




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

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

AVVERTENZA del 22/10/2021

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«BKV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS175PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Estensione d'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius[®]» (REF INT040).*
- *Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI:*
 - *Modifica del limite di rilevazione (LoD)*
 - *Modifica dell'Intervallo di misurazione lineare*
 - *Aggiunta della Ripetibilità*
 - *Aggiunta della Riproducibilità*

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

NOTA BENE

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



BKV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS175PLD



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 2
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE INGENIUS® E ELITE BEGENIUS®	pag. 6
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA ELITE INGENIUS®	pag. 8
PROCEDURA ELITE BEGENIUS®	pag. 15
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 20
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	pag. 30
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 30
PROCEDURA	pag. 32
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 40
Roche cobas z 480 analyzer	pag. 46
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 46
PROCEDURA	pag. 47
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 52
BIBLIOGRAFIA	pag. 54
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 55
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 56
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 58
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 59

BKV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTS175PLD

USO PREVISTO

Il prodotto «BKV ELITE MGB® Kit» è parte di un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e quantificazione del DNA del Poliomavirus umano BK (BKV)** in campioni di DNA estratto da plasma raccolto in EDTA, urine raccolte senza conservanti e liquido cefalorachidiano (CSF).

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

PRINCIPIO DEL SAGGIO

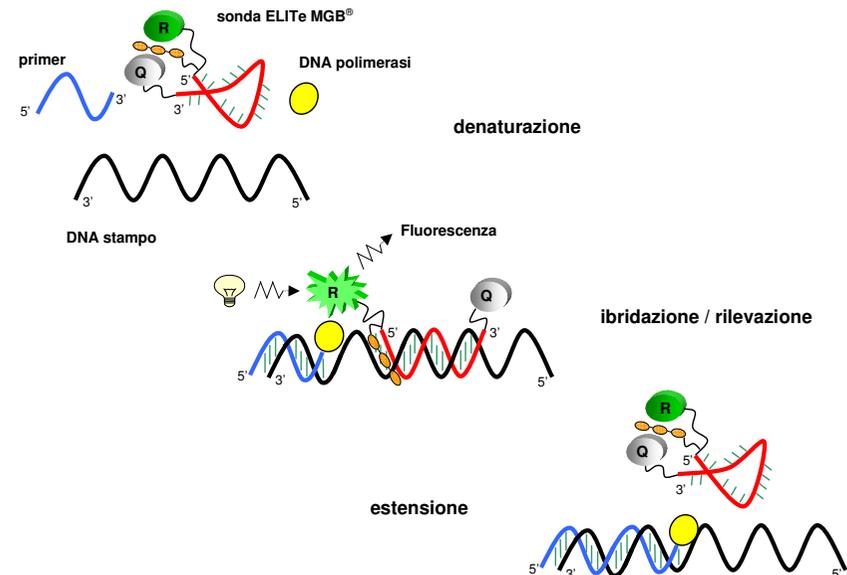
Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di amplificazione real time con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza (thermal cycler per amplificazione real time).

In ogni pozzetto si effettuano due reazioni di amplificazione: una specifica per la regione del gene codificante il **Large T antigen** di BKV e una specifica per la regione del gene umano codificante la **beta Globina** (Controllo Interno di inibizione) utilizzando il DNA estratto dai campioni in esame. La sonda con tecnologia ELITE MGB® specifica per BKV marcata con il fluoroforo FAM è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per BKV. La sonda con tecnologia ELITE MGB® specifica per il Controllo Interno marcata con il fluoroforo AP525 (equivalente a VIC) è attivata quando ibrida con il prodotto della reazione di amplificazione per il Controllo Interno. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza e il titolo del DNA di BKV nel campione di partenza.

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

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

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



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «**BKV ELITe MGB® Kit**» fornisce la miscela di reazione completa e **pronta all'uso** BKV Q - PCR Mix per l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in quattro provette**. Ogni provetta contiene **540 µL** di soluzione, sufficiente per **24 test** (processando almeno 2 campioni per sessione) in associazione al sistema «**ELITe InGenius®**» e «**ELITe BeGenius®**» e **25 test** in associazione ad altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per BKV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata dal quencher non fluorescente) sono specifici per la regione del gene codificante il **Large T antigen** di BKV.

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

La miscela di reazione fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del Cy5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione, l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto consente di effettuare **96 determinazioni in associazione con «ELITe InGenius®»** e «**ELITe BeGenius®**», standard e controlli compresi.

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

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

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

MATERIALE RICHiesto NON INCLUSO NEL PRODOTTO

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

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «**ELITe InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200) o «**ELITe InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice SCH mINT032CS), «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

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

- per il calibratore «**BKV ELITe_STD**» o «**BKV ELITe_STD_1000_100**»,
- per il controllo positivo di amplificazione «**BKV ELITe_PC**» o «**BKV ELITe_PC_1000_100**»,
- per il controllo negativo di amplificazione «**BKV ELITe_NC**» o «**BKV ELITe_NC_1000_100**»,
- per i campioni in analisi «**BKV ELITe_PL_200_100**», «**BKV ELITe_PL_1000_100**» e «**BKV ELITe_U_200_100**».

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «**ELITe BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT040), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice SCH mINT032CS), «**ELITe InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

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

- per il calibratore «**BKV ELITe_Be_STD**»,
- per il controllo positivo di amplificazione «**BKV ELITe_Be_PC**»,
- per il controllo negativo di amplificazione «**BKV ELITe_Be_NC**»,
- per i campioni in analisi «**BKV ELITe_Be_WB_200_100**» e «**BKV ELITe_Be_PL_200_100**».

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

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

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

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

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

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7300 Real-Time PCR System, è richiesto l'impiego del prodotto generico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACCO1), micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, è richiesto l'impiego del prodotto generico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC02), micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento cobas z 480 analyzer, si consiglia l'impiego del prodotto generico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, codice 05232724001), micropiastre con pozzetti da 0,3 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia richiesta la rilevazione del DNA di BKV (analisi qualitativa) è richiesto l'impiego del prodotto di ELITechGroup S.p.A. «**BKV - ELITE Positive Control**» (codice CTR175PLD) o del prodotto di ELITechGroup S.p.A. «**BKV - ELITE Positive Control RF**» (codice CTR175PLD-R) specifico per l'utilizzo con lo strumento cobas z 480 analyzer, controllo positivo di DNA plasmidico.

Nel caso sia richiesta la rilevazione e quantificazione del DNA di BKV (analisi quantitativa) è richiesto l'impiego del prodotto di ELITechGroup S.p.A. «**BKV ELITE Standard**» (codice STD175PLD), quattro diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere la curva standard.

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

Un Fattore di conversione permette di esprimere i risultati quantitativi nelle Unità Internazionali di BKV del "1st WHO International Standard for BK Virus DNA" (NIBSC, Regno Unito, codice 14/212).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

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

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

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

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

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

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

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

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

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

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, è, necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

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

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

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

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

La **BKV Q - PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

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

ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Plasma raccolto in EDTA

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da 200 µL di campioni di plasma con **ELITE InGenius®** e con **ELITE InGenius® Software** versione **1.3** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BKV ELITE_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITE BeGenius** e con **ELITE BeGenius® Software** versione **2.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BKV ELITE_Be_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da 1000 µL di campioni di plasma con **ELITE InGenius®** e con **ELITE InGenius® Software** versione **1.3** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BKV ELITE_PL_1000_100**. Questo protocollo processa 1000 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione all'assay protocol **BKV ELITE_PL_1000_100**.

Urine raccolte senza conservanti

I campioni di urine destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in contenitori senza conservanti secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) e conservati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) per un massimo di quattro ore, altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di sonicazione fornito con «ELITe InGenius SP 200 Consumable Set».

Se possibile, evitare di congelare i campioni di urina. Il congelamento può causare la precipitazione di inibitori e la perdita di titolo del DNA.

In caso di congelamento, si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di urina con **ELITe InGenius** e con **ELITe InGenius Software** versione **1.3** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BKV ELITe_U_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITe BeGenius®** e con **ELITe BeGenius Software** versione **2.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BKV ELITe_U_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiungendo 10 µL di controllo interno **CPE** e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

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

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

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

Controlli di amplificazione

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

come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **BKV ELITe Standard**, in associazione con il protocollo «**BKV ELITe_STD**» o «**BKV ELITe_STD_1000_100**» per **ELITe InGenius** e «**BKV ELITe_Be_STD**» per **ELITe BeGenius**,

come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **BKV - ELITe Positive Control**, in associazione con il protocollo «**BKV ELITe_PC**» o «**BKV ELITe_PC_1000_100**» per **ELITe InGenius** e «**BKV ELITe_Be_PC**» per **ELITe BeGenius**,

come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo «**BKV ELITe_NC**» o «**BKV ELITe_NC_1000_100**» per **ELITe InGenius** e «**BKV ELITe_Be_NC**» per **ELITe BeGenius**.

Nota bene: **ELITe InGenius** con **ELITe InGenius Software** e **ELITe BeGenius** con **ELITe BeGenius Software** permette di ottenere la curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

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

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

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:
- Si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Viene eseguito un intervento di manutenzione sullo strumento.

Controlli di qualità

I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali. I controlli esterni di qualità sono disponibili in commercio.

PROCEDURA ELITe InGenius®

La procedura di utilizzo del prodotto «**BKV - ELITe MGB® Kit**» con il sistema **ELITe InGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere **ELITe InGenius** e selezionare la modalità «**CLOSED**»;
- verificare che i calibratori (**Calibration-BKV Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;
- verificare che i controlli di amplificazione (**Controls - BKV Positive Control, BKV Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione utilizzando i protocolli dei saggi forniti da ELITechGroup. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i kit **ELITe MGB**, le matrici e lo strumento **ELITe InGenius**.

I protocolli dei saggi disponibili per «**BKV ELITe MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per « BKV ELITe MGB® Kit » e ELITe InGenius			
Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
BKV ELITe_PL_200_100	Plasma	copie/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
BKV ELITe_PL_1000_100	Plasma	copie/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 1000 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
BKV ELITe_U_200_100	Urine	copie/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

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

Impostazione della sessione

BKV ELITe MGB kit in associazione a **ELITe InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

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

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota bene: il sistema ELITe InGenius può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

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

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User**

Interface (GUI):

- Scongelare i tubi di BKV Q - PCR Mix per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Scongelare il tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a rre del campione.
- Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio BKV ELITe_PL_200_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
 - se un tubo primario è utilizzato, selezionare "Primary Tube", il tubo primario può essere utilizzato solo partendo da 200 µL di campione;
 - se un tubo secondario è utilizzato, selezionare "Extraction Tube".Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il CPE e la BKV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" o "ELITe InGenius SP1000", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione indicata al punto 8, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

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

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

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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:

- Scongelare i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio BKV ELITe_PL_200_100).
- Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
- Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione eluato nella colonna "Sample Position" sia "ExtraTube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare BKV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare i campioni degli acidi nucleici estratti e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per continuare l'operazione successiva.
- Chiudere la porta dello strumento.
- Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

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

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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 i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare i tubi di BKV Q - PCR Standard (Cal1: BKV Q-PCR Standards 10², Cal2: BKV Q-PCR Standards 10³, Cal3: BKV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: BKV Q-PCR Standards 10⁵). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. A partire dal "Track" di interesse, selezionare il protocollo di dosaggio da utilizzare nella colonna "Assay" (BKV ELITE STD o BKV ELITE STD_1000_100) e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il BKV Q - PCR standard. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
6. Caricare BKV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere l'operazione successiva.
8. Caricare i tubi di calibrazione e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva. Fare attenzione a caricare gli standard nella corretta posizione, seguendo le istruzioni GUI.
9. Chiudere la porta dello strumento.
10. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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. Scongellare i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare il prodotto BKV Positive Control per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita con ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Selezionare l'"Extraction Input Volume": 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e assicurarsi che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Selezionare BKV ELITE_PC O BKV ELITE_PC_1000_100 per il controllo positivo e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per BKV Positive Control (Controllo Positivo),
7. Selezionare BKV ELITE_NC o BKV ELITE_NC_1000_100 e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il Controllo Negativo BKV.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'operazione successiva.
9. Caricare BKV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare la "PCR Cassette", il Controllo Positivo e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

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

Nota bene: I risultati dei test dei Controlli Positivi e Controlli Negativi sono utilizzati dal software dello strumento per compilare le "Control Chart". Quattro risultati dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi, da quattro sessioni diverse, sono richiesti per impostare la carta di controllo. I risultati successivi dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi sono utilizzati per monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota bene: Alla fine della corsa il Controllo Positivo rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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 InGenius**.

ELITE InGenius genera i risultati con «**BKV ELITE MGB® Kit**» attraverso questa procedura:

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

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per BKV ("BKV"), nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "BKV ELITe_STD" e "BKV ELITe_STD_1000_100".

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

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

Nota bene: Quando la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Calibration" e non è possibile approvarla. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

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

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

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per BKV ("BKV") nelle reazioni di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "BKV ELITe_PC", "BKV ELITe_PC_1000_100", "BKV ELITe_NC" e "BKV ELITe_NC_1000_100".

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) dopo l'approvazione da parte del personale con la qualifica di "Amministratore" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI.

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono dopo 15 giorni.

Prima di analizzare un campione dopo l'approvazione della curva di calibrazione è necessario verificare la presenza di un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo approvati e validi per il lotto di PCR Mix che si intende utilizzare. La disponibilità del risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione "Approved" (Status) è visualizzata nella finestra "Controls" della GUI. Se non è presente un risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione approvato e valido, generarlo come descritto sopra.

Nota Bene: Quando un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo è processato insieme con i campioni da analizzare ed il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per BKV ("BKV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC"), in ogni reazione di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio.

Nota bene: Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione e il risultato dei controlli di amplificazione per il lotto di reagente utilizzato. Si raccomanda, ma è facoltativo, di eseguire il Controllo Positivo e Negativo insieme ai calibratori. La disponibilità di una curva di calibrazione e di amplificazione e i risultati del Controllo Positivo e Negativo "Approved" (Status) sono visualizzati nelle finestre "Calibration" e "Controls" del software ELITe InGenius e sono riportati nella sezione "Assay Parameters".

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

La corsa del campione è valida quando le tre condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

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

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

La misura è espressa in "copies / mL" or "IU / mL" come stabilito nel protocollo del saggio.

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

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
BKV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL	DNA di BKV rilevato nell'intervallo di misurazione del saggio, quantità come mostrato.
BKV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL	DNA di BKV rilevato al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio
BKV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL	DNA di BKV rilevato al di sopra del limite superiore di quantificazione del saggio
BKV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU / mL	DNA di BKV non rilevato o inferiore al Limite di Rivelazione del saggio.
Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido a causa di un problema con il Controllo Interno (estrazione errata o presenza di un inibitore).

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" dall'**ELITe InGenius software**. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del DNA, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

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

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare il DNA di BKV sono segnalati come "DNA Not Detected or below LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA di BKV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

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

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

D. Refertazione dei risultati del campione

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

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

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

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

PROCEDURA ELITe BeGenius®

La procedura di utilizzo del prodotto «BKV - ELITe MGB® Kit» con il sistema ELITe BeGenius comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità "CLOSED";
- verificare che i calibratori (**BKV Q-PCR standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;
- verificare che i controlli di amplificazione (**BKV Positive Control** e **BKV Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay protocol forniti da ELITechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITe MGB Kit, le matrici e lo strumento **ELITe BeGenius**.

I protocolli dei saggi disponibili per «BKV ELITe MGB® Kit» sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per «BKV ELITe MGB® kit» e ELITe BeGenius

Nome	Matrice	Rapporto unitario	Caratteristiche
BKV ELITe_Be_WB_200_100	Plasma	copie/mL o IU/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
BKV ELITe_Be_PL_200_100	Urine	copie/mL o IU/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

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

Impostazione della sessione

Il prodotto **BKV ELITe MGB kit** in associazione a **ELITe BeGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- A. Corsa integrata (Extract + PCR),
- B. Corsa di amplificazione (PCR only),
- C. Corsa di Calibrazione (PCR only),
- D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

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

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

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User Interface (GUI)**:

1. Scongellare i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare un tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto 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 dal rack per provette campione L5.
7. Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

Note: 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 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio i.e. BKV ELITe_Be_PL_200_100). 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 per provette campione L4.
11. Caricare i tubi di eluizione barcodati nella cooling area partendo dal rack per eluati L3.

Note: 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 per reagenti/eluati L2.
14. Caricare il CPE e la BKV Q-PCR Mix nella cooling area.
15. Inserire il rack per reagente 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 bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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 i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
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 campioni nella cooling area partendo dal rack per eluati 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 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
8. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio BKV ELITe_Be_PL_200_100).
9. Caricare BKV Q-PCR Mix 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 dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato 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 la porta dello strumento,
14. Premere "Start" per iniziare 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 il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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 i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongellare i tubi di BKV ELITe Standard (Cal1: BKV Q-PCR Standards 10², Cal2: BKV Q-PCR Standards 10³, Cal3: BKV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: BKV Q-PCR Standards 10⁵). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home"
4. . Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
5. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
6. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack per eluati L3.
7. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (BKV ELITe_Be_STD). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare BKV Q-PCR Mix 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 dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato 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 la porta dello strumento,
15. Premere "Start" per iniziare 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 il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre 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 i tubi di BKV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Scongelare il prodotto BKV - ELITe Positive Control per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
7. Caricare il Controllo Positivo e il Controllo Negativo nella cooling area nel rack per eluati L3.
8. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
10. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (BKV ELITe_Be_PC e BKV ELITe_Be_NC). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare BKV Q-PCR Mix nella cooling area.
12. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare e controllare i rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Caricare il rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
15. Chiudere la porta dello strumento,
16. Premere "Start" per iniziare 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 il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della 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 bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Validazione dei risultati del campione

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

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

ELITe BeGenius genera i risultati utilizzando il kit BKV ELITe MGB attraverso la seguente procedura

- A. Convalida della curva di calibrazione,
- B. Convalida dei risultati dell'amplificazione del controllo positivo e del controllo negativo,
- C. Convalida dei risultati del campione,
- D. Report dei risultati del campione.

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

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

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

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

La sensibilità analitica del saggio con le diverse matrici è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di BKV ed in associazione a ELITe InGenius. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di BKV. Il pannello era composto da sei punti intorno alla concentrazione limite e ciascun punto del pannello è stato testato in 12 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con ELITe InGenius e i prodotti ELITeTechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è uguale al 95%.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con ELITe InGenius (UI / mL)				
Volume di campione	Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%	
			valore inferiore	valore superiore
200 µL	urine	142 UI / mL	110 UI / mL	222 UI / mL
	plasma	215 UI / mL	168 UI / mL	319 UI / mL
1000 µL	plasma	44 UI/mL	35 UI / mL	64 UI / mL

La sensibilità analitica espressa in copie / mL è stata calcolata applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pag. 20.

La sensibilità analitica per ogni matrice come copie/mL è riportata sotto.

Limite di rilevazione con ELITe InGenius (copie/ mL)				
Volume di campione	Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%	
			valore inferiore	valore superiore
200 µL	urina	89 copie / mL	69 copie / mL	139 copie / mL
	plasma	165 copie / mL	129 copie / mL	245 copie / mL
1000 µL	plasma	26 copie / mL	21 copie / mL	38 copie / mL

Il limite di rilevazione calcolato è stato verificato in associazione a **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** testando 20 replicati di un campione di plasma collezionato in EDTA e 20 replicati di un campione di urine raccolte senza conservanti, positivamente utilizzando il materiale di riferimento (1st WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione calcolata. Il limite di rilevazione è confermato se almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo secondo la linea guida CLSI EP17-A.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per plasma e urine e ELITe InGenius					
Campione	LoD	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma collezionato in EDTA	215 UI / mL	BKV	20	18	2
Sangue intero collezionato in EDTA	142 UI / mL	BKV	20	20	0

Limite di rilevazione per plasma e urine e ELITe BeGenius					
Campione	LoD	Target	N	Positivo	Negativo
Plasma collezionato in EDTA	215 UI / mL	BKV	20	20	0
Sangue intero collezionato in EDTA	142 UI / mL	BKV	20	19	1

Il valore LoD per il target BKV è stato confermato a 215 UI / mL per il plasma collezionato in EDTA e a 142 UI / mL per il sangue intero collezionato in EDTA.

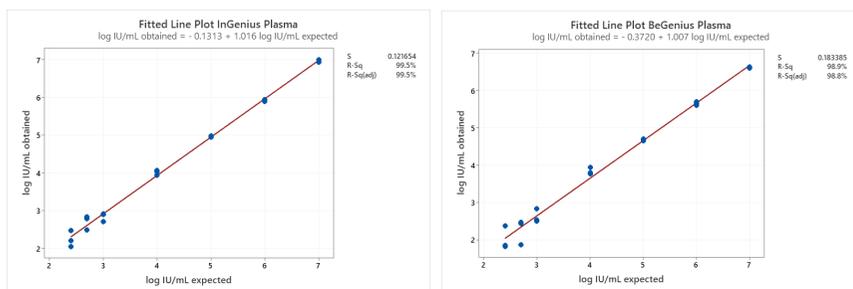
Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto BKV ELITe MGB® Kit in associazione con Plasma e Urine (volume campione 200 µL) e **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di BKV. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di BKV. Il pannello presentava 8 passaggi di diluizione da 10⁷ a 10² UI / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in 3 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con **ELITe InGenius** e i prodotti **ELITechGroup S.p.A.** L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello.

Per il Plasma (volume campione 200 µL):

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di Plasma mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R²) pari a 0,995 per **ELITe InGenius** e 0,989 per **ELITe BeGenius**.

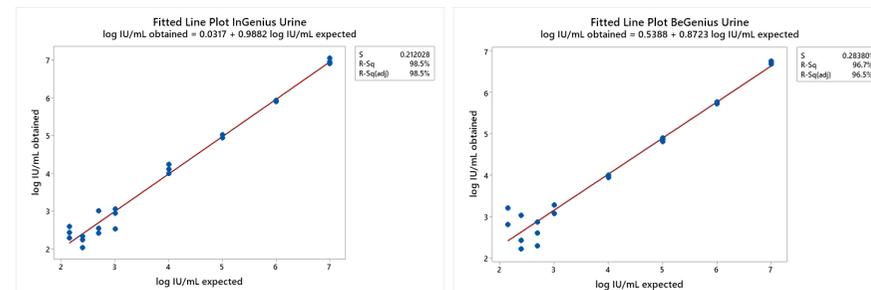
I risultati sono riportati nelle figure seguenti.



Per Urine (volume campione 200 µL):

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di Plasma mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R²) pari a 0,985 per **ELITe InGenius** e 0,967 per **ELITe BeGenius**.

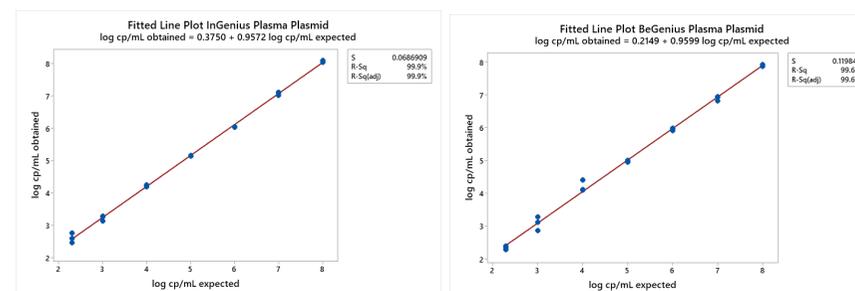
I risultati sono riportati nelle figure seguenti.



L'intervallo di misurazione lineare del prodotto BKV ELITe MGB® Kit utilizzato in associazione a Plasma (volume campione 200 µL) e **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stato testato su un intervallo più esteso di concentrazioni analizzando un pannello di diluizioni di BKV preparato diluendo un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione in matrice negativa per il DNA di BKV. Il pannello presentava 8 passaggi di diluizione di 1 Log da 10⁸ a 10² copie / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in 3 replicati.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di Plasma mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R²) pari a 0,999 per **ELITe InGenius** e 0,996 per **ELITe BeGenius**.

I risultati sono riportati nelle figure seguenti.



Per Plasma (volume campione 200 µL):

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione LoD, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2767 Log UI / mL per **ELITe InGenius** e 0,3012 Log UI / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,0098 Log UI / mL per **ELITe InGenius** e 0,2569 Log UI / mL per **ELITe BeGenius**): 215 UI / mL.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2159 Log UI / mL per **ELITe InGenius** e 0,3357 Log UI / mL per **ELITe BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,1606 Log UI / mL per **ELITe InGenius** e -0,4406 Log UI / mL per **ELITe BeGenius**): 130.000.000 UI / mL.

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come copie / mL sono stati calcolati applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 28.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di plasma e ELITe InGenius e ELITe BeGenius (200 µL)		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	215	130.000.000
copies / mL	165	100.000.000

Per Urine (volume campione 200 µL):

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLoQ) è stato fissato alla concentrazione LoD, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2888 Log UI / mL per **ELITE InGenius** e 0,4031 Log UI / mL per **ELITE BeGenius**) e accurati (Errore pari a 0,1562 Log UI / mL per **ELITE InGenius** e -0,1668 Log UI / mL per **ELITE BeGenius**): 142 IU / mL.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULoQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2114 Log UI / mL per **ELITE InGenius** e 0,3132 Log UI / mL per **ELITE BeGenius**) e accurati (Errore pari a -0,3240 Log UI / mL per **ELITE InGenius** e -0,2860 Log UI / mL per **ELITE BeGenius**): 160,000,000 UI / mL.

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come copie / mL sono stati calcolati applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 28.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

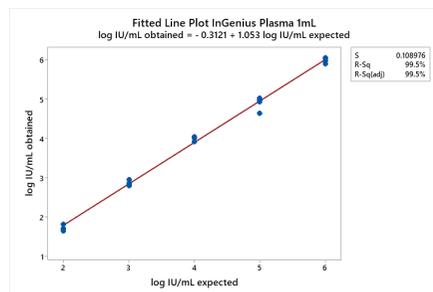
Intervallo di misurazione lineare con campioni di urine e ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	142	160.000.000
copies / mL	89	100.000.000

Per Plasma (volume campione 1000 µL):

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto BKV ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione a Plasma (volume campione 1000 µL) e **ELITE InGenius** è stato testato usando un pannello di diluizioni di BKV. Il pannello è preparato diluendo il "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Regno Unito) in matrice negativa. Il pannello presentava 5 passaggi di diluizione di 1 Log da 10⁶ a 10² UI / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in 4 replicati.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio in associazione con campioni di Plasma (volume campione 1000 µL) mostra una risposta lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione quadrato (R2) pari a 0,995.

I risultati sono riportati nella figura seguente:



L'intervallo di misurazione lineare è stato testato su un intervallo più esteso di concentrazioni analizzando un pannello di diluizioni di BKV preparato diluendo un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione in matrice negativa per il DNA di BKV. Il pannello presentava 6 passaggi di diluizione di 1 Log da 10⁹ a 10⁴ copie / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in 4 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti **ELITEchGroup S.p.A.**

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante analisi di regressione lineare, ha dimostrato che il saggio mostra una risposta lineare per i punti da 10⁸ a 10⁴ copie / mL. Per il punto 10⁹ copie / mL, non è stato possibile calcolare il valore di Ct a causa della concentrazione troppo alta.

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come copie / mL sono stati calcolati applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 28.

I risultati finali per sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di plasma e ELITE InGenius (1000 µL)		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	100	170,000,000
copies / mL	59	100,000,000

Ripetibilità

La Ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto BKV ELITE MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** è stata testata mediante analisi di un pannello di campioni di Plasma raccolto in EDTA. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per BKV ("1st WHO international standard for BKV virus DNA, NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 645 UI/ml) e di 10 x LoD (circa 2150 UI/ml).

La Ripetibilità Intra – Sessione su **ELITE InGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITE InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità Intra – Sessione ELITE InGenius Lotto U0121-047								
Campione	BKV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	27,39	0,24	0,87
3 x LoD	8 / 8	36,66	0,45	1,23				
10 x LoD	8 / 8	34,88	0,56	1,62				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITE InGenius Lotto U0121-047								
Campione	BKV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	-	-	-	48 / 48	27,14	0,36	1,32
3 x LoD	16 / 16	36,36	0,52	1,43				
10 x LoD	16 / 16	34,40	0,68	1,96				

Nel test di ripetibilità su **ELITE InGenius**, il test ha rilevato il target BKV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano l'2% per BKV e l'1,3% per il controllo interno.

La Ripetibilità Intra – Sessione su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità Intra – Sessione ELITe BeGenius Lotto U0121-047								
Campione	BKV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24/24	29,92	0,41	1,37
3 x LoD	8 / 8	37,09	0,52	1,40				
10 x LoD	8 / 8	35,45	0,31	0,88				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITe InGenius Lot U0121-047								
Campione	BKV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 16	-	-	-	48 / 48	29,71	0,49	1,65
3 x LoD	16 / 16	36,68	0,71	1,94				
10 x LoD	16 / 16	34,98	0,55	1,57				

Nel test di ripetibilità su **ELITe BeGenius**, il test ha rilevato il target BKV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano l'2% per BKV e l'1,7% per il controllo interno.

Riproducibilità

La Riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto BKV ELITe MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** è stata testata mediante analisi di un pannello di campioni di sangue intero raccolto in EDTA. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per BKV ("1st WHO international standard for BKV virus DNA", NIBSC) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 645 UI/ml) e di 10 x LoD (circa 2150 UI/ml).

La Riproducibilità Inter – Strumento su **ELITe InGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni differenti, con lo stesso lotto di prodotto, con due strumenti differenti, da due differenti operatori. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Riproducibilità Inter – Lotto su **ELITe InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con due differenti lotti di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe InGenius								
Campione	BKV				Controllo interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	26,88	0,27	0,99
3 x LoD	8 / 8	36,72	0,30	0,82				
10 x LoD	8 / 8	30,89	0,41	1,33				

Riproducibilità Inter – Lotto ELITe InGenius								
Campione	BKV				Controllo interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	26,83	0,34	1,26
3 x LoD	8 / 8	36,94	0,36	0,97				
10 x LoD	8 / 8	35,07	0,28	0,79				

Nel test di riproducibilità su **ELITe InGenius**, il test ha rilevato il target BKV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano l'1,3% per BKV e l'1,3% per il controllo interno.

La Riproducibilità Inter – Strumento su **ELITe BeGenius** è stata ottenuta mediante l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni differenti, con lo stesso lotto di prodotto, con due strumenti differenti, da due differenti operatori. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

La Riproducibilità Inter – Lotto su ELITe BeGenius è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con due differenti lotti di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate.

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Riproducibilità Inter – Strumento ELITe BeGenius								
Campione	BKV				Controllo interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	29,39	0,42	1,44
3 x LoD	8 / 8	36,87	0,58	1,56				
10 x LoD	8 / 8	34,86	0,25	0,72				

Riproducibilità Inter – Lotto ELITe BeGenius								
Campione	BKV				Controllo interno			
	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV	Pos. / Rep.	Ct media	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	29,71	0,69	2,31
3 x LoD	8 / 8	36,81	0,66	1,80				
10 x LoD	8 / 8	35,01	0,41	1,17				

Nel test di riproducibilità su **ELITe BeGenius**, il test ha rilevato il target BKV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano 1,8% per BKV e 2,3% per il controllo interno.

Riproducibilità con materiale di riferimento certificato

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

I risultati, ottenuti partendo da 200 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITe InGenius»				
Campione	Titolo nominale copie / mL	Titolo nominale Log ₁₀ copie / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
BKVMQP01-High	100000	5,000	2/2	5,237
BKVMQP01-Medium	10000	4,000	2/2	4,243
BKVMQP01-Low	1000	3,000	2/2	3,187
BKVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni positivi sono stati rilevati correttamente con un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0,5 Log.

I risultati, ottenuti partendo da 1000 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITe InGenius»				
Campione	Titolo nominale copie / mL	Titolo nominale Log ₁₀ copie / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
BKVMQP01-High	100000	5,000	2/2	5,271
BKVMQP01-Medium	10000	4,000	2/2	4,377
BKVMQP01-Low	1000	3,000	2/2	3,120
BKVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni positivi sono stati rilevati correttamente con un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0,5 Log.

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

I risultati, ottenuti partendo da 200 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Test con material di riferimento calibrato e ELITe InGenius				
Campione	Consensus Log ₁₀ copie / mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
BKVDNA14-01	2,330	0,540	2/2	2,713
BKVDNA14-02	3,632	0,416	2/2	3,973
BKVDNA14-03	4,420	0,410	2/2	4,610
BKVDNA14-04	4,630	0,365	2/2	5,056
BKVDNA14-05	3,620	0,389	2/2	4,191
BKVDNA14-06	negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,159
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,405
BKVDNA14-09	negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	Non rilevato

Tutti i campioni negativi sono stati rilevati correttamente e su otto campioni positivi sette sono stati rilevati positivi. Il campione BKV DNA14-10 a 74 copie/mL non è stato rilevato. Ciò può essere spiegato in quanto il titolo del campione è inferiore al limite di rilevazione. Cinque (5) campioni sono stati quantificati all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus ± 1 deviazione standard (DS) e due campioni entro ± 2 DS.

I risultati, ottenuti partendo da 1000 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Tests with calibrated reference materials and «ELITe InGenius»				
Campione	Consensus Log ₁₀ copie / mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
BKVDNA14-01	2,330	0,540	2/2	2,794
BKVDNA14-02	3,632	0,416	2/2	4,165
BKVDNA14-03	4,420	0,410	2/2	4,684
BKVDNA14-04	4,630	0,365	2/2	5,132
BKVDNA14-05	3,620	0,389	2/2	4,118
BKVDNA14-06	negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,280
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,459
BKVDNA14-09	negativo	N.A.	0/2	Non rilevato
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	1,914

Tutti i campioni negativi sono stati rilevati correttamente come negativi e tutti i campioni positivi sono stati rilevati correttamente come positivi. Quattro (4) campioni sono stati quantificati all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus ± 1 deviazione standard (DS) e quattro campioni entro ± 2 DS.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione da utilizzare con questo saggio per trasformare il risultato quantitativo da copie / mL in Unità Internazionali / mL è stato determinato utilizzando un pannello di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO international standard for BKV virus DNA" NIBSC code 14/212, Regno Unito) nelle diverse matrici negative per il DNA di BKV ed in associazione a ELITe InGenius. Il pannello presentava 6 passaggi di diluizione di 0,5 Log. Ciascun punto del pannello è stato testato in almeno 16 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con ELITe InGenius e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti

Fattore di Conversione a Unità Internazionali Plasma (200 µL), Fc = 1,3 UI / copy						
Campione			Risultati			Differenza Log (ref. - test)
UI / mL	Log UI / mL	N	Media c. / mL	Media UI / mL	Media Log UI / mL	
1.000.000	6	16	638.228	829.696	5,918	0,082
316.228	5,5	16	218.812	284.456	5,454	0,046
100.000	5	16	77.739	101.061	5,004	-0,004
31.623	4,5	16	27.458	35.695	4,552	-0,052
10.000	4	16	8.660	11.258	4,051	-0,051
3.162	3,5	16	2.436	3.167	3,501	-0,001

Fattore di Conversione a Unità Internazionali Urine, Fc = 1,6 UI / copy						
Campione			Risultati			Differenza Log (ref. - test)
UI / mL	Log UI / mL	N	Media c. / mL	Media UI / mL	Media Log UI / mL	
1.000.000	6	16	584.869	935.790	5,971	0,029
316.228	5,5	16	191.554	306.486	5,486	0,014
100.000	5	16	62.702	100.323	5,001	-0,001
31.623	4,5	16	22.267	35.627	4,551	-0,051
10.000	4	16	7.378	11.805	4,072	-0,072
3.162	3,5	16	1.886	3.018	3,479	0,021

Fattore di Conversione a Unità Internazionali Plasma (1000 µL), Fc = 1,7 UI / copy						
Campione			Risultati			Differenza Log (ref. - test)
UI / mL	Log UI / mL	N	Media c. / mL	Media UI / mL	Media Log UI / mL	
1.000.000	6	16	607.196	1.030.366	6,013	-0,013
316.228	5,5	16	196.333	333.162	5,523	-0,023
100.000	5	16	62.356	105.813	5,025	-0,025
31.623	4,5	16	19.726	33.474	4,525	-0,025
10.000	4	16	5.663	9.610	3,983	0,017
3.162	3,5	16	1.656	2.811	3,449	0,051

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con ELITe InGenius		
Volume di campione	Matrice	Fc (UI / copie)
200 µL	Plasma	1,3
200 µL	Urina	1,6
1000 µL	Plasma	1,7

Il fattore di conversione, per convertire un risultato quantitativo da copie/mL a Unità Internazionali/mL, è stato verificato per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius analizzando i risultati ottenuti durante il test di Linearità.

La precisione di quantificazione del target, come deviazione standard del Log IU/mL, era inferiore a 0,5 Log sia per il sangue intero che per il plasma e soddisfa i criteri di accettazione per ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e misurate in Log IU/mL, era inferiore a 0,5 Log sia per il sangue intero che per il plasma e soddisfa i criteri di accettazione per ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

Questi risultati hanno confermato i Fattori di conversione calcolati per ogni matrice con ELITe InGenius.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di plasma e urine positivi per il DNA di BKV.

Il test, partendo da 200 µL di campione è stato eseguito utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA di pazienti positivi per il DNA di BKV e 30 campioni di urine positivi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE-IVD di amplificazione real time).

Il test, partendo da 1000 µL di campione è stato eseguito utilizzando 25 campioni di plasma raccolto in EDTA di pazienti positivi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE-IVD di amplificazione real time) e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV, che sono stati positivamente per il DNA di BKV con "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC codice 14/212, Regno Unito).

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

Volume di campione	Campioni	N	positivi	negativi
200 µL	Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di BKV	30	30	0
	Urina raccolta senza conservanti positiva per il DNA di BKV	30	30	0
1000 µL	Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di BKV	25	25	0
	Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di BKV	30	30	0

Tutti i campioni sono risultati validi e sono stati confermati positivi.

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

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni di sangue intero raccolto in EDTA e di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di BKV in associazione a **ELITe InGenius**. Poiché **ELITe BeGenius** ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a **ELITe InGenius**, si può presumere che i risultati di Specificità diagnostica ottenuti in associazione con **ELITe InGenius** siano applicabili anche a **ELITe BeGenius**.

Il test, partendo da 200 µL di campione è stato eseguito utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA e 30 campioni di urine raccolti senza conservanti, tutti negativi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE-IVD di amplificazione real time).

Il test, partendo da 1000 µL di campione è stato eseguito utilizzando 62 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE-IVD di amplificazione real time).

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Volume di campione	Campioni	N	positivi	negativi
200 µL	Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV	30	2	28
	Urina raccolta senza conservanti negativa per il DNA di BKV	30	0	30
1000 µL	Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV	62	2	60

Tutti i campioni di urina sono risultati validi per l'analisi e sono stati confermati negativi.

Tutti i campioni di plasma sono risultati validi per l'analisi.

Nel caso in cui si sono utilizzati 200 µL di campione: ventotto (28) campioni di plasma su 30 sono stati confermati negativi per il DNA di BKV, due campioni sono risultati positivi a basso titolo (rispettivamente 50 e 70 copie/mL) ed al disotto del limite di rilevazione del test di riferimento.

Nel caso in cui si sono utilizzati 1000 µL di campione: sessanta (60) campioni di plasma su 62 sono stati confermati negativi per il DNA di BKV, due campioni sono risultati positivi a basso titolo (rispettivamente circa 5 e 55 copie/mL).

In questi test, la sensibilità diagnostica totale del saggio è risultata uguale al 97%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

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

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA, urine raccolte senza conservanti e liquido cefalorachidiano.

Plasma raccolto in EDTA

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

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA con il kit «**EXTRAblood**» seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso: partire da **200 µL** di campione, aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno all'inizio dell'estrazione, recuperare il DNA con **60 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con «**ELITe STAR**», con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI_E100S200_EL1** che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITe STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

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

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

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento «**QIASymphony® SP/AS**» e il kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**», con **versione di software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione **"Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC"** e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **500 µL**, è sempre richiesto un volume morto minimo di 100 µL. Preparare la soluzione contenente il buffer AVE ed il carrier RNA secondo le istruzioni nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione. Aggiungere alla soluzione **6 µL** di **CPE** per ciascun campione richiesto. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti la soluzione, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **85 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

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

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

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

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

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

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

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

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per BKV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "BKV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "Cy5" (AP593 è usato invece del Cy5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

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

La modalità di organizzazione di un'analisi quantitativa di 12 campioni è illustrata a titolo di esempio nella sezione precedente relativa alla procedura riferita allo strumento **7300 Real Time PCR System**.

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

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

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

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

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

Allestimento dell'amplificazione

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

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

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

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

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

3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l' **Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:

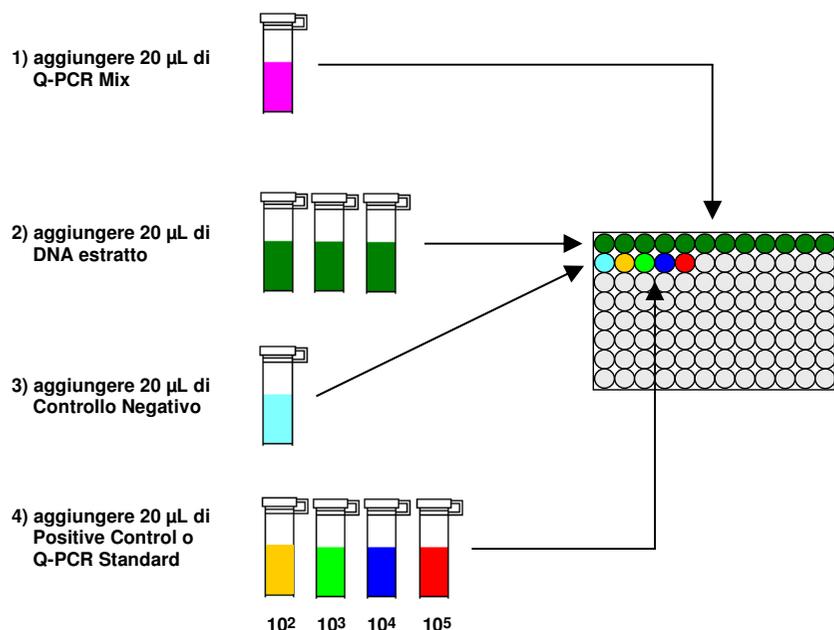
- Quando è richiesto un risultato **qualitativo** dell'analisi (rilevazione del DNA di BKV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **BKV - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **BKV - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

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

5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet** (foglio adesivo di amplificazione).
6. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per es. "anno-mese-giorno-BKV-EGSpA").

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

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



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

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

Analisi qualitativa dei risultati

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 10 copie di DNA del gene codificante il Large T antigen di BKV per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (limite di rilevazione del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni).

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

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

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

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

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

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

Analisi quantitativa dei risultati

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

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

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

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

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

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a 10 copie di DNA del gene codificante il Large T antigen di BKV per reazione di amplificazione, corrispondenti ai genomi Equivalenti per reazione (intervallo di misurazione lineare del prodotto, vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

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

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

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

Dove:

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

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

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

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

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

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti e il kit di estrazione «EXTRAblood» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 15 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti e il sistema di estrazione «ELITe STAR» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti e il sistema di estrazione «ELITe GALAXY» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Quantità}$$

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

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Quantità}$$

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

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

Calcolo dei limiti dell'intervallo di misurazione lineare

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

$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$
--

$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$

Quando si utilizza il kit di estrazione «**EXTRAblood**» con campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti la formula diventa:

Limiti dell'intervallo di misurazione lineare (gEq / mL) con «EXTRAblood»
$\text{Limite inferiore (gEq / mL)} = 15 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superiore (gEq / mL)} = 15 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
da 150 a 15.000.000 gEq / mL

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**ELITe STAR**» con campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti la formula diventa:

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

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**ELITe GALAXY**» con campioni di plasma raccolto in EDTA o di urine raccolte senza conservanti, la formula diventa:

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

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**NucliSENS® easyMAG®**» con campioni di plasma raccolto in EDTA, di urine raccolte senza conservanti o di liquido cefalorachidiano la formula diventa:

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

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

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

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

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

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie di DNA plasmidico + 500 ng di DNA genomico umano	50	49	1

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di BKV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e urine e «**ELITe GALAXY**». Il pannello è stato preparato diluendo il campione JCBK11-06 del " QCMD 2011 JC virus and BK virus DNA EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di BKV. Le concentrazioni virali variavano da 10 gEq / mL a 560 gEq / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico «**ELITe GALAXY**». e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

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

Limite di rilevazione con campioni di plasma e «ELITe GALAXY» (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	190 gEq / mL	122 gEq / mL	452 gEq / mL

Limite di rilevazione con campioni di urina e «ELITe GALAXY» (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	119 gEq / mL	75 gEq / mL	309 gEq / mL

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

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

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

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

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

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

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

A pagina 31 sono calcolati i limiti dell'intervallo di misurazione lineare espressi in gEq / mL riferiti al kit di estrazione utilizzato.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 30,4%, nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 5,2 %, nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

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

Le prove sono state eseguite utilizzando come materiale di riferimento certificato e calibrato un pannello di diluizioni di BKV entro la concentrazione limite (QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «EXTRABlood» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e «EXTRABlood»

Campione	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
JC.BK09-01	JCV-3B, 2,844	0,606	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-02	BKV-1B, 2,960	0,511	2 / 2	2,944
JC.BK09-03	JCV-2B, 2,682	0,612	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-04	Negativo, NA	NA	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-05	BKV, 2,565	0,579	2 / 2	2,185
JC.BK09-06	BKV, 2,853	0,603	2 / 2	2,544
JC.BK09-07	JCV-2B, 3,801	0,628	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-08	BKV, 3,451	0,533	2 / 2	3,364
JC.BK09-09	JCV-2B, 2,234	0,697	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-10	BKV, 4,462	0,576	2 / 2	4,254
JC.BK09-11	JCV-2B, 3,142	0,663	0 / 2	Non rilevato
JC.BK09-12	BKV, 2,898	0,493	2 / 2	2,582

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

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando come materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di BKV entro la concentrazione limite ("QCMD 2013 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con «ELITE STAR» ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente in gEq/mL.

Prove con materiale di riferimento certificato e «ELITE STAR»

Campione	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
JCBK13-01	BKV-1B, 2,581	0,430	2/2	2,727
JCBK13-02	BKV-2B, 3,651	0,400	2/2	3,925
JCBK13-03	BKV-1B, 4,272	0,358	2/2	4,312
JCBK13-04	JCV-1A, 4,394	-	0/2	-
JCBK13-05	JCV-1A, 3,504	-	0/2	-
JCBK13-06	BKV-2B, 1,651	0,599	2/2	1,734
JCBK13-07	-	-	0/2	-
JCBK13-08	BKV-2B, 4,673	0,390	2/2	4,958
JCBK13-09	JCV-1A, 2,670	-	0/2	-
JCBK13-10	JCV-2B, 3,017	-	0/2	-
JCBK13-11	JCV-3A, 2,702	-	0/2	-
JCBK13-12	JCV-3A, 3,017	-	0/2	-

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus dei saggi commerciali.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando come materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di BKV entro la concentrazione limite ("QCMD 2012 JC Virus and BK Virus Proficiency Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con «ELITE GALAXY» ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento calibrato e «ELITe GALAXY»				
Campione	Consensus dei saggi commerciali Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
JCBK12-01	JCV-1A	-	0/2	-
JCBK12-02	BKV-1B-2, 3,596	0,466	2/2	4,009
JCBK12-03	BKV-1B-1, 2,543	0,445	2/2	2,905
JCBK12-04	JCV-1A	-	0/2	-
JCBK12-05	JCV-3A	-	0/2	-
JCBK12-06	Negative	-	0/2	-
JCBK12-07	BKV-1B-2, 1,729	0,573	2/2	2,346
JCBK12-08	BKV-1B-2, 4,681	0,462	2/2	5,046
JCBK12-09	JCV-1A	-	0/2	-
JCBK12-10	JCV-3A	-	0/2	-
JCBK12-11	JCV-1A	-	0/2	-
JCBK12-12	BKV-1B-1, 5,248	0,444	2/2	5,603

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. Quattro (4) campioni sono stati qualificati all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus ± 1 deviazione standard (DS) e un campione entro ± 2 DS.

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

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

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati del gene codificante il Large T antigen di BKV ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici positivi per il DNA di BKV.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 22 campioni di plasma raccolto in EDTA e 22 campioni di urine raccolte senza conservanti, tutti positivi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «EXTRAblood» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di BKV	22	22	0
Urine raccolte senza conservanti positive per il DNA di BKV	22	22	0

La sensibilità diagnostica in queste prove è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di BKV e 30 campioni di urine positivi per il DNA di BKV. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «ELITe STAR» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di BKV	30	29	1
Urine positive per il DNA di BKV	30	30	0

Un campione di plasma ha registrato un risultato negativo. Questa discordanza può essere spiegata dal basso titolo e dalla degradazione del campione.

La sensibilità diagnostica del saggio in queste prove è risultata uguale al 98,3%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 9 campioni di plasma raccolto in EDTA da donatori normali, positivi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV, positivizzati ad un titolo vicino al limite di rivelazione per il DNA di BKV con un campione calibrato e certificato ("QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 1 campione di urine raccolte senza conservanti da donatori normali, positivo per il DNA di BKV (testato con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 30 campioni di urine raccolte senza conservanti negativi per il DNA di BKV, positivizzati ad un titolo vicino al limite di rivelazione per il DNA di BKV con un campione calibrato e certificato ("QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con «ELITe GALAXY» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di BKV	9	9	0
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di BKV	30	30	0
Urine raccolte senza conservanti positive per il DNA di BKV	1	0	1
Urine raccolte senza conservanti positivizzate per il DNA di BKV	30	29	1

La sensibilità diagnostica del saggio in queste prove (vedi due tabelle precedenti) è risultata superiore al 97%.

Specificità analitica: assenza di crossreattività con marcatori potenzialmente interferenti

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

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da BKV, tra cui quelle del genoma completo di JCV, il Poliomavirus umano più simile a BKV, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di BKV ma positivi per il DNA di altri patogeni.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento 18 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di BKV ma positivi per il DNA di altri patogeni quali JCV, HSV1 e HHV8 (testati con prodotti CE IVD di amplificazione). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «EXTRAblood» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV e positivo per il DNA di altri patogeni	18	0	18

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

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento certificato e calibrato un pannello comprensivo di campioni positivi per JCV ("QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

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

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

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di BKV.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 22 campioni di plasma raccolto in EDTA e 22 campioni di urine raccolte senza conservanti, tutti negativi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «EXTRAblood» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV	22	0	22
Urine raccolte senza conservanti negative per il DNA di BKV	22	0	22

La specificità diagnostica in queste prove è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV e 30 campioni di urine negativi per il DNA di BKV. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «ELITe STAR» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV	30	0	30
Urine negative per il DNA di BKV	30	0	30

La specificità diagnostica in queste prove è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 38 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV e 31 campioni di urine raccolte senza conservanti negativi per il DNA di BKV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «ELITe GALAXY» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di BKV	38	0	38
Urine raccolte senza conservanti negative per il DNA di BKV	31	0	31

La specificità diagnostica in queste prove è risultata uguale al 100%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

Roche cobas z 480 analyzer

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

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

Plasma raccolto in EDTA

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

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

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

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

Urine

I campioni di urina destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in contenitori senza conservanti secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) e conservati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) per un massimo di quattro ore altrimenti devono essere conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. Se possibile, evitare di congelare i campioni di urina primo getto. Il congelamento può causare la precipitazione di inibitori e la perdita di titolo del DNA.

In caso di congelamento, si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti e di conservarli a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

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

Sostanze interferenti

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

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

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

Controlli di amplificazione

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

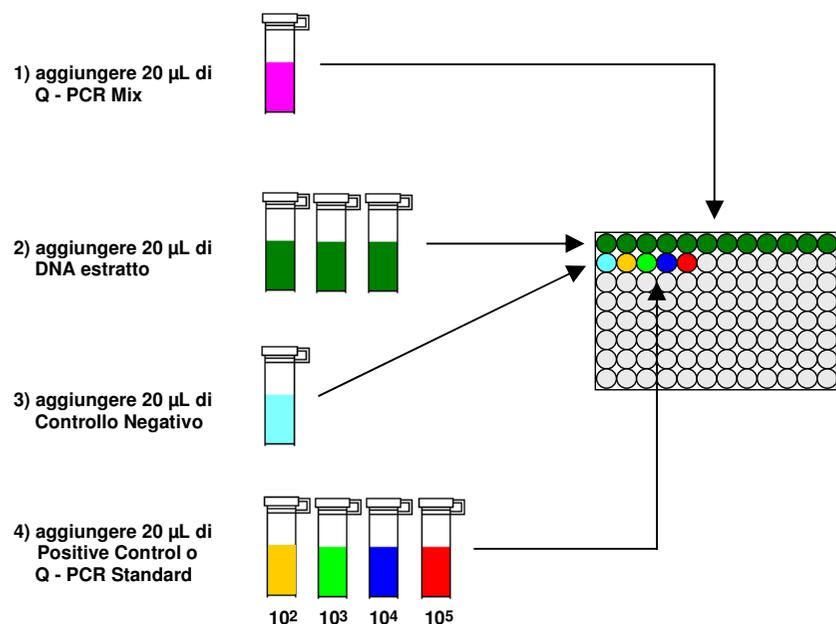
Come controllo negativo utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita nel kit) da aggiungere alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**BKV - ELITe Positive Control**» o in alternativa «**BKV – ELITe Positive Control RF**» oppure il prodotto «**BKV ELITe Standard**».

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

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

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



Analisi qualitativa dei risultati

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

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

Selezionare il gruppo di campioni su cui applicare l'analisi

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

- impostare manualmente (bottone Background) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Background)** per il detector FAM "BKV" **dal ciclo 2 al ciclo 6;**
- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector FAM "CMV" a **0,55;**
- impostare manualmente (bottone Background) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Background)** per il detector VIC "CI" **dal ciclo 6 al ciclo 10;**
- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **0,55.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Analisi quantitativa dei risultati

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

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

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

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

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

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** (finestra Analysis) sono utilizzati per calcolare i genomi Equivalenti (**gEq**) di BKV presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

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

Dove:

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

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

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

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

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

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

Formula semplificata per sangue intero, plasma e urine e MagNA Pure 24
$Nc \text{ (copie / mL)} = 25 \times \text{Quantità}$

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

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

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

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

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

Riproducibilità con materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento calibrato il pannello di «BKV Molecular "Q" Panel» (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e MagNA Pure 24				
Campione	Titolo nominale UI / mL	Titolo nominale Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
BKVMQP01-High	100000	5,000	2/2	4,936
BKVMQP01-Medium	10000	4,000	2/2	3,899
BKVMQP01-Low	1000	3,000	2/2	2,748
BKVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni positivi sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo atteso $\pm 0,5$ Log.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento QCMD 2017 BK Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) un pannello di diluizioni di BKV. Ciascun campione è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Tests with calibrated reference materials and « MagNA Pure 24 »			
Sample	Consensus conc. Log ₁₀ copie / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ copie / mL
BKVDNA17S-01	3,758	2/2	3,775
BKVDNA17S-02	3,821	2/2	3,776
BKVDNA17S-03	4,771	2/2	4,824
BKVDNA17S-04	negativo	0/2	-
BKVDNA17S-05	2,736	2/2	2,748
BKVDNA17S-06	4,734	2/2	4,833
BKVDNA17S-07	3,770	2/2	3,963
BKVDNA17S-08	4,727	2/2	4,810
BKVDNA17S-09	4,637	2/2	4,488
BKVDNA17S-10	4,874	2/2	5,090

Tutti i campioni negativi sono stati rilevati correttamente come negativi e tutti i campioni positivi sono stati correttamente rilevati come positivi con un titolo all'interno dell'intervallo definito dallo studio Consensus $\pm 0,5$ Log.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 30 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di BKV, che sono stati positivamente con il DNA di BKV aggiungendo "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC codice 14/212, Regno Unito) e 30 campioni di urine negative per il DNA di BKV, che sono state positivamente per il DNA di BKV aggiungendo "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC codice 14/212, Regno Unito).

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

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di BKV	30	30	0
Urina positivamente per il DNA di BKV	30	30	0

Tutti i campioni di plasma e urine sono risultati validi e sono stati confermati positivi per il DNA di BKV.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione alle matrici plasma e urine in questa prova è risultata uguale al 100%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 31 campioni di plasma raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di BKV e 32 campioni di urine presunti negativi per il DNA di BKV.

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

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di BKV	31	0	31
Urina presunta negativa per il DNA di BKV	32	0	32

Tutti i campioni di plasma e urina sono risultati validi in prima analisi e confermati negativi per il DNA di BKV. La specificità diagnostica del saggio in associazione alle matrici plasma e urine in questa prova è risultata uguale al 100%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP175PLD.

BIBLIOGRAFIA

- P. Ferrante et al. (1995) *J Med Vir* **47**: 219 - 225
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA, urine raccolte senza conservanti e liquido cefalorachidiano.

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

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

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

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA.

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

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

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

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

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

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato per le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici per evitare risultati errati.

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

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

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

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

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

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

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari, come le diagnosi di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI

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

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

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

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

Presenza di curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma diverso da quello degli altri campioni e degli standard o del controllo positivo.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza di un DNA bersaglio con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

Per ELITe InGenius: Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel plot PCR una amplificazione significativa: - ripetere l'amplificazione con il campione diluito in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only" o - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario in acqua ultrapura per biologia molecolare, impostando la sessione "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI

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

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti sotto licenza di LTC.

Questo prodotto è venduto ai sensi dell'accordo di autorizzazione tra ELITechGroup S.p.A. le sue affiliate e LTC. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include diritti limitati, non trasferibili, a utilizzare solo questa quantità del prodotto, esclusivamente per le attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza relativa a questo prodotto per scopi diversi da quelli sopra dichiarati, contattare Licensing Department, Life Technologies, Inc., 5791 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@LTC.com.

I reagenti per la rivelazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA, n. 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 e brevetti EP n. 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

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

ELITe MGB®, il logo ELITe MGB® ed ELITe InGenius® sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea.

«NucliSENS® easyMAG®» sono marchi registrati della bioMérieux.

«QIASymphony®» è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

«Ficoll®» è un marchio registrato di GE Healthcare.

BKV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS175PLD



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

A. Intended use

The BKV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **human Polyomavirus BK**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	Large T antigen gene	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Plasma EDTA**

› **Urine**

D. Kit content

BKV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS › CPE - Internal Control: CTRCPE | <ul style="list-style-type: none"> › BKV ELITE Standard : STD175PLD › BKV - ELITE Positive Control : CTR175PLD › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|---|---|

F. ELITE InGenius and BeGenius protocol

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 20 µL › BKV Q-PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of quantitative result cp/mL or IU/mL › Frequency of controls 15 days › Frequency of calibration 60 days |
|--|---|

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Urine	142 IU/mL – 89 cp/mL	100% 30/30*	100% 30/30*
Plasma	215 IU/mL – 165 cp/mL	100% 30/30*	97% 28/30*
Plasma (1000 µL)	44 IU/mL – 26 cp/mL	100% 55/55*	97% 60/62*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Urine	89 - 100,000,000	142– 160,000,000	1.6
Plasma	165 - 100,000,000	215 – 130,000,000-	1.3
Plasma (1000 µL)	59 – 100,000,000	100– 170,000,000	1.7

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
BKV Molecular “Q” Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014 BK Virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (9/10)*	Titre as expected value ± 1 log

*confirmed samples/ tested samples

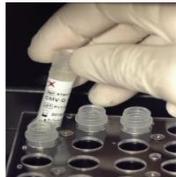
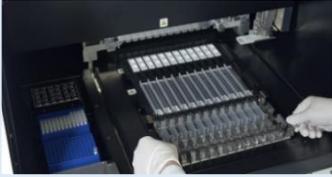
I. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

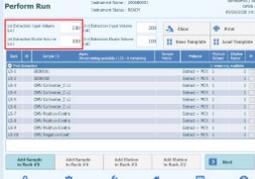
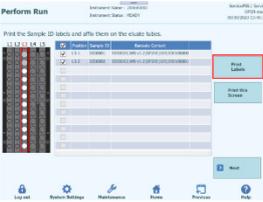
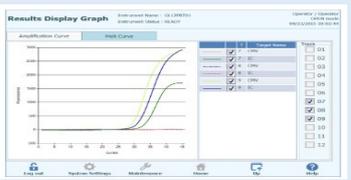
L. Procedures ELITE BeGenius

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: BKV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: BKV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the BKV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»</p> 	<p>2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active</p> 	<p>3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area</p> 
<p>7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack</p> 	<p>8. Close the door. Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

BKV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

The BKV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **human Poliovirus BKV**.
The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	Large T antigen gene	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use PCR Master Mix
- › Number of reactions per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP1000** Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS
- › **BKV ELITE Standard :** STD175PLD
- › **BKV ELITE Positive Control:** CTR175PLD
- › **CPE Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| › Sample volume | 1000 µL | › Unit of quantitative result | International Unit: IU/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › BKV Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	44 UI/mL (26 copies/mL)	100% 55/55*	97% 60/62*

**confirmed samples/ tested samples*

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: BKVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014 : BKVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (8/8)*	Titre as expected value ± 1 log

**confirmed samples/ tested samples*

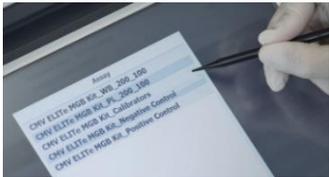
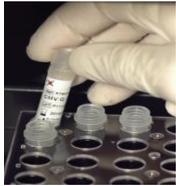
I. Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

BKV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

The «BKV ELITE MGB® Kit» product is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of human Polyomavirus BK (BKV).

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
BKV	Large T antigen gene	FAM
Internal Control	human beta globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Urine

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

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

- › **BKV ELITE Positive Control: CTR175PLD**
- › **BKV ELITE Standard: STD175PLD**
- › **CPE Internal Control: CTRCPE**
- › **easyMAG - Generic protocol 2.0.1**
- › **QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit**
- › **Molecular biology grade water**

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Plasma	-	97% (29/30)*	100% (30/30)*
	Urine	-	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Plasma	190 cp/mL - L	100% (39/39)*	100% (38/38)*
	Urine	119 cp/mL -	93.5% (29/31)*	100% (31/31)*
easyMAG - ABI	Plasma,	-	-	-
	Urine,	-	-	-
	CSF	-	-	-
QIASymphony - ABI	Plasma	-	-	-

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELiTe Star	Plasma, Urine	200 µL	700 µL	100 µL	10 µL
ELiTe Galaxy	Plasma, Urine	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	Plasma, Urine, CSF	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIA Symphony	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

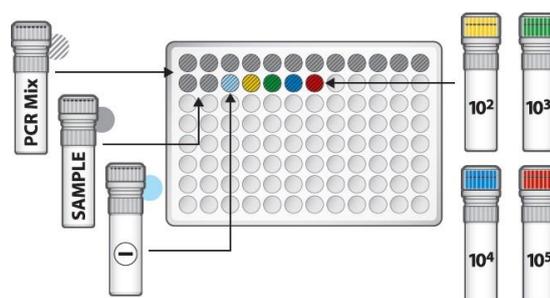
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	BKV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction.

BKV ELITE MGB® kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

The «BKV ELITE MGB® Kit» product a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **human Polyomavirus BK (BKV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
BKV	Large T antigen gene	FAM (465 – 510)
Internal Control	Human beta globin gene	VIC (540 - 580)

C. Validated matrix

- › **Urine**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

Ready to use complete reaction mixture
Number of tests per kit: 100
Freeze and thaw cycles per tube: 5

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

E. Material required not provided in the kit

- › **Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument**
- › **MagNA Pure 24 System = software 1.0**
- › **BKV - ELITE Positive Control: CTR175PLD**
BKV – ELITE Positive Control RF: CTR175PLD-R
- › **BKV ELITE Standard: STD175PLD**
- › **CPE Internal Control: CTRCPE**
- › **Molecular biology grade water**

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Plasma	10 cp/rxn	100% (30/30)*	100% (31/31)*
	Urine	10 cp/rxn	100% (30/30)*	100% (32/32)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	Urine, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments PCR instruments

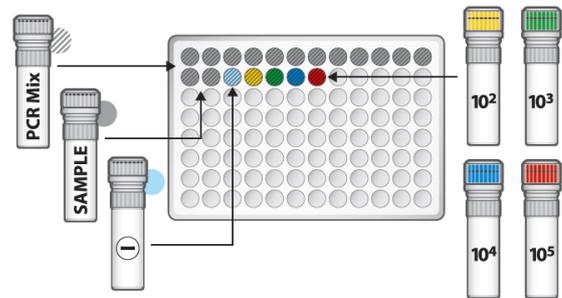
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background Fluorescence Level FAM	BKV FAM	Background Fluorescence Level VIC	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	from cycle 2 to cycle 6	0.55	from cycle 6 to cycle 10	0.55
Cobas-Z 480 PCR instruments	Urine	from cycle 2 to cycle 6	0.55	from cycle 6 to cycle 10	0.55

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The BKV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ copies/mL.