




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 07/06/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:







### « HCV ELITe MGB<sup>®</sup> Kit » Ref. RTK601ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Altri prodotti richiesti: nota riguardo la disponibilità di HCV ELITe Standard (REF STD601ING) e HCV - ELITe Positive Control (REF CTR601ING) come prodotti separati.*
- *Procedura ELITe BeGenius: Istruzioni dettagliate per la preparazione della miscela di reazione completa nel caso di un numero di campioni superiore a 12 in associazione allo strumento ELITe BeGenius.*
- *Procedura ELITe BeGenius: errore battitura in descrizione dell'Assay Protocol.*
- *Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti: estensione del periodo di utilizzo di ciascun reagente a 60 giorni dalla prima apertura.*

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



**HCV ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa  
dell'RNA e per la Real Time PCR

REF RTK601ING

**PRINCIPIO DEL SAGGIO**

Il saggio consiste in una reazione di trascrizione inversa e amplificazione real time (metodica one step) eseguita con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, sistemi automatici e integrati per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione degli acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

Partendo dall'RNA estratto dal campione oggetto di analisi con l'ausilio del sistema **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, la miscela completa HCV PCR Mix esegue una reazione di trascrizione inversa e amplificazione specifica per la regione 5' UTR dell'HCV e per una regione dell'RNA genomico di fago MS2 (controllo interno esogeno di estrazione e inibizione).

La sonda specifica per l'HCV, basata sulla tecnologia ELITE MGB®, e marcata con il fluoroforo FAM, è attivata quando ibridizza con lo specifico prodotto della reazione di amplificazione del controllo interno. L'emissione della fluorescenza aumenta di pari passo con il prodotto specifico della reazione di amplificazione e viene misurata e registrata dallo strumento. L'elaborazione dei dati determina la presenza e il titolo dell'HCV RNA presente nel campione.

La figura seguente illustra in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda che applica la tecnologia ELITE MGB.

**HCV ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
per la Real Time PCR

REF RTK601ING      CE 0344 IVD      -20 °C

**INDICE**

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 4
MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 4
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE INGENIUS®	pag. 7
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 7
PROCEDURA	pag. 8
ELITE BeGENIUS®	pag. 16
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 16
PROCEDURA	pag. 18
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITE INGENIUS® e ELITE BEGENIUS®	pag. 24
BIBLIOGRAFIA	pag. 38
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 39
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 40
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 42
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 42
ALLEGATO: QUICK START GUIDE	pag. A

**USO PREVISTO**

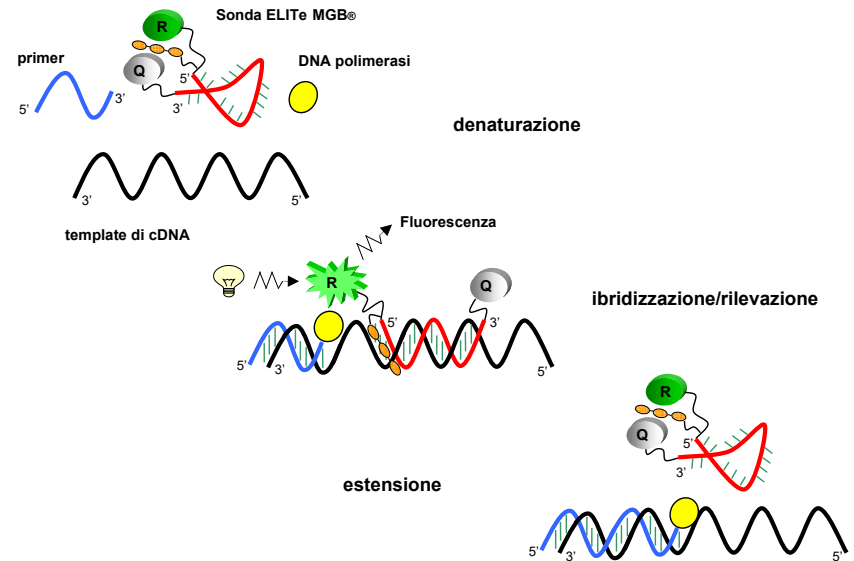
Il prodotto **HCV ELITE MGB® Kit** è un saggio quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione dell'RNA** del virus dell'epatite C (**HCV**) su campioni di RNA estratti da campioni clinici.

Il saggio è in grado di rilevare l'RNA dell'HCV appartenente ai genotipi 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Il saggio è validato in associazione con il sistema **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®** partendo da campioni di plasma umano raccolti in provette con EDTA o ACD e campioni di siero.

Il prodotto trova impiego come ausilio nella gestione di individui HCV-positivi sottoposti a terapia antivirale, insieme con i dati clinici del paziente e ad altri referti di laboratorio.

Il prodotto non trova impiego come test di screening per rilevare la presenza di HCV nel sangue o nei suoi derivati o come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HCV.



**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il prodotto **HCV ELITe MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

• **HCV ELITe MGB Mix**

Questo componente fornisce i seguenti due componenti secondari:

- **HCV PCR Mix**, miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time, pre-aliquotata in **quattro provette** (tappo BIANCO). Ogni provetta contiene **600 µl** di soluzione, che consentono di effettuare **24 test** (almeno 5 campioni per sessione) in associazione con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

Il primer e la sonda per l'HCV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata dal quencher non fluorescente Eclipse) sono specifici per il gene codificante la regione 5' UTR dell'HCV. Il segnale emesso dall'HCV è rilevato dal canale 1 (HCV) di **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

Il primer e la sonda per il controllo interno (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP525 e inattivata dal quencher non fluorescente Eclipse) sono specifici per una regione di RNA genomico di fago (MS2). Il segnale emesso dal controllo interno è rilevato dal canale 2 (IC) di **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

La miscela di reazione fornisce anche il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

- **"RT EnzymeMix"**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa, pre-aliquotata in **due provette** (con tappo NERO). Ogni provetta contiene **20 µl** di soluzione, che consentono di effettuare **48 test** (almeno 5 campioni per sessione) in associazione con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

I due sub-componenti consentono di effettuare **96 test in associazione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius**, utilizzando rispettivamente 20 µl e 0,3 µl per reazione.

• **HCV ELITe Standard**

Questo componente fornisce i sub-componenti **HCV Q-PCR Standard**, quattro soluzioni stabilizzate di DNA plasmidico a un **titolo noto**, ciascuna aliquotata in **una provetta pronta per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **2 sessioni analitiche**. Il DNA plasmidico contiene la regione 5' UTR dell'HCV. La rilevazione del DNA dell'HCV a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HCV ELITe MGB Mix** in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consente di calcolare la curva standard del sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HCV.

La concentrazione del DNA plasmidico in copie/mL è stata determinata mediante misurazione dell'assorbanza con uno spettrofotometro. La concentrazione del DNA plasmidico è stata messa in correlazione con lo standard internazionale "WHO International Standard 6th HCV International Standard" (NIBSC, UK, codice 18/184) con l'aiuto di un fattore di conversione al fine di poter esprimere la concentrazione in unità internazionali/ml (UI/mL).

Il componente consente di effettuare **2 sessioni analitiche distinte in associazione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

• **HCV - ELITe Positive Control**

Questo componente fornisce il sub-componente **HCV Positive Control**, una soluzione stabilizzata di DNA plasmidico a un **titolo noto**, aliquotata in **due provette pronte per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µl** di soluzione sufficienti per **4 sessioni analitiche**. Il DNA plasmidico contiene la regione 5' UTR dell'HCV. La rilevazione e quantificazione del DNA target a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HCV ELITe MGB Mix** in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consentono di validare il sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HCV.

Il componente consente di effettuare **8 sessioni analitiche distinte in associazione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

• **HCV Internal Control**

Questo componente fornisce il sub-componente **HCV CPE**, una soluzione stabilizzata di RNA genomico di fago MS2, aliquotata in **otto provette pronte per l'uso**. Ogni provetta contiene **160 µl** di soluzione, che consentono di effettuare **12 test** (almeno 2 campioni per sessione). L'RNA genomico di MS2 si usa come template di controllo interno esogeno. La rilevazione del cDNA di MS2 a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HCV ELITe MGB Mix** in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consente di validare i risultati dei campioni HCV-negativi.

Il componente consente di effettuare **96 test in associazione con ELITe InGenius e ELITe BeGenius**, utilizzando 10 µL per estrazione.

**MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO**

Componente	Sub-componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
<b>HCV ELITe MGB Mix</b> ref. RTS601ING	HCV PCR Mix ref. RTS601ING	miscela di reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time con <b>tappo BIANCO</b>	4 x 600 µl	-
	RT EnzymeMix ref. RTS003-RT	Trascrittasi inversa in provetta con <b>tappo con inserto NERO</b>	2 x 20 µl	-
<b>HCV ELITe Standard</b> ref. STD601ING	HCV Q-PCR Standard 10 <sup>5</sup> ref. STD601ING-5	Soluzione di plasmide in provetta con <b>tappo ROSSO</b>	1 x 160 µl	-
	HCV Q-PCR Standard 10 <sup>4</sup> ref. STD601ING-4	soluzione di plasmide in provetta con <b>tappo BLU</b>	1 x 160 µl	
	HCV Q-PCR Standard 10 <sup>3</sup> ref. STD601ING-3	soluzione di plasmide in provetta con <b>tappo VERDE</b>	1 x 160 µl	
	HCV Q-PCR Standard 10 <sup>2</sup> ref. STD601ING-2	soluzione di plasmide in provetta con <b>tappo GIALLO</b>	1 x 160 µl	
<b>HCV - ELITe Positive Control</b> ref. CTR601ING	HCV Positive Control ref. CTR601ING	Soluzione di plasmide in provetta con <b>tappo NERO</b>	2 x 160 µl	-
<b>HCV Internal Control</b> ref. CPE601ING	HCV CPE ref. CPE601ING	Soluzione di DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2 in provetta con <b>tappo NEUTRO</b>	8 x 160 µl	-

**MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO**

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti non talcati monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000-14.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- Provetta Sarstedt da 2,0 ml con tappo a vite corrugato (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

**ALTRI PRODOTTI RICHIESTI**

I reagenti per l'estrazione del RNA dai campioni da analizzare e i materiali di consumo **non** sono in dotazione con questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la trascrizione inversa, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, è richiesto l'impiego dello strumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030 e INT040) e dei seguenti Assay Protocol specifici (EG SpA).

Nel caso in cui sia utilizzato lo strumento **ELITE InGenius**:

- parametri per l'amplificazione per i calibratori **HCV ELITE STD**,
- parametri per l'amplificazione per il controllo positivo **HCV ELITE\_PC**,
- parametri per l'amplificazione per il controllo negativo **HCV ELITE\_NC**,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare **HCV ELITE\_PL\_600\_50**,
- parametri per i campioni di siero da analizzare **HCV ELITE\_Se\_600\_50**.

Nel caso in cui sia utilizzato lo strumento **ELITE BeGenius**:

- parametri per l'amplificazione per i calibratori **HCV ELITE\_Be\_STD**,
- parametri per l'amplificazione per il controllo positivo **HCV ELITE\_Be\_PC**,
- parametri per l'amplificazione per il controllo negativo **HCV ELITE\_Be\_NC**,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare **HCV ELITE\_Be\_PL\_600\_50**,
- parametri per i campioni di siero da analizzare **HCV ELITE\_Be\_Se\_600\_50**.

Con gli strumenti **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- cartucce per estrazione **ELITE InGenius® SP 1000** (EG SpA, cod. INT033SP1000),
- materiali di consumo per l'estrazione **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (EG SpA, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione **ELITE InGenius® PCR Cassette** (EG SpA, cod. INT035PCR),
- puntali **300 µl Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, USA, cod. TF-350-L-R-S) per **ELITE InGenius**,
- puntali **1000 µL Filter tips Tecan** (Tecan Group Ltd., ref. 30180118) per **ELITE BeGenius**,
- contenitori **ELITE InGenius® Waste Box** (EG SpA, cod. F2102-000).

**Nota:** in caso di necessità, i Calibratori e il Controllo Positivo sono disponibili anche come prodotti separati: **HCV ELITE Standard**, ref. STD601ING, e **HCV ELITE Positive Control**, ref. CTR601ING.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

### Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare il materiale che viene a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo. 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 utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.  
Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.  
Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.  
Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.

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

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

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

### Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

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

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

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Preparare i reagenti necessari per la sessione in modo tale che siano in quantità sufficienti per l'uso in un solo giorno. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

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

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

### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

#### • HCV ELITE MGB Mix

La miscela **HCV PCR Mix** deve essere conservata al buio a temperatura inferiore a -20 °C.

La **HCV PCR Mix** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

La **HCV 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

Il sub-componente **RT EnzymeMix** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

L'**RT EnzymeMix** deve essere conservata a temperatura inferiore a -20 °C.

L'**RT EnzymeMix** deve essere usato entro 60 giorni dalla prima apertura.

L'**RT EnzymeMix** non deve rimanere esposta a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti durante l'utilizzo.

L'**RT EnzymeMix** non deve rimanere esposta a temperature superiori a -20 °C per un massimo di **dieci volte**: un'ulteriore esposizione può causare un calo delle prestazioni del prodotto.

#### • HCV ELITE Standard

Il sub-componente **HCV Q-PCR Standard** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

Il sub-componente **HCV Q-PCR Standard** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

Il sub-componente **HCV Q-PCR Standard** può essere congelato e scongelato per un massimo di **due volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe compromettere il titolo.

Il sub-componente **HCV Q-PCR Standard** può essere lasciato on board sullo strumento ELITE InGenius nell'area di estrazione nell'area di estrazione per un massimo di **due sessioni di lavoro indipendenti da due ore ciascuna** (modalità "PCR Only").

#### • HCV - ELITE Positive Control

Il sub-componente **HCV Positive Control** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

Il sub-componente **HCV Positive Control** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

Il sub-componente **HCV Positive Control** può essere congelato e scongelato per un massimo di **quattro volte** perché un maggior numero di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe compromettere le prestazioni.

Il sub-componente **HCV Positive Control** può essere lasciato on board sullo strumento ELITE InGenius nell'area di estrazione per un massimo di **quattro sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extraction + PCR Only").

- **HCV Internal Control**

Il sub-componente **HCV CPE** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

Il sub-componente **HCV CPE** può essere congelato e scongelato per un massimo di **dodici volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

Il sub-componente **HCV CPE** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

Il prodotto **HCV CPE** può essere lasciato on board sullo strumento ELITE InGenius nel blocco refrigerato nell'area reagenti per un massimo di **sei sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extraction + PCR").

**ELITE InGenius**

**CAMPIONI E CONTROLLI**

#### Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

##### Plasma raccolto in provette con EDTA o ACD

Raccogliere i campioni di plasma per l'estrazione degli acidi nucleici in provette con EDTA o ACD, identificarli secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (+18/+25 °C) per un massimo di 24 ore o a +2/+8 °C per un massimo di 3 giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a -20 °C per un massimo di 1 mese o a -70 °C per 6 mesi.

Si raccomanda di ripartire i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

**Nota:** L'estrazione dell'RNA dal plasma raccolto in provette con EDTA o ACD si esegue con il sistema **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HCV ELITE\_PL\_600\_50**. Questo protocollo processa 600 µl di campione, partendo da un tubo secondario, aggiunge 10 µL di **HCV CPE** (controllo interno) per ogni estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µl. Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione con l'Assay Protocol.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a -20 °C per un mese.

#### Siero

Raccogliere e identificare i campioni di siero destinati all'estrazione dell'RNA secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per 6 mesi.

Si raccomanda di ripartire i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

**Nota:** L'estrazione dell'RNA dal siero si esegue con il sistema **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HCV ELITE\_Se\_600\_50**. Questo protocollo processa 600 µl di campione, partendo da un tubo secondario, aggiunge 10 µL di **HCV CPE** (controllo interno) per estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µl. Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione con l'Assay Protocol I.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a -20 °C per un mese.

#### Altri campioni:

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: Sangue intero e CSF.

#### Sostanze interferenti

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

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di amplificazione e frequenti risultati non validi.

Non utilizzare il plasma emolizzato al fine di non inibire la reazione di amplificazione e di ottenere frequentemente risultati non validi.

#### Controlli di amplificazione

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

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **HCV ELITE Standard** fornito in questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITE\_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HCV - ELITE Positive Control** fornito in questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITE\_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornito in questo kit) in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITE\_NC**.

**Nota:** Il sistema **ELITE InGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadono dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadono 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.

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

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

#### Controlli di qualità

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

Utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

**PROCEDURA**

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

- verifica del sistema,
- allestimento della sessione,
- lettura ed esportazione dei risultati.

#### Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere lo strumento ELITE InGenius e selezionare la modalità "CLOSED",

- verificare che i calibratori (**HCV 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 nei paragrafi seguenti,
- verificare che i controlli di amplificazione (**HCV Positive Control**, **HCV Negative Control**) siano stati 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 nei paragrafi seguenti,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con i kit ELITe MGB, lo strumento ELITe InGenius e la matrice citata.

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

Protocollo analitico per il prodotto HCV ELITe MGB Kit			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
<b>HCV ELITe_PL_600_50</b>	Plasma	Positivo / copie/ml / UI/ml / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µl Volume eluizione estratto: 50 µl Controllo Interno: 10 µl Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1,7 Volume PCR Mix: 20 µl Volume del campione in PCR: 20 µl
<b>HCV ELITe_Se_600_50</b>	Siero	Positivo / copie/ml / UI/ml / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µl Volume eluizione estratto: 50 µl Controllo Interno: 10 µl Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1,7 Volume PCR Mix: 20 µl Volume del campione in PCR: 20 µl

UI, unità internazionali

Se l'Assay protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

#### Allestimento della sessione

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

- Sessione integrata (eEstrazione + 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 vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

**Nota:** il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory 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.

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

1. Scongellare per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti **HCV PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **24 test**, in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione).
2. Mescolare mediante agitatore le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 10 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

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

3. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

**Nota:** Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

4. Preparare una provetta da 2 ml con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non in dotazione con il kit) per la **miscela di reazione** e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un pennarello a inchiostro permanente.
5. Calcolare i volumi dei due componenti secondari necessari per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

**Nota:** Per calcolare i volumi dei due componenti secondari da preparare per la **miscela di reazione completa**, è necessario definire il numero di campioni (N) da analizzare nell'ambito della sessione e seguire le indicazioni riportate nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µl	(N + 1) x 0,3 µl
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µl	(N + 2) x 0,3 µl
N = 12	290 µl	4,4 µl

6. Preparare la **miscela di reazione completa** aggiungendo all'apposita provetta da 2 ml i volumi calcolati dei due componenti.
7. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

**Nota:** La **miscela di reazione completa** deve essere utilizzata entro **7 ore** se conservata nel blocco refrigerato. La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

**Nota:** La **miscela di reazione completa** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per la preparazione dei tre tipi di sessione.

#### A. Sessione integrata

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

1. Scongellare 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". Ricordarsi che per l'analisi sono necessari 600 µl di campione.
2. Scongellare le provette di **HCV CPE** a temperatura ambiente (~+25 °C). Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo.
3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
4. Verificare che il volume di estrazione sia di 1000 µl (anche se si usano 600 µl di campione) e che il volume di eluato estratto sia di 50 µl.
5. Per ogni "Track" d'interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
6. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare l'Assay protocol da utilizzare (es. HCV ELITe\_PL\_600\_50).
7. Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Nella colonna "Sample Position" (posizione campione) selezionare "Extraction tube" (provetta con campione da estrarre) come posizione da cui caricare il campione. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.  
Per eseguire l'analisi, trasferire 600 µl di campione nell'"Extraction Tube". Il sistema **ELITe InGenius** lascerà nell'"Extraction Tube" l'eventuale quantità eccedente.

- Caricare la **miscela di reazione completa** e **HCV CPE** nel "Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV PCR Mix** e **HCV CPE**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Caricare le **cassette PCR**, le cartucce per estrazione **ELITE InGenius SP 1000**, tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

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

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nell'Elution tube, tapparli, identificarlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

**Nota:** La **miscela di reazione completa** 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 le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

#### **B. Sessione di amplificazione (PCR Only)**

Per allestire la sessione di amplificazione partendo dal RNA estratto, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongellare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per isolarne il contenuto.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
- Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µl (anche se si usano 600 µl di campione) e che il volume eluizione estratto sia di 50 µl.
- Per ogni traccia d'interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre.
- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico da utilizzare (es. HCV ELITE\_PL\_600\_50).
- Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only" (solo PCR).
- Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella "Sample Position" (posizione del campione) sia "Elution Tube (bottom row)" (provetta con soluzione di eluizione; fila in basso). Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV PCR Mix**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.

- Caricare le **cassette PCR** e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

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

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere il campione estratto residuo presente nella provetta con soluzione di eluizione, tapparli e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

**Nota:** La **miscela di reazione completa** 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 le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

#### **C. Sessione di calibrazione**

Per allestire la sessione di calibrazione con Q-PCR Standard, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongellare le provette **HCV Q-PCR Standard** (Cal1: HCV Q-PCR Standard 10<sup>2</sup>, Cal2: HCV Q-PCR Standard 10<sup>3</sup>, Cal3: HCV Q-PCR Standard 10<sup>4</sup>, Cal4: HCV Q-PCR Standard 10<sup>5</sup>) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per isolarne il contenuto.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
- Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µl (anche se si usano 600 µl di campione) e che il volume eluizione estratto sia di 50 µl.
- All'interno della traccia d'interesse, nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico "HCV ELITE\_STD" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV Q-PCR Standard**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV PCR Mix**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Caricare le **cassette PCR** e le provette **HCV Q-PCR Standard** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

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

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il prodotto **HCV Q – PCR Standard** residuo, tapparli e conservarlo a -20 °C.

**Nota:** Il prodotto **HCV Q-PCR Standard** può essere utilizzato per 2 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

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

**Nota:** La miscela di reazione completa 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 le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

#### D. Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

Per preparare la sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongela le provette di **HCV Positive Control** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti per sessione. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per isolarne il contenuto.
2. Come **controllo negativo**, trasferire almeno 50 µl di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.
3. Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µl (anche se si usano 600 µl di campione) e che il volume eluzione estratto sia di 50 µl.
5. Nella colonna "Assay" (saggio), all'interno della traccia d'interesse, selezionare il protocollo analitico da utilizzare.
6. Per il controllo positivo, nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico "HCV ELITe\_PC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV Positive Control**.
7. Per il controllo negativo, selezionare nella colonna "Assay" (saggio) "HCV ELITe\_NC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
8. Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HCV PCR Mix**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
10. Caricare le **cassette di PCR**, la provetta per il **controllo positivo per HCV** e per il **controllo negativo** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

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

**Nota:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il sub-componente **HCV Positive Control** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C. Smaltire il **controllo negativo** residuo.

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

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

**Nota:** La miscela di reazione completa 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 le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

#### Controllo e approvazione dei risultati

Il sistema **ELITe InGenius** 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 sessione, 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:** Il sistema **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory 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.

Il sistema **ELITe InGenius** genera i risultati del prodotto **HCV ELITe MGB Kit** tramite la seguente procedura.

##### A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HCV (canale "HCV") nelle reazioni di amplificazione dei calibratori sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "HCV ELITe\_STD".

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, viene registrata nel database (calibrazione) e può essere consultata e approvata da personale avente la qualifica di "Administrator" (amministratore) o "Analyst" (operatore), seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

La curva di calibrazione, specifica per il lotto di reagente di amplificazione, scadrà **dopo 60 giorni**.

Prima di analizzare qualsiasi campione, è obbligatorio verificare che i risultati di Calibrazione, del Controllo Positivo e del Controllo Negativo siano approvati e validi per il lotto di reagente di amplificazione.

Lo stato dei risultati di Calibrazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione è mostrato nella schermata "Calibratori" (Calibration). Se i risultati di calibrazione sono assenti o scaduti, generarli come descritto sopra.

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.

**Nota:** se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" (calibrazione) si visualizza il messaggio "Failed" (non conforme) che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

**Nota:** Se la curva di calibrazione viene trattata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

##### B. Validazione dei risultati dell'amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HCV (canale HCV) nella reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocol "HCV ELITe\_PC" e "HCV ELITe\_NC".

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) (controlli) 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 per il controllo positivo e il controllo negativo, specifici per il lotto di reagente di amplificazione, scadranno **dopo 15 giorni**.



I risultati delle sessioni di amplificazione per controllo positivo e controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento per calcolare le Carte di controllo ("Control Chart"). 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 della reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" (controlli) appare il messaggio "Failed" (non conforme) che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo.

**Nota:** se il controllo positivo o il controllo negativo vengono trattati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

### C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per HCV (canale "HCV") e dalla sonda del controllo Interno (canale "IC") nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocol "HCV ELITe\_PL\_600\_50" e "HCV ELITe\_Se\_600\_50".

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

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

1) Curva di calibrazione	Status
HCV Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Status
HCV Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Status
HCV Negative Control	APPROVATO

Per ogni campione, il risultato del saggio viene interpretato automaticamente dal sistema secondo quanto stabilito dall'algoritmo del programma **ELITe InGenius software** e dai parametri dell'Assay Protocol

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

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
HCV: RNA rilevato, quantità pari a XXX copies / mL o IU/mL.	L' <b>HCV RNA è stato rilevato</b> nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità indicata.
HCV: RNA Rilevato, quantità inferiore a LLoQ copies / mL o IU/mL.	L' <b>HCV RNA è stato rilevato</b> nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio.
HCV: RNA Rilevato, quantità superiore a LLoQ copies / mL o IU/mL.	L' <b>HCV RNA è stato rilevato</b> nel campione oltre il limite superiore di quantificazione del saggio.
HCV: RNA non Rilevato o inferiore a LoD copie / mL o IU/mL.	L' <b>HCV RNA non è stato rilevato</b> nel campione. Il campione è negativo per l'HCV RNA oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	<b>Risultato del saggio non valido</b> per un errore del controllo interno (errata estrazione o presenza di inibitori). Il test deve essere ripetuto.

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

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ristato com'è oppure diluito mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ristato cominciando dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).

I campioni segnalati come "HCV RNA Non Rilevato o inferiore a LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il RNA dell'HCV. In tal caso non si può escludere che l'HCV RNA sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (v. "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per il target HCV ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità (LoD), quando vengono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "HCV: RNA Rilevato, quantità inferiore LLoQ (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni segnalati come "HCV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ", non sono adatti alla quantificazione. La concentrazione di HCV 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.

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

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

### D. Refertazione dei risultati del campione

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

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

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

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

## ELITe BeGenius®

### CAMPIONI E CONTROLLI

#### Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

#### Plasma raccolto in provette con EDTA o ACD

Raccogliere i campioni di plasma per l'estrazione degli acidi nucleici in provette con EDTA o ACD, identificarli secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (+18/+25 °C) per un massimo di 24 ore o a +2/+8 °C per un massimo di 3 giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a -20 °C per un massimo di 1 mese o a -70 °C per 6 mesi.

Si raccomanda di ripartire i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

**Nota:** L'estrazione dell'RNA dal plasma raccolto in provette con EDTA o ACD si esegue con il sistema **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.1.0** (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **HCV ELITe\_Be\_PL\_600\_50**. Questo protocollo processa 600 µl di campione, partendo da un tubo secondario, aggiunge 10 µL di **HCV CPE** (controllo interno) per ogni estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µl. Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione con l'Assay Protocol.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a -20 °C per un mese.

**Siero**

Raccogliere e identificare i campioni di siero destinati all'estrazione dell'RNA secondo le linee guida del laboratorio, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) per un massimo di tre giorni o a +2/+8 °C per un massimo di cinque giorni. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di un mese o a ~-70 °C per 6 mesi.

Si raccomanda di ripartire i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

**Nota:** L'estrazione dell'RNA dal siero si esegue con il sistema **ELITe BeGenius** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.1.0** (o versioni equivalenti successive) utilizzando utilizzando l'Assay Protocol **HCV ELITe\_Be\_Se\_600\_50**. Questo protocollo processa 600 µl di campione, partendo da un tubo secondario, aggiunge 10 µL di **HCV CPE** (controllo interno) per estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µl. Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione con l'Assay Protocol I.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a -20 °C per un mese.

**Altri campioni:**

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici come: Sangue intero e CSF.

**Sostanze interferenti**

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

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di amplificazione e frequenti risultati non validi.

Non utilizzare il plasma emolizzato al fine di non inibire la reazione di amplificazione e di ottenere frequentemente risultati non validi.

**Controlli di amplificazione**

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

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **HCV ELITe Standard** fornito in questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITe\_Be\_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HCV ELITe Positive Control** fornito in questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITe\_Be\_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornito in questo kit) in associazione con l'Assay Protocol **HCV ELITe\_Be\_NC**.

**Nota:** Il sistema **ELITe BeGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadono dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadono 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.

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

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

**Controlli di qualità**

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

Utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

**PROCEDURA**

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

- Verifica del 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 lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i calibratori (**HCV Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Questo può essere verificato dal menu "Calibration" nella Home page. Se i calibratori non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- verificare che i controlli di amplificazione (**HCV Positive Control**, **HCV Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page. Se i controlli di amplificazione non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il kit ELITe MGB, lo strumento ELITe BeGenius e la matrice citata.

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

Protocollo analitico per il prodotto HCV ELITe MGB Kit			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
<b>HCV ELITe_Be_PL_600_50</b>	Plasma	Positivo / copie/ml / UI/ml / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µl Volume eluizione estratto: 50 µl Controllo Interno: 10 µl Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µl Volume del campione in PCR: 20 µl
<b>HCV ELITe_Be_Se_600_50</b>	Siero	Positivo / copie/ml / UI/ml / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µl Volume eluizione estratto: 50 µl Controllo Interno: 10 µl Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µl Volume del campione in PCR: 20 µl

UI, unità internazionali

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

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

- Scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti **HCV PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **24 test**, in condizioni ottimali di consumo del reagente (2 o più test per sessione).
- Mescolare mediante agitatore le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 10 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

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

- Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

**Nota:** Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- Preparare una provetta da 2 ml con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non in dotazione con il kit) per la **miscela di reazione** e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un pennarello a inchiostro permanente.
- Calcolare i volumi dei due componenti secondari necessari per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

**Nota:** Per calcolare i volumi dei due componenti secondari da preparare per la **miscela di reazione completa**, è necessario definire il numero di campioni (N) da analizzare nell'ambito della sessione e seguire le indicazioni riportate nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µl	(N + 1) x 0,3 µl
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µl	(N + 2) x 0,3 µl
N = 12	290 µl	4,4 µl

- Preparare la **miscela di reazione completa** aggiungendo all'apposita provetta da 2 ml i volumi calcolati dei due componenti.

**Nota:** Nel caso di un numero di campioni superiore a 12:

- preparare una prima provetta da 2 mL con la **miscela di reazione completa** per 12 campioni;
- preparare una seconda provetta da 2 mL con la **miscela di reazione completa** calcolando i volumi dei due componenti secondari in funzione del numero di campioni rimanenti (N-12).

- Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

**Nota:** La **miscela di reazione completa** deve essere utilizzata entro **7 ore** se conservata nel blocco refrigerato. La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

**Nota:** La **miscela di reazione completa** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

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.

**Nota Bene:** Per l'analisi sono necessari 600 µL di campione in tubi da 2,0 mL (non forniti nel kit) precedentemente etichettati.

- Scongelare i tubi di **HCV CPE** a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti, 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.
- Selezionare il "Run mode: Extract + PCR" (estrazione + PCR).
- Caricare i campioni nel "Sample Rack".

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

- Inserire il "Sample Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" (avanti) per procedere con l'operazione successiva.
- Verificare che l'"Extraction Input Volume" (volume di estrazione) sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" (volume di eluizione) sia impostato a 50 µL.
- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (es. HCV ELITE\_Be\_PL\_600\_50). Fare click su "Next" per proseguire.
- Se deve essere effettuata una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 7 a 9 utilizzando il rack L4.
- 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.

- Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
- Ripetere i passaggi 11 e 12 utilizzando il rack L2.
- Caricare **HCV CPE** e la **miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack" 1(caricatore dei reagenti/eluati).
- Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 1" (L1) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
- 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 l'"Extraction Rack" (cestello di estrazione) con le cartucce di estrazione **ELITE InGenius SP 1000** e tutti i consumabili richiesti, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare 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, 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 **miscela completa di reazione** 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 (RNA), procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Se necessario, scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di RNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare nel blocco refrigerato.
2. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (eseguire la corsa).
3. 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.
4. Selezionare il "run mode": "PCR Only" (solo PCR).
5. Caricare gli eluati dei campioni estratti nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati).
6. Inserire l'"Elution Rack" nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
7. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Eluate Volume" sia impostato a 50 µL.
8. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare gli Assay protocol da utilizzare (es. HCV ELITe\_Be\_PL\_600\_50. Fare click su "Next" (avanti) per proseguire.
9. Caricare la **miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
10. Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
11. 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.
12. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
13. Chiudere lo sportello dello strumento,
14. 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 **miscela completa di reazione** 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 di Calibrazione procedere come segue, facendo riferimento alla GUI:

1. Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti i reagenti **HCV Q-PCR Standard** (Cal1: HCV Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HCV Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal3: HCV Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HCV Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>) per l'amplificazione dei calibratori. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e metterle nel blocco refrigerato
2. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (eseguire la corsa).
3. 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.
4. Selezionare il "run mode: PCR Only" (solo PCR).
5. Caricare i calibratori nell'"Elution Rack" (caricatore degli eluati).
6. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare gli Assay protocol da utilizzare (es. HCV ELITe\_Be\_STD). Fare click su "Next" (avanti) per proseguire.
7. Caricare la **miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
8. Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
9. 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.
10. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
11. Chiudere lo sportello dello strumento,
12. 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, prelevare dallo strumento le provette degli **Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C.

**Nota Bene:** le provette di **HCV Q-PCR Standard** possono essere utilizzate per 2 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

**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 **miscela completa di reazione** 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 Corsa 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:

1. Scongellare i reagenti **HCV Positive Control** per l'amplificazione del Controllo Positivo a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette 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 nell'**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**.
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 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.
7. Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (HCV ELITe\_Be\_PC and HCV ELITe\_Be\_NC). Fare click su "Next" per proseguire.
8. Caricare la **miscela completa di reazione** nel "Reagent/Elution Rack" (caricatore dei reagenti/eluati).
9. Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) come indicato dalla GUI. Fare click su "Next" per proseguire.
10. 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.
11. Caricare il "PCR Rack" (cestello di PCR) con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per proseguire.
12. Chiudere la porta dello strumento.
13. 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:** Il **HCV Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

**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 **miscela completa di reazione** 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 sessione, 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:** 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 **HCV ELITe MGB Kit** tramite la seguente procedura:

- A. validazione dei risultati relativi alla calibrazione
- B. validazione dei risultati relativi al controllo positivo e negativo,
- C. validazione dei risultati relativi al campione,
- D. 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 and ELITe BeGenius**

**Limite di rilevabilità (LoD)**

Il limite di rilevabilità (LoD) del kit HCV ELITe MGB è stato definito in associazione con i campioni di plasma e con il sistema ELITe InGenius.

Il LoD è stato definito mediante analisi di un pannello di campioni di plasma negativo per HCV raccolto in ACD positivamente con un materiale di riferimento certificato per HCV (6<sup>th</sup> WHO International Standard, NIBSC) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da 100 UI/ml fino a 6 UI/ml. Ogni livello di diluizione è stato testato in 24 replicati sul sistema ELITe InGenius in modalità "estrazione + PCR". Il LoD è stato calcolato mediante analisi di regressione probit dei dati come concentrazione avente una probabilità del 95% di risultare positiva.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di rilevabilità (UI/ml) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HCV	26	19	48

Il LoD inteso come copie/ml per campioni di plasma raccolto in ACD è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato (2,4 UI/copia). Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie/ml.

Limite di rilevabilità (copie/ml) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HCV	11	8	20

Il valore calcolato di LoD è stato verificato analizzando 30 replicati di plasma raccolto in ACD, 30 replicati di plasma raccolto in EDTA e 30 replicati di siero positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (6<sup>th</sup> WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il LoD è confermato se almeno 27 replicati su 30 risultano positivi come da linee guida CLSI standard EP17-A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Verifica del limite di rilevabilità (LoD) per plasma e siero ed ELITe InGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in provette con ACD	26 UI/ml	HCV	30	29	1
Plasma raccolto in provette con EDTA	26 UI/ml	HCV	30	27	3
Siero	26 UI/ml	HCV	30	27	3

Il valore di LoD per il target HCV è stato confermato come 26 UI/ml per plasma raccolto in ACD, plasma raccolto in EDTA e siero.

Il valore di LoD calcolato per plasma EDTA, plasma ACD e siero è stato verificato in associazione ELITe BeGenius testando 30 replicati di campione di plasma EDTA, 30 replicati di plasma ACD e 30 replicati di siero, positivamente utilizzando il materiale di riferimento certificato HCV (6th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il valore di LoD è confermato se almeno 27 repliche su 30 danno un risultato positivo secondo l'articolo K. Linnet et al. 2004.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione per campioni di plasma e siero ed ELITe BeGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in EDTA	26 UI / mL	HCV	30	30	0
Plasma raccolto in ACD	26 UI / mL	HCV	30	27	3
Siero	26 UI / mL	HCV	30	27	3

Il valore LoD per il target HCV è stato confermato a 26 UI / mL per plasma raccolto in EDTA, plasma raccolto in ACD e siero in associazione con ELITe BeGenius.

#### Equivalenza delle matrici: Plasma raccolto in EDTA, plasma raccolto in ACD e siero

L'equivalenza a livello di prestazioni del kit HCV ELITe MGB è stata verificata utilizzando campioni di plasma raccolto in ACD, di plasma raccolto in EDTA e campioni di siero in associazione con il sistema ELITe InGenius.

Trenta campioni di Plasma in EDTA e 30 campioni di plasma in ACD (provenienti dagli stessi 30 donatori), testati negativi per HCV mediante un saggio immunoenzimatico CE IVD, oni sono stati analizzati su sistema ELITe InGenius in modalità "estrazione + PCR". È stata valutata la percentuale di concordanza di negatività. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del controllo interno, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza %	CV% di Ct IC	CV% totale di Ct IC
Plasma raccolto in EDTA	30	0	30	100%	0,89	0,95
Plasma raccolto in ACD	30	0	30		1,02	

30 campioni di plasma in ACD e 30 campioni di siero (provenienti dagli stessi 30 donatori), testati negativi per HCV, (sono stati analizzati).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza %	CV% di Ct IC	CV% totale di Ct IC
Plasma raccolto in EDTA	30	0	30	100%	0,90	1,11
Siero	30	0	30		1,28	

Trenta campioni di Plasma in EDTA e 30 campioni di plasma in ACD (provenienti dagli stessi 30 donatori), testati negativi per HCV mediante un saggio immunoenzimatico CE IVD sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato (6th WHO HCV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITe InGenius in modalità "estrazione + PCR" (estratto + PCR). È stata valutata la percentuale di concordanza di positività. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del target HCV, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza %	CV% di Ct	CV% totale di Ct	Imprecisione (Log UI/ml)
Plasma raccolto in EDTA	30	30	0	100%	1,96	1,79	0,0190
Plasma raccolto in ACD	30	30	0		1,60		

Trenta campioni di Plasma in EDTA e 30 campioni di siero (provenienti dagli stessi 30 donatori), testati negativi per HCV mediante un saggio immunoenzimatico CE IVD sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato (6th WHO HCV International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivo	Negativo	Concordanza %	CV% di Ct	CV% totale di Ct	Imprecisione (Log UI/ml)
Plasma raccolto in provette con EDTA	30	30	0	100%	1,84	1,81	0,0636
Siero	30	30	0		1,77		

In queste analisi, 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di plasma raccolto in ACD, e 30 campioni appaiati di plasma raccolto in EDTA e di siero hanno evidenziato prestazioni equivalenti quando processati con il kit HCV ELITe MGB in associazione con il sistema ELITe InGenius.

Ulteriori analisi sull'equivalenza delle matrici sono state eseguite nell'ambito dello studio riguardante l'intervallo di misurazione lineare.

#### Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HCV ELITe MGB Kit è stato determinato in associazione con campioni di plasma e il sistema ELITe InGenius.

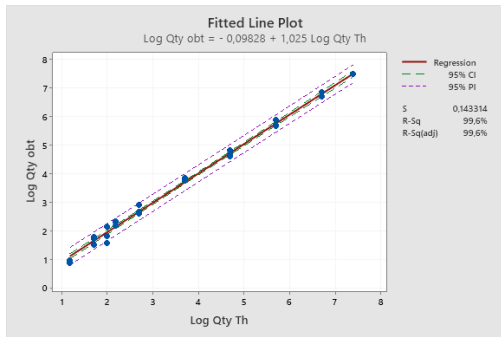
L'intervallo di misurazione lineare è stato determinato utilizzando un pannello di materiale di riferimento per HCV a titolo noto (AcroMatrix™ HCV-S Panel) su plasma raccolto in EDTA. Il pannello comprende dieci punti di diluizioni da  $2,5 \times 10^7$  UI/ml a  $1,5 \times 10^1$  UI/ml. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sul sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita tramite regressione polinomiale e lineare, ha dimostrato che il saggio mostra una quantificazione lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione (R2) pari a 0,996.

**HCV ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la Real Time PCR

REF RTK601ING

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione LoD che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0,2787 Log UI/ml) e accurati (imprecisione = 0,3641 Log UI/ml) entro ±0,5 Log UI/ml: 26 UI/ml.

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0,0089 Log UI/ml) e accurati (imprecisione = 0,0794 Log UI/ml) entro ±0,5 Log UI/ml: 25.000.001 UI/ml.

L'intervallo di misurazione lineare inteso come copie/ml per campioni di plasma raccolti in EDTA è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione (2,4 UI/copia).

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma ed ELITE InGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
26 UI/ml	25.000.001 UI/ml
11 copie/ml	10.416.667 copie/ml

**Nota Bene:** Le prestazioni del prodotto in associazione alle matrici plasma EDTA, plasma ACD e siero sono state dimostrate essere equivalenti.

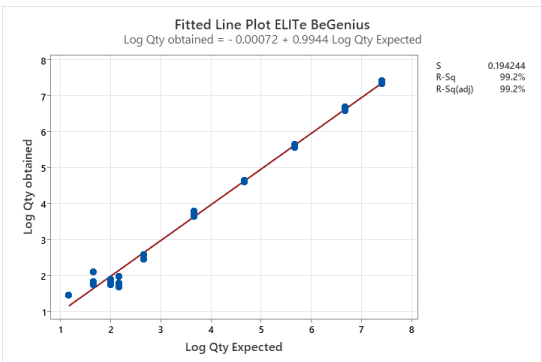
L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HCV ELITE MGB Kit è stato verificato in associazione con campioni di plasma e il sistema **ELITE BeGenius**.

A tal fine è stato utilizzato un pannello di diluizioni del materiale di riferimento HCV HCV (AcroMetrix™ HCV-S Panel AcroMetrix) in campioni di plasma HCV-negativi raccolti in ACD. Il pannello consiste in dieci punti di diluizioni da circa  $2,5 \times 10^7$  UI / mL a 15 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sul sistema **ELITE BeGenius**. L'analisi dei dati ottenuti, eseguita tramite regressione polinomiale e lineare, ha dimostrato che il saggio genera una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione (R2) pari a 0.992.

**HCV ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la Real Time PCR

REF RTK601ING

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione LoD che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0,3762 Log UI/mL) e accurati (inaccuratezza = 0,3583 Log UI/mL) entro ±0,5 Log UI/mL: 26 UI/mL.

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0,0405 Log UI/mL) e accurati (inaccuratezza = 0.0064 Log UI/mL) entro ±0,5 Log IU/mL:  $2,5 \times 10^7$  IU/mL.

L'intervallo di misurazione lineare inteso come copie/mL per campioni di plasma raccolti in ACD è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione (2,4 UI/copia).

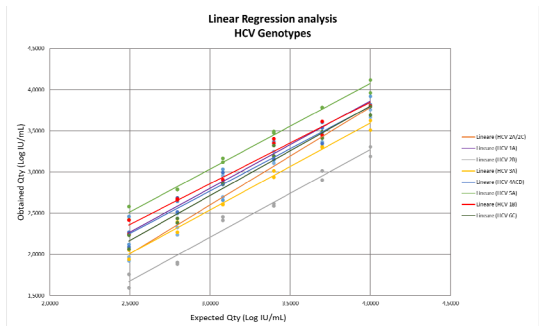
I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma ed ELITE BeGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
26 UI/ml	25.000.001 UI/ml
11 copie/ml	10.416.667 copie/ml

**Nota Bene:** Le prestazioni del prodotto in associazione alle matrici plasma EDTA, plasma ACD e siero sono state dimostrate essere equivalenti.

La linearità di quantificazione del saggio è stata verificata mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolti in EDTA positivamente con materiale di riferimento per HCV (SeraCare) per i genotipi principali di HCV (1, 2, 3, 4, 5, 6). Ogni genotipo di HCV è stato analizzato in un pannello di 6 livelli di diluizione. Ogni livello di diluizione è stato processato in 2 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

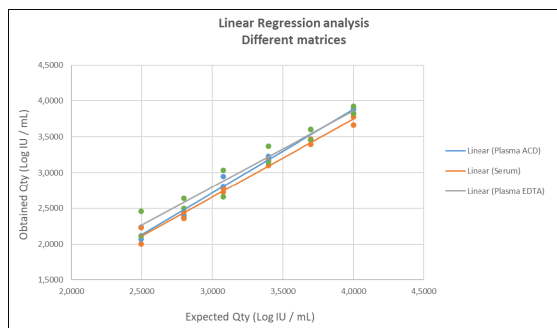
I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i genotipi principali di HCV (1, 2, 3, 4, 5, 6): il valore R2 è compreso tra 0,950 e 0,992 e i risultati quantitativi sono risultati compresi entro  $\pm 0,5$  Log UI/ml, ad eccezione del genotipo 2b di HCV che è stato sottostimato di circa 0,8 Log UI/ml rispetto al valore teorico. Tuttavia, questo campione è stato sottostimato anche da "cobas® HCV-1 for use on the 6800 Systems" (Roche Diagnostics).

La linearità è stata verificata mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolti in ACD e siero positivamente con materiale di riferimento omologato WHO per HCV (NIBSC). Ogni matrice è stata analizzata in un pannello di 6 livelli di diluizione. Ogni livello di diluizione è stato processato in 2 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR". Risultati corrispondenti dell'analisi con plasma raccolti in EDTA sono stati riportati a titolo di riferimento.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per campioni di plasma raccolti in ACD e di siero: il valore di R2 è stato, rispettivamente, di 0,9838 e 0,9870 e i risultati quantitativi entro  $\pm 0,5$  Log UI/ml.

**Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi**

L'efficienza della rilevazione per differenti genotipi di HCV è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi delle regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e della sonda nell'allineamento delle sequenze della regione 5' UTR dell'HCV disponibili nel database ha evidenziato una conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative nei genotipi di HCV (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Quindi si prevede che l'amplificazione e la rilevazione di tutti i genotipi di HCV saranno efficienti.

L'inclusività del saggio, intesa come efficienza di rilevazione e quantificazione rispetto a differenti genotipi, è stata verificata analizzando tre pannelli di materiale di riferimento:

- "AccuTrak HCV RNA Genotype Performance Panel" (Seracare), un pannello di 8 elementi di diversa raccolta di genotipi di HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6.
- HCV Genotype Evaluation Panel 01 (Qnostics).
- Non WHO Reference Material 4th HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC).

Ogni campione del pannello è stato diluito alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml) in campioni negativi di plasma raccolti in ACD e testato sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

AccuTrak HCV RNA Genotype Performance Panel				
Genotipo	Teorico UI/ml	Pos./Rep.	Ct media	UI/ml media
HCV 1°	78	3 / 3	37,16	74
HCV 1B	78	3 / 3	37,74	48
HCV 2A/2C	78	3 / 3	37,64	56
HCV 2B	78	3 / 3	38,14	36
HCV 3A	78	3 / 3	39,70	14

AccuTrak HCV RNA Genotype Performance Panel				
Genotipo	Teorico UI/ml	Pos./Rep.	Ct media	UI/ml media
HCV 4ACD	78	3 / 3	38,18	38
HCV 5A	78	3 / 3	37,20	67
HCV 6C	78	3 / 3	38,07	39

HCV Genotype Evaluation Panel				
Genotipo	Teorico UI/ml	Pos./Rep.	Ct media	UI/ml media
HCV 1a	78	3 / 3	36,22	133
HCV 1b	78	3 / 3	34,11	615
HCV 2b	78	3 / 3	38,24	33
HCV 3a	78	3 / 3	35,46	225
HCV 4a	78	3 / 3	36,09	144
HCV 5a	78	3 / 3	37,22	69
HCV 6a	78	3 / 3	37,56	56

Non WHO Reference Material 4th HCV RNA Genotype Panel				
Genotipo	Teorico UI/ml	Pos./Rep.	Ct media	UI/ml media
HCV 1a	78	3 / 3	38,27	40
HCV 1b	78	3 / 3	37,12	160
HCV 2i	78	3 / 3	38,01	71
HCV 3a	78	3 / 3	39,49	19
HCV 4r	78	3 / 3	40,08	18
HCV 5a	78	3 / 3	38,92	39
HCV 6l	78	2 / 3	38,24	8

Tutti i campioni dei tre pannelli sono stati rilevati correttamente. Nel materiale "Non WHO Reference Material 4th HCV RNA Genotype Panel" (NIBSC), uno su tre replicati del genotipo 6l dell'HCV non è stato rilevato. La maggior parte dei campioni è stata anche quantificata entro il titolo teorico  $\pm 0,5$  Log UI/ml (25-247 UI/ml) con l'ausilio del prodotto HCV ELITE MGB® Kit insieme allo strumento ELITE InGenius. Nel materiale "Non WHO Reference Material 4th HCV RNA Genotype Panel" (NIBSC), il genotipo 6l dell'HCV è stato anche sottostimato. Tuttavia, questo genotipo è stato rilevato e quantificato correttamente negli altri due pannelli.

**Marcatori potenzialmente interferenti: crossreattività**

La potenziale crossreattività con altri microrganismi che si possono rilevare nei campioni clinici di plasma e siero è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nel database dei nucleotidi.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e della sonda sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri microrganismi disponibili nel database. L'analisi delle regioni di ibridizzazione non ha evidenziato omologie significative con i microrganismi diversi da quello di interesse.

La mancata crossreattività con altri microrganismi che possono essere presenti nei campioni clinici di plasma e siero è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC) sono stati analizzati in concentrazione elevata (almeno 10<sup>6</sup> copie/reazione) su tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Al DNA o RNA genomico di ogni microrganismo sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	HCV Pos. / Rep.	Esito
HIV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HIV2	0 / 3	Nessuna crossreattività
HTLV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HTLV2	0 / 3	Nessuna crossreattività
CMV	0 / 3	Nessuna crossreattività
EBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HAV	0 / 3	Nessuna crossreattività



ID campione	HCV Pos. / Rep.	Esito
HBV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HEV	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HSV2	0 / 3	Nessuna crossreattività
HHV6	0 / 3	Nessuna crossreattività
VZV	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu A	0 / 3	Nessuna crossreattività
Flu B	0 / 3	Nessuna crossreattività
RSV	0 / 3	Nessuna crossreattività
ADV	0 / 3	Nessuna crossreattività
WNV	0 / 3	Nessuna crossreattività
DV3	0 / 3	Nessuna crossreattività
EV	0 / 3	Nessuna crossreattività
PVB19	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 3	Nessuna crossreattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna crossreattività per il target HCV quando analizzati con il prodotto HCV ELITe MGB® Kit.

**Marcatori potenzialmente interferenti: Interferenza**

La mancata interferenza con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC, Zeptomatrix) ad elevata concentrazione (almeno 10<sup>5</sup> copie/reazione) sono stati positivamente con materiale di riferimento per HCV RNA (6th WHO International Standard, NIBSC) a bassa concentrazione (circa 10 copie/reazione). I campioni sono stati analizzati su tre replicati in associazione con il sistema ELITe InGenius in modalità "PCR Only" (solo PCR). A ogni campione sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	HCV Pos. / Rep.	Esito
HIV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HIV2	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HTLV2	3 / 3	Nessuna interferenza
CMV	3 / 3	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	Nessuna interferenza
HAV	3 / 3	Nessuna interferenza
HBV	3 / 3	Nessuna interferenza
HEV	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HSV2	3 / 3	Nessuna interferenza
HHV6	3 / 3	Nessuna interferenza
VZV	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu A	3 / 3	Nessuna interferenza
Flu B	3 / 3	Nessuna interferenza
RSV	3 / 3	Nessuna interferenza
ADV	3 / 3	Nessuna interferenza
WNV	3 / 3	Nessuna interferenza
DV3	3 / 3	Nessuna interferenza
EV	3 / 3	Nessuna interferenza
PVB19	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 / 3	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	3 / 3	Nessuna interferenza

La presenza dei microrganismi potenzialmente interferenti analizzati non ha evidenziato alcuna inibizione dell'amplificazione del target HCV quando analizzati con il prodotto HCV ELITe MGB® Kit.

**Sostanze potenzialmente interferenti**

L'effetto di sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando il pannello "AcroMatrix® Inhibition Panel" (Thermo Fisher Scientific Inc.) contenente sostanze endogene, derivanti da emolisi, ittero e lipemia, e sostanze esogene, EDTA ed eparina.

I campioni del pannello di inibizione sono stati positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (6<sup>th</sup> WHO HCV International Standard, NIBSC) a concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml).

Inoltre, altre 7 sostanze potenzialmente interferenti sono state testate a concentrazioni significative: Ganciclovir, azitromicina, glecaprevir, ribavirina, sofosbuvir, pibrentasvir, velpatasvir.

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni di plasma negativi per HCV raccolti in n ACD e positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (NIBSC) a concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml).

I campioni sono stati processati in tre replicati sul sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR". I valori di Ct (campioni di riferimento e in test) del target HCV e il controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità percentuale (%CV) allo scopo di valutare la possibile interferenza.

I risultati sono illustrati nelle tabelle seguenti.

Campione	HCV Pos. / Rep.	Ct di HCV %CV	Ct di IC %CV	Esito
Bilirubina	3 / 3	1,12	0,91	Nessuna interferenza
Trigliceridi	3 / 3	2,20	0,83	Nessuna interferenza
Emoglobina	1 / 3	N.A.	10,80	Interferenza
Eparina	0 / 3	N.A.	7,68	Interferenza
EDTA	3 / 3	1,36	1,28	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	1,94	0,94	Nessuna interferenza
Azitromicina	3 / 3	2,22	1,69	Nessuna interferenza

Campione	HCV Pos. / Rep.	Ct di HCV %CV	Ct di IC %CV	Esito
Sofosbuvir	3 / 3	2,03	0,93	Nessuna interferenza
Pibrentasvir	3 / 3	2,81	0,92	Nessuna interferenza
Glecaprevir	3 / 3	2,00	1,09	Nessuna interferenza
Ribavirina	3 / 3	1,72	1,03	Nessuna interferenza
Velpatasvir	3 / 3	2,01	0,84	Nessuna interferenza
Riferimento	3 / 3	1,12	0,91	Nessuna interferenza

La maggior parte delle sostanze testate non interferisce con l'amplificazione di HCV o del controllo interno. Il coefficiente %CV dei valori di Ct è risultato inferiore al 2,5%.

È stato confermato che l'eparina e l'emoglobina in concentrazione elevata (3,4 – 4,6 g/dL) sono in grado di inibire l'amplificazione di HCV, ma grazie al limite di Ct per il controllo interno (Ct IC < 31), nella maggior parte dei casi i campioni risultano "non validi" e non "falsi negativi".

**Assenza di cross-contaminazione**

L'assenza di cross-contaminazione è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni di plasma negativi per HCV RNA sono stati alternati a campioni di plasma positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (ZeptoMatrix) in concentrazione di 1x10<sup>6</sup> UI/ml.

Cinque serie di campioni, alternando sei campioni positivi con sei campioni negativi, sono state testate con il sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo
Positivo	30	0	30
Negativo	30	30	0

Nessuno dei campioni negativi per HCV ha evidenziato falsi positivi. Non sono state rilevate cross-contaminazioni tra le sessioni, né al loro interno.

**HCV ELITe MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la Real Time PCR

REF RTK601ING

**Tasso globale di errore del sistema**

Il tasso globale di errore del sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato analizzando un pannello di campioni positivamente per HCV RNA a basso titolo.

100 differenti campioni di plasma raccolti in EDTA, 30 differenti campioni di plasma raccolti in ACD e 30 differenti campioni di siero, risultati negativi per HCV RNA, sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato HCV (WHO) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR" (estratto + PCR).  
I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo	UI/ml HCV media
Plasma raccolto in EDTA	100	0	100	55
Plasma raccolto in ACD	30	0	30	62
Siero	30	0	30	52

Nessuno dei campioni positivi per HCV ha evidenziato falsi negativi. In questo test, il tasso globale di errore del sistema è pari allo 0%.

Il tasso totale di errore di sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato in associazione a **ELITe BeGenius** analizzando un pannello di campioni positivamente con HCV RNA a basso titolo.

I 100 differenti campioni di plasma raccolti in EDTA, risultati negativi per HCV RNA, sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato di HCV (WHO) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITe BeGenius in modalità "Extract + PCR".  
I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo	Media HCV UI/mL
Plasma raccolto in EDTA positivamente con HCV	100	0	100	77

Nessuno dei campioni positivamente per HCV ha evidenziato falsi negativi. In questo test, il tasso globale di errore di sistema è pari allo 0%.

**Ripetibilità**

La ripetibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HCV ELITe MGB Kit in associazione con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello ha incluso un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento omologato per HCV (OMS) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml) e di 10 x LoD (circa 260 UI/ml).

La ripetibilità è stata ottenuta mediante analisi di campioni in quattro replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, in due giorni differenti. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Ripetibilità intra-sessione								
Campioni	HCV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	Indet.	-	-	24 / 24	28,41	0,36	1,27
3x LoD	8 / 8	38,02	0,83	2,19				
10x LoD	8 / 8	35,91	0,59	1,65				

Ripetibilità inter-sessione								
Campioni	HCV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	Indet.	-	-	48 / 48	28,47	0,38	1,33
3x LoD	16 / 16	37,89	0,84	2,21				
10x LoD	16 / 16	35,95	0,47	1,32				

**HCV ELITe MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la Real Time PCR

REF RTK601ING

Ripetibilità inter-lotto								
Campioni	HCV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 48	Indet.	-	-	144 / 144	28,52	0,46	1,61
3x LoD	48 / 48	38,25	0,36	0,95				
10x LoD	48 / 48	36,56	0,55	1,51				

Nel test di ripetibilità, il saggio ha rilevato il target HCV come previsto e ha mostrato un basso coefficiente di variabilità %CV dei valori di Ct che non ha superato l'2,19% per HCV e l'1,61% per il controllo interno.

La ripetibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HCV ELITe MGB Kit in associazione con il sistema **ELITe BeGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello comprende un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (6th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/mL) e di 10 x LoD (circa 260 UI/mL).

La ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni in otto replicati, in una sessione al giorno con lo stesso lotto di prodotto, in due giorni differenti. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema ELITe BeGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Ripetibilità intra-sessione con ELITe BeGenius								
Campioni	HCV				Controllo Interno			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	Undet.	-	-	24 / 24	28,09	0,28	0,99
3x LoD	8 / 8	37,65	0,50	1,33				
10x LoD	8 / 8	35,97	0,43	1,19				

Ripetibilità inter-sessione con ELITe BeGenius								
Campioni	HCV				Controllo Interno			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	Undet.	-	-	48 / 48	28,05	0,29	1,03
3x LoD	16 / 16	37,80	0,72	1,91				
10x LoD	16 / 16	35,93	0,47	1,30				

Nel test di ripetibilità con **ELITe BeGenius**, il saggio ha rilevato il target HCV come previsto e ha mostrato un coefficiente di variabilità %CV inferiore al 5% per HCV e per il controllo interno.

**Riproducibilità**

La riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HCV ELITe MGB Kit in associazione con il sistema **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello ha incluso un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per HCV (WHO) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/ml) e di 10 x LoD (circa 260 UI/ml).

La riproducibilità è stata ottenuta mediante analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in una sessione al giorno, in due giorni per sito. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati in tre siti differenti su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema ELITe InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Riproducibilità inter-sito								
Campione	HCV				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 24	Undet.	-	-	72 / 72	28,18	0,59	2,09
3x LoD	24 / 24	36,84	0,59	1,60				
10x LoD	24 / 24	34,94	0,42	1,20				

Nel test di riproducibilità, il saggio ha rilevato il target HCV come previsto e ha mostrato un basso coefficiente di variabilità %CV dei valori di Ct che non ha superato l'1,6% per HCV e l'2,09% per il controllo interno.

La Riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HCV ELITe MGB Kit in associazione con il sistema **ELITe BeGenius** è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di plasma. Il pannello comprende un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HCV (6th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 78 UI/mL) e di 10 x LoD (circa 260 UI/mL). La Riproducibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni per sito. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati in tre siti differenti su tre strumenti differenti e da tre operatori differenti. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità %CV allo scopo di valutare la Riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Riproducibilità inter-strumento con ELITe BeGenius								
Campione	HCV				Controllo Interno			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 24	Undet.	-	-	72 / 72	28.57	0.5529	1.94
3 x LoD	23 / 23	37.99	0.6797	1.79				
10 x LoD	24 / 24	36.54	0.6210	1.70				

Riproducibilità inter-lotto con ELITe BeGenius								
Campione	HCV				Controllo Interno			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negative	0 / 24	Undet.	-	-	72 / 72	28.43	0.41	1.45
3x LoD	24 / 24	37.95	0.75	1.97				
10x LoD	24 / 24	36.35	0.62	1.71				

Nella prova di riproducibilità con **ELITe BeGenius**, il saggio ha rilevato il target HCV secondo le previsioni e ha mostrato un coefficiente %CV dei valori di Ct inferiore al 5% per HCV e per il controllo interno.

#### Fattore di conversione in unità internazionali

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in unità internazionali/ml a partire da copie/ml è stato calcolato utilizzando un pannello di quattro diluizioni (0,5 Log tra diluizioni) del materiale di riferimento calibrato certificato "6th WHO HCV International Standard" (NIBSC) su campioni di plasma raccolti in EDTA negativi per HCV RNA.

Ogni punto del pannello è stato testato su 27 replicati utilizzando tre differenti lotti di prodotto su tre differenti strumenti in tre giorni differenti. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Estrazione + PCR".

Il fattore di conversione è stato calcolato mediante l'analisi della differenza di concentrazione logaritmica tra il titolo di riferimento in UI/ml e i risultati ottenuti in copie/ml, risultando pari a 2,4 UI/copia.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Fattore di conversione in unità internazionali, Fc = 2,4 UI/copia						
Campione (rif)			Risultato			Differenza log (rif. - test)
UI/ml	UI/ml log	N	C./ml media	UI/ml media	Log UI/ml media	
31623	4,5000	27	13233	31254	4,4807	+0,0193
10000	4,0000	27	4482	10595	4,0133	-0,0133
3162	3,5000	27	1414	3342	3,5091	-0,0091
1000	3,0000	27	439	1036	2,9969	+0,0031

Essendo stata dimostrata l'equivalenza tra i campioni di plasma raccolti in EDTA, quelli raccolti in ACD e siero (vedi Equivalenza delle matrici e Intervallo di misurazione lineare), il fattore di conversione può essere applicato alle tre matrici.

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in Unità Internazionali / mL (UI/mL) a partire da copie/mL è stato verificato sui sistemi **ELITe BeGenius** ed **ELITe InGenius** utilizzando un pannello di cinque diluizioni (0,5 Log tra diluizioni) del materiale di riferimento calibrato certificato "6th WHO International Standard", NIBSC, su campioni di plasma raccolti in EDTA risultato negativo per HCV RNA.

Il pannello includeva quattro punti di diluizione da circa 4,5 Log UI/mL a 2,5 Log UI/mL. Ogni punto del pannello è stato testato in 4 replicati.

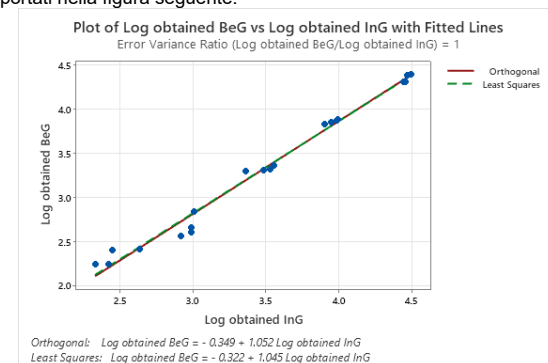
La precisione di quantificazione del target, come deviazione standard del log UI/ml, era inferiore a 0,5 log.

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e misurate in Log UI/ml, era inferiore a 0,5 Log.

Questi risultati hanno confermato il Fattore di conversione calcolato per Plasma con **ELITe InGenius**.

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 - 0,3494 (95% CI: - 0,5546; - 0,1442) e un'intercetta di 1,0523 (95% CI: 0,9943; 1,1103). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,985.

#### Riproducibilità con il materiale di riferimento

La riproducibilità dei risultati del saggio rispetto ai risultati ottenuti utilizzando altri metodi in differenti laboratori è stata verificata analizzando il proficiency panel "QCMD 2020 Hepatitis C Virus RNA EQA Programme" (Qnostics).

Ogni punto del pannello è stato testato sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Estrazione + PCR".

I valori relativi alla quantità indicati dal consensus di sistemi di amplificazione real time in commercio sono stati confrontati con i risultati del saggio al fine di valutare l'accuratezza come imprecisione.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

QCMD 2020 HCV panel		Risultati del consensus	Risultati del test	Differenza (cons. - test)
ID campione	Contenuto del campione	Log UI/ml	Log UI/ml	
HCVRNA101S-01	HCV genotipo 3a	3,3040	3,5794	-0,2754
HCVRNA101S-02	HCV genotipo 3a	2,3130	2,2375	0,0755
HCVRNA101S-03	HCV genotipo 1b	2,8600	3,0532	-0,1932
HCVRNA101S-04	HCV genotipo 1b	2,8370	2,7850	0,0520
HCVRNA101S-05	HCV negativo	non rilevato	non rilevato	N.A.
HCVRNA101S-06	HCV genotipo 1b	3,8500	3,8352	0,0148
HCVRNA101S-07	HCV genotipo 1b	3,3730	3,4432	-0,0702
HCVRNA101S-08	HCV genotipo 1b	1,7880	1,6812	0,1068

In quest'analisi, il saggio ha rilevato correttamente tutti i componenti del pannello. I sette campioni positivi sono stati quantificati nei limiti dell'intervallo del consensus di  $\pm 0,5$  Log UI/ml.

#### Sensibilità diagnostica: correlazione metodologica

La sensibilità diagnostica del saggio, intesa come correlazione dei risultati ottenuti con metodi differenti, è stata valutata in associazione con **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici di pazienti HCV RNA-positivi sottoposti a terapia antivirale e nei limiti del range di misurazione del prodotto HCV ELITe MBG Kit e di un metodo di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD ("cobas® HCV for use on the 4800 Systems" e "cobas® HCV for use on the 6800 Systems", Roche Diagnostics, Cobas HCV).

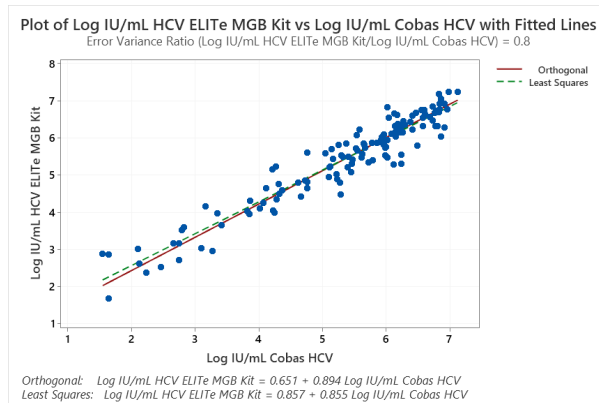
Essendo che il sistema **ELITe BeGenius** ha prestazioni analitiche equivalenti al sistema **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio sui due strumenti sono considerate equivalenti. Di conseguenza la sensibilità diagnostica del saggio su **ELITe InGenius** è considerata valida anche su **ELITe BeGenius**.

Lo studio di correlazione è stato eseguito in due siti differenti sui seguenti 128 campioni di plasma raccolti in EDTA:

- sito 1: 96 campioni clinici HCV RNA-positivi di plasma raccolto in EDTA,
- sito 2: 32 campioni clinici HCV RNA-positivi di plasma raccolto in EDTA,

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati mediante impiego di prodotti di ELITechGroup S.p.A. e di metodi di riferimento. I risultati ottenuti con il prodotto HCV ELITe MBG Kit e con i metodi di riferimento sono stati sottoposti ad analisi di regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



In questo test, l'analisi di regressione di ortogonale ha generato una pendenza pari a 0,894 (CI 95%: 0,846-0,941) e un'intercetta pari a 0,651 (CI 95%: 0,391 – 0,911). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,916.

#### Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, intesa come percentuale di concordanza della negatività dei risultati ottenuti con metodi differenti, è stata valutata in associazione con **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici HCV RNA-negativi testati con un metodo di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD ("cobas® HCV for use on the 4800 Systems" e "cobas® HCV for use on the 6800 Systems", Roche Diagnostics, Cobas HCV).

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**.

Lo studio di specificità diagnostica è stato eseguito in due siti differenti sui seguenti 135 campioni di plasma raccolti in EDTA:

- sito 1: 100 campioni clinici HCV RNA-negativi di plasma raccolti in EDTA,
- sito 2: 35 campioni clinici HCV RNA-negativi di plasma raccolto in EDTA.

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati mediante impiego di prodotti di ELITechGroup S.p.A. I risultati ottenuti con il prodotto HCV ELITe MBG Kit sono stati analizzati allo scopo di calcolare la percentuale di accordo negativo rispetto ai metodi di riferimento.

I risultati, dopo l'analisi discrepante, sono riepilogati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivo	Negativo	Non valido	Specificità diagnostica
Campioni HCV RNA-negativi di plasma raccolto in provette con EDTA	135	0	135	0	100%

In questo test, tutti i campioni si sono confermati negativi. La specificità diagnostica del prodotto HCV ELITe MBG Kit è stata pari al 100%.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 31.

**Nota:** I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati al cap. 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto" di "HCV ELITe MGB Kit", FTP 601ING.

#### BIBLIOGRAFIA

- P. Halfon et al. (2006) *J Clin Microbiology* **44**: 2507 – 2511  
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA o ACD e siero.

Il plasma raccolto in EDTA o ACD e il siero si possono ottenere dal sangue intero conservato a +2/+25 °C per un massimo di 24 ore.

Non utilizzare questo prodotto con plasma raccolto in provette contenenti eparina, perché l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

Non utilizzare questo prodotto con plasma emolizzato, perché l'emoglobina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

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

Questo prodotto non deve essere utilizzato come test di screening per la presenza di HCV nel sangue o negli emoderivati né come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HCV.

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

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

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

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

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

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

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela di reazione completa e dell'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falso-positivi.

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA non è stato rilevato nel RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (vedi "Caratteristiche delle Prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi a causa di un problema di amplificazione del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi, inserimenti o rimozioni nella regione del RNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del RNA target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e di altri esami di laboratorio cui il paziente è stato sottoposto.

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

**RISOLUZIONE DEI PROBLEMI**

<b>Reazione non valida con Q-PCR standard o con il controllo positivo</b>	
<b>Curva standard non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
errore di impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, di Q-PCR Standard e del controllo positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, di Q-PCR standard e del controllo positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi sub-componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nell'"Inventory Area"). Non lasciare la RT EnzymMix a temperatura più alte di -20 °C più di 10 minuti. Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota dei sub-componenti.
Degradazione di Q-PCR standard o del controllo positivo.	Non utilizzare il Q-PCR standard per più di 2 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione). Non utilizzare il controllo positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR standard o di controllo positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..












<b>Reazione non valida del controllo negativo</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
errore di impostazione della sessione	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del controllo negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del controllo negativo.
Contaminazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti secondari	Preparare di nuovo la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione del controllo negativo.	Non utilizzare il controllo negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e degli inventory block.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Reazione non valida del campione	
Possibili cause	Soluzioni
errore di impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del campione.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei sub-componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nell'Inventory Area). Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare il sub-componente RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei sub-componenti.
Degradazione del Controllo Interno.	Usare una nuova aliquota of Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione una diluendo il campione estratto 1:2 in acqua per biologia molecolare impostando la sessione in modalità "PCR Only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Estrazione + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - selezionare la traccia relativa al campione e approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione diluendo il campione estratto 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" oppure - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Estrazione + PCR".

TH Error, SDM Error, Ct Error	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione che genera errore: - ripetere la reazione di amplificazione diluendo il campione estratto 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" oppure - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Estrazione + PCR"

**LEGENDA DEI SIMBOLI**

	Codice articolo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> .
	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98\79\CE relativa ai dispositivi medici diagnostici <i>in vitro</i> . Certificazione rilasciata da DEKRA Certification B.V., Paesi Bassi.
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.

**AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA**

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

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 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 da brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

La tecnologia ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® è coperta da brevetti o è oggetto di domande di brevetto.

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

TaqMan™ è un marchio registrato di Thermo Fisher Scientific.  
cobas® è un marchio registrato di Roche Diagnostics.  
ELITe MGB®, il logo ELITe MGB®, ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione



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

## Intended use

The “HCV ELITe MGB® Kit” product is quantitative nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and the quantification of the RNA of Hepatitis C Virus (HCV) in RNA samples extracted from clinical specimens.

The assay is able to detect the RNA of HCV belonging to 1, 2, 3, 4, 5 and 6 genotypes.

The assay is validated in association with “ELITe InGenius®” and “ELITe BeGenius®” system starting from human plasma collected in EDTA or in ACD and serum samples.

The product is intended for use as an aid in the management of HCV-infected individuals undergoing antiviral therapy, together with patient’s clinical data and other laboratory test results.

This product is not intended for use as a screening test for the presence of HCV in blood or blood products or as a diagnostic test to confirm the presence of HCV infection.

## Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HCV (5' UTR region)	FAM	HCV
Internal Control	MS2 phage	AP525	IC






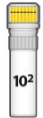


## Validated matrix

› Plasma EDTA

› Plasma ACD

› Serum

## Kit content

HCV ELITe MGB Mix		HCV ELITe Standard				HCV - ELITe Positive Control	HCV Internal Control
 X 4	 X 2				 X 1	 X 2	 X 8
HCV PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT Enzyme Mix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Calibrators: 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>2</sup> 1 set of 4 tubes of 160 µL 2 freeze-thaw cycles				Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use IC 8 tubes of 160 µL 96 extractions per kit 12 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **18 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

## Material required not provided in the kit

- › ELITe InGenius instrument: INT030
- › ELITe InGenius SP 1000 Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S
- › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118

## ELITe InGenius protocol

› Sample volume	600 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HCV CPE volume	10 µL	› Conversion factor to IU	2.4 IU/copy
› Total elution volume	50 µL	› Frequency of controls	15 days
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days
› HCV PCR Mix volume	20 µL		

## Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma / Serum	<b>26 IU / mL</b> 11 copies / mL	<b>R<sup>2</sup> = 0.916</b> 128 quantified samples	<b>100%</b> 135 confirmed samples / 135 tested samples

reference methods:

“cobas® HCV for use on the 4800 Systems” and

“cobas® HCV for use on the 6800 Systems”, Roche Diagnostics.

## Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA or ACD and Serum samples must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) for a maximum of three days or at +2 / +8 °C for a maximum of five days. Otherwise, they must be frozen and stored at ~-20 °C for a maximum of one month or at ~-70 °C for six months. Do not use Plasma collected in heparin in order to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

## ELITE InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse transcription, 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. Log in with username and password. Select the mode "Closed".</p> | <p>2. Verify calibrators: <b>HCV Q-PCR Standard</b> in the "Calibration" menu. Verify controls: <b>HCV Positive Control</b> and <b>HCV Negative Control</b> in the "Controls" menu.<br/><i>Note: Both must have been run, approved and not expired.</i></p> | <p>3. Thaw the <b>HCV PCR Mix</b> and the <b>HCV CPE</b> tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the <b>RT EnzymeMix</b> in ice</p> |
|--|---|---|

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

5. Vortex gently Spin down 5 sec Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

- |   |  |  |
|---|--|--|
| <p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p>  | <p>2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", elution: "50 µL"</p>          | <p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p>       |
| <p>4. Select the "Assay protocol" of interest: HCV ELITE_PL_600_50 or HCV ELITE_Se_600_50</p>         | <p>5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube</p> | <p>6. Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block</p> |
| <p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube 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 method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"</p> | <p>6. Load the complete reaction mixture in the inventory block</p> |
| <p>7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid</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 method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube</p> | <p>6. Load the Internal Control in the inventory block</p> |
| <p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks</p> | <p>8. Close the door Start the run</p>   | <p>9. Archive the eluate sample</p>                        |



## ELITE BeGenius Procedures

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

- |  |   |  |
|--|---|--|
| <b>1.</b> Switch on ELITE InGenius.<br>Log in with username and password.<br>Select the mode "Closed". | <b>2.</b> Verify calibrators: <b>HCV Q-PCR Standard</b> in the "Calibration" menu.<br>Verify controls: <b>HCV Positive Control</b> and <b>HCV Negative Control</b> in the "Controls" menu.<br><i>Note:</i> Both must have been run, approved and not expired. | <b>3.</b> Thaw the <b>HCV PCR Mix</b> and the <b>HCV CPE</b> tubes.<br>Vortex gently.<br>Spin down 5 sec.<br>Keep the <b>RT EnzymeMix</b> in ice |
|--|---|--|

#### 4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0.3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0.3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 $\mu\text{L}$	4.4 $\mu\text{L}$

- 5.** Vortex gently  
Spin down 5 sec  
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Note: For more than 12 samples:

- prepare a first 2 mL tube with the complete reaction mixture for 12 samples;
- prepare a second 2 mL tube with the complete reaction mixture by calculating the volumes of the two sub-components on the basis of the number of samples remaining (N-12).

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

- |   |   |  |
|---|---|--|
| <b>1.</b> Select "Perform Run" on the touch screen  | <b>2.</b> Verify the extraction volumes:<br>Input: "600 $\mu\text{L}$ ", elution: "50 $\mu\text{L}$ " | <b>3.</b> Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID       |
| <b>4.</b> Select the "Assay protocol" of interest: HCV ELITE_Be_PL_600_50 or HCV ELITE_Be_Se_600_50   | <b>5.</b> Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube                  | <b>6.</b> Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block |
| <b>7.</b> Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run   | <b>9.</b> View, approve and store the results  |

### Procedure 2 - PCR only

- |   |   |   |
|---|---|---|
| <b>1 to 4:</b> Follow the Complete Run procedure described above                            | <b>5.</b> Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube" | <b>6.</b> Load the complete reaction mixture in the inventory block |
| <b>7.</b> Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run   | <b>9.</b> View, approve and store the results                       |

### Procedure 3 - Extraction only

- |   |  |  |
|---|--|--|
| <b>1 to 4:</b> Follow the Complete Run procedure described above                        | <b>5.</b> Select the method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube | <b>6.</b> Load the Internal Control in the inventory block |
| <b>7.</b> Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks | <b>8.</b> Close the door<br>Start the run  | <b>9.</b> Archive the eluate sample                        |