetto delle istruzioni del fabbricante.

Prima di eseguire l'analisi, impostare i valori soglia (Threshold) e di fluorescenza di fondo (Baseline), come descritto di seguito. I valori della fluorescenza emessi dalle sonde specifiche durante la reazione di amplificazione e il valore **soglia** della fluorescenza consentono di determinare il **Threshold cycle (Ct)**, il ciclo in cui la fluorescenza ha raggiunto il valore **soglia**.

Quando si usa lo strumento **7500, 7500 Fast Real-Time PCR System**:

Target	Impostazione del valore soglia	baseline	
		start	end
HPV tipo 16	20.000	3	15
HPV tipo 18	20.000	3	15
HPV ad alto rischio	20.000	10	15
IC	10.000	3	15

Quando si usa **CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD**:

Target	Impostazione del valore soglia	baseline	
		start	end
HPV tipo 16	300	3	15
HPV tipo 18	300	3	15
HPV ad alto rischio	300	10	15
IC	100	3	15

Controllo positivo

Nelle reazioni di amplificazione di HR-HPV Positive Control, i valori di Ct servono per validare l'amplificazione e la rilevazione, come descritto nella tabella sottostante:

Reazione HR-HPV Positive Control detector FAM "g16"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
22 ± 3	POSITIVO	CORRETTO

Reazione HR-HPV Positive Control detector JOE "g18"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
23 ± 3	POSITIVO	CORRETTO
Reazione HR-HPV Positive Control detector Texas Red "HR"	**Risultato del saggio**	**Amplificazione/rilevazione**
22 ± 3	POSITIVO	CORRETTO

Reazione HR-HPV Internal Control detector Cy5 "HR"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
*U.D or N/A	-	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione con il **controllo positivo** è **oltre i limiti indicati** o **Ct Undetermined**, il DNA target non è stato rilevato correttamente. Ciò significa che durante la fase di amplificazione o di rilevazione vi sono stati dei problemi (errata distribuzione della miscela di reazione o dei controlli positivi, degradazione della miscela di reazione o dei controlli positivi, errata impostazione del ciclo termico), che possono aver determinato errori nei risultati. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Controllo negativo

Nella reazione di amplificazione sul controllo negativo, i valori di Ct di HR-HPV servono per validare l'amplificazione e la rilevazione, come descritto nella tabella sottostante:

Reazione HR-HPV Negative Control detector FAM "g16"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
*U.D or N/A	NEGATIVO	CORRETTO

Reazione HR-HPV Negative Control detector JOE "g18"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
*U.D or N/A	NEGATIVO	CORRETTO
Reazione HR-HPV Negative Control detector Texas Red "HR"	**Risultato del saggio**	**Amplificazione/rilevazione**
*U.D or N/A	NEGATIVO	CORRETTO

Reazione HR-HPV Internal Control detector Cy5 "HR"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
*U.D or N/A	-	CORRETTO

Si consiglia l'uso del **controllo negativo** nella fase di isolamento del DNA allo scopo di validare la procedura. Non è necessario rilevare tutto il segnale.

Nota: se il risultato dell'amplificazione per il controllo negativo è diverso da "U.D or N/A", ciò significa che si sono verificati problemi durante l'amplificazione. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Campioni

I risultati espressi come Ct delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** si usano come descritto nella tabella sottostante:

N.	Valore di Ct				Positivo o negativo				Risultato
	g16	g18	HR	IC	g16	g18	HR	IC	
1	≤45	≤45	≤45	≤35	+	+	+	+	g16, g18 and HR Positivo
2	≤45	≤45	≤45	*U.D or N/A	+	+	+	-	**g16, g18 and HR Positivo
3	≤45	≤45	U.D or N/A	≤35	+	+	-	+	g16 and g18 Positivo
4	≤45	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	+	+	-	-	g16 and g18 Positivo
5	≤45	U.D or N/A	≤45	≤35	+	-	+	+	g16 and HR Positivo
6	≤45	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	+	-	+	-	g16 and HR Positivo
7	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	≤35	+	-	-	+	g16 Positivo
8	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	+	-	-	-	g16 Positivo
9	U.D or N/A	≤45	≤45	≤35	-	+	+	+	g18 and HR Positivo
10	U.D or N/A	≤45	≤45	U.D or N/A	-	+	+	-	g18 and HR Positivo
11	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	≤35	-	+	-	+	g18 Positivo
12	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	-	+	-	-	g18 Positivo
13	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	≤35	-	-	+	+	HR Positivo
14	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	-	-	+	-	HR Positivo
15	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	≤39	-	-	-	+	Negativo
16	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	-	-	-	-	***Non valido

Nota:
*U.D: non determinato
N/A: non applicabile
** Quando il DNA target viene rilevato nella reazione di amplificazione di un campione, il controllo interno (IC) può dare come risultato Ct non applicabile (N/A). Infatti, la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può risentire dell'effetto di annullamento dovuto alla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza per il gene target. In tal caso, il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.
*** Ciò significa che si sono verificati dei problemi che possono produrre risultati sbagliati. Non è valido e il test deve essere ripetuto.

High Risk HPV ELITe Panel
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK402ING

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, espressa come limite di rilevazione(LoD), permette di rilevare la presenza di circa 10 copie in 5 µl di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.
La sensibilità analitica del saggio, espressa come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione a varie concentrazioni.

Specificità analitica: assenza di cross-reattività.

La specificità analitica del saggio, come assenza di cross reattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata testando un totale di 80 ceppi di riferimento di microrganismi (batteri, lieviti, virus, ecc.) estranei ai target rilevati dal kit: tutti i campioni sono risultati negativi al test.

Interferenza

La potenziale interferenza delle sostanze che si possono trovare nei campioni cervicali (eritrociti, lubrificante vaginale, doccia, gel contraccettivo, crema fungicida, spermicida, muco) con questo saggio, è stata valutata addizionando le sostanze potenzialmente interferenti al campione clinico. Non è stata rilevata interferenza con le prestazioni di questo saggio in presenza di tali sostanze.

Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità diagnostica del saggio, sotto forma di conferma di campioni clinici positivi e di campioni negativi, rispettivamente, sono state verificate su un totale di 265 campioni clinici con risultati noti (105 positivi e 160 negativi).

Tutti i campioni HR-HPV positivi sono stati confermati positivi e tutti i campioni negativi sono stati confermati negativi.

Riproducibilità

La riproducibilità di questo saggio è stata verificata per le seguenti condizioni: lotti, operatori, data e luogo dei test.
Sulla base delle suddette condizioni sono stati analizzati i 14 tipi di DNA target. I risultati dei test sono stati determinati sulla base dei criteri di accettazione.

Ripetibilità

Per valutare la precisione di questo saggio, sono stati verificati i risultati ottenuti con diversi replicati dello stesso campioni di DNA target. Tutti i risultati sono risultati positivi al 100%.

BIBLIOGRAFIA

Anco Molijn, Berhard Kleter, Wim Quint, Leen-Jan van Doorn (2005) *Journal of Clinical Virology 32S* S43–S51, Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.

Tibor Tak´acs, Csaba Jeney, Laura Kov´acs, Johanna M´ozes, M´arta Benczik, Attila Sebe. (2008) *Journal of Virological Methods* 149 153–162, Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types.

P. E. Gravitt, C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutle´e, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple (Jan. 2000) *Journal of Clinical Microbiology*, p. 357–361, Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses

Nicholas R Herrel, Nadia L Johnson, Jennifer E Cameron, Janet Leigh and Michael E Hagensee (2009) *Virology Journal*, 6:90, Development and Validation of a HPV-32 Specific PCR Assay

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con campioni cervico-vaginali raccolti in tampone UTM e cellule da campioni cervico-vaginali raccolti in tampone UTM.

Non utilizzare questo prodotto con campioni contenenti mucina in concentrazione elevata, perché la mucina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è quindi necessario procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

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

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale competente 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 indumenti di lavoro e aree di lavoro idonee 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 personale competente e addestrato per le procedure di biologia molecolare, quali estrazione, amplificazione e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

Quando la sessione di amplificazione è allestista manualmente, questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione/allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione per prevenire risultati falsi positivi.

Quando la sessione di amplificazione è allestista manualmente, questo prodotto richiede l'uso di abbigliamento speciale e di strumenti solo per l'estrazione/allestimento delle reazioni di amplificazione e l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione al fine di prevenire risultati falsi positivi.

A causa di differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione al fine di valutare le differenze a livello tecnologico prima di passare ad un nuovo 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 abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (v. Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

In caso di co-infezioni, la sensibilità per un target può essere compromessa dall'amplificazione di un altro target.

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 nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo 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, falsi positivi e falsi negativi. Questo rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. Questo rischio residuo, in casi particolari, potrebbe indurre decisioni sbagliate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

High Risk HPV ELITe Panel
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK402ING

PROBLEMI E SOLUZIONI

DNA target non rilevato nelle reazioni di Controllo positivo

Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra	dispensare con cura i reagenti nei pozzetti della micropiastra seguendo il Piano di lavoro. Controllare i volumi della miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi del controllo positivo dispensati.
Errato allestimento della sessione su ELITe InGenius	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo positivo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo positivo.
Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del campione	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo.
Errata impostazione dello strumento	Controllare le impostazioni di posizione per le reazioni con il controllo positivo sullo strumento. Controllare le impostazioni del ciclo termico sullo strumento.

DNA target rilevato nella reazione di Controllo negativo

Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra	Evitare la fuoriuscita accidentale di campione dalla provetta. Cambiare sempre i puntali quando si passa da un campione all'altro. Fare attenzione quando si dispensano i campioni, il Controllo negativo e il Controllo positivo nei pozzetti della micropiastra seguendo il Piano di lavoro.
Errato allestimento della sessione su ELITe InGenius.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo negativo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo negativo.
Errore durante la fase di impostazione dello strumento.	Controllare le impostazioni di posizione dei campioni, del Controllo negativo e del Controllo positivo sullo strumento.
Micropiastra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare..	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area di estrazione/allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire le superfici e gli strumenti con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni

Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura i campioni, il controllo negativo e il controllo positivo pipettandoli tre volte nella miscela di reazione. Attenzione a non formare bolle d'aria.
Errore nell'impostazione della "baseline"	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare "Results", i dati relativi a "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere. Utilizzare il calcolo automatico della baseline impostando l'opzione "Auto Baseline".

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errato allestimento della sessione su ELITe InGenius	Controllare la posizione della PCR Mix e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix e del campione.
Degradazione del controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
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". Ripetere l'estrazione e l'amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Degradazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Errore 30103 su ELITe InGenius	
Possibili cause	**Soluzioni**
Concentrazione troppo elevata del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - selezionare la traccia relativa al campione e approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR".

High Risk HPV ELITe Panel
reagenti per l'amplificazione Real Time del DNA

REF **RTK402ING**

LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*
CE	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98\79\CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
CONT	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.
EC REP	Rappresentante autorizzato nell'Unione Europea

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

ELITe InGenius® è un marchio registrato di of ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

CONTATTI

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

Fabbricante:
OSANG Healthcare Co., Ltd
132, Anyangcheondong-ro, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, 14040, Korea
Tel.: +82-31-460-9937
Fax: +82-31-460-9933
Sito web: http://www.osanghc.com

Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
Obelis S.A
Bd. General Wahis 53,1030 Brussels, Belgium
Tel.:+32-2-732-59-54
Fax:+32-2-732-60-03
E-mail: mail@obelis.net

High Risk HPV ELITe Panel used with ELITe InGenius®

Ref.: RTK402ING

ELITechGroup EMPOWERING IVD

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

A. Intended use

The **«High Risk HPV ELITe Panel»** product is a qualitative multiplex nucleic acids real time amplification assay for the detection and differentiation of the DNA of Human Papilloma Virus 14 high-risk types in DNA samples extracted from **cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium.**
The test specifically identifies types HPV16 and HPV18 while concurrently detects the rest of the high-risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68). The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITe InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HPV16	HPV16	FAM
HPV18	HPV18	JOE/HEX
HR-HPV	HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Texas red/Cal fluor red 610
Internal Control	ABL gene	Cy5/Quasar 670

C. Validated matrix

› **Cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium**

D. Kit content

HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix	HR-HPV Positive Control
3 tubes of 550 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	3 tubes of 320 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	2 tubes of 100 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube

› **Maximum shelf-life: 18 months** **Storage: - 20°C**

E. Material required not provided in the kit

- **ELITe InGenius** instrument: INT030
- **ELITe InGenius SP200** Extraction Cartridge: INT032SP200
- **ELITe InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- **ELITe InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS
- **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
- **300 µL Filter Tips:** TF-350-L-R-S
- **2 ml tube Sarstedt:** 72.694.005

F. ELITe InGenius protocol

Sample volume	200 µL	Unit of qualitative result	cp/reaction
Total eluate volume	100 µL	Frequency of controls	15 days
Sample PCR input volume	5 µL		
PCR Mix volume	20 µL		

G. Performance

Matrix	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cervical Specimen	HPV16	10 copies/reaction	100% (29/29)*	100% (143/143)*
	HPV18	10 copies/reaction	100% (21/21)*	100% (151/151)*
	HR-HPV	10 copies/reaction	100% (76/76)*	98.9% (91/92)*

**confirmed samples/ tested samples*

H. Sample preparation

Sample Number (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
1 ≤ N ≤ 4	(N + 1) x 12.5 µL	(N + 1) x 7.5 µL
5 ≤ N ≤ 8	(N + 2) x 12.5 µL	(N + 2) x 7.5 µL
9 ≤ N ≤ 12	(N + 3) x 12.5 µL	(N + 3) x 7.5 µL

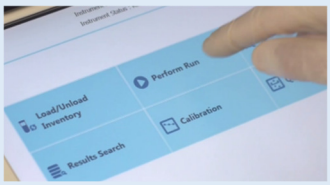
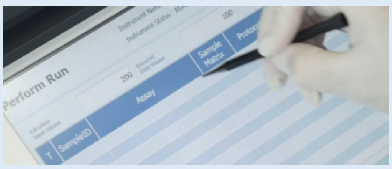
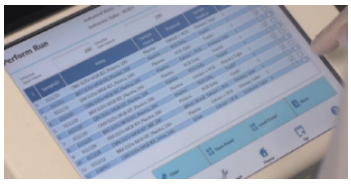
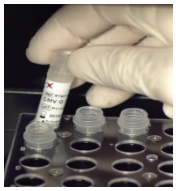
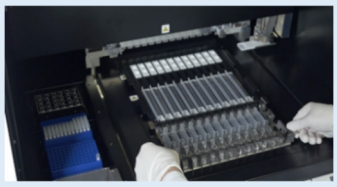
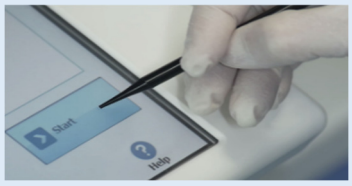
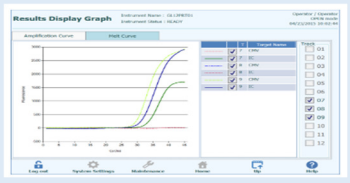
I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITe InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	**2.** Verify controls: HR-HPV ELITe Pos. and neg. controls in the “Control menu” NB: Both have been run, approved and not expired *NB:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the HR-HPV PCR Mix components. Prepare the complete reaction mixture as described in the paragraph H Vortex gently Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen 	**2.** Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, eluate: “100 µL” 	**3.** Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the “Assay protocol” of interest 	**5.** Select the sample position: Extraction tube 	**6.** Load the complete reaction mixture HR-HPV PCR Mix in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, Extraction tube racks 	**8.** Close the door Start the run 	**9.** View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	**5.** Select the protocol “PCR only” and set the sample position “Extra tube”	**6.** Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4
7. Load the PCR cassette rack HR-HPV Reconstitution PCR-Mix in the inventory block	**8.** Close the door Start the run	**9.** View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	**5.** Select the protocol “Extraction Only” and set the sample position: Extraction tube	**6.** Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction tube racks
7. Close the door Start the run	**8.** Archive the eluate sample	

High Risk HPV ELITe Panel used with Open Platforms

Ref. RTK402ING

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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

A. Intended use

The **«High Risk HPV ELITe Panel»** product is a qualitative multiplex nucleic acids real time amplification assay for the detection and differentiation of the DNA of Human Papilloma Virus 14 high-risk types in DNA samples extracted from **cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium.**
The test specifically identifies types HPV16 and HPV18 while concurrently detects the rest of the high-risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68). The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **7500, 7500 Fast Real-Time PCR System and CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD.**

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HPV16	HPV16	FAM
HPV18	HPV18	JOE/HEX
HR-HPV	HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Texas red/Cal fluor red 610
Internal Control	ABL gene	Cy5/Quasar 670

C. Validated matrix

› **Cervical specimens collected in UTM medium and cell from cervical specimens collected in UTM medium**

D. Kit content

HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix	HR-HPV Positive Control
3 tubes of 550 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	3 tubes of 320 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube	2 tubes of 100 µL 100 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube

Maximum shelf-life: 18 months **Storage: - 20°C**

E. Material required not provided in the kit

- 7500 RT PCR System ref: 4351105
- 7500 Fast RT PCR System ref: 4351106
- Biorad CFX96: Ref.1845097
- 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005)
- Molecular biology grade water
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode
- 0.1 mL Hard-Shell 96-Well PCR Plates: Bio-Rad, code HSP9601
  Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film: Bio-Rad, code MSB1001

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ABI 7500, 7500 Fast	Cervical specimens	10 copies/reaction	**100%** (105/105)*	**100%** (160/160)*
CFX96	Cervical specimens	10 copies/reaction	**100%** (105/105)*	**100%** (160/160)*

**confirmed samples/tested samples*

G. Sample preparation

Sample Number (N)	HR-HPV Reaction Mix	HR-HPV Probe Mix
N	(N + 1) x 12.5 µL	(N + 1) x 7.5 µL

H. Procedure

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

Amplification - Settings of 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System.

1. Switch on the thermal cycler
2. Set “g16” detector with “FAM” and quencher “none”
3. Set “g18” detector with “JOE” and quencher “none”
4. Set “HR” detector with “Texas Red” and quencher “none”
5. Set “IC” detector with “Cy5” and quencher “none”
6. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during Elongationstep at 72°C

Stage	Temperature	Timing
UDG-reaction	50°C	2 min
Pre-Denaturation	95°C	10 min
Denaturation	95°C	15 sec
Annealing	54°C	60 sec
Elongation	72°C	30 sec
45 cycles		

Amplification - Settings of CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD.

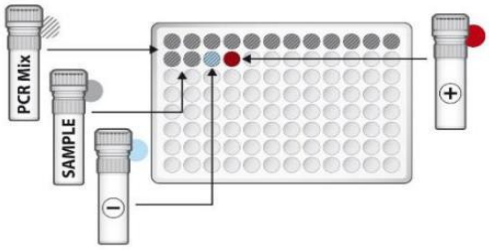
1. Switch on the thermal cycler
2. Set “g16” detector with “FAM”
3. Set “g18” detector with “HEX”
4. Set “HR” detector with “Cal fluor red 610”
5. Set “IC” detector with “Quasar 670”
6. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition must be set during Elongationstep at 72°C

Stage	Temperature	Timing
UDG-reaction	50°C	2 min
Pre-Denaturation	95°C	10 min
Denaturation	95°C	15 sec
Annealing	54°C	60 sec
Elongation	72°C	30 sec
45 cycles		

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw the HR-HPV PCR Mix components.
2. Prepare the complete reaction mixture HR-HPV PCR Mix as described in the paragraph G
3. Mix gently and spin-down
4. Pipet **20 µL** of HR-HPV PCR Mix in all microplate wells in use
5. Add **5 µL** of extracted DNA in sample wells, **5 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **5 µL** of the HR-HPV Positive Controls

   Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
6. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
7. Transfer the microplate in the thermal cyclerand start



Amplification - Threshold for qualitative analysis 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System

Target	Threshold setting	Baseline	
		Start	End
HPV Type #16	20,000	3	15
HPV Type #18	20,000	3	15
HPV High Risk	20,000	10	15
IC	10,000	3	15

Amplification - Threshold for qualitative analysis CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD

Target	Threshold setting	Baseline	
		Start	End
HPV Type #16	300	3	15
HPV Type #18	300	3	15
HPV High Risk	300	10	15
IC	100	3	15

Interpretation - Qualitative results

#	Ct value				Positive or Negative				Results
	g16	g18	HR	IC	g16	g18	HR	IC	
1	≤45	≤45	≤45	≤35	+	+	+	+	g16, g18 and HR Positive
2	≤45	≤45	≤45	*U.D or N/A	+	+	+	-	**g16, g18 and HR Positive
3	≤45	≤45	U.D or N/A	≤35	+	+	-	+	g16 and g18 Positive
4	≤45	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	+	+	-	-	g16 and g18 Positive
5	≤45	U.D or N/A	≤45	≤35	+	-	+	+	g16 and HR Positive
6	≤45	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	+	-	+	-	g16 and HR Positive
7	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	≤35	+	-	-	+	g16 Positive
8	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	+	-	-	-	g16 Positive
9	U.D or N/A	≤45	≤45	≤35	-	+	+	+	g18 and HR Positive
10	U.D or N/A	≤45	≤45	U.D or N/A	-	+	+	-	g18 and HR Positive
11	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	≤35	-	+	-	+	g18 Positive
12	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	U.D or N/A	-	+	-	-	g18 Positive
13	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	≤35	-	-	+	+	HR Positive
14	U.D or N/A	U.D or N/A	≤45	U.D or N/A	-	-	+	-	HR Positive
15	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	≤39	-	-	-	+	Negative
16	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	U.D or N/A	-	-	-	-	***Invalid

Note:

*U.D: Undetermined

N/A: Not applicable

** When the target DNA is detected in a sample amplification reaction, the internal control (IC) may give the result as Ct Not applicable (N/A). In fact, the low-efficiency amplification reaction for the internal control may be displaced by competition from the high-efficiency amplification reaction for Target gene. In such a case, the sample is nevertheless suitable, and the positive result of the assay is valid.

*** This means that problems have occurred which may lead to incorrect results. It is not valid and the test needs to be repeated.