



AVVERTENZA del 20/08/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«Coagulation ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTSD00ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene la seguente modifica:

- *Adeguamento del prodotto al Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR) e conseguente aggiornamento dell'uso previsto.*
- **NOTA:** *La composizione e le CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI del prodotto rimangono invariate.*
- **NOTA:** *I numeri di lotto riportati nella tabella sottostante sono ancora disponibili sul mercato in conformità all'IVDD (98/79/EC) fino alla loro data di scadenza, ai sensi dell'articolo 110 dell'IVDR. Se si è in possesso di questi lotti, la relativa revisione di IFU, NON più disponibile sul sito web, può essere richiesta contattando il personale di ELITechGroup.*

REF PRODOTTO	Numero di Lotto	Data di scadenza
RTSD00ING	U1123-091	31/08/2025
RTSD00ING	U0524-050	31/07/2025

NOTA BENE



LA REVISIONE DI QUESTA IFU NON È COMPATIBILE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVISION OF THIS IFU IS NOT COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



LA RÉVISION DE CETTE IFU N'EST PAS COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRÉCÉDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU NO ES COMPATIBLE CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU NÃO ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST NICHT KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



Coagulation ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTSD00ING

UDI 08033891486204



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
ELITE INGENIUS	pag. 5
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 6
ELITE BEGENIUS	pag. 12
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 12
PROCEDURA	pag. 13
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 17
BIBLIOGRAFIA	pag. 23
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 24
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 25
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 26
AVVISO ALL'UTILIZZATORE	pag. 27
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 27
ANNEX	pag. A

USO PREVISTO

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

- gene del fattore V della coagulazione, polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) G1691A (Leiden),
- gene del fattore II della coagulazione, SNP G20210A,
- Gene 5,10-metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), SNP C677T.

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

Coagulation ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTSD00ING

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

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

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR qualitativa validata su **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione degli acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

A partire dal DNA genomico estratto dai campioni in esame, nella cartuccia si effettuano tre reazioni di amplificazione specifiche per i tre geni umani codificanti per i target di interesse e una reazione di amplificazione specifica per il controllo interno d'idoneità del campione (IC):

- Fattore V, regione dello SNP G1691A (Leiden), rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP639 nel canale **FV** dello strumento,
- Fattore II, regione dello SNP G20210A, rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo FAM nel canale **FII** dello strumento,
- MTHFR, regione dello SNP C677T, rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP593 nel canale **MTHFR** dello strumento,
- Controllo Interno, regione del gene umano codificante la beta Globina, rilevato da una sonda marcata con il fluoroforo AP525 nel canale **IC** dello strumento.

Le sonde con tecnologia ELITE MGB® sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct).

Alla fine del ciclo di amplificazione, l'analisi della curva di dissociazione (melting curve) permette di identificare la temperatura di dissociazione (melting temperature) delle sonde e di rilevare la presenza degli alleli normali e/o mutati.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **Coagulation ELITE MGB Kit**, fornisce la miscela completa di reazione per l'amplificazione Real-Time **52M PCR Mix**, pronta all'uso e pre-aliquotata in otto provette. Ogni provetta contiene **280 µL** di soluzione, sufficiente per **12 test** in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 campioni per sessione) con gli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**.

La **52M PCR Mix** contiene i primer e le sonde specifiche per:

- il gene del Fattore V, regione dello SNP G1691A (Leiden). La sonda è marcata con il fluoroforo AP639, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- il gene del Fattore II, regione dello SNP G20210A. La sonda è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- il gene della MTHFR, regione dello SNP C677T. La sonda è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,
- il IC, regione del gene umano codificante la beta Globina. La sonda è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata dal quencher non fluorescente,

La **52M PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato, e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il kit consente di effettuare **96 test** in associazione agli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
52M PCR Mix	miscela completa di reazione	8 x 280 µL	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (0.5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Acqua per biologia molecolare.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo positivo di amplificazione e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'analisi automatica dei campioni con **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) o **ELITE BeGenius** (EG SpA, ref. INT040) sono richiesti i seguenti prodotti:

- cartucce di estrazione **ELITE InGenius® SP 200** (EG SpA, Ref. INT032SP200),
- materiali di consumo per l'estrazione **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (EG SpA, Ref. INT032CS),
- **ELITE InGenius® Waste Box** (EG SpA, ref. F2102-000),
- **ELITE InGenius® PCR Cassette** (EG SpA, Ref. INT035PCR),
- **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Science, ref. TF-350-L-R-S), per **ELITE InGenius**,
- **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, ref. 30180118), per **ELITE BeGenius**.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati dei campioni con lo strumento **ELITE InGenius**, sono richiesti i seguenti Assay protocols specifici:

- parametri per il controllo positivo di amplificazione **52M ELITE_PC**,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione **52M ELITE_NC**,
- parametri per il campione in analisi **52M ELITE_WB_200_200**.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati dei campioni con lo strumento **ELITE BeGenius**, sono richiesti i seguenti Assay protocols specifici:

- parametri per il controllo positivo di amplificazione **52M ELITE_Be_PC**,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione **52M ELITE_Be_NC**,
- parametri per il campione in analisi **52M ELITE_Be_WB_200_200**.

Per la verifica del sistema è richiesto il prodotto specifico **Coagulation - ELITE Positive Control** (EG SpA, codice CTRD00ING). Il prodotto fornisce una soluzione stabilizzata di DNA plasmidici.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.

Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.

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

Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.

Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

È necessario utilizzare camici, guanti e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi e. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, essenti da DNasi ed RNasi, essenti da DNA ed RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso d'aria laminare. Le pipette utilizzate per la manipolazione dei reagenti devono essere utilizzate esclusivamente per questo scopo. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o essere utilizzate con puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, privi di DNasi e RNasi e privi di DNA e RNA.

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

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **52M PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20° C o inferiore.

La **52M PCR Mix** deve essere utilizzata entro un mese dalla prima apertura del tubo.

La **52M PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sette volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

La **52M PCR Mix** può essere conservata a bordo dello strumento nell'unità di raffreddamento *cool block* di ELITE InGenius o Cool Unit di ELITE BeGenius. fino a **sette sessioni separate di tre ore ciascuna** (modalità Extract + PCR), oppure per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario ad avviare una terza sessione (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

ELITE InGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con sangue intero raccolto in EDTA.

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8° C e conservati a +2 / +8° C per un massimo di tre giorni oppure devono essere congelati e conservati a -20 o -70 °C o temperature inferiori per un massimo di trenta giorni. Anche se sono possibili periodi di conservazione più lunghi a -70 °C o a temperature inferiori, come ampiamente riportato dalla letteratura scientifica, la loro applicazione dovrebbe essere valutata internamente dall'utilizzatore finale di questo prodotto.

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

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.2 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay Protocol **52M ELITE_WB_200_200**. Questo protocollo processa 200 µL di campione ed eluisce gli acidi nucleici in 200 µL. Quando si usa il tubo primario, il volume del campione essere di almeno 2,2 mL (13 x 7,5 mm).

Altri campioni

Al momento non sono disponibili dati relativi alle prestazioni del prodotto con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: saliva.

Sostanze interferenti

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

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare un campione con il prodotto, è obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare:

- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare il prodotto **Coagulation - ELITE Positive Control** (non fornito con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **52M ELITE_PC**
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **52M ELITE_NC**,

Nota: Lo strumento **ELITE InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database. I risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadranno **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto di reagente di amplificazione.

Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ripetuti nei seguenti casi:

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

Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati oppure materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e federali, a seconda dei casi.

PROCEDURA

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

- verifica che il sistema sia pronto,
- allestimento della sessione,
- esame e approvazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere lo strumento ELITE InGenius e accedere al sistema con la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i controlli di amplificazione (52M Positive Control, 52M Negative Control) siano stati processati, approvati e non siano scaduti (Status) in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare. Se i controlli di amplificazione non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITE MGB Kit, lo strumento **ELITE InGenius** e la matrice indicata.

L'Assay Protocol del saggio per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto **Coagulation ELITE MGB Kit** è descritto nella tabella seguente.

Assay Protocol per Coagulation ELITE MGB Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
52M ELITE_WB_200_200	Sangue intero	Wild-type / eterozigote/ omozigote	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume dell'Eluato Estratto: 200 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

Se l'Assay Protocol del saggio di interesse non è presente nel sistema contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup S.p.A..

Allestimento della sessione

Il prodotto **Coagulation ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITE InGenius** per eseguire:

- Sessione integrata (Extract + PCR),
- Sessione di amplificazione (PCR only),
- Sessione di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

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

Nota: **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information System" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITE InGenius**.

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

A Sessione integrata

Per impostare la corsa integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Se necessario, scongelare i campioni a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) e manipolarli secondo le linee guida del laboratorio e quanto descritto nel paragrafo "Campioni e controlli".
2. Scongelare il tubo di **52M PCR Mix** per la sessione a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 campioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **52M PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

3. Selezionare "Perform Run" nella "Home" (schermata iniziale).
4. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
5. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
6. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio 52M ELITE_WB_200_200).
7. Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo), il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
 - se è utilizzato il tubo primario, selezionare "Primary Tube",
 - se è utilizzato un tubo secondario, selezionare "Extraction Tube".Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare la **52M PCR Mix** nell'"Inventory Block" (Blocco dei Reagenti) selezionato seguendo le istruzioni della GUI e inserire il numero di lotto e la data di scadenza della **52M PCR Mix**. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le **PCR Cassette**, le cartucce di estrazione **ELITE InGenius SP 200**, tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota: Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento l'Elution Tube con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C o temperatura inferiore per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota: La miscela **PCR Mix** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Sessione di amplificazione

Per allestire una sessione di amplificazione partendo dal DNA estratto, procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Se necessario, scongelare il tubo di **52M PCR Mix** per la sessione a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (almeno 2 campioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongelare la miscela **52M PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Selezionare "Perform Run" nella "Home" (schermata iniziale).
3. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
4. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay" (saggio) (ad esempio 52M ELITE_WB_200_200).
6. Selezionare "PCR Only" (solo PCR) nella colonna "Protocol" (protocollo).
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" (posizione campione) sia "Elution tube" (provetta di eluzione). Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare la **52M PCR Mix** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI e inserire il numero di lotto e la data di scadenza della **52M PCR Mix**. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare le **PCR Cassette** e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Chiudere la porta dello strumento.
12. Premere Start per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati, come anche di stampare e salvare il rapporto.

Nota: Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento l'"Elution tube" con il campione estratto residuo, chiuderlo e conservarlo a -20 °C o temperature inferiori per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota: La miscela **PCR Mix** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare il tubo di **52M PCR Mix** per la sessione a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per preparare 12 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
Nota: Scongellare la miscela **52M PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.
2. Scongellare il tubo di **52M Positive Control** per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Come Controllo Negativo, trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito con il prodotto "ELITE InGenius SP 200 Consumable Set".
4. Selezionare "Perform Run" nella "Home" (schermata iniziale).
5. Nel Track di interesse selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (saggio).
6. Per il controllo positivo, identificare un "Track" (corsia), selezionare l'Assay Protocol 52M ELITE_PC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del 52M Positive Control.
7. Per il controllo negativo, selezionare l'Assay Protocol 52M ELITE_NC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione.
9. Caricare la **52M PCR Mix** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI e inserire il numero di lotto e la data di scadenza della **52M PCR Mix**. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le **PCR Cassette**, il tubo di **52M Positive Control** e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento.
13. Premere Start per iniziare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati, e di stampare e salvare il rapporto.

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

Nota: Alla fine della corsa le **PCR Cassette** con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La miscela **PCR Mix** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITE InGenius**.

Nota: **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (sistema di interfacciamento - LIS) tramite il quale è possibile inviare automaticamente i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITE InGenius**.

ELITE InGenius genera i risultati con il prodotto **Coagulation ELITE MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

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

A. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i tre geni (canali **FV**, **FII** e **MTHFR**) e per l'IC (canale **IC**) nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dall'**ELITE InGenius** software con i parametri inclusi negli Assay protocol "52M ELITE_PC" e "52M ELITE_NC".

I risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da parte del personale con la qualifica di Administrator (amministratore) o Analyst (operatore), seguendo le istruzioni della GUI.

I risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**.

Prima di analizzare qualsiasi campione, è obbligatorio verificare che i risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo siano approvati e validi per il lotto di reagente di PCR. Lo stato dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo per ciascun lotto di reagente di PCR è mostrato nella schermata "Controlli" (Controls). Se i risultati del controllo positivo e/o del controllo negativo sono assenti o scaduti, generarli come descritto sopra.

I risultati delle sessioni di amplificazione del controllo positivo e del controllo negativo sono utilizzati dal **software ELITE InGenius** per calcolare le Carte di controllo ("Control Chart"). Quattro risultati dei controlli positivi e negativi approvati vengono utilizzati per impostare calcolare le Carte di controllo iniziali. Per i controlli successivi, i risultati vengono analizzati dal software per garantire che le prestazioni del sistema rientrino nei criteri di accettazione, e indicati nei grafici delle Carte di controllo. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

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

B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i tre geni (canali **FV**, **FII**, **MTHFR**) e per l'IC (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol.

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di PCR dei tre geni (Canali **FV**, **FII**, **MTHFR**) e della sonda del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi nell' Assay Protocol 52M ELITE_WB_200_200.

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display") (schermata dei risultati).

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

1) Controllo Positivo	Status
52M Positive Control	APPROVED
2) Controllo Negativo	Status
52M Negative Control	APPROVED

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

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

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante.

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
Factor V: Wild-type for Factor V	Il campione presenta un genotipo normale per il locus Fattore V SNP G1691A.
Factor V: Heterozygous for Factor V Leiden.	Il campione presenta un genotipo eterozigote mutato per il locus Fattore V SNP G1691A (Leiden).
Factor V: Homozygous for Factor V Leiden.	Il campione presenta un genotipo omozigote mutato per il locus Fattore V SNP G1691A (Leiden).
Factor II: Wild-type for Factor II	Il campione presenta un genotipo normale per il locus Fattore II SNP G20210A.
Factor II: Heterozygous for Factor II 20210A.	Il campione presenta un genotipo eterozigote mutato per il locus Fattore II SNP G20210A (20210A).
Factor II: Homozygous for Factor II 20210A.	Il campione presenta un genotipo omozigote mutato per il locus Fattore II SNP G20210A (20210A).
MTHFR: Wild-type for MTHFR	Il campione presenta un genotipo normale per il locus MTHFR SNP C677T.
MTHFR: Heterozygous for MTHFR 677T.	Il campione presenta un genotipo eterozigote mutato per il locus MTHFR SNP C677T (677T).
MTHFR: Homozygous for MTHFR 677T.	Il campione presenta un genotipo omozigote mutato per il locus MTHFR SNP C677T (677T).
IC: Valid Sample	Il campione presenta un valore di Ct dell'IC inferiore a 26,5 e risulta valido.
Inconclusive - Retest Sample.	Risultato del saggio non definito a causa di un problema del campione.
Invalid - Retest Sample.	Risultato del saggio non valido a causa di un problema di estrazione errata, presenza di un inibitore.

I campioni segnalati con "Inconclusive - Retest Sample", non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato, in quanto non è stato possibile identificare la temperatura di dissociazione (Tm) degli alleli normale emutato. In questo caso non è stato possibile eseguire in modo efficiente l'analisi di dissociazione perché si sono verificati problemi con il campione (presenza di inibitori nell'estratto o presenza di altri SNP interferenti) che possono causare risultati errati.

I campioni segnalati con "Invalid - Retest sample" dall'**ELITe InGenius** software non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA genomico umano del campione perché si sono verificati problemi nella fase di estrazione o nella fase di amplificazione (degradazione del DNA, perdita del DNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto o quantità insufficiente di DNA nel campione) che possono causare risultati errati.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il saggio deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione utilizzando la modalità "Extract + PCR".

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

Nota: quando si approvano i risultati del test, verificare sempre il risultato controllando i grafici della curva di dissociazione nel report della sessione di lavoro. Le temperature di dissociazione (Tm) degli alleli wild-type e/o mutati di ciascun gene in analisi devono corrispondere ai picchi mostrati nei grafici della curva di dissociazione.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della corsa del campione come "Sample Report" e "Track Report".

C. Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

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

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

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

ELITe BeGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con campioni di sangue intero raccolti in EDTA.

I campioni di sangue intero per l'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA e identificati secondo le linee guida del laboratorio, trasportati a +2 / +8° C e conservati a +2 / +8° C per un massimo di tre giorni, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 o -70°C o temperatura inferiore per un massimo di trenta giorni. Anche se sono possibili periodi di conservazione più lunghi a -70 °C o temperatura inferiore, come ampiamente riportato dalla letteratura scientifica, la loro applicazione dovrebbe essere valutata internamente dall'utilizzatore finale di questo prodotto.

Si raccomanda di suddividere i campioni da congelare in aliquote per evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero su ELITe BeGenius e con ELITe BeGenius Software versione 2.1.0 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay Protocol **52M ELITe_Be_WB_200_200**. Questo protocollo elabora 200 µl di campione ed eluisce gli acidi nucleici in 200 µl. Quando si utilizza una provetta primaria (13 x 75 mm, 13 x 100 mm o 16 x 100 mm), il volume del campione deve essere almeno di 1,5 mL.

Altri campioni

Al momento non sono disponibili dati relativi alle prestazioni del prodotto con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: saliva.

Sostanze interferenti

I dati disponibili riguardanti l'inibizione causata da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" del capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare un campione, è obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare:

- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare il prodotto **Coagulation - ELITe Positive Control** (non fornito con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **52M ELITe_Be_PC**
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **52M ELITe_Be_NC**,

Nota: Lo strumento ELITe BeGenius richiede la presenza di risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database. I risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto di reagente di amplificazione.

Inoltre, i controlli di amplificazione devono essere ripetuti nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- quando i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando lo strumento ELITe BeGenius deve essere sottoposto ad un importante intervento di manutenzione.

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

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

- verifica che il sistema sia pronto,
- impostazione della sessione,
- esame e approvazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

- Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
- accendere ELITe BeGenius e selezionare la modalità "CLOSED";
- verificare che i controlli di amplificazione (52M Positive Control, 52M Negative Control) siano ottenuti in associazione al lotto di **52 M PCR Mix** che si intende usare e che i risultati siano approvati e non scaduti (Status). Se i controlli di amplificazione non sono approvati o sono scaduti, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito,.
- selezionare il tipo di sessione, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol (protocolli del saggio) forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITe MGB Kit, lo strumento ELITe BeGenius e la matrice indicata.
- L'Assay Protocol del saggio per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto **Coagulation ELITe MGB Kit** è descritto nella tabella seguente.

Assay Protocol per il prodotto Coagulation ELITe MGB Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
52M ELITe_Be_WB_200_200	Sangue intero	Wild-type/ heterozygous/ homozygous	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume dell'Eluato Estratto: 200 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione:1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

Se l'Assay Protocol del saggio di interesse non è presente nel sistema contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup S.p.A..

Impostazione della sessione

Il prodotto **Coagulation ELITe MGB Kit** in associazione allo strumento **ELITe BeGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- Sessione integrata (Extract + PCR),
- Sessione di amplificazione (PCR only),
- Sessione di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

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

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

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

A Sessione integrata

Per allestire una sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Scongellare i campioni a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) e maneggiarli secondo le linee guida del laboratorio e la sezione "Campioni e controlli".
2. Scongellare il tubo di **52M PCR Mix** per la sessione a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo del reagente (almeno 2 reazioni per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota bene: Scongellare la miscela **52M PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

3. Selezionare "Perform Run" nella "Home"(schermata iniziale).
4. Rimuovere i rack dalla Unità di Raffreddamento e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare la "Run mode" (modalità di esecuzione): Extract + PCR.
6. Caricare i campioni nel "Sample Rack" (rack 5 e 4, iniziando sempre dal rack 5), utilizzando gli adattatori per l'adattamento ottimale, se necessario.
7. Inserire il Rack nella "Cooler Unit" (Unità di Raffreddamento) Fare clic su " Next " per continuare.

Nota: Se si utilizzano tubi secondari selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha il codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID".

8. Verificare che l'" Extraction Input Volume" (Volume dell'estrazione iniziale" sia 200 µL e che l'" Extracted Eluate Volume"(Volume di eluizione dell'estrazione) sia 200 µL.
9. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo del test da utilizzare (ad esempio 52M ELITe_Be_WB_200_200). Fare clic su " Next" per continuare
10. Se si utilizza il Rack 4, ripetere le azioni da 7 a 9.
11. Caricare gli "Elution tube" (tubi di eluizione) nei Racks 3 e 2 (partendo sempre dal Rack 3).

Nota: le provette di eluizione possono essere etichettate per migliorare la tracciabilità.

12. Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per proseguire.
13. Se si utilizza il rack 2, ripetere il passaggio 12..
14. Caricare la **52M-PCR Mix** nel Rack 1.
15. Inserire il Rack 1 nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per proseguire.
16. Nell'"Inventory Area" (area consumabili) controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) e, se necessario, sostituire i rack per puntali. Fare clic su "Next" per proseguire.
17. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette" nell'"Inventory Area", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.

18. Caricare l'"Extraction Rack" (cestello di estrazione) con le cartucce di estrazione **ELITE InGenius SP 200** e i materiali di consumo richiesti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per continuare.
19. Chiudere lo sportello dello strumento.
20. Premere "Start" per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, **ELITE BeGenius** consente agli utenti di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report.

Nota: al termine dell'analisi, rimuovere dallo strumento gli "Elution tube" con il campione estratto residuo, chiuderli, identificarli e conservarli a -20 °C o temperatura inferiore per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della sessione, le "**PCR Cassette**" con i prodotti della reazione e gli altri materiali di consumo devono essere rimossi dallo strumento e smaltiti senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La miscela **PCR Mix** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Sessione di amplificazione

Per allestire una sessione di amplificazione a partire dal DNA estratto, attenersi alla seguente procedura facendo riferimento alla GUI:

1. Se necessario, scongelare gli eluati dei campioni a temperatura ambiente (+21 ±5 °C). Mescolare delicatamente e poi centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongela le provette **52M PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 24 reazioni in condizioni ottimizzate (2 o più test per sessione). Mescolare gentilmente e centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Nota: Scongela la miscela **52M PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

3. Selezionare " Perform Run" nella "Home" (schermata iniziale) .
4. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" (unità di raffreddamento) e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare la modalità di esecuzione: PCR Only.
6. Caricare i campioni nei Racks 3 e 2 (partendo sempre dal Rack 3)..
7. Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" (unità di raffreddamento). Fare clic su "Next" per continuare.
8. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e l'"Extraction Elution Volume" sia 200 µL, anche se l'estrazione non viene eseguita.
9. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare l'Assay protocol (protocollo del saggio) (ad esempio. 52M ELITE_Be_WB_200_200). Fare clic su "Next" per continuare.
10. Se si utilizza il rack 2, ripetere la procedura dal punto 7 al 9.
11. Caricare la **PCR 52M Mix** nel Rack 1.
12. Inserire il Reagent/Elution Rack" nell'unità di raffreddamento. Fare clic su "Next" per continuare.
13. Nell'"Inventory Area" (area consumabili) controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) e, se necessario, sostituire i rack per puntali. Fare clic su "Next" per continuare.
14. Caricare "PCR Rack" (cestello di PCR) con le **PCR cassette** nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per continuare.
15. Chiudere lo sportello dello strumento.
16. Premere "Start" per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, **ELITE BeGenius** consente agli utenti di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report.

Nota: al termine della corsa, il campione estratto residuo deve essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C o temperatura inferiore per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: al termine della corsa, le **PCR cassette** e gli altri materiali di consumo devono essere rimossi dallo strumento e smaltiti senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La miscela **PCR Mix** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C. Corsa di amplificazione per controllo positivo e controllo negativo

Per allestire una sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo, attenersi alla procedura seguente facendo riferimento alla GUI:

1. Scongela le provette **52M PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 12 reazioni in condizioni ottimizzate (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo.

Nota: proteggere la **52M PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

2. Scongela le provette del **52M Positive Control** a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo.
3. Trasferire ≥ 50 µL di acqua per biologia molecolare (come controllo negativo) in un "Elution tube" (provetta di eluizione), fornita con il prodotto **ELITE InGenius SP Consumable Set**.
4. Selezionare Perform Run nella Home" (Schermata iniziale).
5. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" (unità di raffreddamento) e posizionarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare la modalità di esecuzione "PCR Only".
7. Caricare le provette del Positive Control e del Negative Control nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati, rack 3).
8. Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" (unità di raffreddamento). Fare clic su "Next" per continuare.
9. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo del test da utilizzare (52M ELITE_Be_PC e 52M ELITE_Be_NC). Fare clic sul pulsante "Next" per continuare
10. Caricare la **52M PCR Mix** nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati, Rack 2).
11. Inserire il "Reagent/Elution Rack" nell'"Unità di raffreddamento". Fare clic su "Next" per continuare il setup.
12. Nell'"Inventory Area" (area consumabili) selezionare controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) e, se necessario, sostituire i rack per puntali. Fare clic su "Next" per proseguire.
13. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con la **PCR Cassette** nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per continuare.
14. Chiudere lo sportello dello strumento.
15. Premere "Start" per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, **ELITE BeGenius** consente agli utenti di visualizzare, approvare e memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report.

Nota: al termine dell'analisi, prelevare dallo strumento il **Positive Control** residuo, chiuderlo e conservato a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Positive Control.

Coagulation ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTSD00ING

Nota: al termine della corsa, le "PCR Cassette" e gli altri materiali di consumo devono essere rimossi dallo strumento e smaltiti senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La miscela PCR Mix può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nel blocco refrigerato per 2 sessioni di 3 ore ciascuna (Modalità Extract + PCR) e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata " Results Display ". In questa schermata vengono mostrati i risultati del campione/controllo e le informazioni relative alla sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report (Sample Report o Track Report).

ELITe BeGenius genera i risultati con il prodotto **Coagulation ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

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

Nota: fare riferimento agli stessi capitoli di **ELITe InGenius** per i dettagli.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI
ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Efficienza di rilevazione (Inclusività)

L'efficienza di rilevazione dei geni Fattore V, Fattore II e MTHFR è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

Le sonde fluorescenti permettono di rilevare gli alleli dei geni Fattore V, Fattore II e MTHFR riportati nella tabella seguente. I limiti degli intervalli di Tm correlati per **ELITe InGenius** sono stati calcolati con i dati ottenuti negli studi di verifica e validazione e di seguito in tabella sono mostrati gli intervalli di Tm in uso. Gli intervalli di Tm per **ELITe BeGenius** sono stati aggiornati analizzando i dati ottenuti nello studio di verifica relativo all'estensione dell'uso del prodotto su ELITe BeGenius.

Gene	Alleli rilevati dal prodotto	Intervallo di Tm	
		ELITe InGenius	ELITe BeGenius
Fattore V	Allele 1691G (normale)	53,0° C – 57,0° C	52,5° C – 56,5° C
	Allele 1691A (mutato, Leiden)	61,0° C – 65,0° C	59,5° C – 63,5° C
Fattore II	Allele 20210G (normale)	56,0° C – 61,0° C	55,0° C – 60,0° C
	Allele 20210A (mutato)	64,0° C – 69,0° C	63,0° C – 68,0° C
MTHFR	Allele MTHFR 677C (normale)	55,0° C – 59,0° C	54,0° C – 58,0° C
	Allele MTHFR 677T (mutato)	64,0° C – 68,0° C	63,0° C – 67,0° C

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del prodotto Coagulation ELITe MGB Kit è stata definita in associazione a **ELITe InGenius** (modalità PCR Only) ed è stata verificata su **ELITe BeGenius** (modalità PCR Only).

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di identificare la presenza di circa 20.000 molecole di DNA bersaglio (pari ai genomi di ~10.000 cellule o ~70 ng DNA genomico umano) nei 20 µL di DNA estratto nella reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica è stata verificata utilizzando pannelli di DNA genomico umano certificato per il Fattore V e Fattore II (WHO Reference Reagent Factor V Leiden, Human gDNA, 1st International Genetic International Panel, NIBSC, UK, code 04/224, e WHO Reference Reagent Prothrombin Mutation G20210A, Human gDNA, 1st International Genetic International Panel, NIBSC, UK, code 05/130).

Coagulation ELITe MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTSD00ING

I tre campioni (wild-type, eterozigote e omozigote) di ciascun pannello sono stati testati in 4 replicati ad una quantità di circa 70 ng per reazione per eseguire la procedura di amplificazione e rilevazione con il prodotto e con gli strumenti **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius**. Tutti i replicati sono risultati validi e determinati correttamente.

Specificità analitica

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

Un campione simulato con circa 80.000 copie di plasmide è stato impiegato in 24 replicati per eseguire la procedura di amplificazione e rilevazione con il prodotto e lo strumento ELITe InGenius. Tutti i replicati sono risultati determinati correttamente: nessun campione mutato per il Fattore II SNP C20209T è stato scambiato per un eterozigote o un omozigote mutato per il Fattore II SNP G20210A.

La specificità analitica è stata inoltre verificata per i seguenti SNP rari pubblicati in letteratura che si trovano in prossimità degli SNP di interesse:

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

La specificità analitica è stata verificata attraverso l'utilizzo di costrutti plasmidici contenenti la regione amplificata dei geni Fattore V, Fattore o MTHFR normale per lo SNP di interesse e mutante per lo SNP raro in analisi.

Campioni simulati con circa 80.000 copie di plasmidi sono stati impiegati in 6 replicati per eseguire la procedura di amplificazione e rilevazione con il prodotto e lo strumento ELITe InGenius. I replicati sono risultati "Inconclusive" o identificati correttamente. Nessun campione mutato per gli SNP rari in analisi è stato identificato come un eterozigote o un omozigote mutato per gli SNP di interesse.

SNP rari che cadono all'interno della regione di ibridazione della sonda possono interferire con il rilevamento dello SNP d'interesse e potrebbero portare a risultati di "falso mutante omozigote" quando si verificano insieme alla mutazione dell'SNP di interesse sull'altro allele.

Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con organismi diversi che possono essere trovati in campioni clinici di sangue intero è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche.

L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa e pertanto non sono attese cross-reattività.

Organismi potenzialmente interferenti: inibizione

L'assenza di inibizione con organismi diversi che possono essere trovati in campioni clinici di sangue intero è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche.

L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa e pertanto non sono attese inibizioni.

Sostanze interferenti

L'effetto di sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando un campione di sangue intero raccolto in EDTA, eterozigote per i tre geni di interesse, addizionato con la potenziale sostanza interferente. (Bilirubina 300 µg/ml, Trigliceridi 4 mg/ml, Eparina 8,3 µg/ml, 50 mM EDTA, Ibuprofene 100 µg/ml, Ganciclovir 10 µg/ml, Ampicillina 18 µg/ml e Ciclosporina 0,3 µg/ml).

I campioni con aggiunta delle sostanze e il campione di riferimento (senza aggiunta delle sostanze) sono stati impiegati per eseguire in 3 replicati l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con il prodotto e il sistema ELITe InGenius. Tutti i replicati sono risultati validi e determinati correttamente.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Sostanze Interferenti	Genotipo FV het / FII het / MTHFR het	IC Ct (Cut-off = 26.5)			Esito
		replicati			
		1	2	3	
Control	3 / 3	22.72	22.42	22.25	Nessuna interferenza
Cyclosporine A	3 / 3	22.55	22.17	22.31	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	22.47	22.87	22.35	Nessuna interferenza
Heparin	3 / 3	22.31	22.67	22.31	Nessuna interferenza
EDTA	3 / 3	23.27	23.46	23.41	Nessuna interferenza
Ibuprofen	3 / 3	24.98	23.77	23.59	Nessuna interferenza
Triglycerides	3 / 3	23.42	24.49	24.51	Nessuna interferenza
Ampicillin	3 / 3	22.59	22.69	22.26	Nessuna interferenza
Bilirubin	3 / 3	22.73	22.61	22.35	Nessuna interferenza

Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata verificata analizzando la variabilità dei risultati ottenuti dal prodotto Coagulation ELITE MGB Kit in associazione con **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** testando un pannello di sangue intero raccolto in EDTA composto da 3 campioni:

- genotipo FII SNP G1691A eterozigote (Leiden) (FV normale e MTHFR normale)
- genotipo FV SNP G20210A eterozigote (FII normale e MTHFR eterozigote)
- genotipo MTHFR SNP C677T eterozigote (FII normale e FV normale)

La Ripetibilità Intra – Sessione è stata ottenuta attraverso l'analisi di 3 campioni del pannello, ciascuno eterozigote per l'SNP di interesse di un gene, in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

La Ripetibilità Inter – Sessione è stata ottenuta attraverso l'analisi di 3 campioni del pannello, ciascuno eterozigote per l'SNP di interesse di un gene, in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

Tutti i replicati sono risultati validi e determinati correttamente. La variabilità dei risultati ottenuti è stata calcolata come Coefficiente di Variazione percentuale (%CV) dei valori di ciclo soglia (Ct) dell'amplificazione dell'IC e dei valori di temperatura di dissociazione (Tm) dei tre geni di interesse.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	8	22.07	0.41
Eterozigote FV SNP G20210A		8	22.91	0.76
Eterozigote MTHFR SNP C677T		8	22.02	1.22

Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	Media Tm	%CV Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Fattore II wild type	8	58.19	0.207
	Fattore II mutato	8	65.66	0.051
Eterozigote FV SNP G20210A	Fattore V wild type	8	55.18	0.048
	Fattore V mutato	8	62.31	0.120
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	8	56.73	0.183
	MTHFR mutato	8	65.90	0.169

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	Media Ct	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.12	1.12
Eterozigote FV SNP G20210A		16	22.91	0.75
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22.10	1.36

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	Media Tm	%CV Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Fattore II wild type	16	58.18	0.182
	Fattore II mutato	16	65.78	0.258
Eterozigote FV SNP G20210A	Fattore V wild type	16	55.18	0.064
	Fattore V mutato	16	62.31	0.116
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.73	0.211
	MTHFR mutato	16	65.96	0.257

La Ripetibilità su **ELITE InGenius** del prodotto Coagulation ELITE MGB Kit ha mostrato un CV% dei valori di Ct dell'amplificazione del IC inferiori al 5% e CV% dei valori di Tm dei tre geni di interesse inferiori al 5%.

Ripetibilità Intra – Sessione con ELITE BeGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	MediaCt	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	8	22.35	1.90
Eterozigote FV SNP G20210A		8	22.95	2.20
Eterozigote MTHFR SNP C677T		8	22.40	1.28

Ripetibilità Intra - Sessione con ELITE BeGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	MediaTm	%CV Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Fattore II wild type	8	57.64	0.392
	Fattore II mutato	8	65.21	0.150
Eterozigote FV SNP G20210A	Fattore V wild type	8	54.84	0.120
	Fattore V mutato	8	61.56	0.242
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	8	56.29	0.174
	MTHFR mutato	8	65.30	0.116

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE BeGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	MediaCt	%CV Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.26	1.58
Eterozigote FV SNP G20210A		16	23.10	2.02
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22.45	1.75

Ripetibilità Inter - Sessione con ELITE BeGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	MediaTm	%CV Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Fattore II wild type	16	57.71	0.494
	Fattore II mutato	16	65.24	0.119
Eterozigote FV SNP G20210A	Fattore V wild type	16	54.84	0.131
	Fattore V mutato	16	61.60	0.218
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.29	0.273
	MTHFR mutato	16	65.28	0.099

La Ripetibilità su **ELITE BeGenius** del prodotto Coagulation ELITE MGB Kit ha mostrato un CV% dei valori di Ct dell'amplificazione del IC inferiori al 5% e CV% dei valori di Tm dei tre geni di interesse inferiori al 5%.

Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata verificata analizzando la variabilità dei risultati ottenuti dal prodotto Coagulation ELITE MGB Kit in associazione con **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** testando un pannello di sangue intero raccolto in EDTA composto da 3 campioni:
- genotipo FII SNP G1691A eterozigote (Leiden) (FV normale e MTHFR normale),
- genotipo FV SNP G20210A eterozigote (FII normale ed eterozigote MTHFR),
- genotipo MTHFR SNP C677T eterozigote (FII normale e FV normale).

La riproducibilità Inter – Lotto è stata ottenuta attraverso l'analisi di 3 campioni del pannello, ciascuno eterozigote per l'SNP di interesse di un gene, in 8 replicati per giorno, utilizzando due 2 lotti diversi e lo stesso strumento in 2 giorni differenti. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

La riproducibilità Inter-strumento è stata ottenuta attraverso l'analisi di 3 campioni del pannello, ciascuno eterozigote per l'SNP di interesse di un gene, in 8 replicati per giorno, utilizzando due strumenti diversi, da parte di due operatori diversi in 2 giorni differenti. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

Tutti i replicati sono risultati validi e determinati correttamente. La variabilità dei risultati ottenuti è stata calcolata come Coefficiente di Variazione percentuale (CV%) dei valori di ciclo soglia (Ct) dell'amplificazione del IC e dei valori di temperatura di fusione (Tm) dei tre geni di interesse.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Inter – Lotto Riproducibilità con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	Media Ct	CV% Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.28	1.28
Eterozigote FV SNP G20210A		16	22.46	2.58
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23.14	1.47

Inter – Lotto Riproducibilità con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	Media Tm	CV% Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Factor II wild type	16	58.1	0.23
	Factor II mutato	16	65.7	0.12
Eterozigote FV SNP G20210A	Factor V wild type	16	55.1	0.10
	Factor V mutato	16	62.3	0.13
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.6	0.32
	MTHFR mutato	16	65.8	0.22

Inter – Strumento Riproducibilità con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Target	N	Media Ct	CV% Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.38	1.53
Eterozigote FV SNP G20210A		16	22.45	2.34
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23.13	1.27

Inter – strumento Riproducibilità con ELITE InGenius				
Pannello di Campioni	Allele	N	Media Tm	CV% Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Factor II wild type	16	58.1	0.27
	Factor II mutato	16	65.6	0.12
Eterozigote FV SNP G20210A	Factor V wild type	16	55.1	0.21
	Factor V mutato	16	62.2	0.16
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.6	0.35
	MTHFR mutato	16	65.7	0.28

La riproducibilità su **ELITE InGenius** del prodotto Coagulation ELITE MGB Kit ha mostrato un CV% dei valori di Ct del IC inferiori al 5% e un %CV dei valori di Tm dei tre geni di interesse inferiore al 5%.

Inter – Lotto Riproducibilità con ELITE BeGenius				
Pannello di campioni	Target	N	Media Ct	CV% Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.42	1.72
Eterozigote FV SNP G20210A		16	22.60	1.99
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	22.80	2.20

Inter – Lotto Riproducibilità ELITE BeGenius				
Pannello di campioni	Allele	N	Media Tm	CV% Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Factor II wild type	16	57.6	0.29
	Factor II mutato	16	65.2	0.11
Eterozigote FV SNP G20210A	Factor V wild type	16	54.8	0.11
	Factor V mutato	16	61.5	0.24
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.2	0.27
	MTHFR mutato	16	65.2	0.28

Inter – strumento Riproducibilità con ELITE BeGenius				
Pannello di campioni	Target	N	Media Ct	CV% Ct
Eterozigote FII SNP G1691A	IC	16	22.51	1.60
Eterozigote FV SNP G20210A		16	22.63	1.68
Eterozigote MTHFR SNP C677T		16	23.15	1.83

Inter – strumento Riproducibilità con ELITE BeGenius				
Pannello di campioni	Allele	N	Media Tm	CV% Tm
Eterozigote FII SNP G1691A	Factor II wild type	16	57.7	0.45
	Factor II mutato	16	65.2	0.13
Eterozigote FV SNP G20210A	Factor V wild type	16	54.8	0.16
	Factor V mutato	16	61.6	0.23
Eterozigote MTHFR SNP C677T	MTHFR wild type	16	56.2	0.30
	MTHFR mutato	16	65.3	0.17

La riproducibilità su **ELITE BeGenius** del prodotto Coagulation ELITE MGB Kit ha mostrato un CV% dei valori di Ct del IC inferiori al 5% e un %CV dei valori di Tm dei tre geni di interesse inferiore al 5%.

Robustezza: Assenza di contaminazione incrociata

L'assenza di contaminazione incrociata è stata verificata analizzando campioni di sangue intero alternati a campioni di acqua per biologia molecolare.

Nel test 6 campioni di sangue intero sono stati alternati a 6 campioni di acqua per biologia molecolare e sono stati impiegati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con il prodotto **Coagulation ELITE MGB Kit** ed **ELITE InGenius** in cinque sessioni diverse.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

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

Il saggio ha restituito risultati invalidi per i campioni di acqua per biologia molecolare testati, dimostrando l'assenza di cross-contaminazione.

Concordanza diagnostica: conferma del genotipo del campione certificato

La concordanza diagnostica di questo saggio, come capacità di identificare correttamente il genotipo del campione certificato, è stata testata su campioni clinici di sangue intero di soggetti con genotipo noto e, per i genotipi omozigoti mutati dei locus Fattore II SNP G20210A e MTHFR SNP C677T, su campioni simulati.

La concordanza diagnostica è stata verificata utilizzando 219 campioni di sangue intero raccolto in EDTA provenienti da soggetti diversi il cui genotipo è stato determinato con prodotti validati di real time PCR di riferimento e 92 campioni simulati con genotipo omozigote mutato, preparati con plasma EDTA addizionato di miscele di DNA plasmidici.

I campioni sono stati impiegati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, utilizzando il prodotto ed **ELITe InGenius**.

I risultati sono riassunti nelle tabelle sottostanti.

Genotipo Campioni: Fattore V G1691A	N	WT	Eterozigoti	Omozigoti mutati	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild-type	108	108	0	0	100%	100%
Eterozigoti	57	0	57	0	100%	
Omozigoti mutati	53	0	0	53	100%	

Nella determinazione allelica del locus Fattore V SNP G1691A, il saggio ha restituito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questa prova la concordanza diagnostica totale per il locus Fattore V SNP G1691A è risultata uguale a 100%.

Genotipo Campioni: Fattore II G20210A	N	WT	Eterozigoti	Omozigoti mutati	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild-type	160	160	0	0	100%	100%
Eterozigoti	59	0	59	0	100%	
Omozigoti mutati (simulati)	56	0	0	56	100%	

Nella determinazione allelica del locus Fattore II SNP G20210A, il saggio ha restituito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questa prova la concordanza diagnostica totale per il locus Fattore II G20210A è risultata uguale a 100%.

Genotipo Campioni: MTHFR C677T	N	WT	Eterozigoti	Omozigoti mutati	Concordanza diagnostica	Concordanza diagnostica totale
Wild-type	63	63	0	0	100%	100%
Eterozigoti	136	0	136	0	100%	
Omozigoti mutati	19	0	0	19	100%	
Omozigoti mutati (simulati)	36	0	0	36		

Nella determinazione allelica del locus MTHFR SNP C677T, il saggio ha restituito risultati concordanti per tutti i campioni analizzati. In questa prova la concordanza diagnostica totale per il locus MTHFR SNP C677T è risultata uguale a 100%.

Poiché **ELITe BeGenius** presenta prestazioni analitiche equivalenti a **ELITe InGenius**, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono considerate equivalenti. Pertanto, le prestazioni diagnostiche del saggio ottenuta in associazione con **ELITe InGenius** è applicabile anche a **ELITe BeGenius**.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 26,5, per entrambi gli strumenti **ELITe InGenius ed ELITe BeGenius**.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e lo strumento sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "Coagulation ELITe MGB Kit", FTP RTSD00ING.

BIBLIOGRAFIA

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

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto campioni clinici di sangue intero raccolto in EDTA.

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con i seguenti campioni clinici: saliva.

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

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi per gli acidi nucleici target del saggio, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per la manipolazione di campioni biologici dedicati ai test di amplificazione degli acidi nucleici per evitare risultati falsi positivi.

Un risultato non valido o non determinato ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA genomico del campione o la temperatura di dissociazione degli alleli. In questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nelle regioni degli acidi nucleici target del saggio in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e le sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione degli acidi nucleici target e portare a risultati errati.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, non determinati o errati. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente. Tuttavia, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato ponderato rispetto ai potenziali benefici per il paziente ed è stato giudicato accettabile.

PROBLEMI E SOLUZIONI

Reazione del Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di controllo positivo e PCR Mix. Controllare i volumi di controllo positivo e PCR Mix.
Degradazione del Positive Control.	Usare una nuova aliquota di controllo positivo.
Degradazione della PCR Mix.	Usare una nuova aliquota di PCR Mix.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica.

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di controllo negativo e PCR Mix. Controllare i volumi di controllo negativo e PCR Mix.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack o del Blocco dell'Inventory Area.	Pulire superfici con detergenti acquosi, lavare camicie, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica.

Reazione del Campione non valida o non definita	
Possibili cause	Soluzioni
Errore durante l'impostazione della sessione.	Controllare la posizione di campioni e PCR Mix. Controllare i volumi di campioni e PCR Mix.
Degradazione della PCR Mix.	Usare una nuova aliquota di PCR Mix.
Presenza di sostanze interferenti nel campione.	Ripetere l'amplificazione con una diluizione 1 : 2 in acqua ultrapura per biologia molecolare del campione eluito in una sessione "PCR only" (solo PCR).
Quantità insufficiente di DNA nel campione.	Ripetere l'amplificazione con una nuova aliquota di campione in una sessione Extract + PCR.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica.

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR).

Errore TH, errore SDM, errore Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con anomala forma del plot.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR).

LEGENDA DEI SIMBOLI

-  Codice articolo.
-  Limite superiore di temperatura.
-  Codice lotto.
-  Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
-  Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.
-  Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC (IVDR) relativo ai dispositivi medico-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.
-  Conservare al riparo dalla luce del sole.
-  Fabbricante.

AVVISO ALL'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 è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente. Al momento dell'attuale revisione dell'IFU, non si sono verificati incidenti gravi o richiami 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.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

Le tecnologie ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti o sono 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.

Coagulation ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius and ELITE BeGenius

Ref: RTSD00ING



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

A. Intended use

The product **Coagulation ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the allelic discrimination of the following three loci in human genomic DNA samples extracted from clinical specimens:

- coagulation Factor V gene, single nucleotide polymorphism (SNP) G1691A (Leiden),
- coagulation Factor II gene, SNP G20210A,
- 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, SNP C677T.

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

The product is intended for use as an aid in assessing the risk of deep vein thrombosis in patients suspected of having coagulation disorders and at risk of deep vein thrombosis.

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

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
SNP G1691A (Leiden)	Factor V	AP639
SNP G20210A	Factor II	FAM
SNP C677T	MTHFR	AP593
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood collected in EDTA.

D. Kit content

52M PCR Mix



X 8

Storage temperature: - 20°C or below

Ready-to-use PCR Master Mix
8 tubes of 280 µL
96 reactions per kit
7 freeze-thaw cycles per tube

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS

- › **Coagulation - ELITE Positive Control**: CTRD00ING
- › **ELITE InGenius Waste Box**: F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen**: TF-350-L-R-S with ELITE InGenius only
- › **1000 µL Filter Tips Tecan**: 30180118 with ELITE BeGenius only

F. Protocol

- | | | | |
|---------------------------|--------|-------------------------------|----------------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | Not Applicable |
| › Total eluate volume | 200 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | › Frequency of calibration | Not Applicable |
| › Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Target	Limit of Detection	Total Diagnostic Agreement
Factor V SNP G1691A	70ng DNA/reaction	100%
Factor II SNP G20210A	70ng DNA/reaction	100%
MTHFR SNP C677T	70ng DNA/reaction	100%

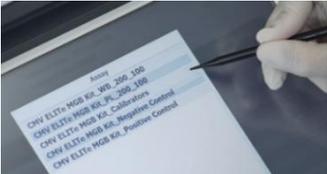
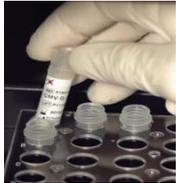
H. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: 52M positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the 52M-PCR-Mix tube Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

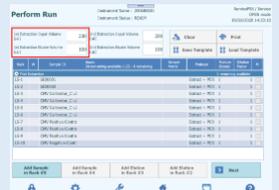
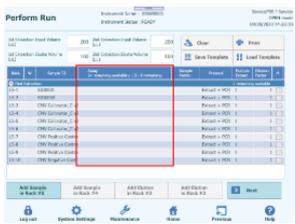
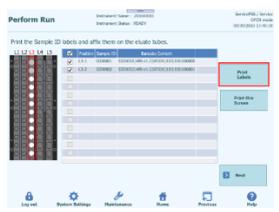
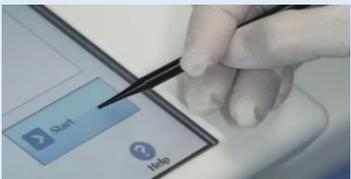
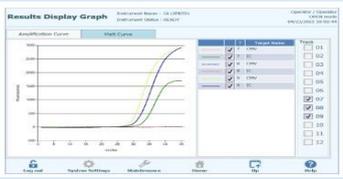
I. Procedures ELITE BeGenius

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE BeGenius. Log in with username and password. Select the mode “Closed”.</p>	<p>2. Verify controls: 52M Positive Control and 52M Negative Control in the “Controls” menu. <i>Note:</i> Both must have been run, approved and not expired.</p>	<p>3. Thaw the 52M PCR Mix tube. Vortex gently. Spin down 5 sec.</p>
---	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»</p> 	<p>2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active</p> 	<p>3. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “200 µL”</p> 
<p>4. Select the “Assay protocol” of interest</p>  <p>Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4</p>	<p>5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area</p> 
<p>7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack</p> 	<p>8. Close the door. Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	5. Close the door. Start the run	6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load : Filter Tips and the Extraction Rack
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluate sample	