



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 07/06/2024

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«HIV1 ELITe MGB Kit» Ref. RTK600ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Altri prodotti richiesti: nota riguardo la disponibilità di HIV1 ELITe Standard (REF STD600ING) e HIV1 - ELITe Positive Control (REF CTR600ING) 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



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



ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

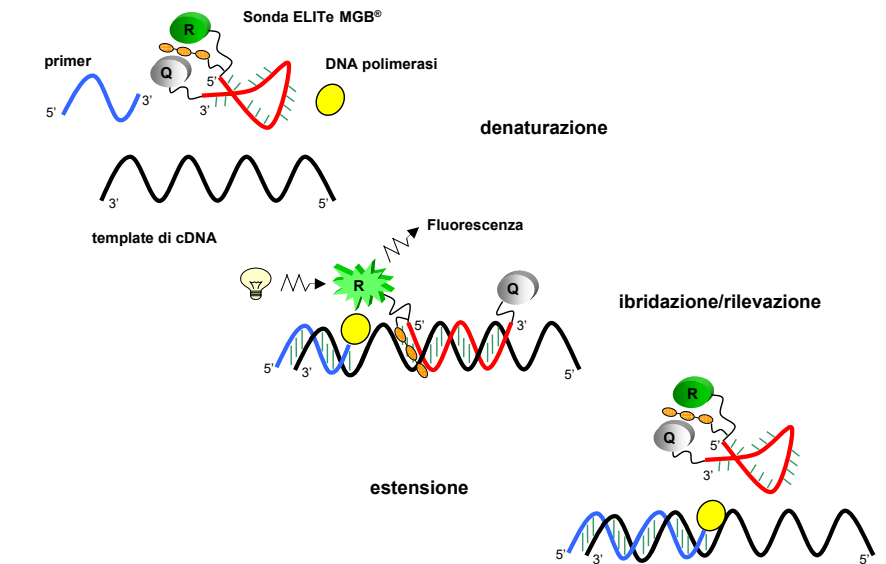
PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di trascrizione inversa e amplificazione real time (metodica one step) eseguita con **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, 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 di reazione completa **HIV1 PCR Mix** esegue una reazione di trascrizione inversa e amplificazione specifica per il gene codificante la polimerasi (regione dell'integrasi) dell'HIV1 e per una regione dell'RNA genomico di fago MS2 (controllo interno esogeno di estrazione e inibizione).

Le sonde specifiche per l'HIV1, basate sulla tecnologia **ELITe MGB®** e **TaqMan™ MGB®**, marcate con il fluoroforo FAM, sono attivate quando ibridano con lo specifico prodotto della reazione di amplificazione dell'HIV1. La sonda specifica per il controllo interno, basata sulla tecnologia **ELITe MGB®** e marcata con il fluoroforo AP525, è attivata quando ibrida 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'HIV1 RNA presente nel campione.

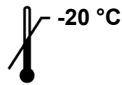
La figura seguente illustra in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda che applica la tecnologia **ELITe MGB®**.



HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for the reverse transcription of RNA and
for real time amplification of cDNA

REF RTK600ING

CE IVD
0344



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. 5
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. 17
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITe InGenius e ELITe BeGenius	pag. 22
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. 43
ANNEX	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto «**HIV1 ELITe MGB® Kit**» è un saggio quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione dell'RNA** del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (**HIV1**) su campioni di RNA estratti da campioni clinici.

Il saggio è in grado di rilevare l'RNA dell'HIV1 appartenente ai gruppi M (sottotipi A, B, C, D, F, G, H, J, K, L), O e N, come pure ai principali sottotipi di CRF CRF01-AE, CRF02-AG e CRF03-AB.

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

Il prodotto trova impiego come ausilio nella gestione di individui HIV1-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 HIV1 nel sangue o nei suoi derivati o come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HIV1.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **HIV1 ELITe MGB® Kit** fornisce i seguenti componenti:

• **HIV1 ELITe MGB® Mix**

Questo componente fornisce i seguenti due componenti secondari:

- **"HIV1 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**.

I primer e le sonde per l'HIV1 (stabilizzate dal gruppo MGB®, marcate con il fluoroforo FAM e inattivate dal quencher non fluorescente Eclipse) sono specifici per il gene codificante la polimerasi (regione dell'integrasi) dell'HIV1. Il segnale emesso dall'HIV1 è rilevato dal canale 1 (HIV1) di **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

I 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.

• **HIV1 ELITe Standard**

Questo componente fornisce i sub-componenti **"HIV1 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 una regione di gene codificante la polimerasi dell'HIV1. La rilevazione dell'HIV1 DNA a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HIV1 ELITe MGB Mix** in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consente di calcolare la curva standard del sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HIV1.

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 Standard4th HIV-1 International Standard" (NIBSC, UK, codice 16/194) con l'ausilio di un fattore di conversione al fine di poter esprimere la concentrazione in unità internazionali/mL (IU/mL).

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

• **HIV1 - ELITe Positive Control**

Questo componente fornisce il sub-componente **"HIV1 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 una regione di gene codificante la polimerasi dell'HIV1. La rilevazione e quantificazione del DNA target a seguito dell'analisi eseguita con il prodotto **HIV1 ELITe MGB Mix** in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consentono di validare il sistema (lotto del prodotto e strumento) per la quantificazione dell'HIV1.

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

• **HIV1 Internal Control**

Questo componente fornisce il sub-componente **"HIV1 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 **HIV1 ELITe MGB Mix** in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** consente di validare i risultati dei campioni HIV1-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
HIV1 ELITe MGB Mix rif. RTS600ING	HIV1 PCR Mix rif. RTS600ING	miscela di reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time con tappo BIANCO	4 x 600 µL	-
	RT EnzymeMix rif. RTS003-RT	Enzimi per trascrittasi inversa in provetta con tappo con NERO	2 x 20 µL	-
HIV1 ELITe Standard rif. STD600ING	HIV1 Q-PCR Standard 10 ⁵ rif. STD600ING-5	soluzione di plasmide in provetta con tappo ROSSO	1 x 160 µL	-
	HIV1 Q-PCR Standard 10 ⁴ rif. STD600ING-4	soluzione di plasmide in provetta con tappo BLU	1 x 160 µL	
	HIV1 Q-PCR Standard 10 ³ rif. STD600ING-3	soluzione di plasmide in provetta con tappo VERDE	1 x 160 µL	
	HIV1 Q-PCR Standard 10 ² rif. STD600ING-2	soluzione di plasmide in provetta con tappo GIALLO	1 x 160 µL	
HIV1 - ELITe Positive Control rif. CTR600ING	HIV1 Positive Control rif. CTR600ING	Soluzione di plasmide in provetta con tappo NERO	2 x 160 µL	-
HIV1 Internal Control rif. CPE600ING	HIV1 CPE rif. CPE600ING	Soluzione di DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2 in provetta con tappo NEUTRO	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** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030) e dei seguenti Assay Protocol specifici (EG SpA):

- parametri per l'amplificazione per i calibratori «**HIV1 ELITe_STD**»,
- parametri per l'amplificazione per il controllo positivo «**HIV1 ELITe_PC**»,
- parametri per l'amplificazione per il controllo negativo «**HIV1 ELITe_NC**»,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare «**HIV1 ELITe_PL_600_50**».

Con lo strumento **ELITe InGenius** 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),
- contenitori «**ELITe InGenius® Waste Box**» (EG SpA, cod. F2102-000).

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

- parametri per l'amplificazione dei calibratori «**HIV1 ELITe_Be_STD**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo positivo «**HIV1 ELITe_Be_PC**»,
- parametri per l'amplificazione del controllo negativo «**HIV1 ELITe_Be_NC**»,
- parametri per i campioni di plasma da analizzare «**HIV1 ELITe_Be_PL_600_50**»,

Con lo strumento **ELITe BeGenius** è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- cartucce di 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 «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118),
- 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: **HIV1 ELITe Standard**, rif. STD600ING, e **HIV1 ELITe Positive Control**, rif. CTR600ING.

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% o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

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

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.

Manipolare 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

• HIV1 ELITe MGB Mix

La **HIV1 PCR Mix** deve essere conservata al buio a temperatura inferiore a -20 °C.

La **HIV1 PCR Mix** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

La **HIV1 PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **cinque volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

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

La **RT EnzymeMix** deve essere utilizzata entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

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

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

• HIV1 ELITe Standard

Gli **HIV1 Q-PCR Standard** devono essere conservati a temperatura inferiore a -20 °C.

Gli **HIV1 Q-PCR Standard** devono essere utilizzati entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

Gli **HIV1 Q-PCR Standard** possono essere congelati e scongelati per un massimo di **due volte** perché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe compromettere il titolo.

Gli **HIV1 Q-PCR Standard** possono essere lasciati on board nell'area di estrazione dell'**ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** per un massimo di **due sessioni di lavoro indipendenti da due ore ciascuna** (modalità "PCR Only").

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

- **HIV1 - ELITe Positive Control**

L'**HIV1 Positive Control** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

L'**HIV1 Positive Control** deve essere utilizzato entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

L'**HIV1 Positive Control** può essere congelato e scongelato per un massimo di **quattro volte** perché un maggior numero di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

L'**HIV1 Positive Control** può essere lasciato on board nell'area di estrazione dell'**ELITe InGenius e ELITe BeGenius** per un massimo di **quattro sessioni di lavoro indipendenti da tre ore ciascuna** (modalità "Extraction + PCR Only").

- **HIV1 Internal Control**

L'**HIV1 CPE** deve essere conservato a temperatura inferiore a -20 °C.

L'**HIV1 CPE** deve essere utilizzato entro 60 giorni dalla prima apertura del tubo.

L'**HIV1 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.

L'**HIV1 CPE** può essere lasciato on board nel blocco refrigerato nell'Area Reagenti dell'**ELITe InGenius e ELITe BeGenius** 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 il protocollo analitico **HIV1 ELITe_PL_600_50**. Questo protocollo processa 600 µL di campione, partendo dal tubo secondario, aggiunge 10 µL dell'**HIV1 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.

Altri campioni

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

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.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

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 **HIV1 ELITe Standard** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HIV1 ELITe STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HIV1 - ELITe Positive Control** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HIV1 ELITe_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit) in associazione con il l'Assay Protocol **HIV1 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, scadranno 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, scadranno 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,
- quando i risultati delle analisi dei controlli di qualità (vedi 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 certificato. 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 **HIV1 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 del sistema

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 (**HIV1 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 (**HIV1 Positive Control**, **HIV1 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 (GIU) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da ELITechGroup S.p.A. Questi protocolli IVD sono stati specificamente validati con il kit **ELITe MGB**, lo strumento **ELITe InGenius** e la matrice citata.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

Gli Assay Protocols disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** sono descritti nella tabella sottostante:

Protocollo analitico per il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit e ELITe InGenius			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
HIV1 ELITe_PL_600_50	Plasma	Positivo/ copie/mL/ IU/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

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 **HIV1 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe InGenius** per eseguire:

- A. Sessione integrata (Estrazione + PCR),
- B. Sessione di amplificazione (PCR only),
- C. Sessione di calibrazione (PCR only),
- D. 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 "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

1. Scongellare per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti **HIV1 PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **24 test**. Mescolare con vortex le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

Nota: Scongellare la miscela **HIV1 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. 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.

3. 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.
4. 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)	HIV1 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. Preparare la **miscela di reazione completa** aggiungendo all'apposita provetta da 2 mL i volumi calcolati dei due componenti.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

6. Mescolare con vortex 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 GIU:

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". Ricordare che per l'analisi sono necessari 600 µL di campione.
2. Scongellare le provette di **HIV1 CPE** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
4. Verificare che il volume di ingresso in estrazione sia di 1000 µL (anche se si useranno 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" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (es. HIV1 ELITe_PL_600_50).
7. Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
8. Nella colonna "Sample Position" selezionare "Extraction tube" come posizione da cui caricare il campione. Fare clic su "Next" 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.
9. Caricare la **miscela di reazione completa** e **HIV1 CPE** nel "Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 PCR Mix** e **HIV1 CPE**. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le **PCR Cassette**, le cartucce per estrazione **ELITe InGenius SP 1000**, tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" 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", tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

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

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

1. Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
2. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume di ingresso in estrazione sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume di eluato estratto sia di 50 µL.
4. Per ogni "Track" d'interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre.
5. Nella colonna "Assay" selezionare l'Assay Protocol da utilizzare (es. HIV1 ELITe_PL_600_50).
6. Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only" (solo PCR).
7. Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
8. Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 PCR Mix**. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Caricare le **PCR Cassette** e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" 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, come anche di stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere il campione estratto residuo presente nell'"Elution Tube", tapparlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

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 GIU:

1. Scongelare le provette **HIV1 Q-PCR Standard** (Cal1: HIV1 Q-PCR Standard 10², Cal2: HIV1 Q-PCR Standard 10³, Cal3: HIV1 Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: HIV1 Q-PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 2 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
2. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
3. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume di ingresso in estrazione sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume di eluato estratto sia di 50 µL.
4. All'interno del "Track" d'interesse, nella colonna "Assay", selezionare l'Assay Protocol "HIV1 ELITe_STD" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 Q-PCR Standard**. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.

5. Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 PCR Mix**. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
6. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
7. Caricare le **PCR Cassette** e le provette **HIV1 Q-PCR Standard** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire.
8. Chiudere lo sportello dello strumento.
9. Premere "Start" 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 **HIV1 Q-PCR Standard** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C.

Nota: Il prodotto **HIV1 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 **PCR Cassette** contenenti i prodotti di amplificazione e altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di amplificazione.

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 con il controllo positivo e il controllo negativo procedere come segue, come risulta dalla GIU:

1. Scongelare la provetta di **HIV1 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.
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".
4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume di estrazione in ingresso sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume di eluzione estratto sia di 50 µL.
5. Nella colonna "Assay", all'interno della traccia d'interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare.
6. Per il **Controllo Positivo**, selezionare nella colonna "Assay" l'Assay Protocol "HIV1 ELITe_PC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 Positive Control**.
7. Per il **Controllo Negativo**, selezionare nella colonna "Assay" "HIV1 ELITe_NC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
8. Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **HIV1 PCR Mix**. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell'"Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Caricare le **PCR Cassette**, la provetta per il **HIV1 Positive Control** e per il **Controllo Negativo** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GIU. Fare clic su "Next" per proseguire.

11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" per avviare la sessione.

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

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il componente **HIV1 Positive Control** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C. Smaltire il **Controllo Negativo** residuo.

Nota: Il sub-componente **HIV1 Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna.

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

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

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", 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 **HIV1 ELITE MGB Kit** tramite la seguente procedura:

- A. Validazione della curva di 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.

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per HIV1 (canale "HIV1") nelle reazioni di amplificazione dei calibratori sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "**HIV1 ELITE STD**".

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

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

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

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 HIV1 (canale "HIV1") 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 Protocols "**HIV1 ELITE_PC**" e "**HIV1 ELITE_NC**".

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

I risultati relativi all'amplificazione per controllo positivo e negativo, specifici per il lotto del reagente, 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 "Control Charts". A tal fine sono richiesti quattro risultati per il controllo positivo e il controllo negativo da quattro sessioni differenti. A questo punto, i risultati per il controllo positivo e il controllo negativo vengono utilizzati per monitorare le prestazioni della 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" appare il messaggio "Failed" 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 HIV1 (canale "HIV1") e dalla sonda del controllo Interno (canale "I/C") nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "**HIV1 ELITE_PL_600_50**".

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

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

1) Curva di calibrazione	Status
HIV1 Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Status
HIV1 Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Status
HIV1 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
HIV1: RNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie / mL o IU / mL.	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità indicata.
HIV1: RNA Rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" copie / mL or IU / mL	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
HIV1: RNA Rilevato, quantità oltre a "ULoQ" copie / mL o IU / mL.	L' HIV1 RNA è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
HIV1: RNA Non rilevato o inferiore a "LoD" copie / m o IU / mL.	L' HIV1 RNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per l'HIV1 RNA oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	Risultato del saggio non valido 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 questo caso l'RNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di amplificazione o estrazione (degradazione o perdita di RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare di risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato "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 ritestato partendo dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR".

I campioni segnalati come "HIV1 RNA non rilevato o inferiore a LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare l'RNA di HIV1. In questo caso non si può escludere che l'RNA di HIV1 sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione del saggio (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per l'RNA di HIV1 ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione, quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "HIV1: RNA Rilevato, quantità inferiore a LLoQ" (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

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 GIU. 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 (~+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 sei mesi.

Si raccomanda di suddividere 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 **HIV1 ELITE_Be_PL_600_50**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge 10 µL per ogni estrazione di **HIV1 CPE** (controllo interno) ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL.

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.

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 risultati non validi.

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare qualunque campione, è 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 **HIV1 ELITE Standard** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HIV1 ELITE_Be_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **HIV1 - ELITE Positive Control** in dotazione con questo kit, in associazione con l'Assay Protocol **HIV1 ELITE_Be_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non in dotazione con questo kit) in associazione con il con l'Assay Protocol **HIV1 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, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere il test con il prodotto Q-PCR Standard in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadranno dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, sarà necessario ripetere i controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione.

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

- quando si inizia un nuovo lotto di reagenti,
- quando i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi 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 certificato. 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 **HIV1 ELITe MGB Kit** con il sistema **ELITe BeGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto,
- Allestimento della sessione,
- Lettura ed esportazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere lo strumento ELITe InGenius e selezionare la modalità "CLOSED",
- verificare che i controlli (**HIV1 Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i calibratori non sono approvati o validi, processarli come descritto nei paragrafi seguenti.
- verificare che i controlli di amplificazione (**HIV1 Positive Control**, **HIV1 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i controlli di amplificazione non sono approvati o validi, 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 Protocols 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 Protocols disponibili per analizzare i campioni con il prodotto **HIV1 ELITe MGB Kit** sono descritti nella tabella sottostante:

Assay Protocol per il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
HIV1 ELITe_Be_PL_600_50	Plasma	Positivi / UI/mL / copie/mL / Negativi	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

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 **HIV1 ELITe MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITe BeGenius** per eseguire:

- A. Sessione integrata (Extract + PCR),
- B. Sessione di amplificazione (PCR only),
- C. Sessione di calibrazione (PCR only),
- D. 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 BeGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

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

1. Scongellare per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti **HIV1 PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **24 test**. Mescolare con vortex le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

Nota: Scongellare la miscela **HIV1 PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. 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.

3. 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.

4. 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)	HIV1 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. 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).

6. Mescolare con vortex 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 Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User Interface (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". Ricordare che per l'analisi sono necessari 600 µL di campione.
2. Scongellare le provette di **HIV1 CPE** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.

5. Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".
6. Caricare i campioni nella cooling area partendo dal rack L5.
7. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

Nota Bene: se un tubo secondario è utilizzato selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha il barcode, digitare manualmente il Sample ID.

8. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia di 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
9. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio i.e. HIV1 ELITE_Be_PL_600_50). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Se deve essere effettuata una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 6 a 9 utilizzando il rack L4.
11. Caricare i tubi di eluizione barcodati nella cooling area partendo dal rack L3.

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

12. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Ripetere i passaggi 11 e 12 utilizzando il rack L2.
14. Caricare il CPE e la **miscela di reazione** nella cooling area.
15. Inserire il rack L1 nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
16. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
17. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
18. Caricare il rack per estrazione con le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" e tutti i consumabili richiesti, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
19. Chiudere lo sportello dello strumento.
20. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota: Alla fine della sessione il campione estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota: La **miscela di reazione** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di RNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
 1. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
 2. Rimuovere i rack 1, 2, e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
 3. Selezionare il "run mode": "PCR Only".

4. Caricare i campioni nella cooling area partendo dal rack L3.
5. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
6. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
7. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio HIV1 ELITE_Be_PL_600_50).
8. Caricare la **miscela di reazione** nella cooling area.
9. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

Nota: Alla fine della corsa il campione rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

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

Nota: La **miscela di reazione** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

Per impostare la corsa di calibrazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare le provette **HIV1 Q-PCR Standard** (Cal1: HIV1 Q-PCR Standard 10², Cal2: HIV1 Q-PCR Standard 10³, Cal3: HIV1 Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: HIV1 Q-PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 2 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack L3.
6. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
8. Selezionare l'Assay Protocol "HIV1 ELITE_Be_STD" da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare la **miscela di reazione** nella cooling area.
10. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

12. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

Nota: La **miscela di reazione** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

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

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

1. Scongelare le provette di **HIV1 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.
2. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
6. Caricare i controlli nella cooling area nel rack L3.
7. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 600 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 50 µL.
9. Selezionare l'Assay Protocol "HIV1 ELITe_Be_PC" per il Positive Control e "HIV1 ELITe_Be_NC" per il Negative Control da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare la **miscela di reazione** nella cooling area.
11. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Chiudere lo sportello dello strumento.
15. Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

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

Nota: La **miscela di reazione** può essere utilizzata per 7 sessioni di lavoro indipendenti da 3 ore ciascuna o può essere conservata nella Cooler Unit per un massimo di 3 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / calibratore / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report").

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

ELITe BeGenius genera i risultati con **HBV ELITe MGB Kit** attraverso questa procedura:

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

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit 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 HIV1 raccolto in ACD, positivamente con un materiale di riferimento certificato per HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da 100 IU/mL fino a 6 IU/mL. Ogni livello di diluizione è stato testato in 24 replicati sul sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR". Il LoD è stato calcolato mediante analisi di regressione Probit dei dati come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione (IU/mL) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HIV1	60	40	122

Il LoD inteso come copie/mL per campioni di plasma raccolti in ACD è stato calcolato applicando lo specifico fattore di conversione indicato (2,3 IU/copia). Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie/mL.

Limite di rilevazione (copie/mL) per campioni di plasma raccolto in ACD ed ELITe InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
HIV1	26	17	53

Il valore calcolato di LoD è stato verificato analizzando 30 replicati di plasma raccolti in ACD e 30 replicati di plasma raccolti in EDTA positivamente con materiale di riferimento certificato per HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il LoD è confermato se almeno 27 replicati su 30 risultano positivi come da linee guida del CLSI standard EP17-A.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Verifica del limite di rilevazione (LoD) per plasma ed ELITe InGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in ACD	60 IU/mL	HIV1	30	29	1
Plasma raccolto in EDTA	60 IU/mL	HIV1	30	28	2

Il valore di LoD per il target HIV1 è stato confermato come 60 IU/mL per plasma raccolto in ACD e EDTA.

Il valore di LoD calcolato per Plasma raccolto in EDTA e Plasma raccolto in ACD è stato verificato in associazione a **ELITe BeGenius** testando 30 replicati di campioni di Plasma raccolto in ACD e 30 replicati di Plasma raccolto in EDTA, positivamente utilizzando il materiale di riferimento certificato HIV1 (4th WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata. Il valore di LoD è confermato se almeno 27 repliche su 30 danno un risultato positivo secondo la linea guida CLSI EP17-A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione per campioni di plasma ed ELITe BeGenius					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma raccolto in ACD	60 UI / mL	HIV1	30	30	0
Plasma raccolto in EDTA	60 UI / mL	HIV1	30	27	3

Il valore LoD per il target HIV1 è stato confermato a 60 IU / mL per Plasma raccolto in EDTA e Plasma raccolto in ACD in associazione con **ELITe BeGenius**.

Equivalenza delle matrici: Plasma raccolto in EDTA e Plasma raccolto in ACD

L'equivalenza a livello di prestazioni del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit è stata verificata utilizzando campioni di plasma raccolti in ACD e campioni di plasma raccolti in EDTA in associazione con il sistema ELITe InGenius.

Un test è stato condotto su 30 campioni di plasma in EDTA e 30 campioni di plasma in ACD (provenienti dagli stessi donatori), testati negativi per HIV1 mediante un saggio immunoenzimatico CE IVD. I campioni sono stati analizzati su sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR". È stata valutata la percentuale di concordanza della 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	Positivi	Negativi	Concordanza %	%CV Ct IC	%CV totale Ct IC
Plasma raccolto in EDTA	30	1	29	96,7%	1,80	1,81
Plasma raccolto in ACD	30	0	30		1,81	

Il campione di plasma risultato positivo ha evidenziato un titolo molto basso (inferiore a 60 IU/mL) compatibile con la mancata identificazione al saggio immunoenzimatico CE IVD utilizzato per certificarne la negatività.

Un test è stato condotto su 30 campioni di plasma raccolti in EDTA e 30 campioni di plasma raccolti in ACD (provenienti dagli stessi donatori), testati negativi per l'HIV1 mediante un saggio immunoenzimatico CE IVD e positivamente con un materiale di riferimento certificato (4th WHO HIV1 International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL). I campioni sono stati analizzati su sistema ELITe InGenius in modalità "Extract + PCR". È stata valutata la percentuale di concordanza della positività. Il coefficiente di variabilità, espresso in percentuale (%CV) dei valori di Ct del target HIV1, è stato calcolato per valutare l'equivalenza delle due matrici.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	N	Positivi	Negativi	Concordanza%	%CV Ct HIV1	%CV totale Ct HIV1	Inaccuratezza Log IU/mL
Plasma raccolto in EDTA	30	30	0	100%	1,81	1,53	0,0744
Plasma raccolto in ACD	30	30	0		1,18		

In queste analisi, 30 campioni appaiati di plasma raccolti in EDTA e in ACD hanno evidenziato prestazioni equivalenti quando processati con il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit 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.

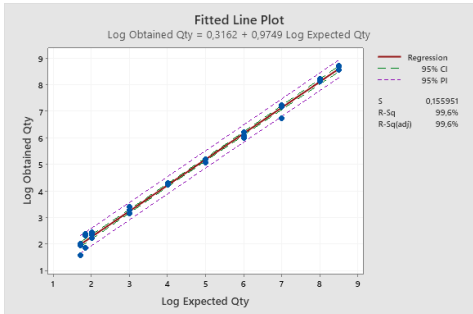
Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit è stato determinato in associazione con campioni di plasma e con i sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

A tal fine è stato utilizzato un pannello di diluizioni del materiale di riferimento HIV1 gruppo M sottotipo B (ZeptoMetrix) in campioni di plasma HIV1-negativi raccolti in EDTA. Il pannello consiste in dieci punti di diluizioni da circa 3.2 x 10⁸ IU / mL a 50 IU / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sui sistemi ELITe InGenius ed **ELITe BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

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

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 = 0,3049 Log IU/mL) e accurati (inaccuratezza = 0,0759 Log IU/mL) entro ±0,5 Log IU/mL: 60 IU/mL.

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0,0816 Log IU/mL) e accurati (inaccuratezza = 0,1459 Log IU/mL) entro ±0,5 Log IU/mL: 319.290.322 IU/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 (2,3 IU/copia).

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma EDTA ed ELITe InGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
60 IU/mL	319.290.322 IU/mL
26 copie/mL	138.821.879 copie/mL

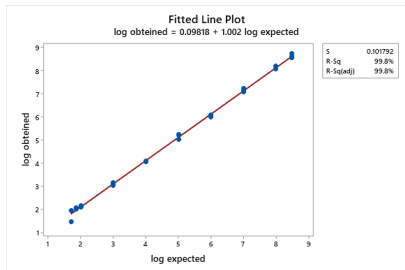
HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit è stato determinato 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 HIV1 gruppo M sottotipo B (ZeptoMetrix) in campioni di plasma HIV1-negativi raccolti in ACD. Il pannello consiste in dieci punti di diluizioni da circa 3.2×10^9 IU / mL a 50 IU / 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 0.998 con **ELITe BeGenius**.

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 = 0,3410 Log IU/mL) e accurati (inaccuratezza = 0.0107 Log IU/mL) entro $\pm 0,5$ Log IU/mL: 60 IU/mL.

Il limite superiore di quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (deviazione standard = 0.0891 Log IU/mL) e accurati (inaccuratezza = -0.1258 Log IU/mL) entro $\pm 0,5$ Log IU/mL: 319.290.322 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 (2,3 IU/copia).

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

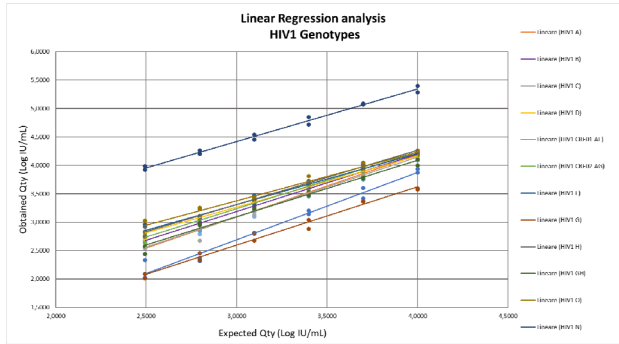
Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma ACD ed ELITe BeGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
60 IU/mL	319.290.322 IU/mL
26 copie/mL	138.821.879 copie/mL

La linearità della quantificazione è stata verificata mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolti in EDTA positivamente con materiale di riferimento per HIV1 (pannello di sottotipi di HIV-1, Istituto di Virologia, Ospedale Universitario di Erlangen) per i genotipi principali di HIV1 (gruppo M sottotipo A, C, D, CRF01-AE, F, G, GH, H, CRF02-AG, gruppo O e gruppo N). Ogni genotipo di HIV1 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".

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

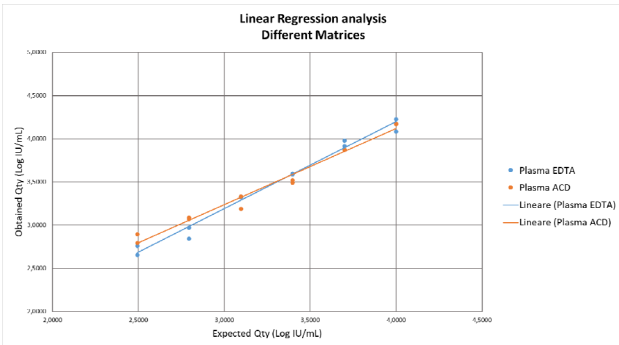
I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità della quantificazione del the saggio è stata confermata per i genotipi principali di HIV1 (gruppo M sottotipo A, C, D, CRF01-AE, F, G, GH, H, CRF02-AG, gruppo O e gruppo N): il valore R2 è compreso tra 0,972 e 0,999 e i risultati quantitativi sono risultati compresi entro $\pm 0,5$ Log IU/mL, ad eccezione del gruppo N di HIV1 che è stato sovrastimato di circa 1,5 Log IU/mL rispetto al valore teorico. Tuttavia, questo campione è stato sovrastimato anche da "cobas® HIV-1 for use on the 6800 Systems" (Roche Diagnostics).

La linearità della quantificazione è stata verificata mediante analisi di campioni negativi di plasma raccolti in EDTA e in ACD positivamente con materiale di riferimento HIV1 gruppo M sottotipo B (Zeptomatrix). Ogni matrice è stata analizzata in un pannello di 6 livelli di diluizione. Ogni livello di diluizione è stato testato in 2 replicati sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Estrazione + PCR". I risultati corrispondenti al test con plasma raccolto in EDTA sono stati riportati a titolo di riferimento.

I risultati sono illustrati nella figura seguente.



La linearità del saggio è stata confermata per i campioni di plasma raccolti in EDTA e in ACD: il valore di R2 è stato, rispettivamente, di 0,984 e 0,980 e i risultati quantitativi entro $\pm 0,5$ Log IU/mL.

Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'efficienza della rilevazione per differenti genotipi di HIV1 è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi delle regioni scelte per l'ibridazione dei primer e della sonda nell'allineamento delle sequenze del gene codificante la polimerasi (regione dell'integrasi) disponibili nel database ha evidenziato una sufficiente conservazione delle sequenze nei genotipi di HIV1 di gruppo M (sottotipo A, B, C, D, F, G, H, J, K, L), O, N, P e sottotipi CRF CRF01-AE, CRF02-AG, CRF03-AB. Quindi si prevede un'efficiente amplificazione e rilevazione dei differenti genotipi di HIV1.

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

- "1st WHO International Reference Preparation for HIV-1 CRF's", (NIBSC, codice: 13/214) includente gruppo O, CRF 11 GJ, CRF02-AG, CRF01-AE, CRF01 A, G, J, U, CRF BG 24, sottotipo J, sottotipo C, sottotipo G e CRF ADG,
- "HIV-1 Subtype Panel" (Istituto di Virologia, Ospedale Universitario di Erlangen), un pannello di 20 elementi di diverse collezioni di HIV1 di gruppo M sottotipo A, B, C, D, CRF01-AE, F, G, H e GH, CRF02-AG, gruppo O e gruppo N.

Ogni campione del pannello è stato diluito alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/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.

1st WHO International Reference Preparation for HIV-1 CRF's					
Sottotipo/gruppo	Ceppo	Teorico IU/mL	Pos./Rep.	Ct media	IU/mL media
Gruppo O	BCF01	180	3 / 3	31,92	2.808
CRF11 GJ	MP1307	180	3 / 3	34,60	478
CRF02-AG	P1261	180	3 / 3	35,34	299
CRF01-AE	CM244	180	3 / 3	36,48	142
CRF01 A,G,J,U	96CM1849	180	3 / 3	37,15	90
CRF BG 24	X2456	180	3 / 3	36,69	123
Sottotipo J	SE9173	180	3 / 3	35,91	210
Sottotipo C	X1936	180	3 / 3	36,01	199
Sottotipo G	P962	180	3 / 3	35,08	344
CRF ADG	24203	180	3 / 3	34,67	461

Pannello sottotipo HIV-1 di Erlangen					
ID campione	Ceppo	Teorico IU/mL	Pos./Rep.	Ct media	IU/mL media
HIV1 A1	92UG029	180	3/3	35,27	345
HIV1 A2	00KE_KER2018	180	3/3	34,62	506
HIV1 B1	92TH026	180	3/3	35,27	311
HIV1 B2	90TH_BK132	180	3/3	34,77	452
HIV1 C1	92BR025	180	3/3	35,01	372
HIV1 C2	99ET_14	180	3/3	34,74	466
HIV1 D1	92UG021	180	3/3	35,53	265
HIV1 D2	92UG035	180	3/3	34,12	683
HIV1 D3	92UG024	180	3/3	34,50	531
HIV1 E1	92TH022	180	3/3	36,28	166
HIV1 F1	93BR029	180	3/3	35,44	282
HIV1 F2	93BR020	180	3/3	35,58	251
HIV1 G	RU570	180	3/3	36,96	109
HIV1 H	VI525	180	3/3	35,11	361
HIV1 GH	VI557	180	3/3	35,17	336
HIV1 AG1	01CM.0005BBY	180	3/3	36,23	176
HIV1 AG2	01CM.0008BBY	180	3/3	34,74	451
HIV1 N	YBF30	180	3/3	30,60	7.694
HIV1 O1	MVP5180	180	3/3	34,47	555
HIV1 O2	CA-9	180	3/3	31,34	4.615

Tutti i campioni sono stati rilevati e quantificati correttamente entro il titolo teorico $\pm 0,5$ Log IU/mL (57 – 569 IU/mL) con il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit in associazione con lo strumento **ELITe InGenius** tranne per quattro campioni che sono stati sovrastimati. In particolare, HIV1 gruppo N e O sono stati sovrastimati più di 1 Log IU/mL rispetto al valore teorico. Tuttavia, questi campioni sono stati sovrastimati anche da "cobas® HIV-1 for use on the 6800 Systems" (Roche Diagnostics).

Marcatori potenzialmente interferenti: crossreattività

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

Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e della sonda sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri microrganismi disponibili nel database. L'analisi delle regioni di ibridazione non ha evidenziato omologie significative con la maggior parte dei microrganismi diversi da quello di interesse, a eccezione di HIV2, il microrganismo più simile ad HIV1, che ha un'omologia pari a circa l'80%.

La mancata crossreattività con altri microrganismi che possono essere presenti nei campioni clinici di plasma 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, Zeptomatrix) sono stati analizzati in concentrazione elevata (almeno 10⁵ 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	HIV1 Pos./Rep.	Esito
HIV2	3 / 3	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
HIV1	0 / 3	Nessuna crossreattività
HCV	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 HIV1 quando analizzati con il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit, eccetto HIV2 che può dare risultati positivi con una quantificazione 2.000 volte inferiore al titolo teorico di HIV2.

Marcatori potenzialmente interferenti: Interferenza

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

I campioni di DNA o RNA genomico di altri organismi potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC, ZeptoMatrix) sono stati positivamente ad elevata concentrazione (almeno 10⁵ copie/reazione) in associazione con RNA genomico dell'HIV1 (PEI) a bassa concentrazione (circa 20 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	HIV1 Pos./Rep.	Esito
HIV2	3 / 3	No 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
HIV1	3 / 3	Nessuna interferenza
HCV	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 testati non ha evidenziato alcuna inibizione dell'amplificazione del target HIV1 utilizzando il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit.

Nota: Sebbene non inibisca la rilevazione di HIV1, la presenza di HIV2 può causare l'over-quantificazione di HIV1 in campioni provenienti da individui con doppia infezione da HIV1 e HIV2 a causa della crossreattività di HIV2.

Sostanze potenzialmente interferenti

L'effetto di sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando il pannello "AcroMetrix® 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 HIV1 (PEI) a concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL).

Inoltre, altre 14 sostanze potenzialmente interferenti sono state testate a concentrazioni significative: ganciclovir, azitromicina, abacavir, emtricitabina, lamivudina, tenofovir, doravirina, efavirenz, rilpivirina, atazanavir, darunavir, bicitegravir, elvitegravir, maraviroc.

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente ai campioni negativi per HIV1 di plasma raccolti in ACD positivamente con materiale di riferimento certificato di HIV1 (PEI) a concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL).

I campioni sono stati testati in tre replicati sul sistema **ELITe InGenius** in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct (campioni di riferimento e in test) del target HIV1 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	HIV1 Pos./Rep.	Ct HIV1 %CV	Ct IC %CV	Esito
EDTA	3 / 3	1,91	0,96	Nessuna interferenza
Eparina	0 / 3	N.A.	10,82	Interferenza
Sangue molto emolitico	3 / 3	0,99	1,35	Nessuna interferenza
Plasma lipemico	3 / 3	0,94	0,44	Nessuna interferenza
Plasma itterico	3 / 3	1,10	2,44	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	0,80	0,32	Nessuna interferenza
Azitromicina	3 / 3	0,92	0,41	Nessuna interferenza
Abacavir	3 / 3	1,61	0,53	Nessuna interferenza
Emtricitabina	3 / 3	1,06	0,65	Nessuna interferenza
Lamivudina	3 / 3	1,61	0,47	Nessuna interferenza
Tenofovir	3 / 3	0,84	0,92	Nessuna interferenza
Doravirina	3 / 3	1,03	0,59	Nessuna interferenza
Efavirenz	3 / 3	1,70	1,12	Nessuna interferenza
Rilpivirina	3 / 3	1,11	0,39	Nessuna interferenza
Atazanavir	3 / 3	0,87	0,73	Nessuna interferenza
Darunavir	3 / 3	1,53	0,91	Nessuna interferenza
Bicitegravir	3 / 3	1,09	0,42	Nessuna interferenza
Elvitegravir	3 / 3	1,23	0,63	Nessuna interferenza
Maraviroc	3 / 3	1,68	0,78	Nessuna interferenza

La maggior parte delle sostanze testate non interferisce con l'amplificazione del target HIV1 o del controllo interno. Il coefficiente %CV dei valori di Ct è risultato inferiore al 2,5%.

È stato confermato che l'eparina è in grado di inibire l'amplificazione di HIV1, ma grazie al limite di Ct per il controllo interno (Ct IC < 33), i campioni risultano "non validi" e non "falsi negativi".

Assenza di crosscontaminazione

L'assenza di crosscontaminazione è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni di plasma negativi per HIV1 RNA sono stati alternati a campioni di plasma positivamente con materiale di riferimento certificato di HIV1 (ZeptoMetrix) ad una concentrazione di 1x10⁶ IU/mL.

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo
Plasma raccolto in ACD positivamente a 1x10 ⁶ HIV1 IU/mL	30	0	30
Plasma raccolto in ACD negativo per HIV1	30	30	0

Nessuno dei campioni negativi per HIV1 ha evidenziato falsi positivi. Non sono state rilevate crosscontaminazioni tra le sessioni, né al loro interno.

Tasso totale di errore di sistema

Il tasso globale di errore di sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato analizzando un pannello di campioni positivamente con HIV1 RNA a basso titolo.

I 100 differenti campioni di plasma raccolti in EDTA e i 30 campioni appaiati di plasma raccolti in ACD, risultati negativi per HIV1 RNA, sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato di HIV1 (PEI) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL). I campioni sono stati analizzati su sistema **ELITe InGenius** in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo	IU/mL HIV1 media
Plasma raccolto in EDTA positivamente con HIV1	100	0	100	247
Plasma raccolto in ACD positivamente con HIV1	30	0	30	196

Nessuno dei campioni positivamente per HIV1 ha evidenziato falsi negativi. In questo test, il tasso globale di errore di sistema è pari allo 0%.

HIV1 ELITE MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

Il tasso totale di errore di sistema, con risultati falsi negativi, è stato verificato in associazione a **ELITE BeGenius** analizzando un pannello di campioni positivizzati con HIV1 RNA a basso titolo.

I 100 differenti campioni di plasma raccolti in EDTA, risultati negativi per HIV1 RNA, sono stati positivizzati con un materiale di riferimento certificato di HIV1 (PEI) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/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	IU/mL HIV1 media
Plasma raccolto in EDTA positivizzato con HIV1	100	0	100	294

Nessuno dei campioni positivizzati per HIV1 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 HIV1 ELITE MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITE InGenius e 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 HIV1 (PEI) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL) e di 10 x LoD (circa 600 IU/mL).

La ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei 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 caricati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITE InGenius** 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 InGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	Indet.	-	-	24 / 24	29,38	0,30	1,01
3x LoD	8 / 8	34,91	0,34	0,99				
10x LoD	8 / 8	33,08	0,24	0,73				

Ripetibilità inter-sessione con ELITE InGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	Indet.	-	-	48 / 48	29,40	0,27	0,91
3x LoD	16 / 16	35,00	0,37	1,07				
10x LoD	16 / 16	33,13	0,21	0,63				

Nel test di ripetibilità con **ELITE InGenius**, il saggio ha rilevato il target HIV1 come previsto e ha mostrato un basso coefficiente di variabilità %CV dei valori di Ct che non ha superato l'1,2% per HIV1 e l'1,3% per il controllo interno.

La ripetibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HIV1 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 HIV1 (4th WHO HIV1 International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL) e di 10 x LoD (circa 600 IU/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.

HIV1 ELITE MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Ripetibilità intra-sessione con ELITE BeGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	Indet.	-	-	24 / 24	29,71	0,40	1,34
3x LoD	8 / 8	35,90	0,72	2,02				
10x LoD	8 / 8	33,94	0,62	1,83				

Ripetibilità inter-sessione con ELITE BeGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	Indet.	-	-	48 / 48	29,78	0,32	1,06
3x LoD	16 / 16	35,99	0,59	1,64				
10x LoD	16 / 16	34,11	0,51	1,49				

Nel test di ripetibilità con **ELITE BeGenius**, il saggio ha rilevato il target HIV1 come previsto e ha mostrato un coefficiente di variabilità %CV inferiore al 5% per HIV1 e per il controllo interno.

Riproducibilità

La Riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HIV1 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 comprende un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per HIV1 (PEI) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL) e di 10 x LoD (circa 600 IU/mL).

La Riproducibilità è stata ottenuta mediante l'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 "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-sito con ELITE InGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 24	Indet.	-	-	72 / 72	29,51	0,40	1,36
3x LoD	24 / 24	35,01	0,66	1,88				
10x LoD	24 / 24	33,34	0,23	0,68				

Riproducibilità inter-lotto con ELITE InGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 48	Indet.	-	-	144 / 144	29,64	0,38	1,29
3x LoD	48 / 48	35,06	0,39	1,10				
10x LoD	48 / 48	33,31	0,32	0,97				

Nel test di riproducibilità con **ELITE InGenius**, il saggio ha rilevato il target HIV1 come previsto e ha mostrato un basso coefficiente %CV dei valori di Ct che non ha superato l'1,9% per HIV1 e l'1,4% per il controllo interno.

La Riproducibilità dei risultati ottenuti mediante il prodotto HIV1 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 HIV1 (4th WHO HIV1 International Standard, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 180 IU/mL) e di 10 x LoD (circa 600 IU/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	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	72 / 72	29,97	0,74	2,47
3 x LoD	24 / 24	35,86	0,59	1,65				
10 x LoD	24 / 24	34,12	0,41	1,19				

Riproducibilità inter-lotto con ELITE BeGenius								
Campione	HIV1				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 48	Indet.	-	-	144 / 144	29,92	0,56	1,87
3x LoD	48 / 48	35,79	0,67	1,87				
10x LoD	48 / 48	34,06	0,3.	0,98				

Nella prova di riproducibilità con **ELITE BeGenius**, il saggio ha rilevato il target HIV1 secondo le previsioni e ha mostrato un coefficiente %CV dei valori di Ct inferiore al 5% per HIV1 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 "4th WHO HIV1 International Standard" (NIBSC) su campioni di plasma raccolti in EDTA negativi per HIV1 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 processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITE InGenius** in modalità "Extract + PCR".

Il fattore di conversione è stato calcolato mediante l'analisi della differenza di concentrazione logaritmica tra il titolo di riferimento in IU/mL e i risultati ottenuti in copie/mL, risultando pari a 2,3 IU/copia.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Fattore di conversione in Unità Internazionali, Fc = 2,3 IU/copia						
Campione di riferimento			Risultato			Differenza Log (rif. - test)
IU/mL	IU/mL log	N	C./mL media	IU/mL media	Log IU/mL media	
10.000	4,0000	27	4.052	9.320	3,9623	+0,0377
3.162	3,5000	26	1.379	3.172	3,4913	+0,0087
1.000	3,0000	27	500	1.149	3,0494	-0,0494
316	2,5000	27	156	359	2,5366	-0,0366

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

Il fattore di conversione per esprimere i risultati quantitativi in Unità Internazionali / 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 "4th WHO HIV1 International Standard" (NIBSC) su campioni di plasma raccolti in EDTA risultato negativo per HIV1 RNA.

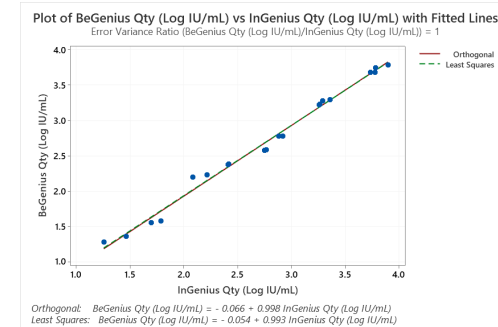
Il pannello includeva quattro punti di diluizione da circa 4,0 Log IU / mL a 1,9 Log IU / mL. Ogni punto del pannello è stato testato in 4 replicati.

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

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e misurate in Log IU/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 0,998 (95% IC: 0,953; 1,042.) e un intercetta di -0,666 (95% IC: - 0,194; 0,061). La regressione lineare ha generato un R2 di 0,991.

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 2018 Human Immunodeficiency Virus RNA EQA Programme" (Qnostics).

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

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Pannello QCMD 2018 HIV1		Consensus	Risultati del test	Differenza Log (rif. - test)
ID campione	Contenuto del campione	Log c/mL	Log c/mL	
HIV1RNA18S-01	HIV1-negativo	n.a.	n.a.	n.a.
HIV1RNA18S-02	HIV1 tipo B	3,777	3,920	-0,143
HIV1RNA18S-03	HIV1 tipo B	3,767	3,908	-0,141
HIV1RNA18S-04	HIV1 tipo B	2,315	2,449	-0,134
HIV1RNA18S-05	HIV1 tipo AG	2,987	3,466	-0,479
HIV1RNA18S-06	HIV1 tipo C	2,345	2,316	+0,029
HIV1RNA18S-07	HIV1 tipo C	3,357	3,307	+0,050
HIV1RNA18S-08	HIV1 tipo C	2,330	2,140	+0,190

In questo test, il saggio ha rilevato correttamente tutti i componenti del pannello. I sette campioni positivi sono stati quantificati nei limiti dell'intervallo del consensus (sistemi di amplificazione real time in commercio) ± 0,5 Log IU/mL.

La riproducibilità dei risultati del saggio è stata verificata anche testando il pannello "HIV-1 RNA EDTA AccuSet™ Performance Panel" (SeraCare).

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

Il valore di quantificazione di riferimento dei campioni ottenuto con "COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test" (Roche Diagnostics) e "Abbott m2000 RealTime HIV-1 Assay" (Abbott), forniti da SeraCare, è stato confrontato con i risultati del saggio allo scopo di valutare l'accuratezza come inaccuratezza.

I risultati sono illustrati nelle tabelle seguenti.

Pannello HIV1 di SeraCare		Risultati ottenuti con COBAS Roche	Risultati del test	Differenza (rif. - test)
ID campione	Batch	Log c/mL	Log c/mL	
SeraCare_01	10047508	2,7482	3,1209	-0,3727
SeraCare_02	10056461	n.a.	n.a.	n.a.
SeraCare_03	10047514	2,2405	2,2068	+0,0337
SeraCare_04	10047519	4,3546	4,2142	+0,1405
SeraCare_05	10044233	3,0799	3,0881	-0,0082
SeraCare_06	10056463	3,2601	3,5190	-0,2590
SeraCare_07	10047518	4,5548	4,8794	-0,3246
SeraCare_08	10047515	4,1651	4,0840	+0,0810
Pannello HIV1 di SeraCare		Risultati ottenuti con m2000 Abbott	Risultati del test	Differenza (rif. - test)
ID campione	Batch	Log c/mL	Log c/mL	
SeraCare_09	10047517	4,5124	4,6529	-0,1405
SeraCare_10	10047520	4,8556	4,8175	+0,0382
SeraCare_11	10057462	4,1700	4,1761	-0,0061
SeraCare_12	10057427	n.a.	n.a.	n.a.
SeraCare_01	10047508	3,0934	3,1209	-0,0275
SeraCare_02	10056461	n.a.	n.a.	n.a.
SeraCare_03	10047514	2,1038	2,2068	-0,1030
SeraCare_04	10047519	4,3077	4,2142	+0,0935
SeraCare_05	10044233	3,1232	3,0881	+0,0351
SeraCare_06	10056463	3,5190	3,5190	+0,0000
SeraCare_07	10047518	4,5339	4,8794	-0,3456
SeraCare_08	10047515	4,2273	4,0840	+0,1433
SeraCare_09	10047517	4,7333	4,6529	+0,0804
SeraCare_10	10047520	4,7928	4,8175	-0,0247
SeraCare_11	10057462	4,0934	4,1761	-0,0826
SeraCare_12	10057427	n.a.	n.a.	n.a.

In questo test, il saggio ha rilevato correttamente tutti i componenti del pannello. I dieci campioni positivi sono stati quantificati nei limiti dell'intervallo del valore di riferimento (sistemi di amplificazione real time in commercio) ± 0.5 Log IU/mL.

Sensibilità diagnostica: correlazione metodologica

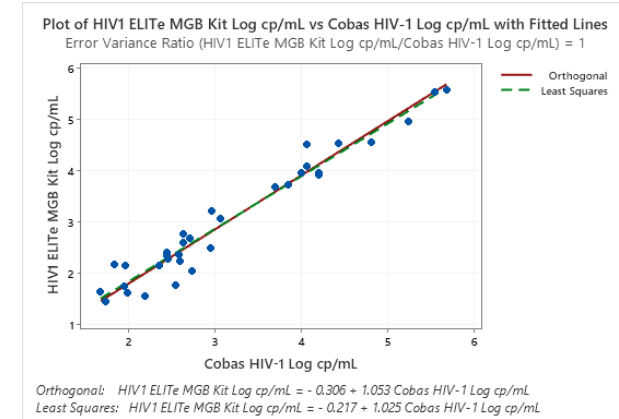
La sensibilità diagnostica del saggio, intesa come correlazione dei risultati ottenuti con metodi differenti, è stata valutata in associazione con **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici di pazienti HIV1 RNA-positivi sottoposti a terapia antivirale e nei limiti del range di misurazione del prodotto HIV1 ELITe MBG Kit, testati con due metodi di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD ("cobas HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics, Cobas HIV-1).

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 nel sito 1 su 33 campioni clinici HIV1 RNA-positivi di plasma raccolti in EDTA usando il metodo "cobas HIV-1 for use on the 6800 System" come riferimento.

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 del metodo di riferimento. I risultati ottenuti con il prodotto HIV1 ELITe MBG Kit e con il metodo 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 nella figura sottostante.



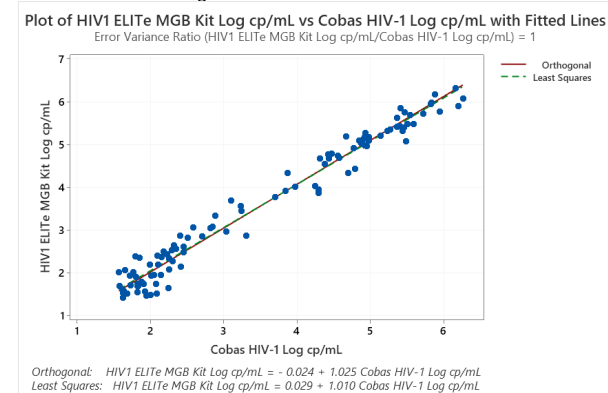
In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,053 (95% CI: 0,967; 1,138) e un'intercetta pari a -0,306 (95% CI: -0,591; 0,020). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,950.

Lo studio di correlazione è stato eseguito nel sito 2 e nel sito 3 sui seguenti 107 campioni di plasma raccolti in EDTA usando il metodo "cobas HIV-1 for use on the 4800 System" come riferimento:

- sito 2: 29 campioni clinici HIV1 RNA-positivi di plasma raccolti in EDTA,
- sito 3: 78 campioni clinici HIV1 RNA-positivi di plasma raccolti 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 del metodo di riferimento. I risultati ottenuti con il prodotto HIV1 ELITe MBG Kit e con il metodo di riferimento sono stati sottoposti ad analisi di regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione tra i metodi.

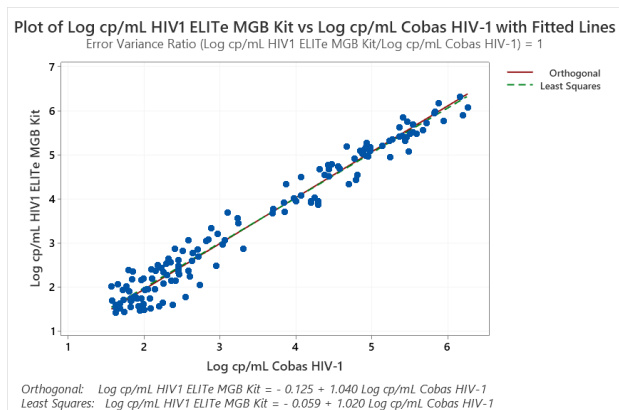
I risultati sono sintetizzati nella figura sottostante.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,025 (95% CI: 0,992; 1,059) e un'intercetta pari a -0,024 (95% CI: -0,152; 0,104). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,971.

Dal momento che i due metodi di riferimento utilizzati ("cobas HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics, Cobas HIV-1) hanno dimostrato prestazioni equivalenti, lo studio di correlazione è stato condotto anche sui risultati combinati tra i tre diversi siti.

I risultati sono sintetizzati nella figura sottostante.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,040 (95% CI: 1,006; 1,073) e un'intercetta pari a -0,125 (95% CI: -0,248; 0,002). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,964.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, intesa come percentuale di concordanza dei risultati negativi ottenuti con metodi differenti, è stata valutata in associazione a **ELITe InGenius** analizzando campioni clinici HIV1 RNA-negativi testati con un metodo di riferimento di diagnostica molecolare marcato CE IVD ("cobas® HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas® HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics, Cobas HIV-1).

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.

Dal momento che i due metodi di riferimento utilizzati ("cobas HIV-1 for use on the 4800 System" e "cobas HIV-1 for use on the 6800 System", Roche Diagnostics, Cobas HIV-1) hanno dimostrato prestazioni equivalenti, lo studio di specificità diagnostica è stato eseguito in tre siti differenti sui seguenti 196 campioni di plasma raccolti in EDTA:

- sito 1: 90 campioni clinici HIV1 RNA-negativi di plasma raccolti in EDTA,
- sito 2: 77 campioni clinici HIV1 RNA-negativi di plasma raccolti in EDTA,
- sito 3: 29 campioni clinici HIV1 RNA-negativi di plasma raccolti 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 HIV1 ELITe MGB Kit sono stati analizzati allo scopo di calcolare la percentuale di concordanza dei risultati negativi rispetto ai metodi di riferimento.

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

Campioni	N	Positivo	Negativo	Non valido	Specificità diagnostica
Plasma raccolto in EDTA HIV1 RNA-negativo	196	1	195	0	99,5%

In questo test, 195 campioni si sono confermati negativi. Un campione ha dato un secondo risultato positivo discordante con titolo più basso rispetto al LoD del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit e dei metodi di riferimento. Questo campione ha un titolo molto basso e può generare casualmente risultati positivi. La specificità diagnostica del prodotto HIV1 ELITe MGB Kit è stata pari all'99,5%.

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 "HIV1 ELITe MGB Kit", FTP 600ING.

BIBLIOGRAFIA

- J. Müller et al. (2007) *J. Virol. Methods* **142**: 127 - 135.
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.
Il plasma raccolto in EDTA o ACD si può 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.

Al momento non sono disponibili dati riguardo le prestazioni del prodotto con i seguenti campioni clinici: sangue intero, siero e liquor cefalorachidiano.

Questo prodotto non deve essere utilizzato come test di screening per la presenza di HIV1 nel sangue o negli emoderivati né come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HIV1.

Questo prodotto mostra crossreattività con HIV2 che può dare risultati positivi con una quantificazione 2.000 volte inferiore al titolo teorico di HIV2. Ciononostante, tenuto conto l'uso previsto del prodotto, l'epidemiologia dell'HIV2 e l'implementazione di algoritmi diagnostici chiari (es. CDC) mirati a differenziare l'infezione da HIV1 da quella da HIV2, la crossreattività dell'HIV2 non rappresenta un reale problema. Tuttavia, il prodotto HIV1 ELITe MGB Kit non è ideale per il trattamento di individui con doppia infezione da HIV1 e HIV2. In questo caso, la presenza di HIV2 non inibisce la rilevazione di HIV1, ma può causare un'over-quantificazione di HIV1 dovuta alla crossreattività di HIV2.

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

La metodica di amplificazione real time utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia, questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni per l'uso riportate in questo manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici 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'utilizzo di indumenti di lavoro e la disponibilità di aree idonee alla manipolazione di campioni biologici 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'utilizzo di indumenti di lavoro e strumenti dedicati all'allestimento 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 del target 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 rilevazione del prodotto (v. "Caratteristiche prestazionali"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi a causa di problemi nell'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

Reazione con Q-PCR standard o con il controllo positivo non valida	
Curva standard non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nell'impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, dei Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, dei Q-PCR standard e del controllo positivo.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi sub-componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di tre sessioni (7 ore nell' "Inventory Area"). Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20°C per più di 10 minuti. Non lasciare la miscela di reazione completa 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..












Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del controllo negativo. Controllare i volumi della miscela di reazione completa e del controllo negativo.
Contaminazione della miscela di reazione completa o dei suoi sub-componenti.	Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. 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 del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela di reazione completa e del campione. Controllare i volumi della miscela di reazione completa e del campione.
Errore di preparazione della miscela di reazione completa.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzata durante la preparazione della miscela di reazione completa.
Degradazione della miscela di reazione completa o dei suoi sub-componenti.	Non utilizzare la miscela di reazione completa per più di tre sessioni (7 ore nell'“Inventory Area”). Non lasciare la miscela di reazione completa a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare di nuovo la miscela di reazione completa. Utilizzare una nuova aliquota dei sub-componenti.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota del Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti estratte con il campione.	Ripetere l'amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito impostando la sessione in modalità “PCR Only”. Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione impostando la sessione in modalità “Extract + 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 del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità “PCR Only” oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità “Extract + PCR”.

Errore TH, errore SDM, Errore Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa che genera un errore: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità “PCR Only” oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità “Extract + 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.

HIV1 ELITe MGB® Kit
reagents for RNA reverse transcription and
cDNA Real Time amplification

REF RTK600ING

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 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® ed ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea.



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

Intended use

The “HIV1 ELITe MGB® Kit” product is a quantitative nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and the quantification of the RNA of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV1) in RNA samples extracted from clinical specimens. The assay is able to detect the RNA of HIV1 belonging to group M (subtypes A, B, C, D, F, G, H, J, K, L), group O, group N and major CRF subtypes CRF01-AE, CRF02-AG and CRF03-AB.

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

The product is intended for use as an aid in the management of HIV1-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 HIV1 in blood or blood products or as a diagnostic test to confirm the presence of HIV1 infection.

Amplified sequence









Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HIV1 polymerase gene (integrase region)	FAM	HIV1
Internal Control	MS2	AP525	IC

Validated matrix

› Plasma EDTA

› Plasma ACD

Kit content

HIV1 ELITe MGB Mix		HIV1 ELITe Standard				HIV1 - ELITe Positive Control	HIV1 Internal Control
 X 4	 X 2				 X 1	 X 2	 X 8
HIV PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT EnzymeMix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Calibrators: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 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 BeGenius instrument: INT040
- › 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 µL: TF-350-L-R-S
- › 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118

ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	600 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HIV1 CPE volume	10 µL		Copies: Copies/mL
› Total elution volume	50 µL	› Conversion factor to IU	2.3 IU/copy
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of controls	15 days
› Complete PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma	60 IU / mL 26 copies / mL	R² = 0.964 <i>141 quantified samples</i>	99.5% <i>195 confirmed samples / 196 tested samples</i>

reference methods:

“cobas® HIV1 for use on the 4800 Systems” and

“cobas® HIV1 for use on the 6800 Systems”, Roche Diagnostics.

Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA or ACD samples must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) for a maximum of one day or at +2 / +8 °C for a maximum of three 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 modes are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: HIV1 Q-PCR Standard in the "Calibration" menu Verify controls: HIV1 Positive Control and HIV1 Negative Control in the "Controls" menu <i>Note:</i> Both must have been run, approved and not expired	3. Thaw the HIV1 PCR Mix and the HIV1 CPE tubes Vortex gently Spin down 5 sec Keep the RT EnzymeMix in ice
------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HIV1 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

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", elution: "50 µL"	3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HIV1 ELITE_PL_600_50	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube	6. Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

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

1. Switch on ELiTe BeGenius.
Log in with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: **HIV1 Q-PCR Standard** in the "Calibration" menu
Verify controls: **HIV1 Positive Control** and **HIV1 Negative Control** in the "Controls" menu
Note: Both must have been run, approved and not expired
3. Thaw the **HIV1 PCR Mix** and the **HIV1 CPE** tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec
Keep the **RT EnzymeMix** in ice

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HIV1 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 μL	4.4 μL

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).

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

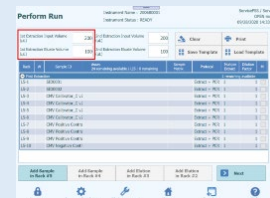
1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»



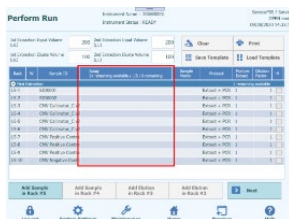
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



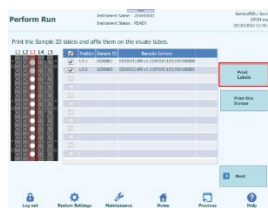
3. Verify the extraction volumes: Input: "600 μL ", Eluate: "50 μL "



4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the complete reaction mixture and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door. Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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