

Istruzioni per l'uso

HPV PLUS ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



REF RTS402ING

UDI 08033891487393

CE **IVD**
0123

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Revisione	Notifiche dei cambiamenti	Data (dd/mm/yyyy)
00	Nuovo sviluppo di prodotto	20/09/2024

INDICE

1 USO PREVISTO	4
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....	4
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	5
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	5
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	6
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
8 CAMPIONI E CONTROLLI	8
9 PROCEDURA ELITe InGenius.....	9
10 PROCEDURA ELITe BeGenius	15
11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	19
12 BIBLIOGRAFIA	33
13 LIMITI DELLA PROCEDURA	34
14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	35
15 LEGENDA DEI SIMBOLI	37
16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE	38
17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....	38
Appendix A QUICK START GUIDE.....	39

1 USO PREVISTO

Il prodotto **HPV PLUS ELITE MGB Kit®** è un dispositivo medico diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come test Real-Time PCR qualitativo multiplex degli acidi nucleici estratti da campioni clinici, per la rilevazione e identificazione del DNA genomico di 14 sottotipi ad alto rischio del Papilloma Virus umano (HPV), così come segue: rilevazione e tipizzazione dei sottotipi ad alto rischio HPV 16, 18, 31 e 45, rilevazione dei sottotipi ad alto rischio HPV 33, 52 e 58 come gruppo HPV HR1, rilevazione dei sottotipi ad alto rischio non coperti dal vaccino HPV 35, 39, 51, 56, 59, 66 e 68 come gruppo HPV HR2.

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 cervicali umani raccolti in fissativo per citologia a base alcolica.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi delle infezioni da HPV in pazienti con precedente risultato positivo a un test citologico o molecolare.

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

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa per la rilevazione del DNA di HPV isolato da campioni clinici e amplificato con l'utilizzo del reagente **HPV PLUS PCR Mix** che contiene primers e sonde con tecnologia ELITE MGB o TaqMan™ MGB.

Le sonde sono attivate quando ibridano con i prodotti specifici della PCR. Gli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm).

Nelle sonde 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, in caso di tecnologia ELITE MGB, la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

- la regione genomica **E6/E7** dei sottotipi HPV16 e HPV31, rilevati nel canale **HPV16_31** e discriminati in base alla temperatura di melting. Le sonde sono stabilizzate dal gruppo MGB, inattivate dall' Eclipse Dark Quencher® e marcate con il fluoroforo FAM,
- la regione genomica **E6/E7** dei sottotipi HPV18 e HPV45, rilevati nel canale **HPV18_45** e discriminati in base alla temperatura di melting. Le sonde sono stabilizzate dal gruppo MGB, inattivate dall' Eclipse Dark Quencher, e marcate con il fluoroforo AquaPhluor® 690 (AP690),
- la regione genomica **E6/E7** del gruppo HPV HR1 (sottotipi HPV33, HPV52 e HPV58), rilevati nel canale **HPV_HR1**. Le sonde sono stabilizzate dal gruppo MGB, inattivate dall' Eclipse Dark Quencher, e marcate con il fluoroforo AquaPhluor 639 (AP639),
- la regione genomica **E6/E7** del gruppo HPV HR2 (sottotipi HPV35, HPV39, HPV51, HPV56, HPV59, HPV66 e HPV68), rilevati nel canale **HPV_HR2**. Le sonde sono stabilizzate dal gruppo MGB, inattivate dall' Eclipse Dark Quencher, e marcate con il fluoroforo AquaPhluor 593 (AP593),
- il gene della beta globina umana come Controllo Interno endogeno, 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 **HPV PLUS PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica.

Il Controllo Interno endogeno monitora la cellularità del campione, l'efficienza di estrazione e l'efficienza della PCR.

Il prodotto **HPV PLUS ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** (12 test a tubo), utilizzando 20 µL di PCR Mix per reazione.

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

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
HPV PLUS PCR Mix cod. RTS402ING	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR, in provetta con tappo BIANCO	8 x 280 µL	-

5 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 (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- 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.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, i controlli positivo e negativo di amplificazione e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

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

Tabella 2

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
<p>ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) ELITE InGenius Software versione 1.3.0.19 (o successiva) HPV PLUS ELITE_PC, Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HPV PLUS ELITE_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HPV PLUS ELITE_Cyt_SenseS_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni cervicali</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 HPV PLUS - ELITE Positive Control (EG SpA, cod. CTR4024ING) ThinPrep® Pap Test PreservCyt® Solution (Hologic, Inc., cod. 70098-002, 20 mL of PreservCyt® Solution). BD SurePath™ Collection Vial 10 mL (Becton, Dickinson and Company, cod. 491439 / 491438 / 491440, 10 mL of SurePath® Preservative Fluid).</p>
<p>ELITE BeGenius (EG SpA cod. INT040) ELITE BeGenius Software versione 2.2.1. (o successiva) HPV PLUS ELITE_Be_PC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo HPV PLUS ELITE_Be_NC, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo HPV PLUS ELITE_Be_Cyt_Sense_200_100, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni cervicali</p>	

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

- Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con 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.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

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

*con congelamento intermedio

8 CAMPIONI E CONTROLLI

8.1 Campioni

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

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto e conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Campioni cervicali per citologia liquida	ThinPrep® Pap Test PreservCyt® Solution (Hologic, Inc.)	≤ 6 mesi	≤ 6 mesi	NR	NR
	BD SurePath™ Collection Vial 10 mL (Becton, Dickinson and C.)	≤ 3 mesi	≤ 6 mesi	NR	NR

NR: non raccomandato

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.

Tabella 5 Assay Protocols per HPV PLUS ELITE MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Campioni cervicali per citologia liquida	ELITE InGenius	HPV PLUS ELITE_Cyt_Sense_200_100	Positivo / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	HPV PLUS ELITE_Be_Cyt_Sense_200_100		

Per tutti i protocolli, è richiesto 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).

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 disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#).

8.2 Controlli di PCR

E' obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

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

NOTA

ELITE InGenius ed **ELITE BeGenius** richiedono risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR. 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 l'analisi dei controlli positivi e negativi. Inoltre, 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.

8.3 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.

9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **HPV PLUS ELITE MGB Kit** con **ELITE InGenius** si articola in tre fasi:

Tabella 6

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

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- Nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **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.

9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HPV PLUS 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 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 **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 test in condizioni ottimali (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 tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 7

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Per l'analisi, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Extraction tube (tubo di estrazione) precedentemente etichettato.	Scongela a temperatura ambiente gli Elution tube (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongela 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 (Provetta eluato), fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione)	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (Esegui sessione).
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (Volume di eluato estratto) sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (ID campione, SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Non applicabile
5	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) 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.
6	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" (Protocollo) selezionare "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
7	Nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) selezionare "Extraction Tube" (Tubo di estrazione) come posizione in cui caricare il campione.	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" (Posizione campione) che la posizione sia "Elution Tube".
8	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
9	Caricare la PCR Mix nell' "Inventory Block" (Area reagenti) 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" (Area reagenti) 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" (Area reagenti) 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.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali)	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).	Nell'"Inventory Area" (Area di carico) controllare/caricare i Tip Rack (Rack puntali).
12	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire

Tabella 7 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
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.	Caricare le PCR cassette e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).	Premere "Start" (Inizio).

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 circa 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 **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 **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** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

9.3 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 **HPV PLUS ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

9.3.1 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 “**ELITE_PC**” e “**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 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, l’amplificazione dei Controlli non validi e di tutti i campioni deve essere ripetuta.

9.3.2 Validazione dei risultati dei campioni

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione dei target (Canali **HPV16-31**, **HPV18-45**, **HPV HR1** e **HPV HR2**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi nell’ Assay Protocol **HPV PLUS ELITE_Cyt_Sense_200_100**.

I risultati vengono mostrati nella schermata “Results Display”.

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

Tabella 8

1) Controllo Positivo	Status
HPV PLUS Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
HPV PLUS 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 il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Tabella 9

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16	Il DNA di HPV16-31 è stato rilevato nel campione. Il sottotipo è HPV16 .
HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV31	Il DNA di HPV16-31 è stato rilevato nel campione. Il sottotipo è HPV31 .
HPV16_31:DNA Rilevato Tipizzazione non determinata	Il DNA di HPV16-31 è stato rilevato nel campione ma non è stato possibile effettuare l'analisi di tipizzazione.
HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18	Il DNA di HPV18-45 è stato rilevato nel campione. Il sottotipo è HPV18 .
HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV45	Il DNA di HPV18-45 è stato rilevato nel campione. Il sottotipo è HPV45 .
HPV18_45:DNA Rilevato Tipizzazione non determinata	Il DNA di HPV18-45 è stato rilevato nel campione ma non è stato possibile effettuare l'analisi di tipizzazione.
HPV_HR1:DNA Rilevato	Il DNA del gruppo HPV HR1 (HPV33, HPV52 o HPV58) è stato rilevato nel campione.
HPV_HR2:DNA Rilevato	Il DNA del gruppo HPV HR2 (HPV35, HPV39, HPV51, HPV56, HPV59, HPV66 o HPV68) è stato rilevato nel campione.
HPV16_31:DNA Non rilevato o inferiore LoD	Il DNA di HPV16-31 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di HPV16 e HPV31, oppure la sua concentrazione è al disotto del Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
HPV18_45:DNA Non rilevato o inferiore LoD	Il DNA di HPV18-45 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di HPV16 e HPV31, oppure la sua concentrazione è al disotto del Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
HPV-HR1:DNA Non rilevato o inferiore LoD	Il DNA del gruppo HPV HR1 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di HPV33, HPV52 e HPV58, oppure la sua concentrazione è al disotto del Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
HPV-HR2:DNA Non rilevato o inferiore LoD	Il DNA del gruppo HPV HR2 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il DNA di HPV35, HPV39, HPV51, HPV56, HPV59, HPV66 e HPV68, oppure la sua concentrazione è al disotto del Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Non valido-Ripeti test su campione	Risultato del saggio non valido per un errore del controllo interno (ad esempio causato da un'estrazione scorretta o dalla presenza di inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato "Invalido-Ripetere il campione": in questo caso, il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di raccolta del campione, estrazione o amplificazione (es. 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 [14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 35](#)).

I campioni che riportano il risultato "HPV16-31:DNA Non rilevato o inferiore LoD", "HPV18-45:DNA Non rilevato o inferiore LoD", "HPV_HR1:DNA Non rilevato o inferiore LoD", "HPV_HR2:DNA Non rilevato o inferiore LoD", sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di HPV. In tal caso non si può escludere che il DNA di HPV sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione del saggio

(vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

I campioni che riportano il risultato "HPV16_31:DNA Rilevato Tipizzazione non determinata" e "HPV18_45:DNA Rilevato Tipizzazione non determinata" sono idonei per l'analisi e il DNA di HPV è stato rilevato nel campione, tuttavia non è stato possibile effettuare l'analisi di melting. In questo caso il campione è positivo per uno o entrambi i target in quel canale.

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".

9.3.3 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.

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

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto HPV PLUS ELITe MGB Kit con ELITe BeGenius si articola in tre fasi:

Tabella 10

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

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **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.

10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **HPV PLUS 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 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

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali (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 tre tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

Tabella 11

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Per l'analisi, 200 µL di campione devono essere trasferiti in un Tubo Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettato.	Scongelare a temperatura ambiente gli " Elution tube " (Provetta con eluato) con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare 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 " (Provetta con eluato), fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).	Nella schermata Home, selezionare " Perform Run " (Esegui sessione).
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.	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 ".	Selezionare il "Run mode": " PCR Only ".
5	Caricare i campioni nel " Sample Rack " (Rack campioni). 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 " (Rack di eluizione).	Caricare le provette di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nell' "Elution Rack" (Rack di eluizione).

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
6	Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (ID campione, SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il "SID".	Inserire il "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol."	Inserire il "Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (ID campione, SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol."
7	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.	Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" (volume estrazione input) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare. (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare. (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" (Saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare. (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
	Nota: Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.		Non applicabile
11	Caricare gli "Elution tube" (Provetta eluato) nell'" Elution Rack" (Rack di eluazione).	Non applicabile	Non applicabile
12	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	Non applicabile
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile	Non applicabile
14	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
15	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni 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).	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).
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" (Rack Puntali).	Nell' "Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack" . (Rack Puntali).

Tabella 11 (segue)

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)	C. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
18	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
19	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.
20	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
21	Caricare l'"Extraction Rack" (rack di estrazione) con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i consumabili richiesti.	Non applicabile	Non applicabile
22	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
23	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).	Premere "Start" (inizio).

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 circa 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 **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 **Controllo Positivo** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

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

10.3 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 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 **HPV PLUS ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
2. Validazione dei risultati dei campioni,
3. Refertazione dei risultati dei campioni.

NOTA

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della “Procedura” dello strumento **ELITE InGenius**.

11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di Rilevazione (LoD) del saggio è stato definito sullo strumento ELITE BeGenius testando un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep e positivizzati con le cellule di riferimento SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18).

L'analisi di regressione Probit è stata eseguita sui risultati e il valore di LoD è stato stimato come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 12 Limite di rilevazione su ELITE BeGenius e campioni cervicali raccolti in ThinPrep

Linea cellulare	LoD (cellule / mL)	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
SiHa (HPV16)	202	142	368
HeLa (HPV18)	56	40	98

Il valore di LoD calcolato è stato verificato testando con gli strumenti ELITE BeGenius e ELITE InGenius dei pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep e SurePath e positivizzati con gli standard internazionali WHO di HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 e HPV45, oltre che con il DNA plasmidico di HPV35. La verifica del Limite di Rilevazione è stata fatta ad un titolo dei vari genotipi corrispondente al valore di LoD calcolato per le cellule HeLa. I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 13 Conferma del valore di LoD su ELITE BeGenius e ELITE InGenius con campioni cervicali raccolti in ThinPrep e SurePath

Campione	LoD Confirmation					
	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV35
Titolo del target in IU / mL (o *copie / mL)	1.700	1.700	1.700	2.000	1.700	1.700*
Replicati (N)	24	24	24	24	24	24
% di risultati positivi	>87%	>87%	>87%	>87%	>87%	>87%

Inclusività: Efficienza di rilevazione dei diversi genotipi di HPV ad alto rischio

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione dei principali genotipi ad alto rischio di HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi ha mostrato un elevato livello di conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative. Quindi si prevede un'efficiente amplificazione e rilevazione dei diversi sottotipi.

L'inclusività per i 14 genotipi ad alto rischio di HPV è stata verificata mediante l'analisi di materiali di riferimento da diversi fornitori (ATCC, Vircell, Seracare, Acrometrix, NIBSC e Microbix) o di DNA plasmidici (EG SpA) quando il materiale di riferimento non era disponibile.

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 14 Risultati del test di inclusività su ELITE BeGenius

Target	Pannello	Pos. / Rep.	Esito
HPV16	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
	Acrometrix	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
	Microbix	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
	ATCC	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
	SeraCare	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
	Vircell	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV16
HPV18	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
	Acrometrix	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
	Microbix	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
	ATCC	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
	SeraCare	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
	Vircell	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV18
HPV31	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV31
	Microbix	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV31
	ATCC	6 / 6	HPV16_31:DNA Rilevato Tipo HPV31
HPV45	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV45
	Microbix	6 / 6	HPV18_45:DNA Rilevato Tipo HPV45
HPV33	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV_HR1:DNA Rilevato
	Microbix	6 / 6	HPV_HR1:DNA Rilevato
HPV52	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV_HR1:DNA Rilevato
HPV58	WHO IU, NIBSC	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV68	Acrometrix	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV39	Microbix	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV51	SeraCare	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV35	plasmid DNA	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato

Tabella 14 Risultati del test di inclusività su ELITE BeGenius (segue)

Target	Pannello	Pos. / Rep.	Esito
HPV56	plasmid DNA	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV59	plasmid DNA	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
HPV66	plasmid DNA	6 / 6	HPV_HR2:DNA Rilevato
Negative	Acrometrix	0 / 6	Tutti i target:DNA Non rilevato
	Microbix	0 / 6	Tutti i target:DNA Non rilevato
	SeraCare	0 / 6	Tutti i target:DNA Non rilevato

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati dal prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit

Co-infezioni

La potenziale interferenza tra i target del saggio, in caso di co-infezione, è stata valutata mediante un test di co-amplificazione a due target, utilizzando i DNA plasmidici di HPV16, HPV18, HPV31, HPV45, HPV33 e HPV35.

Per ogni target, la concentrazione più bassa rilevabile in tutti i replicati (5 su 5) è stata riportata nella seguente tabella.

Tabella 15 Risultati del test di co-infezione su ELITE BeGenius

Target ad alta concentrazione	Target a bassa concentrazione
HPV16 100.000 copie /reazione	HPV18 1.000 copie /reazione
	HPV31 10.000 copie /reazione
	HPV33 3.000 copie /reazione
	HPV35 2.000 copie /reazione
	HPV45 500 copie /reazione
HPV31 100.000 copie /reazione	HPV16 5.000 copie /reazione
	HPV18 1.000 copie /reazione
	HPV33 4.000 copie /reazione
	HPV35 500 copie /reazione
	HPV45 1.000 copie /reazione
HPV18 100.000 copie /reazione	HPV16 750 copie /reazione
	HPV31 500 copie /reazione
	HPV33 3.000 copie /reazione
	HPV35 500 copie /reazione
	HPV45 15.000 copie /reazione

Tabella 15 Risultati del test di co-infezione su ELITe BeGenius (segue)

Target ad alta concentrazione	Target a bassa concentrazione
HPV45 100.000 copie /reazione	HPV16 750 copie /reazione
	HPV18 5.000 copie /reazione
	HPV31 500 copie /reazione
	HPV33 5.000 copie /reazione
	HPV35 500 copie /reazione
HPV33 100.000 copie /reazione	HPV16 1.000 copie /reazione
	HPV18 1.000 copie /reazione
	HPV31 500 copie /reazione
	HPV35 500 copie /reazione
	HPV45 1.000 copie /reazione
HPV35 100.000 copie /reazione	HPV16 2.000 copie /reazione
	HPV18 500 copie /reazione
	HPV31 500 copie /reazione
	HPV33 4.000 copie /reazione
	HPV45 1.000 copie /reazione

In caso di co-infezioni, il prodotto HPV PLUS ELITe MGB Kit mostra una minima interferenza tra i target.

Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con altri organismi o genotipi di HPV non inclusi nell'uso previsto del prodotto e che possono essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri organismi indesiderati (virus, batteri, protozoi e funghi) e con la maggior parte dei genotipi di HPV non inclusi nell'uso previsto.

L'assenza di cross-reattività è stata verificata anche attraverso l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati degli organismi indesiderati (ATCC, Vircell, DSMZ, NIBSC). Inoltre, sono stati analizzati materiali di riferimento (NIBSC) o DNA plasmidici (EG SpA) contenenti la regione E6/E7 dei principali genotipi di HPV non inclusi nell'uso previsto (a circa 10⁵ copie / reazione).

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 16 Risultati del test di cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti su ELITe BeGenius

Campione	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
<i>Herpes simplex virus 1</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Herpes simplex virus 2</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Mycoplasma hominis</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività

Tabella 16 Risultati del test di cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti su ELITE BeGenius (segue)

Campione	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Ureaplasma parvum</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Treponema pallidum</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Mobiluncus mulieri</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Bacteroides fragilis</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV6	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV11	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV42	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV43	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV44	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV26	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV30	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV34	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività

Tabella 16 Risultati del test di cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti su ELITE BeGenius (segue)

Campione	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
HPV40	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV53	0 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Cross-reattività
HPV54	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV61	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV67	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV69	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV70	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV72_a	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV72_b	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV73	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
HPV82	0 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Cross-reattività

Con il prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit, è stata osservata una cross-reattività con i genotipi HPV53 e HPV82 per il target HPV HR2.

HPV82 è stato rilevato nel gruppo HPV HR2 con alta efficienza ($\geq 1 \times 10^3$ copie / mL).

HPV53 è stato rilevato nel gruppo HPV HR2 con bassa efficienza ($\geq 1 \times 10^6$ copie / mL).

Entrambi i genotipi sono classificati come possibili cancerogeni (Gruppo 2B, Classificazione IARC) sulla base di studi epidemiologici, filogenetici e funzionali.

Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione causata da altri organismi o genotipi di HPV non inclusi nell'uso previsto del prodotto e che possono essere presenti nei campioni clinici è stata valutata attraverso l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati degli organismi indesiderati (ATCC, Vircell, DSMZ, NIBSC). Inoltre, sono stati analizzati materiali di riferimento (NIBSC) o DNA plasmidici (EG SpA) contenenti la regione E6/E7 dei principali genotipi di HPV non inclusi nell'uso previsto (a circa 10^5 copie / reazione). Per valutare l'inibizione, i campioni sono stati positivamente con il prodotto HPV PLUS - ELITE Positive Control diluito 1 a 10 (100 copie / reazione dei DNA plasmidici di HPV16, HPV18, HPV33, HPV35).

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 17 Risultati del test di inibizione con organismi potenzialmente interferenti su ELITE BeGenius

Campione positivizzato con PC 1:10	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
<i>Herpes simplex virus 1</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Herpes simplex virus 2</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Mycoplasma hominis</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Ureaplasma parvum</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Treponema pallidum</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Gardnerella vaginalis</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Mobiluncus mulieri</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Bacteroides fragilis</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Candida albicans</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Chlamydia trachomatis</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Mycoplasma genitalium</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
<i>Trichomonas vaginalis</i>	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV6	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV11	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV42	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV43	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV44	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV26	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV30	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV34	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV40	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV53	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV54	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV61	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV67	3 / 5	5 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	Inibizione
HPV69	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV70	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione

Tabella 17 Risultati del test di inibizione con organismi potenzialmente interferenti su ELITe BeGenius (segue)

Campione positivizzato con PC 1:10	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
HPV72_a	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV72_b	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV73	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV82	0 / 5	5 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Inibizione

Con il prodotto HPV PLUS ELITe MGB Kit, è stato osservato un effetto inibitorio con i genotipi HPV67 e HPV82.

In presenza di questi due genotipi, è stata valutata la più bassa concentrazione dei target rilevabile, come indicato nella seguente tabella.

Genotipo	Target in test	Concentrazione-Target in test	Pos. / Rep.	Esito
HPV67 (100.000 copie / reazione)	HPV16	200 copie / reazione	5 / 5	Lieve inibizione
	HPV18	100 copie / reazione	5 / 5	Nessuna inibizione
	HPV33	1.000 copie / reazione	5 / 5	Parziale inibizione
	HPV35	100 copie / reazione	5 / 5	Nessuna inibizione
HPV82 (100.000 copie / reazione)	HPV16	1.000 copie / reazione	5 / 5	Parziale inibizione
	HPV18	1.000 copie / reazione	5 / 5	Parziale inibizione
	HPV33	4.000 copie / reazione	5 / 5	Parziale inibizione

Nota: il genotipo HPV82 viene amplificato come HPV HR2, per questo motivo in sua presenza è attesa una parziale inibizione degli altri target a bassa concentrazione.

Entrambi i genotipi sono classificati come possibili cancerogeni (Gruppo 2B, Classificazione IARC) sulla base di studi epidemiologici, filogenetici e funzionali

Sostanze potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La cross-reattività di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici è stata valutata per il saggio attraverso l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep.

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 18 Risultati del test di cross-reattività con sostanze potenzialmente interferenti su ELITe BeGenius

Campione	Positivi / Replicati				IC	Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45		
Mucina	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Leucociti da sangue periferico (PBLs)	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Sangue intero	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Aciclovir	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Clotrimazolo	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Metronidazolo	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Nonoxinol 9	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Progesterone	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Vaselina	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Vagisil deodorante	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività
Vagisil gel	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5	Nessuna cross-reattività

Utilizzando il prodotto HPV PLUS ELITe MGB Kit, tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato alcuna cross-reattività

Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

L'inibizione da parte di sostanze potenzialmente interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici è stata valutata per il saggio attraverso l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep. Per valutare l'inibizione, i campioni sono stati positivamente con materiali di riferimento ad una concentrazione 3 volte il valore di LoD (cellule SiHa per HPV16, cellule HeLa per HPV18, DNA plasmidico di HPV33, DNA plasmidico di HPV35).

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella

Tabella 19 Risultati del test di inibizione con sostanze potenzialmente interferenti su ELITe BeGenius

Campione positivizzato	Positivi / Replicati				IC	Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45		
Mucina	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Leucociti da sangue periferico (PBLs)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Sangue intero	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Aciclovir	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Clotrimazolo	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Metronidazolo	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione

Tabella 19 Risultati del test di inibizione con sostanze potenzialmente interferenti su ELITE BeGenius (segue)

Campione positivizzato	Positivi / Replicati					Esito
	HPV 16-31	HPV HR2	HPV HR1	HPV 18-45	IC	
Nonoxinol 9	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Progesterone	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Vaselina	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Vagisil deodorante	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione
Vagisil gel	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	Nessuna inibizione

Utilizzando il prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit, tutte le sostanze potenzialmente interferenti testate non hanno mostrato inibizione di amplificazione dei target.

Nota: il Vagisil gel (idratante vaginale) può inibire a più alta concentrazione (> 1% m/v).

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep e eventualmente positivizzati con i materiali di riferimento (cellule SiHa per HPV16, cellule HeLa per HPV18, DNA plasmidico di HPV33, DNA plasmidico di HPV35).

Un esempio dei risultati di ripetibilità intra-sessione dei valori di Ct (su un giorno) è riportato nella seguente tabella.

Tabella 20 Test di ripetibilità intra-sessione - Ct (un giorno / un lotto)

Campione	Target	N	ELITE BeGenius				ELITE InGenius			
			Media Ct	SD	CV%	% Concor-danza	Media Ct	SD	%CV	% Concor-danza
Negati-vo	HPV16-31	6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		6	33,13	0,31	0,93	100%	32,68	0,48	1,47	100%
33+35 3xLoD		6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		6	31,33	0,30	0,95	100%	30,86	0,33	1,07	100%
Negati-vo	HPV18-45	6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		6	35,22	0,49	1,38	100%	33,11	0,32	0,95	100%
33+35 3xLoD		6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		6	33,69	0,57	1,68	100%	31,46	0,14	0,43	100%

Tabella 20 Test di ripetibilità intra-sessione - Ct (un giorno / un lotto) (segue)

Campione	Target	N	ELITe BeGenius				ELITe InGenius			
			Media Ct	SD	CV%	% Concor-danza	Media Ct	SD	%CV	% Concor-danza
Negati-vo	HPV-HR1	6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		6	34,72	0,43	1,23	100%	33,51	0,10	0,31	100%
10xLoD		6	31,52	0,58	1,83	100%	30,54	0,12	0,38	100%
Negati-vo	HPV-HR2	6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		6	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		6	33,38	0,39	1,18	100%	33,17	0,18	0,54	100%
10xLoD		6	31,48	0,39	1,23	100%	31,16	0,15	0,48	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione (su due giorni) è riportato nelle tabella seguente.

Tabella 21 Test di ripetibilità inter-sessione - Ct (due giorni / un lotto)

Campio-ne	Target	N	ELITe BeGenius				ELITe InGenius			
			Media Ct	SD	CV%	% Concor-danza	Media Ct	SD	%CV	% Concor-danza
Negativo	HPV16-31	12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		12	33,11	0,44	1,33	100%	32,57	0,45	1,39	100%
33+35 3xLoD		12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		12	31,21	0,37	1,19	100%	30,72	0,33	1,08	100%
Negativo	HPV18-45	12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		12	35,49	0,58	1,62	100%	33,12	0,37	1,11	100%
33+35 3xLoD		12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		12	34,19	0,73	2,12	100%	31,82	0,50	1,56	100%
Negativo	HPV-HR1	12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		12	34,07	0,77	2,26	100%	32,65	0,91	2,80	100%
10xLoD		12	31,27	0,56	1,78	100%	30,23	0,35	1,15	100%

Tabella 21 Test di ripetibilità inter-sessione - Ct (due giorni / un lotto) (segue)

Campione	Target	N	ELITE BeGenius				ELITE InGenius			
			Media Ct	SD	CV%	% Concor- danza	Media Ct	SD	%CV	% Concor- danza
Negativo	HPV-HR2	12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		12	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		12	33,32	0,31	0,92	100%	32,84	0,37	1,13	100%
10xLoD		12	31,42	0,30	0,94	100%	31,07	0,18	0,59	100%

Nel test di ripetibilità, HPV PLUS ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come CV% uguale a 2,80% (e una variabilità massima di valori di Tm come CV % uguale a 0,58%).

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep ed eventualmente positivizzati con i materiali di riferimento (cellule SiHa per HPV16, cellule HeLa per HPV18, DNA plasmidico di HPV33, DNA plasmidico di HPV35).

I risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (su tre lotti) sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 22 Riproducibilità Inter-Lotto (sei giorni/ tre lotti)

Campione	Target	N	ELITE BeGenius				ELITE InGenius			
			Ct Me- dia	SD	%CV	% Concor- danza	Ct Me- dia	SD	%CV	%Concor- danza
Negativo	HPV16-31	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	32,88	0,55	1,68	100%	32,24	0,46	1,44	100%
33+35 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		36	30,81	0,52	1,68	100%	30,22	0,54	1,79	100%
Negativo	HPV18-45	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	35,30	0,64	1,82	100%	33,39	0,41	1,24	100%
33+35 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		36	33,92	0,69	2,04	100%	31,94	0,48	1,51	100%
Negativo	HPV-HR1	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		36	33,55	0,74	2,21	100%	32,49	0,67	2,08	100%
10xLoD		36	31,01	0,54	1,74	100%	30,12	0,33	1,10	100%

Tabella 22 Riproducibilità Inter-Lotto (sei giorni/ tre lotti) (segue)

Campione	Target	N	ELITe BeGenius				ELITe InGenius			
			Ct Media	SD	%CV	%Concordanza	Ct Media	SD	%CV	%Concordanza
Negativo	HPV-HR2	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		36	33,07	0,49	1,47	100%	32,71	0,33	1,02	100%
10xLoD		36	31,18	0,36	1,15	100%	30,97	0,21	0,66	100%

I risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su tre strumenti) sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 23 Riproducibilità Inter-Strumento (sei giorni/ tre lotti / tre strumenti)

Campione	Target	N	ELITe BeGenius				ELITe InGenius			
			Ct Media	SD	%CV	%Concordanza	Ct Media	SD	%CV	%Concordanza
Neg	HPV16-31	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	32,47	0,46	1,42	100%	31,67	0,87	2,74	100%
33+35 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		36	30,35	0,45	1,50	100%	29,64	0,71	2,40	100%
Neg	HPV18-45	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	34,37	0,45	1,30	100%	33,21	0,42	1,28	100%
33+35 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
10xLoD		36	33,06	0,46	1,38	100%	31,80	0,37	1,18	100%
Neg	HPV-HR1	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		36	32,90	0,39	1,18	100%	32,73	0,41	1,26	100%
10xLoD		36	30,35	0,25	0,83	100%	30,09	0,30	1,01	100%
Neg	HPV-HR2	36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
16+18 3xLoD		36	-	-	-	100%	-	-	-	100%
33+35 3xLoD		36	32,82	0,32	0,98	100%	32,72	0,25	0,76	100%
10xLoD		36	30,85	0,27	0,88	100%	30,79	0,24	0,77	100%

Nel test di riproducibilità, il prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come atteso e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct dei target come CV% uguale a 2,74% (e una variabilità massima di valori di Tm dei target come CV% uguale a 0,41%).

Cross-contaminazione

La possibile cross-contaminazione durante l'analisi è stata valutata per il saggio testando 60 replicati di un pool di campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep alternati a 60 replicati dello stesso pool positivizzati con il DNA plasmidico di HPV16 (EG SpA), ad una concentrazione di $\sim 1 \times 10^7$ copie /mL in 5 sessioni.

I risultati del test sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 24 Risultati del test di cross-contaminazione su ELITE BeGenius

Campione	N	Positivo	Negativo	%Concordanza
Positivo	60	60	0	100%
Negativo	60	0	60	100%

Con il prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit non è stata rilevata cross-contaminazione, né all'interno della sessione né tra sessioni.

Tasso totale di errore di sistema

Il tasso totale di errore di sistema per il saggio è stato valutato testando un pannello di 100 campioni cervicali negativi raccolti in ThinPrep e positivizzati con lo Standard Internazionale WHO di HPV16 (NIBSC) a 3 volte il valore di LoD.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 25 Risultati del tasso totale di errore di Sistema su ELITE BeGenius

Campioni	N	Positivi	Negativi	Tasso totale di errore di sistema
Campioni cervicali positivizzati a 3x LoD	100	100	0	0%

Con il prodotto HPV PLUS ELITE MGB Kit nessuno dei campioni positivi per HPV16 ha dato un risultato falso negativo. Il tasso totale di errore di sistema è risultato pari allo 0%.

Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche, tenendo conto della Sensibilità Diagnostica e della Specificità Diagnostica, sono state valutate testando campioni cervicali umani raccolti in fissativo per citologia a base alcolica in associazione ad ELITE BeGenius.

Poiché l'ELITE InGenius ha prestazioni analitiche equivalenti a quelle dell'ELITE BeGenius, le prestazioni cliniche del saggio sui due strumenti sono da considerarsi equivalenti. Di conseguenza le prestazioni cliniche del saggio ottenute su ELITE BeGenius sono applicabile anche su ELITE InGenius.

I campioni clinici utilizzati nello studio derivavano da donne tra i 17 e gli 89 anni con un precedente risultato citologico o molecolare di positività ad HPV. I campioni sono stati certificati come negativi o positivi con un metodo di riferimento validato in un laboratorio di riferimento per il test di HPV.

Le prestazioni cliniche, come concordanza rispetto al metodo di riferimento, sono state valutate attraverso il valore del kappa di Cohen. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 26 Prestazioni cliniche per HPV16–31

		Metodo di riferimento			AUC	Kappa di Cohen
		Positivi	Negativi	Totale		
HPV PLUS ELITe MGB Kit	Positivi	56	0	56	98,4%	0,967
	Negativi	2	65	67		
	Totale	58	65	123		

Tabella 27 Prestazioni cliniche per HPV HR2

		Metodo di riferimento			AUC	Kappa di Cohen
		Positivi	Negativi	Totale		
HPV PLUS ELITe MGB Kit	Positivi	54	3	57	94,2%	0,885
	Negativi	4	59	63		
	Totale	58	62	120		

Tabella 28 Prestazioni cliniche per HPV HR1

		Metodo di riferimento			AUC	Kappa di Cohen
		Positivi	Negativi	Totale		
HPV PLUS ELITe MGB Kit	Positivi	49	0	49	96,6%	0,931
	Negativi	4	65	69		
	Totale	53	65	118		

Tabella 29 Prestazioni cliniche per HPV18–45

		Metodo di riferimento			AUC	Kappa di Cohen
		Positivi	Negativi	Totale		
HPV PLUS ELITe MGB Kit	Positivi	53	1	54	97,5%	0,950
	Negativi	2	64	66		
	Totale	55	65	120		

Il prodotto HPV PLUS ELITe MGB Kit ha generato valori di AUC (area sottesa alla curva) e di Kappa di Cohen per tutti i canali corrispondenti a una concordanza pressoché perfetta rispetto al metodo di riferimento.

12 BIBLIOGRAFIA

- K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740.
- E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30.
- G. Anderson and M. Scott (1991) *Clin. Chem.* 37: 398 – 402.
- A. Marrone and J. Ballantyne (2010) *Forensic Sci. Intern. Genetics* 4: 168 – 177.
- A. Pal and R. Kundu (2020) *Front. Microbiol.* 10: 3116

J. Rotondo and F. Martini (2020) Front. Microbiol. 11: 591452.

N. Muñoz et al. (2003) The New England Journal of Medicine 348: 518 – 527.

C. J. L. M. Meijer et al. (2009) Int J Cancer 124: 516 – 520.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012). Volume 100 B.

13 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: campioni cervicali raccolti in fissativo per citologia a base alcolica.

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

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, PCR 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 dei target non è stato rilevato negli acidi nucleici estratti dal campione, ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda [11 "Caratteristiche delle Prestazioni" pagina 19](#)). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

In caso di coinfezioni, la sensibilità per un target potrebbe essere impattata dall'amplificazione di un secondo target (si veda [11 "Caratteristiche delle Prestazioni" pagina 19](#)).

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un fallimento 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 del DNA target.

Una cross-reattività è stata osservata con HPV53 e HPV82, due genotipi possibili cancerogeni (Gruppo 2B) non inclusi nell'uso previsto del prodotto (si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

Una parziale inibizione è stata osservata con HPV67 e HPV82, due genotipi possibili cancerogeni (Gruppo 2B) non inclusi nell'uso previsto del prodotto (si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

Una inibizione è stata osservata con idratante vaginale ad alta concentrazione (> 1% m/v, si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI pagina 19](#)).

Il prodotto non è validato secondo le linee guida Meijer per lo screening di HPV.

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.

14 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 30

Reazione del Controllo Positivo 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.	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 Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A.

Tabella 31

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 S.p.A..

Tabella 32

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la 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. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
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 S.p.A..

Tabella 33

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

Tabella 34

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).

Tabella 35

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 preanalitiche.	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 Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro per aerosol. Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale di laboratorio	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 Eseguire un ciclo di decontaminazione UV. Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix

15 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC relativo ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*. Certificazione rilasciata da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germany.



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

16 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente.

Al momento dell'attuale revisione dell'IFU, non si sono verificati incidenti gravi o richiami del dispositivo, aventi un impatto sulle prestazioni e sulla sicurezza del dispositivo.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà reso disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com, senza indebito ritardo.

17 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 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® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea. ThinPrep® Pap Test PreservCyt® è un marchio registrato di Hologic Inc; BD SurePath™ è un marchio registrato di Benton, Dickinson and Company.

Appendix A HPV PLUS ELITE MGB Kit used in association with Genius series® platforms



CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use at www.elitechgroup.com.

INTENDED USE

The product **HPV PLUS ELITE MGB® Kit** is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as a qualitative multiplex nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and identification of the **genomic DNA of Human Papilloma Virus** 14 high-risk types as follow: detection and typing of the high-risk HPV 16, 18, 31, 45, detection of high-risk HPV HR1 group (33, 52, 58) and detection of high-risk HPV HR2 group, non-vaccinal types, (35, 39, 51, 56, 59, 66 and 68), extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human cervical specimens placed in alcohol-based fixative for cytology.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of HPV infections, in patients with cervical cytology or HPV molecular positive test results. The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observation and laboratory outcomes.

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target 1	E6/E7	FAM	HPV16-31
Target 2	E6/E7	AP690	HPV18-45
Target 3	E6/E7	AP639	HPV HR1
Target 4	E6/E7	AP593	HPV HR2
Internal Control	beta globin	AP525	IC

Validated matrix

Cervical specimen for liquid cytology, collected in ThinPrep® Pap Test PreservCyt® Solution (Hologic, Inc.)
Cervical specimen for liquid cytology, collected in BD SurePath™ Collection Vial 10 mL (Becton, Dickinson and C.)

Kit content and related products

HPV PLUS ELITe MGB Kit Kit (RTS402ING)		HPV PLUS - ELITe Positive Control (CTR402ING)	
 X 8		 X 3	
HPV PLUS PCR Mix 8 tubes of 280 µL 12 reactions per tube 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles per tube		HPV PLUS Positive Control 3 tubes of 160 µL 4 reactions per tube 12 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles	
Maximum shelf-life:	24 months	Maximum shelf-life	24 months
Storage temperature	≤ -20°C	Storage temperature	≤ -20°C

Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> › ELITe InGenius instrument: INT030. › ELITe BeGenius instrument: INT040. › ELITe InGenius SP 200: INT032SP200. › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS. › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000. › 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S. › 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118. 	<p>ThinPrep® Pap Test PreservCyt® Solution (Hologic, Inc., code 70098-002, 20 mL of PreservCyt® Solution).</p> <p>BD SurePath™ Collection Vial 10 mL (Becton, Dickinson and Company, codes 491439 / 491438 / 491440, 10 mL of SurePath® Preservative Fluid).</p>
--	--

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Protocol

› Sample volume	200 µL	› Eluate PCR input volume	20 µL
› Total elution volume	100 µL	› PCR Mix volume	20 µL
		› Frequency of controls	15 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Target	Clinical performamnces	
		AUC	Cohen's kappa
Cervical specimens for liquid cytology	HPV16-31	98.4%	0.967
	HPV HR2	94.2%	0.885
	HPV HR1	96.6%	0.931
	HPV18-45	97.5%	0.950

Matrix	Target	Limit of Detection
Cervical samples collected in ThinPrep and Sure Path on ELITe BeGenius and ELITe InGenius	HPV16	1,700 (IU / mL)
	HPV18	1,700 (IU / mL)
	HPV31	1,700 (IU / mL)
	HPV33	2,000 (IU / mL)
	HPV45	1,700 (IU / mL)
	HPV35	1,700 (copies / mL)

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	Collection requirements	Transport/Storage conditions			
		+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Cervical specimens for liquid cytology	ThinPrep® Pap Test PreservCyt® Solution (Hologic, Inc.)	≤ 6 months	≤ 6 months	NR	NR
	BD SurePath™ Collection Vial 10 mL (Becton, Dickinson and C.)	≤ 3 months	≤ 6 months	NR	NR

NR: not recommended

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 modes are available: complete run (Extract + PCR), or PCR Only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED".</p>	<p>2. Verify controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.</p>	<p>3. Thaw the PCR Mix tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.</p>
--	--	---

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: HPV PLUS ELITE_Cyt_Sense_200_100.	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load PCR Cassettes, ELITE InGenius SP 200 extraction cartridges, and all required consumables and samples to be extracted	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, 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: HPV PLUS ELITE_Cyt_Sense_200_100 or HPV PLUS ELITE_PC or HPV PLUS ELITE_NC	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	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 modes 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 controls: Positive Control and Negative Control in the "Controls" menu. <u>Note:</u> Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the PCR Mix 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", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay Protocol" of interest: HPV PLUS ELITE_Be_Cyt_Sense_200_100 <u>Note:</u> 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 in the Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" 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

NOTE

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

Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid or controls 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: HPV PLUS ELITE_Be_Cyt_Sense_200_100 or HPV PLUS ELITE_Be_PC or HPV PLUS ELITE_Be_NC.	5. Load the PCR-Mix in the Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	8. View, approve and store the results	

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

