

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

AVVERTENZA del 15/02/2023

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«VZV ELITe MGB® Kit» Ref. RTS035PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Aggiornamento per l'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040) e la matrice Liquido Cefalorachidiano.*
- *Descrizione del valore di Cut-off per il Controllo Interno (IC) già adottato nell'Assay Protocol del prodotto (paragrafo "Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi")*
- *Paragrafo "Caratteristiche delle Prestazione InGenius e BeGenius" aggiornato per:*
 - *valore di LoD confermati dopo calcolo su liquido cefalorachidia*
 - *refusi*

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

NOTA BENE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



VZV ELITe MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS035PLD



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 2
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE INGENIUS	pag. 6
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA ELITE INGENIUS	pag. 8
ELITE BEGENIUS	pag. 15
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 15
PROCEDURA ELITE BEGENIUS	pag. 16
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITE INGENIUS ED ELITE BEGENIUS	pag. 22
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	pag. 32
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 32
PROCEDURA	pag. 34
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 42
Roche cobas z 480 analyzer	pag. 48
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 48
PROCEDURA	pag. 49
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 54
BIBLIOGRAFIA	pag. 57
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 57
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 58
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 60
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 61

VZV ELITe MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS035PLD

USO PREVISTO

Il prodotto **VZV ELITe MGB® Kit** è parte di un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del virus erpetico umano Varicella - Zoster (VZV)** in campioni di DNA estratto da liquido cefalorachidiano (liquor), sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

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

PRINCIPIO DEL SAGGIO

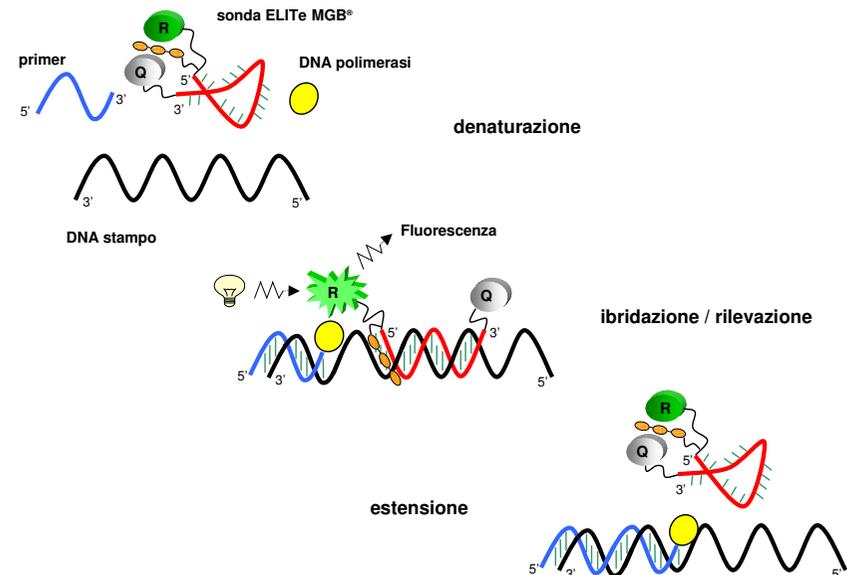
Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di amplificazione real time con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza (amplificazione real time).

In ogni pozzetto si effettuano due reazioni di amplificazione: una specifica per la regione del gene codificante la **Major DNA binding protein** (ORF 29) di VZV e una specifica per la regione del gene umano codificante la **beta Globina** (Controllo Interno di inibizione) utilizzando il DNA estratto dai campioni in esame. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per VZV marcata con il fluoroforo FAM è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per VZV. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per il Controllo Interno marcata con il fluoroforo AP525 (equivalente a VIC) è attivata quando ibrida con il prodotto della reazione di amplificazione per il Controllo Interno. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza e il titolo del DNA di VZV nel campione di partenza.

A fine sessione è possibile eseguire l'analisi della curva di dissociazione (melting curve) ed identificare la temperatura di dissociazione (melting temperature) per confermare la presenza del target corretto o identificare la presenza di mutazioni.

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

Nella figura di seguito è illustrato in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda con tecnologia ELITe MGB®. Notare come la sonda non è idrolizzata durante il ciclo di amplificazione e può quindi essere utilizzata per l'analisi della curva di dissociazione.



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **VZV ELITe MGB Kit**, fornisce la miscela di reazione completa e pronta all'uso "VZV Q - PCR Mix" per l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, prealiquotata in quattro provette. Ogni provetta contiene **540 µL** di soluzione, sufficiente per **24 test** in associazione al sistema **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, e **25 test** in associazione ad altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per VZV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione del gene codificante la **Major DNA binding protein** (ORF 29) di VZV.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per il Controllo Interno (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP525, equivalente a VIC, e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per la regione **promotore e 5' UTR del gene umano codificante la beta Globina**.

La miscela di reazione fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del CY5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione, l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il kit consente di effettuare **96 determinazioni in associazione al sistema ELITe InGenius ed ELITe BeGenius**, standard e controlli compresi.

Il prodotto consente di effettuare **100 determinazioni in associazione ad altri sistemi**, standard e controlli compresi.

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
VZV Q - PCR Mix	miscela completa di reazione	4 x 540 µL	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Acqua ultrapura per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real-Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrato come previsto dal fabbricante.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza cobas z 480 analyzer calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento **ELITe InGenius** (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione **ELITe InGenius SP 200** (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., codice SCH mINT032CS), **ELITe InGenius Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), **ELITe InGenius PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e **Filter tips 300** (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento **ELITe InGenius** (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- Parametri per il calibratore **VZV ELITe STD**,
- Parametri per il controllo positivo di amplificazione **VZV ELITe PC**
- Parametri per il controllo negativo di amplificazione **VZV ELITe NC**,
- Parametri per i campioni in analisi **VZV ELITe_WB_200_100**, **VZV ELITe_PL_200_100**, e **VZV ELITe_CSF_200_100**.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., codice INT040), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici i: cassette di estrazione **ELITe InGenius SP 200** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), I consumabili per l'estrazione e l'amplificazione degli acidi nucleici da campioni biologici **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS), **ELITe InGenius Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000), **ELITe InGenius PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR) and **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040), sono richiesti i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- Parametri per i calibratori **VZV ELITe_Be_STD**,
- Parametri per il controllo positivo di amplificazione **VZV ELITe_Be_PC**,
- Parametri per il controllo negativo di amplificazione **VZV ELITe_Be_NC**,
- Parametri per i campioni in analisi **VZV ELITe_Be_WB_200_100**, **VZV ELITe_Be_PL_200_100** e **VZV ELITe_Be_CSF_200_100**.

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico **ELITe STAR 200 Extraction Kit** (ELITechGroup S.p.A., codice INT011EX), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **ELITe STAR** (ELITechGroup S.p.A., codice INT010).

Per l'estrazione automatica del DNA e la preparazione della micropiastra di amplificazione dei campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico **ELITe GALAXY 300 Extraction Kit** (ELITechGroup S.p.A., codice INT021EX), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **ELITe GALAXY** (ELITechGroup S.p.A., codice INT020).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare è anche validato l'impiego dei prodotti generici **NucliSENS® easyMAG® Reagents** (bioMérieux SA, codici 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®** (bioMérieux SA, codice 200111).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare è anche validato l'impiego dei prodotti **QIASymphony® DNA Mini Kit** (QIAGEN GmbH, code 931236) e **QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** (QIAGEN GmbH, codice 937055), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **QIASymphony® SP/AS** (QIAGEN GmbH, codici 9001297, 9001301) e relativi prodotti generici.

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è anche validato l'impiego del prodotto generico **Magna Pure 24 Total NA Isolation Kit** (Roche, codice 07658036001), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento **Magna Pure 24 System** (Roche, codice 07290519001).

Come controllo positivo di estrazione di acidi nucleici da campioni non cellulari e controllo di inibizione è richiesto l'impiego del prodotto generico **CPE - Internal Control** (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7300 Real-Time PCR System, è richiesto l'impiego dei prodotti generici **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** (Life Technologies., codice N8010560) micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, è richiesto l'impiego dei prodotti generici **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies., codice 4346906) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time. micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento cobas z 480 analyzer, si consiglia l'impiego del prodotto

generico **AD-plate 0.3ml** (Roche, codice 05232724001), micropiastre con pozzetti da 0,3 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia richiesta la rilevazione del DNA di VZV (analisi qualitativa) è richiesto l'impiego del prodotto di ELITechGroup S.p.A. **VZV - ELITe Positive Control** (codice CTR035PLD), o del prodotto di ELITechGroup S.p.A. **VZV - ELITe Positive Control RF** (codice CTR035PLD-R) specifico per l'utilizzo con lo strumento cobas z 480 analyzer, controllo positivo di DNA plasmidico.

Nel caso sia richiesta la rilevazione e quantificazione del DNA di VZV è richiesto l'impiego del prodotto **VZV ELITe Standard** (ELITechGroup S.p.A., codice STD035PLD), quattro diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere la curva standard.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

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

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

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

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

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

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

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

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

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

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

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **VZV Q - PCR Mix** deve essere conservata al buio a temperatura inferiore ai -20 °C.

La **VZV Q - PCR Mix** deve essere utilizzata entro un mese dalla prima apertura del tubo.

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

La **VZV Q - PCR Mix** può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuno oppure può essere tenuto nel blocco refrigerato dello strumento fino a 3 sessioni consecutive di lavoro da 3 ore ciascuna. Mescolare gentilmente e centrifugare la Mix per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

ELITe InGenius

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni 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 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe_CSF_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Per analisi con questo prodotto, 0,2 mL di campione risospeso devono essere rasferiti nell'**Extraction tube** fornito con ELITe InGenius SP 200 Consumable Set o in un **tubo da 2 mL** Sarstedt, ref. 72.694.005).

Nota bene: Pipettare campioni dal tubo primario all'**Extraction tube** può generare contaminazioni. Utilizzare le pipette appropriate e seguire le raccomandazioni riportate nella sezione "**Avvertenze e Precauzioni**".

Altri campioni:

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: tamponi di lesioni mucocutanee e liquido amniotico

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

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

Controlli di amplificazione

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

- come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **VZV ELITe Standard**, in associazione con il rispettivo Assay Protocol **VZV ELITe STD** per **ELITe InGenius**,
- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **VZV - ELITe Positive Control** in associazione con il rispettivo Assay Protocol **VZV ELITe_PC** per **ELITe InGenius**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il rispettivo Assay Protocol **VZV ELITe_NC** per **ELITe InGenius**,

Nota bene: **ELITe InGenius Software** permette di ottenere le curve di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione memorizzato nel loro database.

Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi della calibrazione in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

I calibratori e 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,
- Vengono eseguiti interventi di manutenzione sugli strumenti **ELITe InGenius**.

Controlli di qualità

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

PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **VZV - ELITe MGB Kit** con il sistema **ELITe InGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema
- allestimento della sessione
- lettura ed esportazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i calibratori (**Calibration-VZV Q-PCR Standard**) siano stati processati, approvati e non siano scaduti (status), in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i calibratori non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nel paragrafo seguente;
- verificare che i controlli di amplificazione (**Controls - VZV Positive Control, VZV Negative Control**) siano processati, approvati e non siano scaduti (status), in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i controlli di amplificazione non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nel paragrafo seguente
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG S.p.A.

Gli Assay Protocols disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **VZV ELITe MGB Kit** sono descritti nella tabella seguente:

Assay Protocol per il prodotto VZV ELITe MGB Kit			
Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
VZV ELITe_WB_200_100	Sangue Intero	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
VZV ELITe_PL_200_100	Plasma	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
VZV ELITe_CSF_200_100	Liquor	copie/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Elutato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se l'Assay Protocol di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

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

Impostazione della sessione

Il prodotto **VZV ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema ELITe InGenius per eseguire:

- Sessione integrata (Extract + PCR),
- Sessione di amplificazione (PCR only),
- Sessione di Calibrazione (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 disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota bene: il sistema ELITe InGenius può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per l'allestimento dei quattro tipi di sessione.

A Sessione integrata

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

- Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli". Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.
- Scongelare i tubi di **VZV Q - PCR Mix** per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongelare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

- Scongelare il tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" (corsia) di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (saggio) da utilizzare (ad esempio VZV ELITe_PL_200_100).
- Verificare che nella colonna "Protocol" (protocollo) il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR" (Estrazione + PCR) per l'Assay Protocol.
- Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
 - se un tubo primario è utilizzato, selezionare "Primary Tube";
 - se un tubo secondario è utilizzato, selezionare "Extraction Tube".Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Caricare il CPE e la VZV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" (Blocco dei reagenti) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi CPE e la VZV Q-PCR Mix. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Nell'"Inventory Area" (area consumabili) selezionata controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Caricare le "**PCR Cassette**", le cartucce di estrazione "**ELITe InGenius SP 200**", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione indicata al punto 8, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report (rapporto).

Quando il sistema è inattivo, la porta può essere aperta (End of Run) e i materiali di consumo rimossi dallo strumento.

Nota bene: Alla fine della sessione il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "**PCR Cassette**" contenenti i prodotti della reazione di amplificazione, le cartucce e i reagenti per estrazione, i materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuno oppure può essere tenuta nel blocco refrigerato dello strumento fino a 3 sessioni consecutive di lavoro da 3 ore ciascuna. Mescolare gentilmente e centrifugare la Mix per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

Per allestire una sessione di amplificazione partendo da acidi nucleici già estratti, procedere come segue, facendo riferimento dalla GUI:

- Scongelare i tubi di **VZV Q - PCR Mix** in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongelare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

- Selezionare "Perform Run" (esegui sessione) dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" (corsia) di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay" (saggio) (ad esempio VZV ELITe_PL_200_100).
- Selezionare "PCR Only" (solo PCR) nella colonna "Protocol" (protocollo).
- Nella colonna "Sample Position" (posizione campione) selezionare "Elution Tube" (provetta di eluazione) come posizione in cui caricare il campione. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Caricare VZV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" (Blocco dei reagenti) selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi di VZV Q-PCR Mix. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Caricare i campioni degli acidi nucleici estratti e le "**PCR Cassette**", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per proseguire.
- Chiudere la porta dello strumento,
- Premere "Start" (avvio) per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report (rapporto).

Nota bene: Alla fine della sessione prelevare dallo strumento l'"Elution tube" con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuno oppure può essere tenuto nel blocco refrigerato dello strumento fino a 3 sessioni consecutive di lavoro da 3 ore ciascuna. Mescolare gentilmente e centrifugare la Mix per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

Per allestire una sessione calibrazione, procedere come segue, facendo riferimento dalla GUI:

1. Scongellare i tubi di VZV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Note:** Scongellare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.
2. Scongellare i tubi di VZV Q - PCR Standard (Cal1: VZV Q-PCR Standards 10², Cal2: VZV Q-PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q-PCR Standards 10⁵). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.
 3. Selezionare "Perform Run" (esegui sessione) dalla schermata "Home".
 4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia impostato a 100 µL.
 5. Identificare un "Track"(corsia), selezionare nella colonna "Assay" (saggio) l'Assay Protocol da utilizzare (VZV ELITe STD) e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del VZV Q - PCR standard. Fare clic su "Next" per proseguire.
 6. Caricare VZV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" (Blocco dei reagenti) selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi di VZV Q-PCR Mix. Fare clic su "Next" per proseguire.
 7. Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
 8. Caricare i tubi di calibrazione e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic sul pulsante "Next" proseguire. Fare attenzione a caricare gli standard nella corretta posizione, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.
 9. Chiudere lo sportello dello strumento,
 10. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della sessione, prelevare dallo strumento le provette di calibrazione, chiuderle e conservarle a -20 °C.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "PCR Cassette", con i prodotti di reazione e i consumabili, e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuno oppure può essere tenuto nel blocco refrigerato dello strumento fino a 3 sessioni consecutive di lavoro da 3 ore ciascuna. Mescolare gentilmente e centrifugare la Mix per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

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

Per allestire una sessione del Controllo Positivo e Negativo, procedere come segue, facendo riferimento dalla GUI:

1. Scongellare i tubi di VZV Q - PCR Mix a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.
- Note:** Scongellare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.
2. Scongellare le provette di **Controllo Positivo** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.
 1. Come **Controllo Negativo**, trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube" (provetta di eluizione), fornito con il prodotto **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.
 3. Selezionare "Perform Run" (esegui sessione) dalla schermata "Home".

4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluato estratto) sia di 100 µL.
5. Per il controllo positivo, identificare un "Track" (corsia), selezionare nella colonna "Assay" (saggio) l'Assay Protocol VZV ELITe_PC e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per VZV Positive Control (Controllo Positivo),
6. Per il controllo negativo, identificare un "Track" (corsia), selezionare nella colonna "Assay" (saggio) l'Assay Protocol VZV ELITe_NC e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il Controllo Negativo VZV. Fare clic su "Next" per proseguire.
7. Nella colonna "Protocol" (protocollo) verificare che sia riportato "PCR Only" (solo PCR).
8. Verificare nella colonna "Sample Position" (posizione del campione) che la posizione sia "Elution Tube" (provetta di eluizione). Fare clic su "Next" per proseguire.
9. Caricare **VZV Q-PCR Mix** nell'"Inventory Block" (Blocco dei reagenti) selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi di VZV Q-PCR Mix. Fare clic su "Next" per proseguire.
10. Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
11. Caricare la "PCR Cassette", le provette per il Controllo Positivo e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per proseguire.
12. Chiudere lo sportello dello strumento,
13. Premere "Start" (avvio) per avviare la corsa.

Una volta completata la procedura, l'**ELITe InGenius** permette all'operatore di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il report (rapporto).

Nota bene: Il Controllo Positivo deve essere eseguito come controllo di amplificazione, per impostare la carta di controllo. Quattro (4) valori controllo positivo, da 4 sedute diverse sono richiesti per impostare la carta di controllo. Dopo di che, i valori del controllo positivo sono utilizzati per monitorare la fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota bene: Alla fine della sessione il Controllo Positivo rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Smaltire le provette di Controllo Negativo.

Nota: Il controllo positivo può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota bene: Alla fine della sessione le "PCR Cassette", con i prodotti di reazione e i consumabili, devono essere rimosse dallo strumento ed smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuno oppure può essere tenuto nel blocco refrigerato dello strumento fino a 3 sessioni consecutive di lavoro da 3 ore ciascuna. Mescolare gentilmente e centrifugare la Mix per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Controllo e approvazione dei risultati

L'ELITe InGenius monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ogni reazione e applica automaticamente i parametri del protocollo di analisi per generare curve di PCR che vengono poi interpretate in risultati.

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

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

Nota Bene: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITe InGenius**.

ELITe InGenius genera i risultati con **VZV ELITe MGB Kit** attraverso questa procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione
- B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
- C. Validazione dei risultati del campione
- D. Refertazione dei risultati del campione

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per VZV ("VZV"), nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio "VZV ELITe_STD".

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, è memorizzata nel database (Calibration) e può essere visualizzata e approvata da parte del personale con la qualifica di "Amministratore" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI. La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, scadrà dopo 60 giorni.

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per il lotto di reagente di amplificazione utilizzato. La disponibilità di una curva di calibrazione e i risultati del controllo di amplificazione "Approved" (Status) sono visualizzati nella finestra "Calibration" del software ELITe InGenius.

Nota bene: Quando la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Calibration" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

Nota Bene: Nel caso in cui la curva di calibrazione sia caricata insieme ai campioni ed il risultato non sia valido, l'intera sessione non sarà valida e l'amplificazione di tutti i campioni dovrà essere ripetuta.

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

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per VZV ("VZV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC"), nelle reazioni di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nei protocolli dei saggi "VZV ELITe_PC" e "VZV ELITe_NC". I valori Ct risultanti vengono utilizzati per convalidare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

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

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, 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 amplificazione. Lo stato dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo per ciascun lotto di reagente di amplificazione 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 per controllo positivo e controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento per impostare i "Control Charts". A tal fine sono richiesti quattro risultati per il controllo positivo e il controllo negativo da quattro sessioni differenti. A questo punto, i risultati per il controllo positivo e il controllo negativo vengono utilizzati per monitorare le prestazioni durante la fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: se il risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" (fallito) nella schermata "Controls" che ne impedisce l'approvazione. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo vengono trattati insieme con i campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per VZV ("VZV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC") in ogni reazione di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols VZV ELITe_WB_200_100, VZV ELITe_PL_200_100 and VZV ELITe_CSF_200_100.

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

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

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

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITe InGenius software** e dai parametri del protocollo del saggio.

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

Risultato del campione	Interpretazione
VZV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL	DNA di VZV rilevato nell'intervallo di misurazione del saggio, quantità come mostrato.
VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL	DNA di VZV rilevato al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio
VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL	DNA di VZV rilevato al di sopra del limite superiore di quantificazione del saggio
VZV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL	DNA di VZV non rilevato o inferiore al Limite di Rilevazione del saggio.
Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido a causa di un problema rilevato dal Controllo Interno (estrazione errata o presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test dovrebbe essere ripetuto).

I campioni segnalati come "VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ", non sono adatti alla quantificazione. La concentrazione di DNA di VZV rilevata nel campione è inferiore al livello in cui può essere accuratamente quantificata (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni"). Se il campione è stato diluito prima dell'estrazione o della PCR, può essere analizzato nuovamente senza diluizione.

I campioni segnalati come "VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ", non sono adatti alla quantificazione. La concentrazione di DNA di VZV rilevata nel campione è superiore al livello in cui può essere accuratamente quantificata (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni"). Il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati entro l'intervallo lineare del test.

I campioni segnalati come "VZV: DNA Not Detected or below LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di VZV. In questo caso il campione può essere negativo per il DNA di VZV, oppure il DNA di VZV può essere presente ad una concentrazione inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni segnalati VZV positivi ad una concentrazione inferiore al LoD, quando vengono rilevati dal test, vengono riportati come "VZV: DNA Detected, quantity below LLoQ" (vedere "Caratteristiche delle prestazioni").

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

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

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

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 sessione come "Sample Report" e "Track Report".

D. 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 i seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

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

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni 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 BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione 2.0.0 (o versioni successive equivalenti), utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe Be_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni 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 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione 2.0.0 (o versioni successive equivalenti), utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe Be_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Liquido cefalorachidiano (liquor)

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

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

Nota: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **VZV ELITe Be_CSF_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Altri campioni:

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: tamponi di lesioni mucocutanee e liquido amniotico.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

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

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

Controlli di amplificazione

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

- come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **VZV ELITe Standard**, in associazione con il protocollo **VZV ELITe Be_STD** per **ELITe BeGenius**,
- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **VZV - ELITe Positive Control** in associazione con il protocollo **VZV ELITe Be_PC** per **ELITe BeGenius**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo **VZV ELITe Be_NC** per **ELITe BeGenius**,

Nota: Il sistema **ELITe BeGenius** richiede una curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione memorizzato nel suo database.

Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'impostazione della calibrazione.

La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario ri-eseguire i controlli positivi e negativi.

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:

- Si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Vengono eseguiti interventi di manutenzione sullo strumento **ELITe BeGenius**.

Controlli di qualità

Si raccomanda la validazione delle procedure di estrazione e amplificazione con l'utilizzo di campioni testati o di materiale di riferimento certificato. I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali. I controlli esterni di qualità sono disponibili in commercio.

Procedura ELITe BeGenius

La procedura di utilizzo del prodotto **VZV - ELITe MGB Kit** con il sistema **ELITe BeGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Allestimento della sessione
- Lettura ed esportazione 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 calibratori (Calibration-**VZV Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page; se i calibratori non sono approvati o non sono validi, processarli come descritto nel paragrafo seguente;

- verificare che i controlli di amplificazione (Controls - **VZV Positive Control**, **VZV Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page; se i calibratori non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nel paragrafo seguente

- scegliere il tipo di sessione, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione utilizzando e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A.

Gli Assay Protocol disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **VZV ELITe MGB Kit** sono descritti nella tabella sottostante:

Assay Protocol per il prodotto VZV ELITe MGB Kit e ELITe BeGenius			
Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
VZV ELITe_Be_WB_200_100	Sangue Intero	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Fattore di diluizione: 1 Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
VZV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Fattore di diluizione: 1 Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
VZV ELITe_Be_CSF_200_100	CSF	copie/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione estratto: 100 µL Fattore di diluizione: 1 Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

Allestimento della sessione

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

- Sessione integrata (Estrazione + PCR),
- Sessione di amplificazione (PCR only),
- Sessione di Calibrazione (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 quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota: il sistema **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per l'allestimento dei tre tipi di sessione.

A Sessione integrata

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

- Se necessario, scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli". Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.

- Scongellare i tubi di **VZV Q - PCR Mix** per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongellare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

- Scongellare i tubi di CPE in numero sufficiente per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
- Rimuovere tutti i Racks (caricatori) dalla "Cooler Unit" (unità raffreddata) e posizionarli sul tavolo di preparazione.
- Caricare i campioni nel "Sample Rack" (caricatore dei campioni).

Nota Bene: Quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack".

- Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Se necessario, per ogni "Position" (posizione) d'interesse inserire il "SampleID" (SID).

Nota Bene: Quando si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha un'etichetta con barcode, digitare manualmente il Sample ID.

- Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluizione) sia impostato a 100 µL.

- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare: (es: VZV_ELITe_Be_PL-200_100). Fare click su "Next" per proseguire.

- Caricare gli "Elution tube" (tubi di eluizione) nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati).

Nota Bene: I tubi di eluizione possono essere etichettati per aumentare la tracciabilità.

- Caricare le VZV Q - PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
- Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
- Se necessario, per ogni VZV Q - PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No." (lotto), "Exp. Date" (scadenza), "T/R" (numero reazioni del tubo).
- Nell'"Inventory Area" (area consumabili) controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire
- Caricare le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e tutti i consumabili di estrazione seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della sessione rimuovere dallo strumento gli "Elution tube" con il campione estratto residuo, chiuderli, identificarli e conservarli a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "PCR cassette" contenenti i prodotti della reazione di amplificazione, le cartucce e i reagenti di estrazione, i materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nota bene: La **VZV Q - PCR Mix** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare le provette per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

B Sessione di amplificazione

Per allestire una sessione di amplificazione partendo da acidi nucleici estratti, procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Se necessario, scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare nel blocco refrigerato.
2. Scongelare i tubi di VZV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongelare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (eseguire la corsa).
4. Rimuovere i Racks (caricatori) dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2 e L3) della "Cooler Unit" (unità raffreddata) e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only" (solo PCR).
6. Caricare gli eluati dei campioni estratti nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati).
7. Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3) come indicato dalla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
8. Se necessario, per ogni "Position" (position) d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix" (matrice), "Extraction Kit" (kit di estrazione), "Extracted Eluate Vol." (volume estratto).
9. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare gli Assay protocol da utilizzare (ad esempio VZV ELITe_Be_PL_200_100). Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
10. Caricare le VZV Q - PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
11. Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
12. Se necessario, per ogni VZV Q - PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No." (lotto), "Exp. Date" (scadenza), "T/R" (numero reazioni del tubo).
13. Nell'"Inventory Area" (area consumabili) controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
14. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
15. Chiudere lo sportello dello strumento,
16. Premere "Start" (avvio) per iniziare la sessione.

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

Nota Bene: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento gli "Elution tube" con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota Bene: La **VZV Q - PCR Mix** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare le provette per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

C Sessione di calibrazione

Per allestire una sessione di amplificazione partendo da acidi nucleici estratti, procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Scongelare i tubi di VZV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongelare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

2. Scongelare i tubi di VZV Q - PCR Standard (Cal1: VZV Q-PCR Standards 10², Cal2: VZV Q-PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q-PCR Standards 10⁵). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
6. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack per eluati L3.
7. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. 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 100 µL.
9. Selezionare il protocollo "VZV ELITe_Be_STD" nella Colonna "Assay". Cliccare "Next" per continuare il caricamento.
10. Caricare VZV Q-PCR Mix nel rack L2.
11. Inserire il rack L2 nella "Cooler Unit" Cliccare "Next" per continuare il caricamento.
12. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere l'operazione successiva.
13. Caricare i tubi di calibrazione e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva. Fare attenzione a caricare gli standard nella corretta posizione, seguendo le istruzioni GUI
14. Chiudere la porta dello strumento,
15. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato e conservato a -20 °C.

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

Nota Bene: La **VZV Q-PCR Mix** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare le provette per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

D. Sessione di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per allestire una sessione di amplificazione del Controllo Positivo e Negativo procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

Note: Scongelare la miscela **VZV Q - PCR Mix** al riparo dalla luce perchè il reagente è fotosensibile.

1. Scongelare il prodotto VZV - Positive Control per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato.
2. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito con **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.
 1. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (eseguire la corsa).
 2. Rimuovere i Racks (caricatori) dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2 e L3) della "Cooler Unit" (unità raffreddata) e posizionarli sul tavolo di preparazione.
 3. Selezionare il "run mode: PCR Only" (solo PCR).
 4. Caricare i campioni di Controllo Positivo e Controllo Negativo nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati).

- Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" (avanti) per proseguire.
- Se necessario, per ogni "Position" (position) d'interesse selezionare nella colonna "Reagent Name" il tipo di reagente e inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No." (lotto), "Exp. Date" (scadenza), "T/R" (numero reazioni del tubo).
- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare l'Assay Protocol da utilizzare "VZV ELITe_Be_PC" e "VZV ELITe_Be_NC" nella Colonna "Assay". Fare click su "Next" per proseguire.
- Caricare VZV Q – PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
- Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
- Nell'"Inventory Area" (area consumabili) selezionata controllare/caricare i "Tip Rack" (contenitori dei puntali) seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Chiudere la porta dello strumento,
- Premere "Start" (avvio) per iniziare la corsa.

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

Nota Bene: Alla fine della sessione, prelevare dallo strumento le provette di **Positive Control**, chiuderle e conservarle a -20 °C. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

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

Nota Bene: La **VZV Q - PCR Mix** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente e centrifugare le provette per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

Controllo e approvazione dei risultati

Il sistema **ELITe BeGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri del protocollo di analisi per generare curve di amplificazione e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

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

Nota Bene: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento **ELITe BeGenius**.

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

Il sistema **ELITe BeGenius** genera i risultati del prodotto **VZV ELITe MGB Kit** tramite la seguente procedura:

- Validazione della curva di calibrazione
- Validazione dei risultati relativi al Controllo Positivo e del Controllo Negativo
- Validazione dei risultati relativi al campione
- Refertazione dei risultati relativi al campione

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione (LoD), permette di rilevare la presenza di circa 10 copie DNA plasmidico nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 24 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti **ELITechGroup S.p.A.** su due strumenti differenti.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 500 ng di DNA genomico umano	24	24	0

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione di **VZV ELITe MGB Kit** è stato verificato con le matrici **plasma (PL)** e **sangue intero (WB)** in EDTA e **CSF** sugli strumenti **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius (Extr + PCR mode)**

Per sangue intero (WB):

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione (LoD) è stata verificata testando 20 campioni di sangue intero (WB) positivamente a 117 copie / mL ed analizzati su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** in modalità "Extr. + PCR". Per la positività è stato utilizzato il materiale di riferimento per **VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530))**.

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione è confermata per 18 campioni su 20 dando un risultato positivo.

I risultati sono riportati nell'apposita tabella:

Limite di Rilevazione (LoD) per campioni di sangue intero (Whole Blood) ed ELITe InGenius					
Campione	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Whole blood collected in EDTA	100 copies / mL	20	20	20	0

Limite di Rilevazione (LoD) per campioni di sangue intero (Whole Blood) ed ELITe BeGenius					
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Whole blood collected in EDTA	100 copies / mL	20	20	20	0

Il limite di Rilevazione per **VZV** è stato confermato a 100 copie / mL per il sangue intero (WB) in EDTA

Per Plasma (PL):

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione (LoD) è stata verificata testando 20 campioni di plasma (PL) positivamente a 69 copie / mL ed analizzati su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** in modalità "Extr. + PCR". Per la positività è stato utilizzato il materiale di riferimento per **VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530))**.

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione è confermata per 18 campioni su 20 dando un risultato positivo.

I risultati sono riportati nell'apposita tabella:

Limite di Rilevazione (LoD) per campioni di Plasma ed ELITe InGenius					
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Plasma collected in EDTA	69 copies / mL	20	20	20	0

Limite di Rilevazione (LoD) per campioni di Plasma ed ELITe BeGenius					
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Plasma collected in EDTA	69 copies / mL	20	20	20	0

Il limite di Rilevazione per VZV è stato confermato a 69 copie / mL per il plasma (PL) in EDTA

Per liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

Il limite di rilevazione di questo saggio è stato verificato testando 20 replicati di campione di CSF positivamente a 69 copie/mL su sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR". I campioni sono stati positivamente utilizzando il materiale di riferimento "Varicella Zoster Virus Culture Fluid" (ZeptoMetrix Corporation, Ref. 954530).

Il limite di rilevazione è confermato se almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per CSF e ELITe InGenius					
Campione	LoD	N	Valido	Positivo	Negativo
Liquido cefalorachidiano	69 copies / mL	20	20	19	1

Limite di rilevazione per CSF e ELITe BeGenius					
Campione	LoD	N	Valido	Positivo	Negativo
Liquido cefalorachidiano	69 copies / mL	20	20	20	0

Il valore LoD per il target VZV è stato confermato a 69 copie / mL per CSF.

Range di Linearità e Limite di Quantificazione

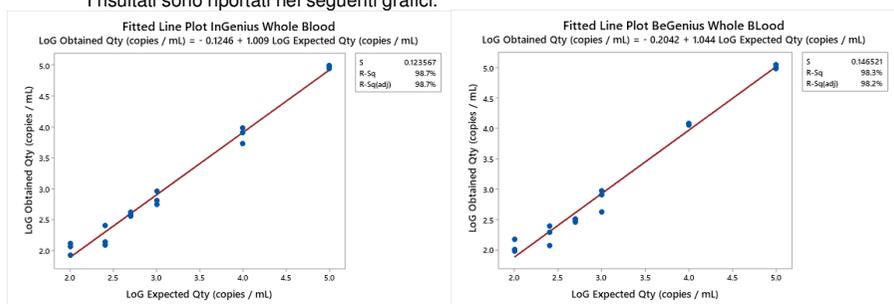
L'intervallo di Linearità di VZV ELITe MGB Kit è stato verificato con le matrici **plasma (PL)** e **sangue intero (WB)** in EDTA e **CSF**, sugli strumenti **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** (Extr + PCR mode) utilizzando un pannello di diluizioni di VZV. Il pannello è stato preparato utilizzando il materiale di riferimento per VZV (Acrometrix e Zeptomatrix per Varicella Zoster Virus DNA) in matrici VZV DNA negative.

Per sangue intero (WB):

Il pannello consiste in sei diluizioni da 1×10^5 copie / mL a 1×10^2 copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in triplicato utilizzando un pannello di materiale di riferimento per VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

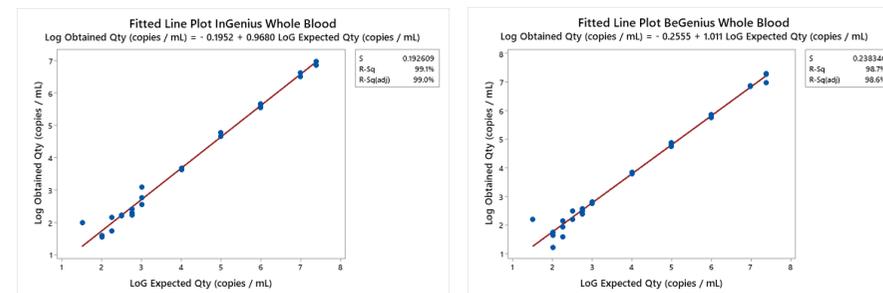
L'analisi di regressione lineare dei dati ottenuti dimostra una risposta lineare dei campioni di sangue intero per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione R2 pari a 0,987 per **ELITe InGenius** e 0,983 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nei seguenti grafici:



L'intervallo di Linearità di VZV ELITe MGB® Kit usato con la matrice sangue intero (WB) in EDTA, sugli strumenti **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** (Extr + PCR mode) è stato testato utilizzando un pannello di diluizioni di VZV ancora più ampio. Il pannello è stato preparato utilizzando DNA plasmidico per VZV in matrici VZV DNA negative. Sono state fatte dieci diluizioni da $2,5 \times 10^7$ copie / mL a 1×10^2 copie / mL per sangue intero. Ogni campione del pannello è stato testato in triplicato.

L'analisi di regressione lineare dei dati ottenuti dimostra una risposta lineare dei campioni di sangue intero per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione R2 pari a 0,991 per **ELITe InGenius** e 0,987 per **ELITe BeGenius**.



Il Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione del Limite di Rilevazione (LoD), dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a 0,2215 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,3219 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,1038 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,2149 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 100 copie / mL.

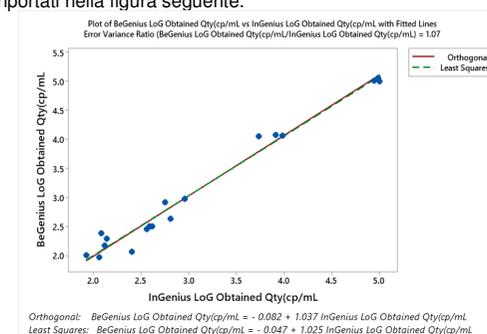
Il Limite Superiore di Quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta testata, dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a to 0,0626 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,1790 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,4509 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,2062 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella:

Intervallo di misura Lineare per sangue intero (WB) e ELITe InGenius® e ELITe BeGenius®		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	100	25.000.000

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riportati nella figura seguente.



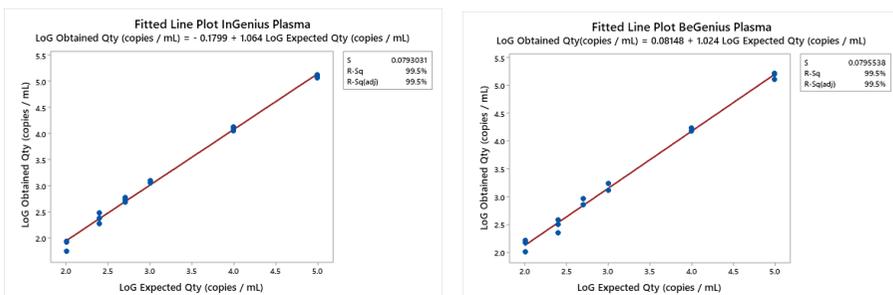
In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 1,037 (95% CI: 0,9608; 1,1126) e un intercetta di 0,082 (95% CI: - 0,3286; 0,1652). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,978.

Per Plasma:

Il pannello consiste in sei diluizioni da 1×10^5 copie / mL a 1×10^2 copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in triplicato utilizzando un pannello preparato con materiale di riferimento (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

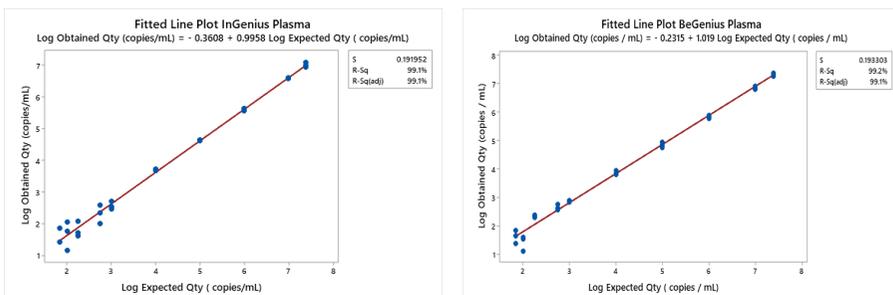
L'analisi di regressione lineare dei dati ottenuti dimostra una risposta lineare dei campioni di plasma per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione R2 pari a 0,995 per **ELITe InGenius** e 0,995 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nei seguenti grafici:



L'intervallo di Linearità di VZV ELITe MGB Kit usato con la matricie plasma (PL) in EDTA, sugli strumenti ELITe InGenius ed ELITe BeGenius (Extr + PCR mode) è stato testato utilizzando un pannello di diluizioni di VZV ancora più ampio. Il pannello è stato preparato utilizzando DNA plasmidico per VZV in matrici VZV DNA negative. Sono state fatte dieci diluizioni da $2,5 \times 10^7$ copie / mL a 69 copie / mL per il plasma. Ogni campione del pannello è stato testato in triplicato.

L'analisi di regressione lineare dei dati ottenuti dimostra una risposta lineare dei campioni di sangue intero per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione R2 pari a 0,991 per **ELITe InGenius** e 0,992 per **ELITe BeGenius**.



Il Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione del Limite di Rilevazione (LoD), dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a 0,2005 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,2048 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,1384 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,2513 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**): 69 copie / mL.

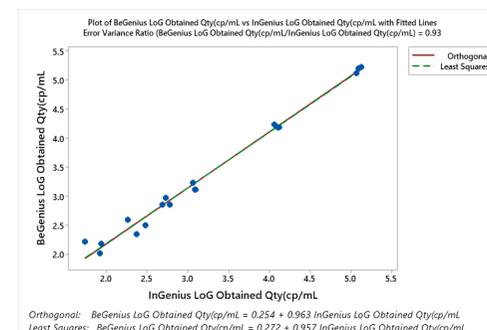
Il Limite Superiore di Quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta testata, dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a 0,0831 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,0444 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,3828 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,0775 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella:

Intervallo di misura Lineare per Plasma ed ELITe InGenius ed ELITe BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	69	25.000.000

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riportati nella figura seguente.



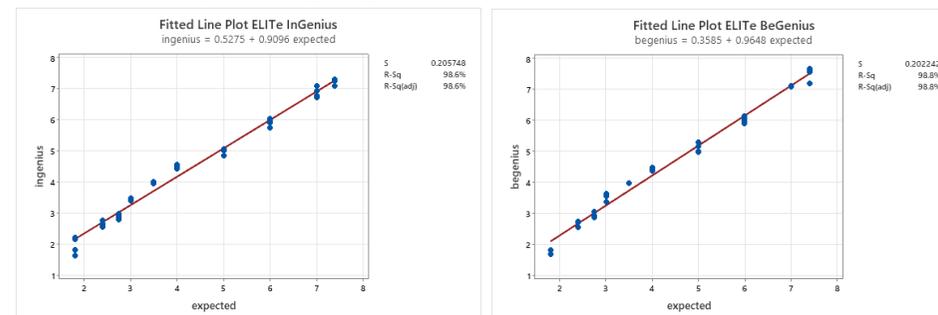
In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 0,963 (95% CI: 0,912; 1,013) e un intercetta di 0,254 (95% CI: 0,082; 0,425). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,989.

Per liquido cefalorachidiano CSF (liquor)

Il pannello consiste in dieci diluizioni da $2,5 \times 10^7$ copie / mL a 69 copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in quadruplicato utilizzando un pannello preparato con materiale di riferimento ((Zeptomatrix, Varicella Zooster Varicella Zoster Virus (VZV) Strain: Ellen Culture Fluid (1 mL), (0810171CF)).

L'analisi di regressione lineare dei dati ottenuti dimostra una risposta lineare dei campioni di plasma per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione R2 pari a 0,986 per **ELITe InGenius** e 0,988 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nei seguenti grafici:



Il Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione del Limite di Rilevazione (LoD), dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a 0,2816 Log copie / mL per **ELITe InGenius** e 0,0787 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,1127 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,0902 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**): 69 copie / mL.

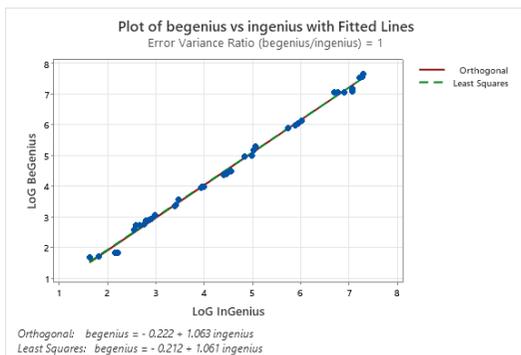
Il Limite Superiore di Quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta testata, dando risultati di quantificazione precisi (Standard Deviation pari a 0,1005 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,2102 Log copie / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Bias pari a 0,1803 Log copie / mL for **ELITe InGenius** e 0,0936 Log copie / mL for **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copie / mL.

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella:

Intervallo di misura Lineare per CSF ed ELITe InGenius ed ELITe BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	69	25.000.000

I risultati ottenuti con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** sono stati analizzati tramite regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i due metodi.

I risultati sono riportati nella figura seguente.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza di 1,063 (95% CI: 1,0418; 1,0847) e un intercetta di -0.222 (95% CI: -0.3241, -0.1196). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,996.

Ripetibilità:

La Ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto VZV ELITe MGB Kit in associazione con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** è stata testata analizzando un pannello di campioni di sangue intero (WB) in EDTA. Il pannello include un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento per VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 300 copie / mL) e di 10 x LoD (circa 1000 copie / mL).

La ripetibilità Intra – Sessione su **ELITe InGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, con lo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITe InGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, con lo stesso operatore, in due giorni differenti. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

I valori dei Ct del target e del Controllo Interno è stato utilizzato per calcolare %CV in funzione di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Un riepilogo dei risultati è riportato nel seguente

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe InGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23,76	0,38	1,58
3 x LoD	8 / 8	36,53	0,21	0,57				
10 x LoD	8 / 8	34,78	0,21	0,61				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITe InGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	23,85	0,48	2,01
3 x LoD	16 / 16	36,67	0,43	1,17				
10 x LoD	16 / 16	34,77	0,32	0,91				

Il test di Ripetibilità effettuato su **ELITe InGenius**, dimostra un valore di %CV dei valori di Ct che non eccedono il 5% per VZV per il Controllo Interno.

La ripetibilità Intra – Sessione su **ELITe BeGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, con lo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate.

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITe BeGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, con lo stesso operatore, in due giorni differenti. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate.

I valori dei Ct del target e del Controllo Interno è stato utilizzato per calcolare %CV in funzione di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Un riepilogo dei risultati è riportato nella seguente tabella

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe BeGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,33	0,60	2,21
3 x LoD	8 / 8	37,49	0,74	1,97				
10 x LoD	8 / 8	35,38	0,35	0,98				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITe BeGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	26,67	0,60	2,25
3 x LoD	16 / 16	37,32	0,69	1,84				
10 x LoD	16 / 16	35,39	0,31	0,87				

Il test di Ripetibilità effettuato su **ELITe BeGenius**, dimostra un valore di %CV dei valori di Ct che non eccedono il 5% per VZV per il Controllo Interno.

Riproducibilità

La Riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto VZV ELITe MGB Kit in associazione con **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** è stata testata analizzando un pannello di campioni di sangue intero (WB) in EDTA. Il pannello include un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento per VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 300 copie / mL) e di 10 x LoD (circa 1000 copie / mL).

La Riproducibilità Inter–Strumento su **ELITe InGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in una sessione al giorno, per due giorni, utilizzando lo stesso lotto di prodotto e due strumenti differenti da due differenti operatori. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

La Riproducibilità Inter –Lotto su **ELITe InGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, utilizzando due lotti differenti di prodotto e lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

I valori dei Ct del target e del Controllo Interno è stato utilizzato per calcolare %CV in funzione di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Riproducibilità Inter –Strumento ELITe InGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	22,76	0,61	2,69
3 x LoD	8 / 8	36,47	0,32	0,86				
10 x LoD	8 / 8	34,87	0,34	0,99				

Riproducibilità Inter –Lotto ELITe InGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23,07	0,58	2,54
3 x LoD	8 / 8	36,78	0,27	0,75				

10 x LoD	8 / 8	35,06	0,31	0,88			
----------	-------	-------	------	------	--	--	--

Il test di Riproducibilità effettuato su **ELITe InGenius**, dimostra un valore di %CV dei valori di Ct che non eccedono il 5% per VZV per il Controllo Interno.

La Riproducibilità Inter–Strumento su **ELITe BeGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in una sessione al giorno, per due giorni, utilizzando lo stesso lotto di prodotto e due strumenti differenti da due differenti operatori. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

La Riproducibilità Inter –Lotto su **ELITe BeGenius** è stata effettuata analizzando un pannello di 8 replicati, in due sessioni al giorno, utilizzando due lotti differenti di prodotto e lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati analizzati in posizioni randomizzate in modalità "Extract + PCR".

I valori dei Ct del target e del Controllo Interno è stato utilizzato per calcolare %CV in funzione di valutare la Ripetibilità come imprecisione

Un riepilogo dei risultati è riportato nella seguente tabella

Riproducibilità Inter –Strumento ELITe BeGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26,22	0,67	2,55
3 x LoD	8 / 8	37,05	0,47	1,26				
10 x LoD	8 / 8	35,18	0,43	1,21				

Riproducibilità Inter –Lotto ELITe BeGenius								
Campioni	VZV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26,43	0,99	3,73
3 x LoD	8 / 8	37,11	0,45	1,21				
10 x LoD	8 / 8	35,05	0,36	1,03				

Il test di Riproducibilità effettuato su **ELITe BeGenius**, dimostra un valore di %CV dei valori di Ct che non eccedono il 5% per VZV per il Controllo Interno.

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato VZV Molecular "Q" Panel (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e ELITe InGenius™				
Campione	Titolo nominale copie / mL	Titolo nominale Log ₁₀ copie / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
VZVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,138
VZVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	4,312
VZVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,340
VZVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni positivi sono stati rilevati correttamente con un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0.5 Log.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento riferimento QCMD 2014 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) un pannello di diluizioni di VZV. Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e ELITe InGenius				
Campione	Consensus conc. Log ₁₀ copie / mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
VZVDNA14-01	3,267	0,438	2/2	3,674
VZVDNA14-02	3,339	0,520	2/2	3,713
VZVDNA14-03	2,465	0,491	2/2	2,768
VZVDNA14-04	Negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
VZVDNA14-05	2,716	0,377	2/2	3,317
VZVDNA14-06	1,980	0,411	1/2	1,994
VZVDNA14-07	Negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
VZVDNA14-08	3,475	0,678	2/2	3,870
VZVDNA14-09	3,918	0,653	2/2	4,306
VZVDNA14-10	2,071	0,428	2/2	1,949

Tutti i campioni negativi e positivi sono stati rilevati correttamente in accordo con i risultati quantitativi definiti dal consensus EQA. Il campione VZV DNA14-06 ha dato un solo risultato positivo su 2 replicati. Ciò può essere spiegato in quanto il titolo del campione è inferiore al limite di rilevazione. Sette campioni sono stati quantificati all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus ± 1 Deviazione Standard (DS), un campione è stato quantificato all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus ± 2 DS.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

Sangue intero e Plasma

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di VZV in associazione a **ELITe InGenius**. Essendo che il sistema **ELITe BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti al sistema **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio sui due strumenti sono considerate equivalenti. Di conseguenza la sensibilità diagnostica del saggio su **ELITe InGenius** è considerata valida anche su **ELITe BeGenius**.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 28 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV, positivamente per VZV con il punto VZV07-04 del QCMD 2007 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 750 copie /mL e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV, positivamente per VZV con il campione VZV ELITe-IQC High (ELITech Group S.p.A.) ad un titolo di 750 copie / mL.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	28	27	1
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	30	0

Tutti i campioni di plasma sono risultati validi e positivi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio in associazione a campioni di plasma è risultata uguale al 100%.

Tutti i campioni di sangue sono risultati validi e 27 su 28 campioni sono stati confermati come positivi. Un campione di sangue è risultato negativo, non è stato possibile rianalizzare il campione discrepante in quanto non era più disponibile.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio in associazione a campioni di sangue intero è risultata uguale al 96.4%.

Liquido cefaloarachidiano

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di liquido cefaloarachidiano positivi per il DNA di VZV in associazione a **ELITe InGenius**.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 20 campioni di liquido cefaloarachidiano negativi per il DNA di VZV positivamente con il campione VZV ELITe-IQC High (ELITech Group S.p.A.) ad un titolo di 750 copie / mL.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione,

rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.
I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivizzato per il DNA di VZV	20	20	0

Tutti i campioni di liquido cefalorachidiano sono risultati validi e positivi.
In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

Sangue intero e Plasma

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA e plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV in associazione a **ELITe InGenius**. Essendo che il sistema **ELITe BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti al sistema **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio sui due strumenti sono considerate equivalenti. Di conseguenza la specificità diagnostica del saggio su **ELITe InGenius** è considerata valida anche su **ELITe BeGenius**.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di VZV e 34 campioni di plasma raccolto in EDTA di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di VZV.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.
I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	34	0	34
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	30	0	30

Tutti i campioni di sangue intero e di plasma e sono risultati validi e negativi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100% per entrambe le matrici.

Liquido cefaloarachidiano

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di VZV in associazione a **ELITe InGenius**.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 22 campioni di liquido cefalorachidiano di donatori sani presumibilmente negativi per il DNA di VZV.

Ciascun campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'**ELITe InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di VZV	22	0	22

Tutti i campioni di liquido cefalorachidiano sono risultati validi e negativi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

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

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: liquido cefalorachidiano, sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

Liquido cefalorachidiano

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

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

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con **ELITe STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**UUNI_E100S200_ELI**" che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe STAR**. Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe GALAXY**. Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL / campione** di **CPE**. Al CPE deve essere aggiunto **IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: Quando si esegue l'estrazione del DNA da liquido cefalorachidiano con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, caricare la Strip sullo strumento e avviare l'estrazione, al termine dei 10 minuti di incubazione aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenuto della Strip con la pipetta multicanale e il programma 3, proseguire con l'estrazione, recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Sangue intero raccolto in EDTA

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

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

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da sangue intero (campione cellulare) con il kit **EXTRAblood** seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso: partire da **200 µL** di campione (2 milioni di cellule al massimo), recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe STAR** con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe STAR**. Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe GALAXY**. Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL / campione di CPE**. Al CPE deve essere aggiunto l'**IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni 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 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe STAR** con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100S200_ELI** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe STAR**. Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione e eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su **ELITe GALAXY**. Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL / campione di CPE**. Al CPE deve essere aggiunto l'**IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: Quando si esegue l'estrazione del DNA da plasma con lo strumento **NucliSENS® easyMAG®** utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento **QIAAsymphony® SP/AS** e il kit **QIAAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**, con **versione di software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione **"Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC"** e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **500 µL**, è sempre richiesto un volume morto minimo di 100 µL. Preparare la soluzione contenente il buffer AVE ed il carrier RNA secondo le istruzioni nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione.

Aggiungere alla soluzione **6 µL** di **CPE** per ciascun campione richiesto. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti la soluzione, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **85 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Altri campioni:

Non sono disponibili dati riguardo le caratteristiche delle prestazioni con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: tamponi di lesioni mucocutanee e liquido amniotico.

Sostanze interferenti

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

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

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

Controlli di amplificazione

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

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

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

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time

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

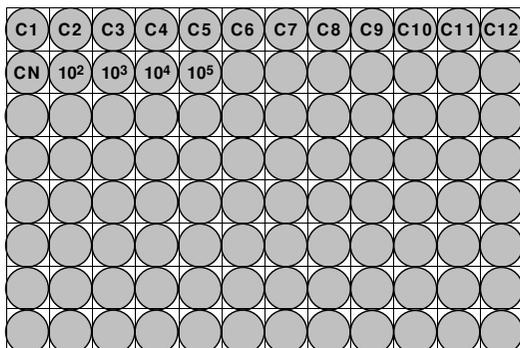
Se si utilizza uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

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

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

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

Vedere sotto, a titolo di esempio, come organizzare un'analisi quantitativa di 12 campioni.



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

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

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

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

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

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

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

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per VZV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "VZV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "CY5" (AP593 è usato invece del CY5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota).

Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

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

La modalità di organizzazione di un'analisi quantitativa di alcuni campioni è illustrata a titolo di esempio nella sezione relativa alla procedura riferita allo strumento **7300 Real Time PCR System**.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

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

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

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

Allestimento dell'amplificazione

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

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

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

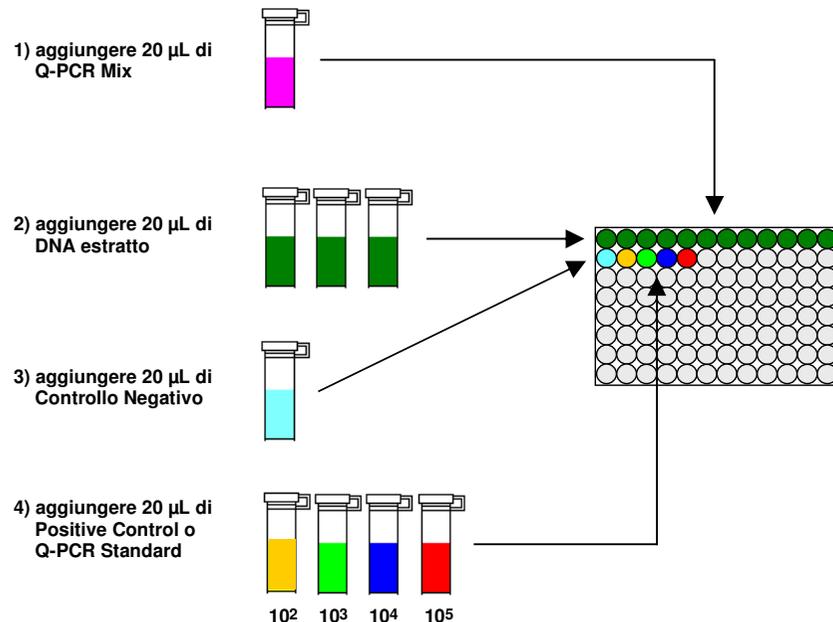
Nota bene: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a - 20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.

- Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL di Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l' **Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
- In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:
 - Quando è richiesto un risultato **qualitativo** dell'analisi (rilevazione del DNA di VZV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL di VZV - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **VZV - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
 - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di VZV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL di VZV Q - PCR Standard 10²** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **VZV Q - PCR Standard 10²** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **VZV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
- Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet** (foglio adesivo di amplificazione).
- Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cyclers per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-VZV-EGSpA").

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

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



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

Nota bene: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento **ELITe GALAXY**, caricare la micropiastra di eluizione, la miscela completa di reazione e la micropiastra di amplificazione come previsto dal manuale di istruzioni d'uso dello strumento e seguendo quanto richiesto dalla GUI.

Analisi qualitativa dei risultati

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 10 copie di DNA del gene codificante la Major DNA binding protein (ORF 29) di VZV per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (limite di rilevazione del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni).

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

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

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

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

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

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

Analisi quantitativa dei risultati

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

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

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

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

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

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA del gene codificante la Major DNA binding protein (ORF 29) di VZV per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (intervallo di misurazione lineare del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

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

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

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

Dove:

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

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

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

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

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

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il kit di estrazione **EXTRAblood** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e EXTRAblood
Nc (gEq / mL) = 25 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di sangue intero, plasma raccolti in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione **ELITe STAR** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero, plasma e liquido cefalorachidiano e ELITe STAR
Nc (gEq / mL) = 28 x Quantità

Quando si utilizzano campioni di sangue intero, plasma raccolti in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione **ELITe GALAXY** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero, plasma e liquido cefalorachidiano e ELITe GALAXY
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano e il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma, liquido cefalorachidiano e NucliSENS® easyMAG®
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Quantità}$

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

Formula semplificata per plasma e QIASymphony® SP/AS
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Quantità}$

Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

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

$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$

Quando si utilizza il kit di estrazione **EXTRAblood** con campioni di sangue intero raccolto in EDTA la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con EXTRAblood
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 25 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 25 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 250 a 25.000.000 gEq / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITe STAR** con campioni di sangue intero, plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con ELITe STAR
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 28 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 28 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 280 a 28.000.000 gEq / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITe GALAXY** con campioni di sangue intero, plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano, la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con ELITe GALAXY
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 35 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 35 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 350 a 35.000.000 gEq / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione **NucliSENS® easyMAG®** con campioni di plasma raccolto in EDTA o di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con NucliSENS® easyMAG®
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 10 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 10 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 100 a 10.000.000 gEq / mL

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

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con QIASymphony® SP/AS
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 12 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 12 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 120 a 12.000.000 gEq / mL

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio permette di rilevare la presenza di circa 10 molecole di DNA bersaglio nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 50 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di VZV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero e **ELITe GALAXY**. Il pannello è stato preparato diluendo il campione VZV07-12 del "QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di VZV. Le concentrazioni virali variavano da 10 gEq / mL a 562 gEq / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero e ELITe GALAXY (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	100 gEq / mL	64 gEq / mL	241 gEq / mL

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di VZV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e **ELITe GALAXY**. Il pannello è stato preparato diluendo il campione VZV07-12 del "QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel", (Qnostic Ltd., Regno Unito), in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di VZV. Le concentrazioni virali variavano da 10 gEq / mL a 562 gEq / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di plasma e ELITe GALAXY (gEq / mL)			
Intervallo di confidenza del 95%			
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	69 gEq / mL	46 gEq / mL	164 gEq / mL

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio permette di quantificare da 1.000.000 a 10 molecole di DNA bersaglio nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

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

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10⁶ molecole per reazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta, (10⁵ molecole / 20 µL).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10 molecole per reazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa, (10² molecole / 20 µL).

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

A pagina 25 sono calcolati i limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in gEq / mL riferiti al kit di estrazione utilizzato.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 21,0 % nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 9,7% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche e in diversi laboratori, è stata verificata con un pannello di materiale di riferimento certificato.

Le prove sono state eseguite utilizzando come materiale di riferimento certificato e calibrato un pannello di diluizioni di VZV, ceppi 98/4 ed Ellen, entro la concentrazione limite "QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato risospeso in sangue intero raccolto in EDTA impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **EXTRAblood** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e EXTRAblood				
Campione	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
VZV10-01	2,047	0,593	2/2	1,748
VZV10-02	negativo	NA	0/2	Non rilevato
VZV10-03	1,844	1,140	2/2	1,569
VZV10-04	1,489	0,378	1/2	1,439
VZV10-05	HSV1	NA	0/2	Non rilevato
VZV10-06	2,428	0,471	2/2	2,274
VZV10-07	2,149	0,648	2/2	2,070
VZV10-08	3,410	0,454	2/2	3,618
VZV10-09	0,964	0,729	1/2	1,687
VZV10-10	3,174	0,454	2/2	3,136

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I campioni VZV10-04 (31 copie / mL) e VZV10-09 (9 copie / mL) hanno dato un solo risultato positivo sui 2 replicati, ma presentano concentrazioni inferiori al limite di rilevazione del prodotto. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando come materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni dei ceppi 98/4 e Ellen di VZV entro la concentrazione limite "QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con **ELITe STAR** ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITe STAR				
Campione	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
VZV12-01	Negativo, NA	NA	0/2	Non rilevato
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,535
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,564
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,267
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,854
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,349
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,129
VZV12-08	1,926	0,418	2/2	1,697
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	2,531
VZV12-10	Negativo, NA	NA	0/2	Non rilevato

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus ± 1 Deviazione Standard.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di VZV entro il limite di concentrazione "QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ogni campione è stato testato in duplicato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITe GALAXY** ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in gEq/mL sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e ELITe GALAXY				
Campioni	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ virus conc.	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
VZV12-01	Negativo	NA	0/2	Non rilevato
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,061
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,275
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,435
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,686
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,359
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,027
VZV12-08	1,926	0,418	1/2	1,860
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	1,957
VZV12-10	Negativo	NA	0/2	Non rilevato

Tutti i campioni negativi e tutti i campioni positivi sono stati rilevati correttamente nell'intervallo definito dal Consensus dei saggi commerciali. Il campione VZV12-08 ha dato un solo risultato positivo su 2 replicati; ciò può essere spiegato dal titolo del campione molto vicino al limite di rilevazione. Tutti i risultati quantitativi ottenuti sono all'interno del range definito dal Consensus ± 1 deviazione standard.

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

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

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati del gene codificante la Major DNA binding protein (ORF 29) di VZV ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, è stata verificata utilizzando un pannello di materiale di riferimento certificato.

La sensibilità diagnostica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento certificato e calibrato un pannello comprensivo di campioni positivi per il DNA di VZV dei ceppi 98/4 ed Ellen ("QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati ottenuti sono riportati al paragrafo "Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato".

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando un pannello di campioni di sangue intero di donatori positivamente per il DNA di VZV.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 24 campioni di sangue intero di donatori raccolto in EDTA presumibilmente negativi per il DNA di VZV "Biological Sample Library Europe S.A.S.", (Lione, Francia) positivamente a titolo noto per il DNA di VZV con il punto VZV03-10 del "QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel" (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **EXTRAblood** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	24	24	0

Tutti i campioni positivamente per il DNA di VZV sono stati rilevati correttamente come positivi. La sensibilità diagnostica è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 22 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di VZV, positivamente a basso titolo per il DNA di VZV aggiungendo il campione VZV12-03 ("QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito), 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivamente per il DNA di VZV aggiungendo il campione VZV07-06 ("QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **ELITe STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivamente per il DNA di VZV	22	22	0
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	30	0

Tutti i campioni positivamente per il DNA di VZV sono stati rilevati correttamente come positivi.

La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 20 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di VZV, positivamente a basso titolo per il DNA di VZV aggiungendo il campione VZV12-03 ("QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito), 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivamente per il DNA di VZV aggiungendo il campione VZV07-06 ("QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivamente per il DNA di VZV aggiungendo il campione VZV07-06 ("QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivamente per il DNA di VZV	20	20	0
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	29	0
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	29	0

Un campione di plasma e un campione di sangue intero hanno dato un risultato non valido, a causa di un errore nella fase di estrazione e non sono stati usati per calcolare la sensibilità.

La sensibilità diagnostica del saggio è risultata pari al 100%.

Specificità analitica: assenza di crossreattività con marcatori potenzialmente interferenti

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

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da VZV, tra cui quelle dei genomi completi di HSV1 e HSV2, i virus erpetici umani più simili a VZV, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando un pannello di materiale di riferimento certificato.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento certificato e calibrato un pannello di diluizioni di HSV1 e HSV2 entro la concentrazione limite ("QCMD 2009 Herpes Simplex virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **EXTRAblood** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e EXTRAblood				
Campione	Contenuto	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ conc. virale	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0/2	Non rilevato
HSV09-02	HSV2	2,236	0/2	Non rilevato
HSV09-03	HSV2	3,293	0/2	Non rilevato
HSV09-04	HSV2	2,314	0/2	Non rilevato
HSV09-05	VZV	-	2/2	4,939
HSV09-06	HSV1	2,402	0/2	Non rilevato
HSV09-07	HSV1	4,189	0/2	Non rilevato
HSV09-08	HSV2	2,389	0/2	Non rilevato
HSV09-09	negativo	-	0/2	Non rilevato
HSV09-10	HSV1	3,205	0/2	Non rilevato

Nessuna crossreattività è stata rilevata con i campioni positivi per il DNA di altri patogeni.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando un pannello di campioni di sangue intero di donatori presumibilmente negativi per il DNA di VZV.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 24 campioni di sangue intero di donatori raccolto in EDTA presumibilmente negativi per il DNA di VZV ("Biological Sample Library Europe S.A.S.", Lione, Francia). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **EXTRAblood** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA presumibilmente negativo per il DNA di VZV	24	1	23

Un campione di sangue intero di donatore ha dato un risultato positivo per il DNA di VZV con un titolo molto basso (circa 17 gEq / mL) con i prodotti ELITechGroup S.p.A. In una seconda sessione di amplificazione lo stesso campione è risultato negativo valido. Questa discordanza può essere spiegata da una riattivazione di VZV, un virus ampiamente diffuso nella popolazione, dopo un periodo di latenza. La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 95,8 %.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 24 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di VZV, 30 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di VZV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con **ELITe STAR** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di VZV	24	0	24
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	30	0	29
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	30	0	30

Un campione di sangue intero ha dato un risultato non valido, probabilmente per la presenza di un inibitore e non è stato usato per calcolare la specificità.

La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 22 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di VZV, 34 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di VZV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 35 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con **ELITe GALAXY** e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di VZV	22	0	22
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	35	0	35
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di VZV	34	0	34

Tutti i campioni sono stati rilevati negativi per il DNA di VZV.
La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Roche cobas z 480 analyzer

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici:

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. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento **MagNA Pure 24 System**, con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **"Pathogen200"** e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE 20 µL** / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni 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 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento **MagNA Pure 24 System**, con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **"Pathogen200"** e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE 20 µL** / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Altri campioni:

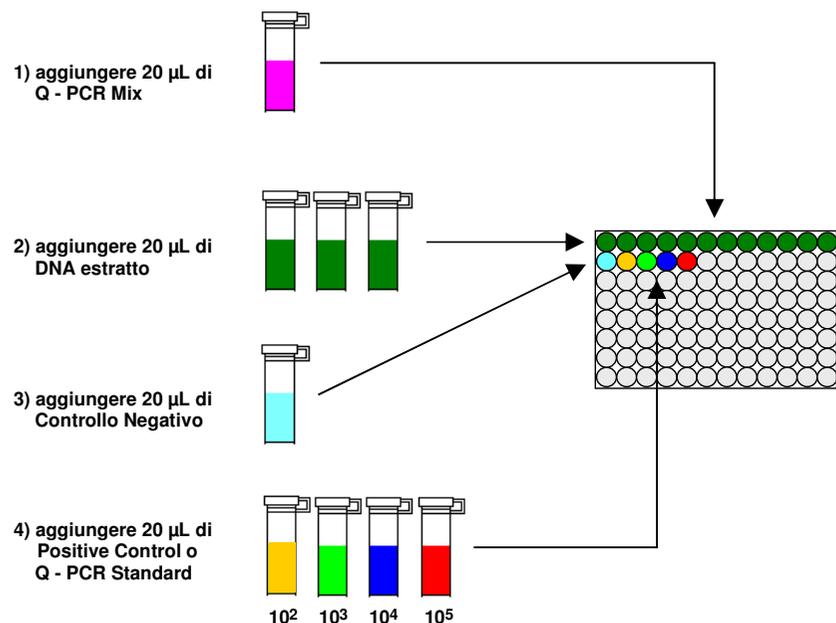
Non sono disponibili dati riguardo le caratteristiche delle prestazioni con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: liquido cefalorachidiano (liquor), tamponi di lesioni mucocutanee e liquido amniotico.

- Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di VZV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **VZV Q - PCR Standard 10²** nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **VZV Q - PCR Standard 10²** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **VZV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.

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

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

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



Analisi qualitativa dei risultati

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

Selezionare il menù "Analysis" e scegliere il tipo "Absolute Quant/Fit Points" (n°2 punti)

Selezionare il gruppo di campioni su cui applicare l'analisi

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- impostare manualmente (bottone Background) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Background)** dal ciclo 2 al ciclo 6;

Selezionare il detector (bottone Filter Comb) su cui applicare l'analisi

Per campioni di **Plasma**

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector FAM "VZV" a **0,55**;

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,2**

Per campioni di **Sangue intero**

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector FAM "VZV" a **0,80**;

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,5**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nota bene: Verificare con il software dello strumento (finestra Analysis) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

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

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

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

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

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

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

Analisi quantitativa dei risultati

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

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** o i valori di Ct nelle reazioni di amplificazione dei quattro Q - PCR standard non sono posizionati regolarmente sulla retta standard, il DNA bersaglio non è stato rilevato correttamente. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

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

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a circa 10 copie per reazione, da 25.000.000 a 250 copie per mL di sangue intero usando il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** (vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "VZV"	copie di VZV per reazione
Quantità > 1 x 10 ⁶	SUPERIORI A 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantità ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantità
Quantità < 1,0 x 10 ¹	INFERIORI A 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (finestra Analysis) sono utilizzati per calcolare le copie di VZV presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dove:

Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;
Ep è l'efficienza della procedura, estrazione ed amplificazione, **espressa in decimali**,
Ve è il volume totale ottenuto dall'estrazione **espresso in µL**;
Va è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di amplificazione **espresso in µL**;
Quantità è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione **espresso in copie per reazione**.

Quando si utilizzano campioni di sangue intero e plasma raccolti in EDTA e urine e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in copie / mL**, la formula diventa:

$$Nc \text{ (copie / mL)} = 25 \times \text{Quantità}$$

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in 150.000 copie di pBETAGLOBINA / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 18 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 150.000 copie di pBETAGLOBINA	18	18	0

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio, come intervallo di misurazione lineare, permette di quantificare da circa 1.000.000 a circa 10 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando un pannello di diluizioni (1 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10⁷ molecole per reazione a 10¹ molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a circa 10 copie / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10² copie / 20 µL).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10⁶ copie / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10⁵ copie / 20 µL).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con MagNA Pure 24		
	Limite inferiore	Limite superiore
copie / mL	25	25,000,000
copie / reazione	10	1,000,000

Le trasformazioni da copie / mL a copie / reazione e viceversa sono state calcolate come illustrato a pagina 39.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio dei valori di Ct inferiore all'1% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 7% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 12% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

Sensibilità analitica: riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche e in diversi laboratori, è stata verificata con un pannello di materiale di riferimento certificato.

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato QCMD 2017 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e "MagNA Pure 24"		
Campione	Target	Positivi/Replicati
VZVDNA17S-01	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-02	Negative	0/2
VZVDNA17S-03	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-04	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-05	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-06	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-07	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-08	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-09	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-10	VZV Ellen	2/2

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente.

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei valori di un materiale di riferimento calibrato, è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento il pannello calibrato VZV Molecular 'Q' Panel (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato testato in 2 replicati eseguendo l'estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e "MagNA Pure 24"	
Campione	Positivi/Replicati
VZVMQP01-High	2/2
VZVMQP01-Medium	2/2
VZVMQP01-Low	2/2
VZVMQP01-Negative	0/2

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 30 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV, che sono stati positivamente per il DNA di VZV aggiungendo VZVMQP01-High (Qnostics, Ltd, Regno Unito) e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di VZV, che sono stati positivamente per il DNA di VZV aggiungendo VZVMQP01-High (Qnostics, Ltd, Regno Unito).

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di VZV	30	30	0

Tutti i campioni sono risultati validi e sono stati confermati positivi per il DNA di VZV.

La sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 36 campioni di sangue intero raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di VZV e 34 campioni di plasma raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di VZV.

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di VZV	36	0	36
Plasma raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di VZV	34	0	34

Tutti i campioni sono risultati validi in prima analisi e sono stati confermati negativi per il DNA di VZV.

La specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "VZV ELITe MGB® Kit", FTP RTS035PLD.

BIBLIOGRAFIA

A. J. Wakefield et al. (1992) *J Med Virology* 38: 183 - 190
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: liquido cefalorachidiano, sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA.

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

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

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

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: tamponi di lesioni muco-cutanee, liquido amniotico.

Utilizzare questo prodotto solo con gli strumenti validati e i campioni clinici associati indicati nella sessione "Campioni e Controlli".

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

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni; per evitare risultati errati è 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 VZV, 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 personale competente e addestrato per le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici per evitare risultati errati.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione per stimare queste differenze prima di passare a un nuovo prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA di VZV non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di VZV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno; in questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta a partire dall'estrazione con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nella regione del genoma virale in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA di VZV.

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 risultati non

validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari, come le diagnosi prenatali e di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI

DNA bersaglio non rilevato nella reazione del Positive Control o dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi di controllo positivo o standard dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius	Controllare la posizione della miscela di reazione, del Positive Control e dei Q - PCR Standard. Controllare i volumi della miscela di reazione, del Positive Control e dei Q - PCR Standard.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del controllo positivo o standard.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo o standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni del controllo positivo o standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio rilevato nella reazione di Controllo negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella micropiastra seguendo il piano di lavoro.
Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius	Controllare la posizione della miscela di reazione e del Negative Control. Controllare i volumi della miscela di reazione e del Negative Control.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard impostata sullo strumento.
Micropiastra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio e Controllo Interno non rilevato nelle reazioni dei campioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropietra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di campioni dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius	Controllare la posizione della miscela di reazione e dei campioni. Controllare i volumi della miscela di reazione e dei campioni.
Degradazione del controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only". Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione.
Problemi di conservazione dei reagenti.	Verificare che la miscela di reazione non sia rimasta esposta a temperatura ambiente per oltre 30 minuti.
Problemi durante la fase di estrazione	Verificare la qualità e la concentrazione del DNA estratto.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e controllo positivo o standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Per ELITe InGenius: Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI

	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
	Dispositivo medico diagnostico in vitro.
	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> .
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuto.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti per la rivelazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA, n. 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 e brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

Questa licenza limitata permette alla persona o all'entità legale alla quale il prodotto è stato fornito di usare il prodotto e i dati generati con l'uso del prodotto, solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite per altri scopi.

ELITe MGB® e il logo "ELITe MGB®" sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea.

ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup.

NucLiSENS® easyMAG® sono marchi registrati della bioMérieux.

QIASymphony® è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

Ficoll® è un marchio registrato di GE Healthcare.

VZV ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS035PLD



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 «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
96 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage temperature: - 20°C

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
- › **VZV - ELITe Standard:** STD035PLD
- › **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

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

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	100 cp / mL	100 – 25,000,000	96% 27/28*	100% 34/34*
Plasma	69 cp /mL	69 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 30/30*
CSF	69 cp / reaction	69 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

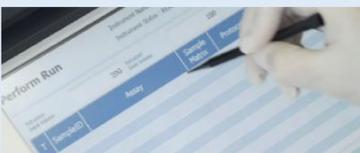
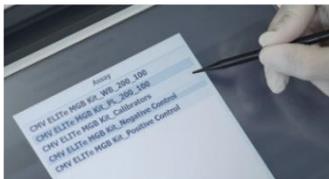
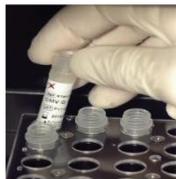
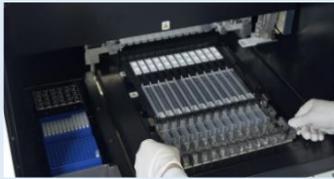
H. Procedures ELITE InGenius®

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, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volume: Input: "200 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or extraction tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

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

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 the Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

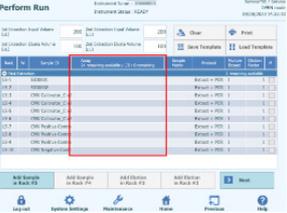
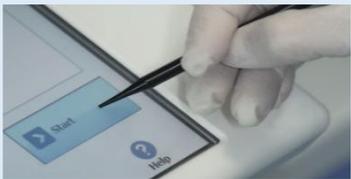
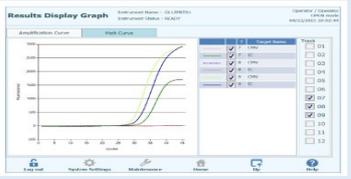
L. Procedures ELITE BeGenius®

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, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

- | | | |
|--|---|---|
| <p>1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode “Closed”</p> | <p>2. Verify calibrators: VZV Q-PCR standard in the “Calibration menu”
Verify controls: VZV pos. and neg. controls in the “Control menu”
<i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p> | <p>3. Thaw the VZV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
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: “100 µL”</p>  |
| <p>4. Select the “Assay protocol” of interest</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 and the CPE Internal Control 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>  |
- Note:** if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

- | | | |
|--|--|--|
| <p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p> | <p>5. Select the protocol “Extraction Only” in the Assay Protocol selection screen.</p> | <p>6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p> |
| <p>7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack</p> | <p>8. Close the door
Start the run</p> | <p>9. Archive the eluate sample</p> |

VZV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS035PLD



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 «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITe STAR: INT010
- › ELITe STAR 200 extraction kit: INT011EX
- › ELITe GALAXY: INT020
- › ELITe GALAXY 300 extraction kit: INT021EX
- ›

- › VZV ELITe Standard: STD035PLD
- › VZV - ELITe Positive Control: CTR035PLD
- › CPE - Internal Control: CTCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITe STAR - ABI	Whole blood	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (29/29)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole blood	100 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (35/35)*
	Plasma	69 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (20/20)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe STAR	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITe GALAXY	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

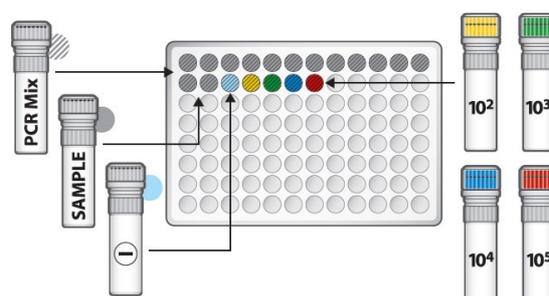
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw VZV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	VZV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

VZV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

VZV ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS035PLD



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 «**VZV ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of VZV infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood EDTA**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

VZV Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument**
- › **MagNA Pure 24 System**, software 1.0
- › **VZV - ELITE Positive Control**: CTR035PLD
- › **VZV ELITE Standard**: STD035PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (36/36)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

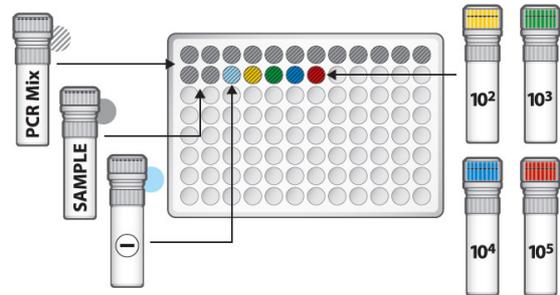
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM channel 465 -510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC channel 540 - 580"

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw VZV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells
Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	VZV FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

*manually set the Threshold and Noiseband

Interpretation - Qualitative results

VZV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

*Repeat the assay starting from the extraction

Interpretation - Quantitative results

The VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.