

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

AVVERTENZA del 23/01/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«HHV7 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS037PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Estensione d'uso in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius[®]» (REF INT040) e le matrici sangue intero e plasma.*
- *Aggiornate le Caratteristiche di Prestazione:*
 - *Valori di LoD, LLoD e ULoD confermate in matrice*
 - *Ripetibilità e Riproducibilità calcolate in matrice*
 - *Valore dell'Internal-cut off cambiato da 36 a 35*

Composizione e utilizzo 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
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



HHV7 ELITE MGB® Kit
reagenti per la Real-Time PCR del DNA

REF RTS037PLD



INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 2
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	pag. 5
PROCEDURA ELITE InGenius	pag. 7
PROCEDURA ELITE BeGenius	pag. 12
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	pag. 17
CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI STRUMENTI	pag. 23
PROCEDURA ALTRI STRUMENTI	pag. 24
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ALTRI STRUMENTI	pag. 33
BIBLIOGRAFIA	pag. 35
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 36
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 37
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 41
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 42
ALLEGATO: QUICK START GUIDE	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB® Kit** è un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus erpetico umano 7 (HHV7)**, in campioni di DNA estratto da sangue intero raccolto in EDTA, da plasma raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano (CSF).

Il saggio è 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 e plasma raccolti in EDTA.

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **7300 Real-Time PCR System and 7500 Real-Time PCR System** e a campioni umani di sangue intero e plasma raccolti in EDTA, e fluido cefalorachidiano.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da HHV7, insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

HHV7 ELITE MGB® Kit
reagenti per la Real-Time PCR del DNA

REF RTS037PLD

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR quantitativa per la rilevazione del DNA di HHV7, isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente **HHV7 Q PCR Mix**, che contiene primers e sonde con tecnologia MGB.

Le sonde ELITE MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La concentrazione del DNA di HHV7 è calcolata rispetto ad una curva di calibrazione.

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

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** fornisce il reagente **HHV7 Q - PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

- una regione del **gene U57** codificante una proteina capsidica di HHV7, rilevata nel canale **HHV7**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM
- la sequenza artificiale **IC2** del Controllo Interno (**IC**), rilevato nel canale **IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

La **HHV7 PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del Cy5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione, e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto **ELITE MGB Kit** consente di **effettuare 96 test** in associazione con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL di **HHV7 PCR Mix** per reazione.

Il prodotto consente di effettuare **100 test in associazione ad altri sistemi**, utilizzando 20 µL di **HHV7 PCR Mix** per reazione.

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** può essere anche utilizzato in associazione con altri strumenti equivalenti.

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HHV7 Q-PCR Mix cod. RTS037PLD	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR in provetta con tappo trasparente	4 x 540 µL	-

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~3,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Thermomixer.
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).

- Acqua per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di inibizione, i controlli positivo e negativo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
<p>ELITe InGenius (ELITeTechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITe InGenius Software versione 1.3.0.17 (o successiva) HHV7 ELITe STD, Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori HHV7 ELITe PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HHV7 ELITe NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HHV7 ELITe WB_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero. HHV7 ELITe PL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma</p>	<p>ELITe InGenius SP 200 (EG SpA, cod. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, cod. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, cod. INT035PCR) ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, cod. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITe BeGenius CPE - Internal Control (EG SpA, cod. CTCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD037PLD) HHV7 - ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR037PLD)</p>
<p>ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITe BeGenius Software versione 2.1.0. (o successiva) HHV7 ELITe Be STD, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori HHV7 ELITe Be PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HHV7 ELITe Be NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HHV7 ELITe Be WB_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero. HHV7 ELITe Be PL_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma.</p>	<p>MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, cod. N8010560) CPE – Internal Control (EG SpA, cod. CTCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR037PLD) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, cod. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>
<p>7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, cod. 4351101) QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, cod. 200111)</p>	<p>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (LifeTechnologies, cod. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA., cod. CTCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR037PLD) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, cod. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985) QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, cod. 9001297, 9001301) NucliSENS easyMAG (bioMérieux SA, cod. 200111)</p>	<p>MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (LifeTechnologies, cod. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA., cod. CTCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, cod. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, cod. CTR037PLD) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, cod. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, cod. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>

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 potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

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

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

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

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

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

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

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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.

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

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

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

Manipolare i campioni estratti in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità On board (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)
HHV7 PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque	fino a cinque sessioni indipendenti* da tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna più il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro)

*con congelamento intermedio

CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

Campioni

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

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Sangue intero	EDTA	≤ 24 ore	≤ 72 ore	≤ 1 mese	> 1 mese
Plasma	EDTA	≤ 24 ore	≤ 72 ore	≤ 1 mese	> 1 mese

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per eseguire l'analisi dei campioni su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit **ELITE MGB** e **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con le matrici indicate.

Assay Protocol per HHV7 ELITE MGB Kit				
Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Sangue intero	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_WB_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluzione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_WB_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluzione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
Plasma	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_PL_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluzione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_PL_200_100	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluzione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Per tutti i protocolli, il trasferimento di 200 µL di campione in un Extraction tube (per **ELITE InGenius**) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per **ELITE BeGenius**) è facoltativo.

NOTA: Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Nota: Il trasferimento con le pipette dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione "Avvertenze e precauzioni".

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

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

Non utilizzare plasma raccolto in eparina, che è un noto inibitore di trascrizione inversa e PCR. Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Calibratori e Controlli di PCR

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Curva di Calibrazione, utilizzare il prodotto **HHV7 ELITE Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **HHV7 ELITE_STD** o **HHV7 ELITE_Be_STD**.

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

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare il prodotto **HHV7 - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **HHV7 ELITE_PC** o **HHV7 ELITE_Be_PC**.
- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **HHV7 ELITE_NC** o **HHV7 ELITE_Be_NC**.

Nota: ELITE InGenius ed **ELITE BeGenius** richiedono la generazione e l'approvazione della curva di calibrazione e risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR. Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni** e la validazione dei risultati dei controlli di PCR, approvati e memorizzati nel database scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente la curva di calibrazione e l'analisi dei controlli positivi e negativi.

Inoltre, i calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

Controlli di qualità

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

PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HHV7 ELITe MGB Kit** con **ELITe InGenius** si articola in tre fasi:

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

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i calibratori (**HHV7 Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **HHV7 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito,
 - nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**HHV7 Positive Control**, **HHV7 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **HHV7 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "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.

I protocolli per l'analisi qualitativa sono disponibili su richiesta.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV7 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITe InGenius** per eseguire:

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

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

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

Prima di impostare una sessione:

-Scongelare le provette necessarie di **HHV7 Q - PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

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

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

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Scongelare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongelare a temperatura ambiente gli Elution tubes con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
6	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only".
7	Selezionare "Extraction tube" nella colonna "Sample Position".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" come posizione in cui caricare il campione.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Caricare il CPE e la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .
12	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
13	Caricare le PCR cassette , le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le PCR cassette e gli Elution tube con i campioni da analizzare.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start".	Premere "Start".

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni). Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL
4	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Q-PCR Standard.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
6	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".
7	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	Caricare la PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
8	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i Tip Rack .
10	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
11	Caricare le PCR cassette e le provette per il Q-PCR Standard	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

Dopo il completamento della procedura, **ELITe InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ±10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

Nota: Gli **HHV7 Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

Nota: Il **HHV7 Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** contenenti i prodotti della reazione di PCR, gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la

fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

ELITe InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display" nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

ELITe InGenius genera i risultati del prodotto **HHV7 ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- Validazione della Curva di Calibrazione,
- Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati dei campioni,
- Refertazione dei risultati dei campioni.

A. Validazione della Curva di Calibrazione

L' **ELITe InGenius software** interpreta i risultati di PCR per il target dei calibratori con i parametri inclusi nell' Assay Protocol **HHV7 ELITe STD**. Il Ct risultante rispetto alla concentrazione genera la curva di calibrazione.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente di PCR, vengono registrate nel database (Calibration). Esse possono essere consultate e approvate da personale avente qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

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

Nota: Se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" si visualizza il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute. Se la curva di calibrazione viene processata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

Il **software ELITe InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol "**HHV7 ELITe_PC**" e "**HHV7 ELITe_NC**". I valori di Ct e Tm ottenuti sono utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**. I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITe InGenius** per impostare i grafici di controllo che monitorano le prestazioni delle fasi di amplificazione. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento

Nota: Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

Nota: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati dei campioni

Il software **ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione dei target (canale **HHV7**) e del controllo interno (canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **HHV7 ELITE_WB_200_100** e **HHV7 ELITE_PL_200_100**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

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

1) Curva di calibrazione	Status
HHV7 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo Positivo	Status
HHV7 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo Negativo	Status
HHV7 Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal software **ELITE InGenius** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se i DNA dei patogeni è stato rilevati o non rilevato.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HHV7:DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL	Il DNA di HHV7 è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità mostrata.
HHV7:DNA rilevato, quantità inferiore a "LLOQ" copie/mL	Il DNA di HHV7 è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio
HHV7:DNA rilevato, quantità oltre "ULOQ" copie/mL	Il DNA di HHV7 è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio.
HHV7:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL	Il DNA di HHV7 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di HHV7 oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Non Valido-Ripetere il campione	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato " Non Valido-Ripetere il campione": in questo caso il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione o amplificazione (e.g. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only".

In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi "Risoluzione dei problemi").

I campioni segnalati come "HHV7:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di HHV7". In tal caso non si può escludere che il DNA di HHV7 sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di HHV7 ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione, quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "HHV7:DNA rilevato, quantità inferiore a LLOQ" (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di HHV7 ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono identificati nel report come "HHV7:DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL" (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per il DNA di HHV7 ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio sono identificati nel report come "HHV7:DNA rilevato, quantità oltre "ULOQ" copie / mL" e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi "Caratteristiche delle prestazioni"). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o la PCR e ritestato al fine di ottenere risultati all'interno del range di misurazione lineare del saggio.

Nota: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio riguardanti il paziente.

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

D. Refertazione dei risultati dei campioni

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

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

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

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

PROCEDURA ELITE BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** con **ELITE BeGenius** si articola in tre fasi:

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

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITE BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i calibratori (**HHV7 Q - PCR Standard**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di **HHV7 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito,
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**HHV7 Positive Control, HHV7 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **HHV7 PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo "Campioni e Controlli), specificamente validati per **ELITE BeGenius** e le matrici indicate.

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.

FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITE BeGenius** per eseguire:

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

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

Nota: Il sistema **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 le provette necessarie di **HHV7 PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test** (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

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

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

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Scongelerare le provette necessarie di controllo interno CPE a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	Scongelerare a temperatura ambiente gli " Elution tubes " con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere tutti i Racks dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": " Extract + PCR ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
5	Caricare i campioni nel " Sample Rack ". Quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack"	Caricare gli eluati dei campioni estratti nell'" Elution Rack ".
6	Inserire il " Sample Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il SID).	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli " Elution tube " nell'" Elution Rack ".	Non applicabile
13	Inserire l'" Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando "Lane 2" (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
16	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX e / o CPE inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX inserire "S/N", "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il " PCR Basket " con le " PCR Cassette " nell'Inventory Area.	Caricare il " PCR Basket " con le " PCR Cassette " nell'Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l'" Extraction Basket " con le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere "Start".	Premere "Start".

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Scongelare le provette di Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni). Preparare il Controllo Negativo trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run ".
3	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i Racks dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
5	Caricare le provette di Q-PCR Standard nell' "Elution Rack".	Caricare le provette di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nell' "Elution Rack".
6	Inserire l' " Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol..".	Inserire l' " Elution Rack " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol..".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l' "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l' "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Click "Next" to continue.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR MIX inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i " Tip Rack ".
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il " PCR Basket " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.	Caricare il " PCR Basket " con le " PCR Cassette " nell' Inventory Area.
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
	Premere "Start".	Premere "Start".

Dopo il completamento della procedura, **ELITE BeGenius** permette di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati, e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 ±10 °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a -20 °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro); mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

Nota: l'**HHV7 Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smettere le provette di **Controllo Negativo**.

Nota: l'**HHV7 Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della corsa rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** contenenti i prodotti della reazione di PCR e i materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

FASE 3 – Esame ed approvazione dei risultati

ELITE BeGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

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

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

ELITE BeGenius genera i risultati del prodotto **HHV7 ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

- Validazione della Curva di Calibrazione
- Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati dei campioni,
- Refertazione dei risultati dei campioni.

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Sensibilità analitica: limite del bianco con Sangue Intero

A causa dell'elevata prevalenza di HHV7 nella popolazione (circa 80%) riportata in letteratura (Michael Kidd et al.) è attesa una certa percentuale di risultati bassi positivi clinicamente non significativi quando si analizzano campioni di sangue intero. Al fine di ottenere la negatività del saggio con questo tipo di campioni, è stato definito un cut-off del valore di Ct per il target HHV7 uguale a 35 con l'ELITe InGenius e l'ELITe BeGenius.

I risultati su ELITe InGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Limite del bianco con Sangue Intero in EDTA ed ELITe InGenius			
Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HHV7	35	0	35

I risultati su ELITe BeGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Limite del bianco con Sangue Intero in EDTA ed ELITe BeGenius			
Campioni	N	positive	negative
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HHV7	20	0	20

Nel test del limite del bianco, il HHV7 ELITe MGB Kit ha rilevato correttamente tutti i campioni testati come atteso applicando il cut-off del valore di Ct per il target HHV7.

Sensibilità analitica: limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) dell'amplificazione del DNA, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie di DNA nei 20 µL aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica di questo saggio è stata testata su ELITe InGenius utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 10 µL insieme a un DNA plasmidico contenente il controllo interno ad un titolo di 20.000 copie / 10 µL.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico HHV7 + 20.000 copie di controllo interno	18	18	0

Il valore di LoD teorico è stato verificato testando con ELITe InGenius e ELITe BeGenius un pool di campioni di Sangue intero e Plasma raccolti in EDTA positivamente con materiale di riferimento di HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST) alla concentrazione teorica.

I risultati ottenuti hanno confermato il valore di LoD per il target di HHV7 ELITe MGB Kit, sia su ELITe InGenius che su ELITe BeGenius.

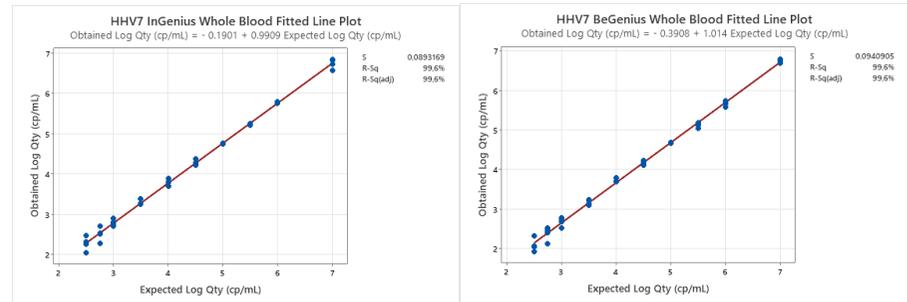
Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare di HHV7 ELITe MGB Kit è stato determinato nei campioni di Sangue intero e Plasma raccolti in EDTA con ELITe InGenius and ELITe BeGenius.

Per Sangue Intero:

L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato utilizzando un pannello di diluizioni di DNA target di HHV7 in campioni negativi di Sangue intero.

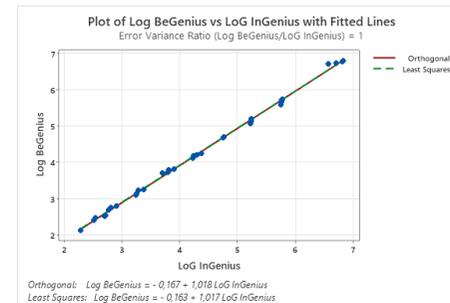
I risultati sono riportati nella seguente figura.



L'intervallo di misurazione lineare in copie / mL per Plasma in EDTA è calcolato applicando il Fattore di conversione specifico riportato nella sezione seguente.

I risultati ottenuti con ELITe InGenius e ELITe BeGenius sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono riassunti nella figura seguente.

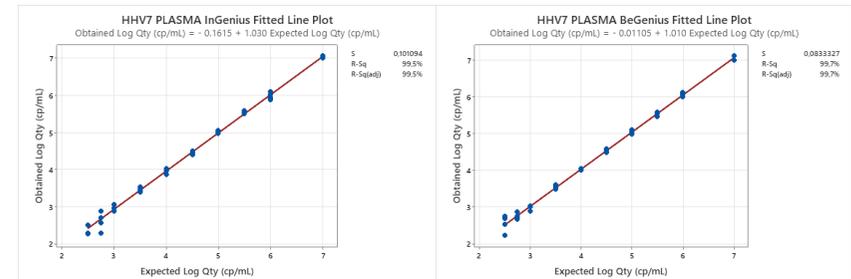


L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0.167 (95% 0.2256, -0.1075) e una pendenza pari a 1.018 (95% CI: 1.0048, 1.0307). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,999.

Per Plasma in EDTA:

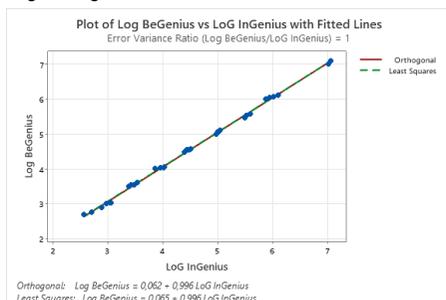
L'intervallo di misurazione lineare è stato verificato utilizzando un pannello di diluizioni del DNA target di HHV7 in campioni negativi di Plasma

I risultati sono riportati nella seguente figura.



I risultati ottenuti con ELITe InGenius e ELITe BeGenius sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono riassunti nella figura seguente.



L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.062 (95% CI: 0.0053; 0.1194) e una pendenza pari a 0.996 (95% CI: 0.9845; 1.0082). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,999.

L'intervallo di misurazione lineare per Sangue intero e Plasma raccolti in EDTA copre un intervallo di concentrazione come riportato nella tabella seguente:

Intervallo di Misurazione Lineare per HHV7 ELITE MGB Kit con ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Matrice	Limite inferiore	Limite superiore
Sangue Intero	500 copies / mL	10.000.000 copies / mL
Plasma	500 copies / mL	10.000.000 copies / mL

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi o positivizzati con HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST).

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) su ELITE InGenius è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE InGenius					
Campione	Pos. / Neg.	HHV7			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8 / 8	32,97	0,38	1,14	100%
10X LoD	8 / 8	31,18	0,29	0,92	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) su ELITE BeGenius è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE BeGenius					
Campione	Pos. / Neg.	HHV7			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	NA	NA	NA	100%
3X LoD	8 / 8	34,52	0,30	0,88	100%
10X LoD	8 / 8	32,36	0,22	0,69	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) con ELITE InGenius è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE InGenius					
Campione	Pos. / Neg.	HHV7			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16 / 16	33,07	0,36	1,09	100%
10X LoD	16 / 16	31,17	0,24	0,77	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) con ELITE BeGenius è riportato nella tabella seguente.

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE BeGenius					
Campione	Pos. / Neg.	HHV7			%Concordanza
		Media Ct	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	NA	NA	NA	100%
3X LoD	16 / 16	34,41	0,49	1,42	100%
10X LoD	16 / 16	32,34	0,30	0,92	100%

Nel test di ripetibilità, HHV7 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct del target come %CV uguale a 1,42%.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE InGenius e ELITE BeGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi o positivizzati con HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST).

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (due lotti) con ELITE InGenius sono riportati nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LoD	8 / 8	33,39	0,20	0,59	100%
10 X LoD	8 / 8	31,39	0,18	0,57	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (due lotti) con ELITE BeGenius sono riportati nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter - Lotto con ELITE BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LoD	8 / 8	34,58	0,14	0,42	100%
10 X LoD	8 / 8	32,66	0,24	0,75	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su due giorni, due lotti e due strumenti) con ELITE InGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter - Strumento con ELITE InGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LoD	8 / 8	34,50	0,31	0,90	100%
10 X LoD	8 / 8	32,61	0,23	0,69	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su due giorni, due lotti e due strumenti) con ELITE BeGenius sono mostrati nella tabella seguente.

Riproducibilità Inter - Strumento con ELITE BeGenius					
Campione	HHV7				%Concordanza
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LoD	8 / 8	33,25	0,26	0,79	100%
10 X LoD	8 / 8	31,26	0,21	0,66	100%

Nel test di Riproducibilità, HHV7 ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct come CV% uguale a 0,90%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione a **ELITE InGenius**, utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA e di plasma raccolto in EDTA.

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	Specificità Diagnostica %
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HHV7	38	0	38	100%
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di HHV7	33	0	33	100%

Tutti i campioni di Sangue Intero e Plasma erano validi per il test. Il cut-off del valore di Ct per il target HHV7 è stato applicato solo per i campioni di sangue intero

La specificità diagnostica di HHV7 ELITE MGB Kit in associazione a Sangue Intero e Plasma in EDTA è risultata uguale a 100%.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 35 in campioni di Sangue intero e Plasma raccolto in EDTA con ELITE InGenius e ELITE BeGenius.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione a **ELITE InGenius**, utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA.

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando campioni di Sangue intero e di Plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di HHV7, positivizzati con il campione Human Herpes Virus Type 7 Stock NATHHV7-ST (ZeptoMetrix Corporation ref. NATHHV7-ST) ad un titolo di 1000 copie /mL.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi	Sensibilità Diagnostica %
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HHV7	34	34	0	100%
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di HHV7	33	33	0	100%

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi.

La sensibilità diagnostica di HHV7 ELITE MGB Kit in associazione a Sangue intero e Plasma in EDTA è risultata uguale a 100 %.

Nota: I dati ed i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "HHV7 ELITE MGB Kit", FTP037PLD.

**CAMPIONI E CONTROLLI PER ALTRI
STRUMENTI**

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con il **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA e liquido cefalorachidiano (CSF).

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e/o conservati a temperatura ambiente (+16 / +26 °C) per un massimo di 24 ore, a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **100 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, caricare la Strip sullo strumento e avviare l'estrazione senza incubazione per la lisi. Dopo che lo strumento ha aggiunto il **NucliSENS® easyMAG®** Lysis Buffer mescolare direttamente sullo strumento per tre volte il contenuto della Strip con la pipetta multicanale fornita usando il programma 3, lasciare in incubazione per 10 minuti, quindi aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno e la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenuto della Strip con la pipetta multicanale e il programma 3, proseguire con l'estrazione. Recuperare il DNA con **50 µL** di tampone di eluizione.

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento **QIASymphony® SP/AS** e il kit **QIASymphony® DNA Mini kit**, con versione di **software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione "**Virus Blood_200_V4_default IC**" e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **200 µL**, è sempre richiesto un volume morto minimo di 100 µL. Aggiungere al buffer ATE 5 µL di CPE per ciascun campione richiesto. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti buffer ATE, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **60 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Liquido cefalorachidiano

I campioni di liquido cefalorachidiano destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le indicazioni del laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Nota: Quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti ed avviare l'estrazione. Al termine dei 10 minuti di incubazione, aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e proseguire con l'estrazione. Recuperare il DNA estratto con **100 µL** di tampone di eluizione.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Controlli di amplificazione

E' assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita nel prodotto) da aggiungere alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto **HHV7 - ELITe Positive Control** oppure il prodotto **HHV7 ELITe Standard**.

Controlli di qualità

E' consigliato convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione, estrazione ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento calibrato.

PROCEDURA ALTRI STRUMENTI

Impostazione della sessione di amplificazione real time

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

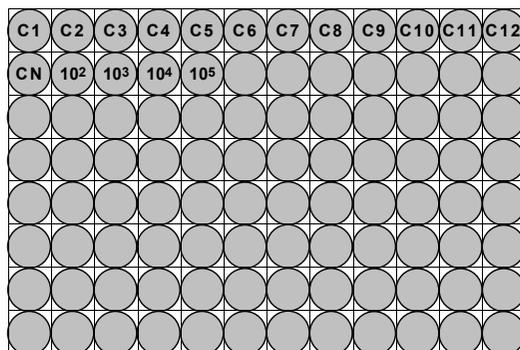
Se si utilizza uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per HHV7 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "HHV7";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è usato invece del ROX normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Nota: per la quantificazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10⁵ copie, 10⁴ copie, 10³ copie, 10² copie) per ottenere la **Curva standard**.

Si illustra di seguito, a titolo di esempio, come può essere organizzata l'analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: C1 - C12: Campioni da analizzare; CN: Controllo negativo di amplificazione; 10²: Standard 10² copie; 10³: Standard 10³ copie; 10⁴: Standard 10⁴ copie; 10⁵: Standard 10⁵ copie.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:
- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

Nota: l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di ibridazione a 60 °C.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "Ciclo termico";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare il valore di volume per la simulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C a 80 °C**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociazione (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Se si utilizza uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per HHV7 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "HHV7";

- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) il "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "Cy5" (AP593 è usato invece del Cy5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campioni, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Nota: per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10⁵ copie, 10⁴ copie, 10³ copie, 10² copie) per ottenere la **Curva standard**.

La modalità di organizzazione di un'analisi quantitativa di 12 campioni è illustrata a titolo di esempio nella sezione precedente relativa alla procedura per lo strumento **7300 Real Time PCR System**.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:
- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

Nota: l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di ibridazione a 60 °C.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "Ciclo termico";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare il valore di volume per la simulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C a 80 °C**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociazione (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

Allestimento dell'amplificazione

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **HHV7 Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **HHV7 - Positive Control** o le provette di **HHV7 Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**Amplification microplate** (micropiastra di amplificazione) che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.

- prelevare l'**Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzato nella sessione facendo attenzione a maneggiarlo con guanti senza polvere e a non danneggiarlo.

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **HHV7 Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

Nota: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a -20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 volte**.

2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:

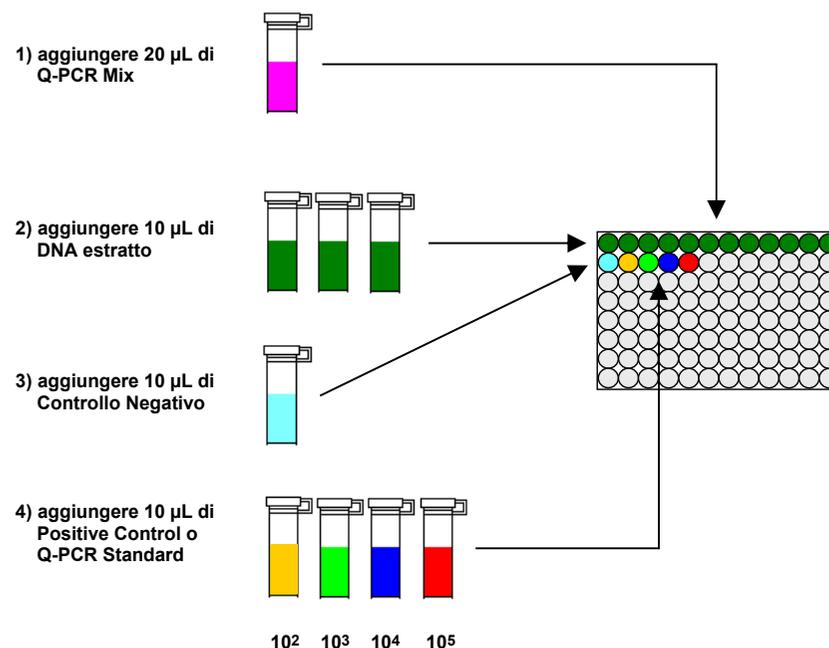
- Quando è richiesto un risultato **qualitativo** dell'analisi (rilevazione del DNA di HHV7): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **HHV7 - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **HHV7 - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

- Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di HHV7): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **HHV7 Q - PCR Standard 10²** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **HHV7 Q - PCR Standard 10²** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con gli **HHV7 Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.

5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
6. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-HHV7-EGSpA").

Nota: Al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di amplificazione.



Nota: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento **QIASymphony® SP/AS**, inserire la micropiastro contenente gli estratti, i reagenti e la micropiastro di amplificazione negli alloggiamenti dedicati, usando gli appositi adattatori, quindi seguire quanto previsto dal manuale di istruzioni d'uso del preparatore automatico ed i passaggi richiesti dal software.

Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per HHV7 (detector FAM "HHV7") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "CI") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- impostare manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Baseline)** dal ciclo 6 al ciclo 15;

Nota: Nel caso di un campione positivo ad alto titolo di HHV7, la fluorescenza FAM della sonda specifica per HHV7 può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** deve essere adattato dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

Se si è utilizzato uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "HHV7" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" a **0,05**.

Se si è utilizzato uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "HHV7" a **0,2**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" a **0,1**.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore **Soglia** di fluorescenza sono utilizzati per determinare il **Ciclo Soglia (Ct, Threshold cycle)**, cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore **Soglia** di fluorescenza.

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control***, il valore del **Ct** per HHV7 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control detector FAM "HHV7"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** per HHV7, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

***Nota:** Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di HHV7, al posto della reazione con il **Positive Control** è stata allestita la serie di reazioni con i **Q - PCR Standard**. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per HHV7 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo detector FAM "HHV7"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato (Undetermined)** per HHV7, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per HHV7 è utilizzato per rilevare la presenza di DNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

Nota: Verificare con il software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 10 copie di DNA del gene codificante la proteina capsidica (U57) di HHV7 per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, (limite di rilevazione del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni).

I risultati come **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di HHV7
detector FAM "HHV7"	detector VIC "CI"			
Ct Non determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	non idoneo	non valido	-
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, negativo	NON RILEVATO
Ct Determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	idoneo	valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, positivo	RILEVATO

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HHV7 e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (degradazione del DNA del controllo interno, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per HHV7 e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di HHV7 non è stato rivelato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di HHV7 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di DNA di HHV7, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 35 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di HHV7. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Analisi quantitativa dei risultati

Dopo avere eseguito la procedura per l'analisi qualitativa dei risultati è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

I valori di **Ct** per HHV7 nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard (Standard Curve)** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Curva Standard detector FAM "HHV7"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETTA

Se il valore del **Coefficiente di correlazione (R2)** non rientra nei limiti, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

I valori di **Ct** per HHV7 nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità (Quantity)** di DNA bersaglio presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA del gene U57 codificante una proteina capsidica di HHV7 per reazioni di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (intervallo di misurazione lineare del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "HHV7"	genomi Equivalenti di HHV7 per reazione
Quantità > 1 x 10 ⁶	SUPERIORI A 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantità ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantità
Quantità < 1 x 10 ¹	INFERIORI A 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati per calcolare i genomi Equivalenti (**gEq**) di HHV7 presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{Ve \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dove:

Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;

Ep è l'efficienza della procedura, estrazione ed amplificazione **espressa in decimali**,

Ve è il volume totale ottenuto dall'estrazione **espresso in µL**,

Va è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di amplificazione **espresso in µL**,

Quantità è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione **espresso in gEq per reazione**.

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e NucliSENS® easyMAG®

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 100 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di liquido cefalorachidiano e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per liquido cefalorachidiano e NucliSENS® easyMAG®

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 20 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizza il sistema di estrazione **QIASymphony® SP/AS** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e QIASymphony® SP/AS

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 45 \times \text{Quantità}$$

Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come gEq / mL di campione, quando si utilizza una particolare metodica di estrazione, possono essere calcolati a partire dall'intervallo di misurazione lineare della reazione di amplificazione secondo questa formula:

$$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con NucliSENS® easyMAG®

$$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 100 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 100 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

$$\text{da } 1000 \text{ a } 100.000.000 \text{ gEq / mL}$$

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con NucliSENS® easyMAG®

$$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 20 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 20 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

$$\text{da } 200 \text{ a } 20.000.000 \text{ gEq / mL}$$

Quando si utilizza il sistema di estrazione **QIASymphony® SP/AS** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con QIASymphony® SP/AS

$$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 45 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 45 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

$$\text{da } 450 \text{ a } 45.000.000 \text{ gEq / mL}$$

**CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI con
ALTRI STRUMENTI**

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio permette di rilevare la presenza di circa 10 molecole di DNA bersaglio nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione del patogeno di interesse la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Questo DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 10 µL insieme a IC-DNA ad un titolo di 20.000 copie / 10 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 10 µL. Questo campione è stato impiegato in 50 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 20.000 copie di IC-DNA + + 500 ng di DNA genomico umano	50	50	0

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio permette di quantificare da 1.000.000 a 10 molecole di DNA bersaglio nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come intervallo di misurazione lineare, è stata determinata utilizzando un pannello di diluizioni (1 log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10⁷ molecole per reazione a 10¹ molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10⁶ molecole per reazione corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10⁵ molecole / 10 µL).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10 molecole per reazione corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10² molecole / 10 µL).

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare (gEq / reazione)	
Limite superiore	1.000.000 gEq DNA / reazione
Limite inferiore	10 gEq DNA / reazione

A pagina 13 sono calcolati i limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in gEq / mL riferiti al kit di estrazione utilizzato.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 25,9% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere una inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 9,0% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 10 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione e l'accuratezza sono state determinate utilizzando i dati ottenuti nelle prove per lo studio dell'intervallo di misurazione lineare.

Sensibilità analitica: efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi

La sensibilità analitica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati del gene **U57** codificante una proteina capsidica di HHV7, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni positivi per il DNA di HHV7.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento: 23 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativo (testato con un prodotto di amplificazione nested), positivamente per il DNA di HHV7 con il materiale di riferimento certificato "HHV7 Culture Fluid", (codice 0810071CF, ZeptoMetrix, USA) ad un titolo di circa tre volte il limite di rilevazione. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di HHV7	23	23	0

La sensibilità diagnostica in questa prova è risultata pari al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 25 campioni di liquido cefalorachidiano negativo (testato con un prodotto di amplificazione nested), positivamente per il DNA di HHV7 con il materiale di riferimento certificato "HHV7 Culture Fluid", (codice 0810071CF, ZeptoMetrix, USA) ad un titolo di circa tre volte il limite di rilevazione. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'estrazione automatica NucliSENS® easyMAG® e l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivamente per il DNA di HHV7	25	25	0

La sensibilità diagnostica in questa prova è risultata pari al 100%.

Specificità analitica: assenza di cross-reattività con marcatori potenzialmente interferenti

La specificità analitica del saggio, come assenza di cross-reattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da HHV7, tra cui quelle del genoma completo di CMV, EBV e HHV6, i virus umani più simili a HHV7, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di cross-reattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando alcuni campioni negativi per il DNA di HHV7 ma positivi per il DNA di altri patogeni. Tutti i campioni sono stati confermati negativi.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento 12 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di HHV7 (testati con un prodotto di amplificazione nested) e positivi per il DNA di altri patogeni (CMV, EBV e HHV6). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per CMV	4	0	4
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per EBV	6	0	6
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per HHV6	1	0	1
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per HHV6 e EBV	1	0	1

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di HHV7.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 23 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, tutti negativi per il DNA di HHV7 (testati con un prodotto di amplificazione nested). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di HHV7	23	0	23

La specificità diagnostica in questa prova è risultata pari al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 26 campioni di liquido cefalorachidiano, tutti negativi per il DNA di HHV7 (testati con un prodotto di amplificazione nested). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'estrazione automatica NucliSENS® easyMAG® e l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di HHV7	26	1	25

Un campione è risultato positivo con un titolo virale inferiore a 1 copia / reazione. La discordanza può essere spiegata considerando che campioni con titoli così bassi possono dare alternativamente ed in modo casuale risultati positivi e negativi.

La specificità diagnostica in questa prova è risultata pari al 96,1%.

Nota: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "HHV7 ELITe MGB® Kit", FTP RTS037PLD.

BIBLIOGRAFIA

- F. Drago et al. (1997) *Lancet* 349: 1367 - 1368 (allegato n° 1, 2 pagine);
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30
 Michael Kidd et al. (1996) *The Journal of Infectious Diseases* 174: 396-401
 K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740.

LIMITI DELLA PROCEDURA

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

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

Plasma collected in EDTA shall be obtained from whole blood stored at room temperature or +2 / +8 °C for no longer than 24 hours.

Non utilizzare con questo prodotto il DNA estratto da campioni eparinati: l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e causa risultati non validi.

Non utilizzare con questo prodotto DNA estratto contaminato da emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo: queste sostanze inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

Non utilizzare con questo prodotto DNA estratto contenente elevate quantità di DNA genomico umano che possono inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sospensioni di leucociti e sospensioni di granulociti, liquido amniotico.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

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

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

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

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni); in questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali. Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione del DNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

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

pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITE InGenius and ELITE BeGenius

Reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard o della Curva standard non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix	Non utilizzare la PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo o dei Q-PCR Standards.	Non utilizzare i Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato) Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR Standard o Controllo Positivo
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Reazione del Controllo Negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata 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 il PCR Mix per più di 7 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Preparare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota dei Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

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.

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche.	<p>Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione.</p> <p>Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro per aerosol.</p> <p>Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.</p>
Contaminazione ambientale di laboratorio	<p>Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA.</p> <p>Eseguire un ciclo di decontaminazione UV.</p> <p>Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix e / o CTR CPE</p>

Open Platform:

DNA bersaglio non rilevato nella reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastre.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastre seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi di controllo positivo o standard dispensati.
Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del Controllo positivo o dello standard	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo o standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni del controllo positivo o standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento

DNA bersaglio rilevato nella reazione del Controllo Negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastre	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella micropiastre seguendo il piano di lavoro.
Errore durante l'impostazione dello strumento	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard impostata sullo strumento.
Micropiastre sigillata male	Sigillare con attenzione la micropiastre
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 per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare 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, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle.
Errore nell'impostazione della "baseline"	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Presenza di curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma diverso da quello degli altri campioni e degli standard o del controllo positivo.	<p>Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione.</p> <p>Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza di un DNA bersaglio con una possibile mutazione.2</p> <p>Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.</p>

LEGENDA DEI SIMBOLI

- REF** Numero di catalogo.
-  Limite superiore di temperatura.
- LOT** Codice del lotto.
-  Da utilizzare prima del (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.
-  Tenere lontano dalla luce solare.
-  Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e brevetti EP numero 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.

«NucliSENS® easyMAG®» sono marchi registrati della bioMérieux.

«QIASymphony®» è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

Ficoll® è un marchio commerciale di GE Healthcare Bio-Sciences AB.

HHV7 ELITE MGB® kit used in association with Genius series® platforms



Ref: RTS037PLD

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

Intended use

The HHV7 ELITE MGB® Kit product is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and the quantification of the DNA of **Human Herpes Virus 7 (HHV7)**, extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood and plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HHV7 infections.

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

Amplified sequence

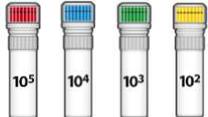
	Gene	Fluorophore	Channel
Target	capsid protein gene U57	FAM	HHV7
Internal Control	IC2	AP525 (VIC)	IC

Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

Kit content and related products

HHV7 ELITE MGB KIT RTS037PLD	HHV7 ELITE Standard STD037PLD	HHV7 - ELITE Positive Control CTR037PLD
 X 4	 X 2	 X 1
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles each set (4 separate sessions on board)	Ready-to-use PC 1 tube of 160 µL 4 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles (4 separate sessions on board)
Maximum shelf-life:	24 months	
Storage temperature	≤ -20°C	

Other products required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| › ELITE InGenius instrument: INT030 | › HHV7 ELITE Standard: STD037PLD |
| › ELITE BeGenius instrument: INT040 | › HHV7 - ELITE Positive Control: CTR037PLD |
| › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 | › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 |
| › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR | › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S |
| › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS | › 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118 |
| › CPE - Internal Control: CTCRPE | |

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | cp/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 10 µL | | |
| › HHV7 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

ELITE InGenius and ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	500 cp/mL	100% 34/34*	100% 38/38*
Plasma	500 cp/mL	100% 33/33*	100% 33/33*

*confirmed samples/ tested samples

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Sample type	Transport/Storage conditions			
	+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Whole Blood collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month
Plasma collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month

Do not use Plasma collected in heparin to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITE InGenius Procedures

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

Before analysis

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Switch on ELITE InGenius.
Log in with username and password.
Select the mode "CLOSED". | 2. Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Control menu" <i>Note:</i> All must have been run, approved and not expired | 3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec. |
|---|--|--|

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

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", elution: "100 µL" | 3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITE_PL_200_100 or HHV7 ELITE_WB_200_100 | 5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position:
Primary tube or Extraction Tube | 6. Load the PCR Mix and Internal Control in the Inventory Block |
| 7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tips, Extraction Tube racks and primary sample racks | 8. Close the door
Start the run | 9. View, approve and store the results |

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

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

- | | | |
|--|--|--|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", elution: "100 µL" | 3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITE_PC and HHV7 ELITE_NC or HHV7 ELITE_STD) | 5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution tube" | 6. Load the PCR Mix in the inventory block |
| 7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid | 8. Close the door
Start the run | 9. View, approve and store the results |

ELiTe BeGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELiTe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode " CLOSED ".	2. Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Controls" menu. <i>Note:</i> All must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
---	--	---

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

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elution: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELiTe_Be_PL_200_100 or HHV7 ELiTe_Be_WB_200_100) Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR-Mix and the Internal Control in Reagent Rack/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7 Load "PCR Basket" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELiTe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls or standards barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4 Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELiTe_Be_PC and HHV7 ELiTe_Be_NC or HHV7 ELiTe_Be_STD)	5. Load the PCR-Mix in Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Basket" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	