



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

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

NOTICE of CHANGE dated 22/10/2021

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«BKV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS175PLD

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Extended Use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040).*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - o *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - o *Change in Linear measuring range*
 - o *Addition of Repeatability*
 - o *Addition of Reproducibility*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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

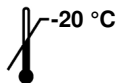


BKV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD



IVD



INHALT

VERWENDUNGSZWECK	Seite 1
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 3
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 3
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	Seite 3
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 5
ELITE INGENIUS und ELITE BEGENIUS	Seite 6
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 6
ELITE INGENIUS VERFAHREN	Seite 8
ELITE BEGENIUS VERFAHREN	Seite 14
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 21
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Seite 32
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 32
VERFAHREN	Seite 34
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 42
Roche cobas z 480 analyzer	Seite 47
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 47
VERFAHREN	Seite 48
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 53
QUELLENANGABEN	Seite 54
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 54
FEHLERBEHEBUNG	Seite 56
SYMBOLS	Seite 58
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 59

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt „BKV ELITe MGB® Kit“ ist Teil eines qualitativen und quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Polyomavirus BK (BKV)** in DNA-Proben, die aus in EDTA entnommenem Plasma, ohne Konservierungsmittel entnommenem Urin und Liquor extrahiert wurden.

BKV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD

Das Produkt ist zur Verwendung bei der Diagnose und Überwachung von BKV-Infektionen, sowie klinischen Daten des Patienten und weiteren Laborbefunden bestimmt.

TESTPRINZIPIEN

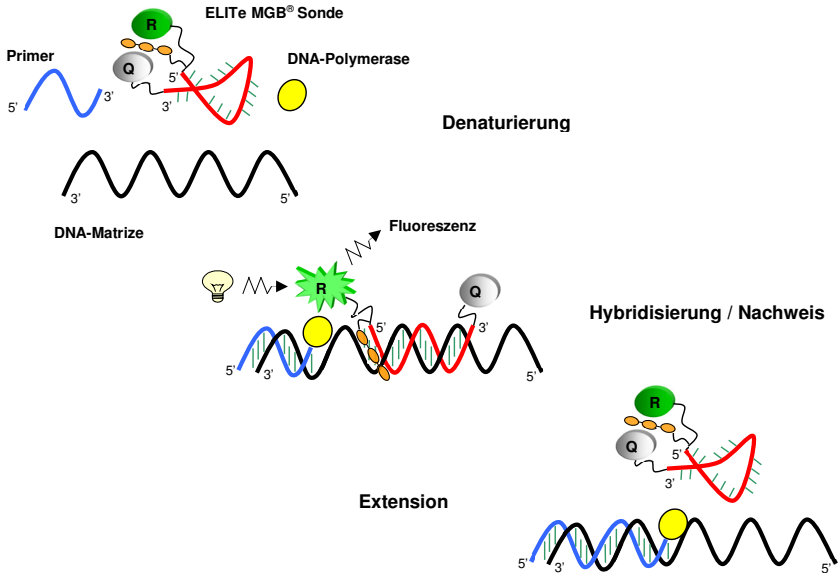
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion für die Region des **großen T-Antigen**-Gens von BKV und eine spezifische Reaktion für die Region des **humanen beta-Globin**-Gens (interne Kontrolle der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, BKV-spezifische Sonde mit ELITe MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der BKV-Amplifikationsreaktion hybridisiert. Die mit einem AP525-Fluorophor (analog zu VIC) markierte, für die interne Kontrolle spezifische Sonde mit ELITe MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion der internen Kontrolle hybridisiert. Die Fluoreszenzemission erhöht sich mit Zunahme des spezifischen Produkts der Amplifikationsreaktion und wird vom Gerät gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verarbeitung der Daten lassen sich das Vorhandensein und der Titer von BKV-DNA in der Ausgangsprobe nachweisen.

Im Anschluss an den Amplifikationslauf kann die Dissoziationskurve (Schmelzkurve) analysiert werden, um die Dissoziations-temperatur (Schmelztemperatur) zu ermitteln und das Vorhandensein der korrekten Targets zu bestätigen oder das Vorhandensein von Mutationen zu identifizieren.

Der Test ist mit den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Systemen validiert.

In der folgenden Abbildung ist der Mechanismus der Aktivierung und Fluoreszenzemission der ELITe MGB®-Technologie-Sonde zusammenfassend dargestellt. Bitte beachten Sie, dass die Sonde während des Amplifikationszyklus nicht hydrolysiert wird, damit sie für die Analyse der Dissoziationskurve verwendet werden kann.



BKV ELITE MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das Produkt „**BKV ELITE MGB® Kit**“ enthält das **gebrauchsfertige** Komplettgemisch „**BKV Q - PCR Mix**“ zur Echtzeit-Amplifikation in einer stabilisierenden Lösung, die **in vier Einweg-Teströhrchen aliquotiert wird**. Jedes Röhrchen enthält **540 µl** Lösung, die für **24 Tests** mit dem „**ELITE InGenius®**“ und „**ELITE BeGenius®**“ und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die Primer und die BKV-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für die Region des **großen T-Antigen-Gens** von BKV.

Die Primer und die spezifische Sonde für die interne Kontrolle (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit AP525-Fluorophor, analog zu VIC, und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für die **Promoter- und 5'-UTR-Region** des humanen **beta-Globin-Gens**.

Das Reaktionsgemisch enthält Puffer, Magnesiumchlorid, Triphosphatnucleotide, AP593-Fluorophor (anstelle von ROX oder CY5 verwendet) als Passivreferenz für die Fluoreszenz-Normalisierung, das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie das „Warmstart“-DNA-Polymerase-Enzym.

Das Produkt reicht aus für **96 Tests** mit „**ELITE InGenius®**“ und „**ELITE BeGenius®**“ einschließlich Standards und Kontrollen.

Das Produkt reicht aus für **100 Tests mit anderen Systemen** einschließlich Standards und Kontrollen.

IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
BKV Q - PCR Mix	komplettes Reaktionsgemisch	4 x 540 µl	-

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Laminar-Flow-Haube.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tisch-Mikrozentrifuge (12.000–14.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.
- Programmierbarer Thermostat mit optischem Fluoreszenznachweissystem 7300 Real-Time PCR System oder 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems Inc.), das gemäß den Herstelleranweisungen kalibriert ist.

SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE

Die Reagenzien für die Extraktion von DNA aus den Proben, die positive Kontrolle der Extraktion, die Positivkontrolle der Amplifikation, die bekannten DNA-Mengenstandards und die Verbrauchsmaterialien sind nicht in diesem Produkt enthalten.

Für die manuelle DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben muss das generische Produkt „**EXTRAblood**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. EXTB01), ein Kit zur Extraktion von DNA aus zellulären und nicht-zellulären Proben, verwendet werden.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät „**ELITE InGenius®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) werden die folgenden generischen Produkte benötigt: die Extraktionskartuschen „**ELITE InGenius® SP 200®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200) oder „**ELITE InGenius® SP 1000®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT033SP1000), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nucleinsäuren aus biologischen Proben „**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), „**ELITE InGenius® Waste Box®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr.

BKV ELITE MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD

F2102-000), „**ELITE InGenius® PCR Cassette**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und **300 µl Filter Tips Axygen®** (Axygen BioScience Inc., CA, USA, Art.-Nr. TF-350-L-R-S).

Für die automatische DNA-Extraktion, Amplifikation und Interpretation der Probenanalyse werden das Gerät „**ELITE InGenius®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) und die folgenden spezifischen Assay Protocols (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

- für die Kalibratoren „**BKV ELITE STD**“ oder „**BKV ELITE STD 1000 100**“,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation „**BKV ELITE PC**“ oder „**BKV ELITE PC 1000 100**“,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation „**BKV ELITE NC**“ oder „**BKV ELITE NC 1000 100**“,
- für die Probenanalyse „**BKV ELITE PL 200 100**“, „**BKV ELITE PL 1000 100**“ und „**BKV ELITE U 200 100**“.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät „**ELITE BeGenius®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) werden die folgenden generischen Produkte benötigt: die Extraktionskartuschen „**ELITE InGenius® SP 200®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nucleinsäuren aus biologischen Proben „**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), „**ELITE InGenius® Waste Box®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000), „**ELITE InGenius® PCR Cassette**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und «**1000 µl Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

Für die automatische DNA-Extraktion, Amplifikation und Interpretation der Probenanalyse werden das Gerät „**ELITE BeGenius®**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) und die folgenden spezifischen Assay Protocols (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

- für die Kalibratoren „**BKV ELITE Be STD**“
- für die Positivkontrolle der Amplifikation „**BKV ELITE Be PC**“
- für die Negativkontrolle der Amplifikation „**BKV ELITE Be NC**“
- für die Probenanalyse „**BKV ELITE Be PL 200 100**“, und „**BKV ELITE Be U 200 100**“.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben muss das generische Produkt „**ELITE STAR 200 Extraction Kit**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT011EX), ein Kit zur Extraktion von Nucleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**ELITE STAR**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT010) verwendet werden.

Für die automatische DNA-Extraktion und Vorbereitung von Mikrotiterplatten für die Amplifikation von zu analysierenden Proben muss das generische Produkt „**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT021EX), ein Kit zur Extraktion von DNA und RNA aus nicht zellulären und zellulären Proben, mit dem Gerät „**ELITE GALAXY**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT020) verwendet werden.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben müssen die generischen Produkte „**NucliSENS® easyMAG® Reagents**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), Kits zur Extraktion von Nucleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**NucliSENS® easyMAG®**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111) verwendet werden.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben werden die Produkte „**QIASymphony® DNA Mini Kit**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 931236) und „**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 37055), Kits zur Extraktion von Nucleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 9001297, 9001301) und den dazugehörigen generischen Produkten benötigt.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben werden die Produkte «**MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, ref. 07658036001), kit zur Extraktion von Nucleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät «**MagNA Pure 24 System**» (Roche, ref. 07290519001) wird ebenfalls validiert.

Als Positivkontrolle der Nucleinsäureextraktion aus nicht-zellulären Proben und als Inhibitionskontrolle muss das generische Produkt „**CPE - Internal Control**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTROPE), eine stabilisierte Lösung, die zwei Plasmid-DNAs und die genomische RNA des MS2-Phagen enthält, verwendet werden.

Beim Einsatz eines 7300 Real-Time PCR System für die DNA-Amplifikation muss das generische Produkt „**Q - PCR Microplates**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC01), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument für die DNA-Amplifikation muss das generische Produkt „**Q - PCR Microplates Fast**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC02),

Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Wenn ein cobas z 480 Analysegerät verwendet wird, ist die Verwendung eines generischen Produkts erforderlich «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, ref. 05232724001), mikrotiterplatten mit 0,3 mL Wells und selbstklebenden Verschlussfolien für die Echtzeit-Amplifikation.

Wird für die qualitative Analyse ein Nachweis von BKV-DNA benötigt, muss das Produkt „**BKV - ELITE Positive Control**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR175PLD), oder das Produkt «**BKV - ELITE Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR175PLD-R), aus Plasmid-DNA bestehende Positivkontrolle, verwendet werden.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von BKV-DNA für die quantitative Analyse benötigt, muss das Produkt „**BKV ELITE Standard**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD175PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve, verwendet werden.

Ein Umrechnungsfaktor ermöglicht es, die Ergebnisse der quantitativen Analyse in Internationalen Einheiten von BKV des "1st WHO International Standard for BK Virus DNA" (NIBSC code 14/212, Großbritannien) auszudrücken.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist ausschließlich für die *In-vitro*-Anwendung bestimmt.

Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Alle biologischen Proben sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie potenziell infektiös. Direkten Kontakt mit den biologischen Proben vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Die Materialien, die mit den biologischen Proben in Kontakt kommen, müssen vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten mit 3 % Natriumhypochlorit behandelt oder eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Alle zur Durchführung des Tests verwendeten Reagenzien und Materialien sind so zu handhaben und zu entsorgen, als wären sie potenziell infektiös. Direkten Kontakt mit den Reagenzien vermeiden. Verspritzen und Aerosolbildung vermeiden. Abfall ist unter Einhaltung angemessener Sicherheitsstandards zu handhaben und zu entsorgen. Brennbares Einwegmaterial muss verbrannt werden. Saurer und basischer Flüssigabfall muss vor der Entsorgung neutralisiert werden.

Geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe sowie Augen-/Gesichtsschutz tragen.

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind in den Arbeitsbereichen verboten.

Nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.

Restliche Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Vor Durchführung des Tests alle dem Produkt beiliegenden Anweisungen aufmerksam lesen.

Bei der Durchführung des Tests die dem Produkt beiliegenden Anweisungen befolgen.

Das Produkt nicht nach dem angegebenen Ablaufdatum verwenden.

Nur die im Produkt enthaltenen bzw. vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwenden.

Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen verwenden.

Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

Molekularbiologische Verfahren, wie die Nukleinsäureextraktion, -amplifikation und -detektion, dürfen nur von qualifiziertem und geschultem Personal durchgeführt werden, um das Risiko von fehlerhaften Ergebnissen zu vermeiden. Dies gilt insbesondere angesichts des Abbaus von in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren sowie der Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten zu beachten. Niemals ein Amplifikationsprodukt in den für die Extraktion/Vorbereitung von Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich einführen.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs müssen Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel vorhanden sein, die ausschließlich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten verwendet werden. Niemals Laborkittel, Schutzhandschuhe

oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation / den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

Die Proben dürfen ausschließlich für diese Art von Analyse verwendet werden. Proben müssen unter einer Laminar-Flow-Haube gehandhabt werden. Röhrchen, die verschiedene Proben enthalten, dürfen niemals gleichzeitig geöffnet werden. Pipetten, die für die Handhabung von Proben verwendet werden, dürfen nur für diesen spezifischen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Die Reagenzien müssen unter einer Laminar-Flow-Haube gehandhabt werden. Die für die Amplifikation benötigten Reagenzien müssen so vorbereitet werden, dass sie in einem einzelnen Lauf verwendet werden können. Die Pipetten, die für die Handhabung der Reagenzien verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Amplifikationsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die Pipetten, die für die Handhabung von Amplifikationsprodukten verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden.

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der **BKV Q - PCR Mix** muss bei -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

Der **BKV Q - PCR Mix** darf maximal **fünf Mal** eingefroren und wieder aufgetaut werden; weitere Gefrier- und Auftauzyklen können zu einem Verlust der Produktleistung führen.

ELITE InGenius® und ELITE BeGenius®

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden:

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die Proben vor dem Einfrieren in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITE InGenius®** und der **ELITE InGenius® Software**, Version **1.3** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **BKV ELITE_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE** interne Kontrolle bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITE BeGenius®** und der **ELITE BeGenius® Software**, Version **2.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **BKV ELITE_Be_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE** interne Kontrolle bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärrohrcchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 1000 µl Plasma mit dem **ELITE InGenius®** und der **ELITE InGenius® Software**, Version **1.3** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **BKV ELITE_PL_1000_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 1000 µl Probe, fügt die **CPE** interne Kontrolle bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Das Primärrohrcchchen kann NICHT zusammen mit dem Assay Protocol **BKV ELITE_PL_1000_100** verwendet werden.

Ohne Konservierungsmittel entnommener Urin

Die Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius SP 200 Consumable Set“ enthaltene Ultraschallröhrchen überführt werden.

Falls möglich, das Einfrieren von Morgenurinproben vermeiden. Das Einfrieren kann die Fällung von Inhibitoren und den Verlust des DNA-Titers verursachen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus Urin mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version **1.3** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **BKV ELITe_U_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE** interne Kontrolle bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus Urin mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **BKV ELITe_Be_U_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE** interne Kontrolle bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Störende Substanzen

Die Probe darf kein Heparin enthalten, um das Problem einer Inhibition und die Möglichkeit häufiger ungültiger Ergebnisse zu verhindern.

Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch antivirale, antibiotische, chemotherapeutische oder immun supprimierende Medikamente vor.

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve und die Amplifikationskontrollen für jede Amplifikationsreagenzcharge zu generieren und zu genehmigen:

als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **BKV ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll „**BKV ELITe STD**“ oder „**BKV ELITe STD_1000_100**“, für ELITe InGenius, und "BKV ELITe_Be STD" für ELITe BeGenius, zu verwenden.

als Amplifikations-Positivkontrolle ist **BKV - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**BKV ELITe PC**“ oder „**BKV ELITe PC_1000_100**“ für ELITe InGenius, und "BKV ELITe_Be_PC" für ELITe BeGenius, zu verwenden.

als Amplifikations-Negativkontrolle ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**BKV ELITe NC**“ oder „**BKV ELITe NC_1000_100**“ für ELITe InGenius, und "BKV ELITe_Be_NC" für ELITe BeGenius, zu verwenden.

Hinweis: **ELITe InGenius** mit **ELITe InGenius Software** ermöglicht die Generierung der Kalibrationskurve und die Validierung der Amplifikationskontrollen für jede in der Datenbank zu speichernde Amplifikationsreagenzcharge.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kalibrationskurven laufen nach **60 Tagen** ab. Nach dem Ablaufdatum muss das Kalibratorset erneut verarbeitet werden.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kontrollergebnisse der Amplifikationsvalidierung laufen nach **15 Tagen** ab. Nach dem Ablaufdatum müssen die Positiv- und die Negativkontrolle erneut verarbeitet werden.

Die Kalibratoren und Amplifikationskontrollen müssen neu getestet werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- eine neue Charge von Amplifikationsreagenzien wird gestartet,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- eine größere Wartung wird am **ELITe InGenius**-Gerät durchgeführt.

Qualitätskontrollen

Externe Qualitätskontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen anzuwenden. Externe Qualitätskontrollen sind auf dem Markt erhältlich.

ELITe InGenius® VERFAHREN

Das beim Gebrauch des „**BKV ELITe MGB® Kit**“ mit dem System **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

- Prüfung der Systembereitschaft
- Einrichtung des Laufs
- Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Probenanalyseaufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:

- **ELITe InGenius™** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- prüfen, ob die Kalibratoren (**BKV Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und dass sie noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**BKV - Positive Control**, **BKV Negative Control**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Control“ (Kontrolle) überprüft werden;
- den Typ des Laufs auswählen und den Lauf einrichten; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITeTechGroup bereitgestellten Assay Protocols verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits, Matrizes und dem Gerät ELITe InGenius validiert.

Die für das „**BKV ELITe MGB® Kit**“ verfügbaren Assay Protocols sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay Protocols für „BKV ELITe MGB® Kit“			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
BKV ELITe_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
BKV ELITe_PL_1000_100	Plasma	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 1000 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
BKV ELITe_U_200_100	Urin	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

Falls das betreffende Assay Protocol nicht im System vorhanden ist, wenden Sie sich an Ihren ELITeTechGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

Das **BKV ELITe MGB® Kit** zusammen mit **ELITe InGenius** kann zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- A. Integrierter Lauf (Extraktion + PCR),
- B. Amplifikationslauf (nur PCR),
- C. Kalibrationslauf (nur PCR),
- D. Amplifikationslauf für die Positiv- und Negativkontrolle (nur PCR).

Alle für den Lauf benötigten Parameter sind in dem auf dem Gerät verfügbaren Assay Protocol enthalten und werden bei Auswahl des Assay Protocol automatisch abgerufen.

Hinweis: Das ELITE InGenius System kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Informationen gesendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlauftypen sind nachfolgend beschrieben.

A. Integrierter Lauf

Zum Einrichten eines integrierten Laufs führen Sie die folgenden Schritte durch, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche der Software angegeben:

1. Die BKV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Die CPE-Röhrchen für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
6. Das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (d.h. BKV ELITE_PL_200_100).
7. Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) das Protokoll „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) angezeigt wird.
8. Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
 - wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen; das Primärröhrchen kann erst ab 200 µl Probe verwendet werden;
 - wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Sonication Tube“ (Ultraschallröhrchen) auswählen.
 Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. CPE und BKV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die PCR-Kassette („PCR Cassette“), die Extraktionskartuschen „ELITE InGenius SP 200“, alle benötigten Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden Proben in die unter Schritt 8 angegebenen Positionen laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITE InGenius** es, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR-Mix kann für 5 unabhängige Arbeitssitzungen von je 3 Stunden verwendet werden oder bis zu 3 aufeinanderfolgende Arbeitssitzungen von je 3 Stunden im Kühlblock aufbewahrt werden. Mischen Sie vorsichtig und schleudern Sie den Inhalt 5 Sekunden lang, bevor Sie die nächste Sitzung beginnen.

B. Amplifikationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen BKV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3. Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
4. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
5. Das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (d.h. BKV ELITE_PL_200_100).
6. In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
7. Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „ExtraTube (bottom row)“ (Zusatzröhrchen (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Den BKV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Gerätetür schließen.
12. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITE InGenius** es, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR-Mix kann für 5 unabhängige Arbeitssitzungen von je 3 Stunden verwendet werden oder bis zu 3 aufeinanderfolgende Arbeitssitzungen von je 3 Stunden im Kühlblock aufbewahrt werden. Mischen Sie vorsichtig und schleudern Sie den Inhalt 5 Sekunden lang, bevor Sie die nächste Sitzung beginnen.

C. Kalibrationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Kalibrationslaufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. Die BKV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. BKV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: BKV Q - PCR Standards 10², Cal2: BKV Q - PCR Standards 10³, Cal3: BKV Q - PCR Standards 10⁴, Cal4: BKV Q - PCR Standards 10⁵). Jedes Röhrchen reicht aus für 8 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw.

- 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
- Beginnend mit der relevanten Spur das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (BKV ELITe STD) und die Chargennummer und das Ablaufdatum für den BKV Q - PCR Standard eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Den BKV Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Die Kalibrorröhrchen und die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) auf das Gerät laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren. Darauf achten, dass die PCR Standard-Flüssigkeiten in die richtigen Spuren eingesetzt werden, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben.
 - Die Gerätetür schließen.
 - Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITe InGenius** es, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs können die übrigen Kalibratoren aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR-Mix kann für 5 unabhängige Arbeitssitzungen von je 3 Stunden verwendet werden oder bis zu 3 aufeinanderfolgende Arbeitssitzungen von je 3 Stunden im Kühlblock aufbewahrt werden. Mischen Sie vorsichtig und schleudern Sie den Inhalt 5 Sekunden lang, bevor Sie die nächste Sitzung beginnen.

D. Amplifikationslauf für Positivkontrolle und Negativkontrolle

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs für die Positivkontrolle und Negativkontrolle wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen BKV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Das Produkt BKV - Positive Control für die Amplifikation der Positivkontrolle verwenden. Ein Röhrchen auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
- Wählen Sie für die Positivkontrolle BKV ELITe_PC oder BKV ELITe_PC_1000_100 und geben Sie die Chargennummer und das Verfallsdatum für die BKV-Positivkontrolle ein.
- Wählen Sie für die Negativkontrolle BKV ELITe_NC oder BKV ELITe_NC_1000_100 und geben Sie die Chargennummer und das Verfallsdatum des molekularbiologischen Wassers ein.
- Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den BKV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Die PCR-Amplifikationskassette, die Positivkontrolle und/oder die Negativkontrolle gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITe InGenius** es, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Die Positivkontrolle und Negativkontrolle muss als Amplifikationskontrollen ausgeführt werden, um die Regelkarte („Control Chart“) einzurichten. Zum Einrichten der Karte werden vier (4) Ergebnisse der Positivkontrolle und Negativkontrolle aus 4 verschiedenen Läufen benötigt. Anschließend werden die Werte der Positivkontrolle und Negativkontrolle zur Überwachung der Amplifikationsstufe herangezogen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige Positivkontrolle aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR-Mix kann für 5 unabhängige Arbeitssitzungen von je 3 Stunden verwendet werden oder bis zu 3 aufeinanderfolgende Arbeitssitzungen von je 3 Stunden im Kühlblock aufbewahrt werden. Mischen Sie vorsichtig und schleudern Sie den Inhalt 5 Sekunden lang, bevor Sie die nächste Sitzung beginnen.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/Kalibrator-/Kontrollergebnisse sowie die Informationen zum Lauf angezeigt. Über diesen Bildschirm kann das Ergebnis genehmigt und können die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden.

Hinweis: Ausführliche Informationen sind dem Benutzerhandbuch des Geräts **ELITe InGenius** zu entnehmen.

ELITe InGenius generiert die Ergebnisse mithilfe des „BKV ELITe MGB® Kit“ und geht dabei folgendermaßen vor:

- Validierung der Kalibrationskurve,
- Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und die Negativkontrolle,
- Validierung der Probenergebnisse,
- Ausgabe des Probenergebnisberichts.

A. Validierung der Kalibrationskurve

Die von der spezifischen BKV-Sonde („BKV“) in den Kalibrator-Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay Protocol „BKV ELITe STD“ und „BKV ELITe STD_1000_100“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifische Kalibrationskurve wird in der Datenbank gespeichert, nachdem der „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die Genehmigung dazu erteilt hat.

Die für die Amplifikationsreagenziencharge spezifische Kalibrationskurve läuft nach 60 Tagen ab.

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve für die verwendete Amplifikationsreagenzcharge zu generieren und zu genehmigen. Die Verfügbarkeit von Kalibrationskurven-Ergebnissen mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Calibration“ (Kalibration) der ELITe InGenius Software angezeigt.

Hinweis: Erfüllt die Kalibrationskurve nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „not passed“ (nicht bestanden) im Menü „Calibration“ angezeigt und die Kurve kann nicht genehmigt werden. Die Kalibrator-Amplifikationsreaktionen müssen in diesem Fall wiederholt werden.

Hinweis: Wird der Kalibrationskurve zusammen mit Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, dann ist der gesamte Lauf ungültig und die Amplifikation aller Proben muss wiederholt werden.

B. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und die Negativkontrolle

Die von der spezifischen BKV-Sonde („BKV“) in den Amplifikationsreaktionen der Positiv- und Negativkontrolle ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den in den Assay Protocols „BKV ELITe_PC“, „BKV ELITe_PC_1000_100“, „BKV ELITe_NC“ und „BKV ELITe_NC_1000_100“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und die Negativkontrolle werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert, nachdem der „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die Genehmigung dazu erteilt hat.

Die für die Amplifikationsreagenziencharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und die Negativkontrolle laufen nach 15 Tagen ab.

Vor der Analyse von Proben und nach der Genehmigung die Kalibrationskurve ist es unbedingt erforderlich, für die verwendete Amplifikationsreagenzcharge die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und Negativkontrolle zu generieren und zu genehmigen. Die Verfügbarkeit von Ergebnissen des Amplifikationslaufs für die Positiv- und Negativkontrolle mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) der ELITe InGenius Software angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und Negativkontrolle, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

Hinweis: Erfüllt das Ergebnis der Positiv- bzw. Negativkontrolle nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „not passed“ (nicht bestanden) im Menü „Controls“ angezeigt und das Ergebnis kann nicht genehmigt werden. Die Amplifikationsreaktion der Positiv- bzw. Negativkontrolle muss wiederholt werden.

Hinweis: Wird die Positiv- bzw. Negativkontrolle zusammen mit Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, dann ist der gesamte Lauf ungültig und die Amplifikation aller Proben muss wiederholt werden.

C. Validierung der Probenergebnisse

Die von der spezifischen BKV-Sonde („BKV“) und der spezifischen Sonde für die interne Kontrolle („IC“) in der jeweiligen Proben-Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay Protocol enthaltenen Parametern interpretiert.

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve und die Amplifikationskontrollen für die verwendete Reagenziencharge zu generieren und zu genehmigen. Es wird empfohlen, die Positiv- und die Negativkontrolle zusammen mit den Kalibratoren auszuführen. Dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Die Verfügbarkeit einer Kalibrationskurve sowie von Ergebnissen des Amplifikationslaufs für die Positiv- und Negativkontrolle mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird in den Fenstern „Calibration“ (Kalibration) und „Control“ (Kontrolle) der ELITe InGenius Software angezeigt.

Die Ergebnisse sind in den vom Gerät generierten Berichten beschrieben („Result Display“ (Ergebnisanzeige)).

Der Probenlauf ist gültig, wenn die drei in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen erfüllt sind.

1) Kalibrationskurve	Status
BKV Q - PCR Standard	APPROVED (Genehmigt)
2) Positivkontrolle	Status
BKV - Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
3) Negativkontrolle	Status
BKV - Negative Control	APPROVED (Genehmigt)

Die **ELITe InGenius Software** berechnet die Viruslast für jede Probe automatisch gemäß dem Algorithmus der Software und den Parametern des Assay Protocol.

Das System berechnet die Viruslast für jede Probe automatisch. Das Ergebnis wird wie im Assay Protocol festgelegt entweder in „Kopien/ml“ oder „IU/ml“ angegeben.

Die möglichen Ergebnismeldungen einer Probe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Ergebnis des Probenlaufs	Interpretation
BKV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL (BKV: DNA erkannt, Menge gleich XXX Kopien/ml bzw. IU/ml)	BKV-DNA erkannt innerhalb des Messbereich des Tests, Menge wie angezeigt.
BKV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL (BKV: DNA erkannt, Menge unter LLoQ Kopien/ml bzw. IU/ml)	BKV-DNA erkannt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Tests
BKV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL (BKV: DNA erkannt, Menge über ULoQ Kopien/ml bzw. IU/ml)	BKV-DNA erkannt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Tests
BKV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU / mL (BKV: DNA nicht erkannt oder unter LoD Kopien/ml bzw. IU/ml)	BKV-DNA nicht erkannt oder unterhalb der Nachweisgrenze des Tests

Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	Ungültiges Testergebnis aufgrund von fehlerhafter interner Kontrolle (falsche Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors).
--	---

Nicht für die Analyse geeignete Proben werden von der **ELITe InGenius Software** als „Invalid - Retest Sample“ (Ungültig - Probe erneut testen) ausgegeben. In diesem Fall wurde die interne Kontroll-DNA aufgrund möglicher Probleme beim Amplifikations- oder Extraktionsschritt nicht erkannt (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Verschleppung von Inhibitoren im Eluat), die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können.

Wenn das Eluatvolumen ausreicht, kann die extrahierte Probe mithilfe eines Amplifikationslaufs im Modus „PCR Only“ (nur PCR) erneut getestet werden. Ist auch das zweite Ergebnis ungültig, muss die Probe beginnend mit der Extraktion eines neuen Aliquots im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) erneut getestet werden.

Für die Analyse geeignete Proben, bei denen keine BKV-DNA nachgewiesen werden konnte, werden mit der Meldung „BKV: DNA Not Detected or below LoD“ (BKV: DNA nicht erkannt oder unterhalb der Nachweisgrenze) ausgegeben. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die BKV-DNA bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden ist (siehe „Leistungsmerkmale“).

Hinweis: Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse des Probenlaufs werden in der Datenbank gespeichert und können, falls gültig, vom „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche unter „Result Display“ (Ergebnisanzeige) genehmigt werden. Über das Fenster „Result Display“ können die Ergebnisse des Probenlaufs als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ (Spurbericht) ausgedruckt und gespeichert werden.

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

Die Probenergebnisse werden in der Datenbank gespeichert und können als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ exportiert werden.

Der „Sample Report“ zeigt die Details eines Probenlaufs sortiert nach Proben-ID (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Details eines Probenlaufs nach ausgewählter Spur an.

Der „Sample Report“ und der „Track Report“ können ausgedruckt und von autorisiertem Personal unterschrieben werden.

ELITe BeGenius® VERFAHREN

Einrichtung des Laufs

Das **HHV6 ELITe MGB Kit** kann zusammen mit **ELITe BeGenius** zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- A. Probenlauf (EXTR + PCR),
- B. Amplifikationslauf (nur PCR),
- C. Kalibrationslauf (nur PCR),
- D. Lauf für Positiv- und Negativkontrolle (nur PCR).

Alle für den Lauf benötigten Parameter sind in dem auf dem Gerät verfügbaren Assay Protocol enthalten und werden bei Auswahl des Assay Protocol automatisch abgerufen.

Hinweis: Das System ELITe BeGenius kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Informationen geladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlaufstypen sind nachfolgend beschrieben.

A. Probenlauf

Gehen Sie zum Einrichten des integrierten Laufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der **grafischen Benutzeroberfläche**:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HHV6 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrchen auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Die Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
5. Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
6. Die Proben ab dem Probenrack in L5 in den Kühlbereich laden.
7. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

Hinweis: Beim Laden von Sekundärröhrchen „2-ml-Röhrchen“ angeben. Bei Sekundärröhrchen ohne Barcode die Proben-ID manuell eingeben.

8. Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und extrahiertes Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
9. Das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. HHV6 ELITE_Be_WB_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Bei Durchführung einer zweiten Extraktion die Schritte 6–9 wiederholen und dafür das L4-Probenrack verwenden.
11. Die barcodierten Eluatröhrchen ab dem L3-Elutionsrack in den Kühlbereich laden.

Hinweis: Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit etikettiert werden.

12. Das Elutionsrack L3 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Schritte 11 und 12 wiederholen und dafür das Reagenz-/Elutionsrack L2 verwenden.
14. CPE und HHV6 Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
15. Das Reagenzienrack L1 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
16. Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
17. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
18. Das Extraktionsrack mit den Extraktionskartuschen „ELITE InGenius SP 200“ und den für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
19. Die Gerätetür schließen.
20. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITE BeGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 7 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

B. Amplifikationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs mit eluierten Proben wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HHV6 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR)
5. Die Proben ab dem Elutionsrack in L3 in den Kühlbereich laden.
6. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
7. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
8. Das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HHV6 ELITE_Be_WB_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. HHV6 Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
10. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Die Gerätetür schließen.
14. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITE BeGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs muss die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

C. Kalibrationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Kalibrationslaufs mit den Q-PCR Standards wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HHV6 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Die HHV6 Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: HHV6 Q-PCR Standards 10², Cal2: HHV6 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HHV6 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HHV6 Q-PCR Standards 10⁵). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang

herunterzentrifugieren.

- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR)
- Die Kalibratorröhrchen in das L3-Elutionsrack laden.
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
- Das zu verwendende Assay Protocol „HHV6 ELITE_Be_STD“ in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- HHV6 Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
- Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITE BeGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs können die übrigen Kalibratoren aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der Q-PCR-Standards vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs muss die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2225 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,3005 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,0623 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,0557 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse: 183 IU/ml ausgegeben werden.

Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde festgesetzt auf die höchste getestete Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0678 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und -0,0303 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis -0,2982 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und -0,3632 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse: 25.000.000 IU/ml ausgegeben werden.

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für in EDTA entnommenes Vollblut wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 27 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Bei Plasma:

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit in EDTA gesammelten Plasmaproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des

Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,994 bei **ELITE InGenius** und 0,998 bei **ELITE BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,1399 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,2706 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = -0,1976 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,2210 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml: 145 IU/ml ausgegeben werden.

Die obere Quantifizierungsgrenze (ULoQ) wurde festgesetzt auf die höchste Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0306 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,0576 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,0310 log IU/ml bei **ELITE InGenius** und 0,3674 log IU/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml: 25.000.000 IU/ml ausgegeben werden.

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für in EDTA entnommenes Plasma wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 27 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der mit dem Produkt HHV6 ELITE MGB Kit in Kombination mit den Systemen **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von in EDTA entnommenen Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 549 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1830 IU/ml) mit zertifiziertem HHV6-Referenzmaterial (1st WHO International Standard for HHV-6B virus DNA) dotiert waren.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Wiederholpräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITE InGenius, Charge U0421-043								
Probe	HHV6				Interne Kontrolle			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/7	-	-	-	24/24	23,59	0,24	1,03
3 x LoD	8/8	34,79	0,40	1,14				
10 x LoD	8/8	33,06	0,24	0,74				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITE InGenius, Charge U0421-043								
Probe	HHV6				Interne Kontrolle			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/15	-	-	-	47/47	23,73	0,30	1,26
3 x LoD	16/16	34,67	0,48	1,37				
10 x LoD	16/16	32,87	0,29	0,89				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die HHV6-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,4 % bei HHV6 und 1,3 % bei der internen Kontrolle nicht überstiegen.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit

demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITe BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Wiederholpräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITe BeGenius** erkannte der Assay die HHV6-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,2 % bei HHV6 und 2 % bei der internen Kontrolle nicht überstiegen.

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt HHV6 ELITe MGB Kit in Kombination mit den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 549 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1830 IU/ml) mit zertifiziertem HHV6-Referenzmaterial (1st WHO International Standard for HHV-6B virus DNA) dotiert waren.

Die geräteübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITe InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch zwei verschiedene Bediener in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, an zwei Tagen mit zwei verschiedenen Geräten bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITe InGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die chargenübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITe InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, mit zwei verschiedenen Chargen und mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITe InGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITe InGenius** erkannte der Assay die HHV6-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,8 % bei HHV6 und 1,6 % bei der internen Kontrolle nicht überstiegen.

Die geräteübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITe BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch zwei verschiedene Bediener in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, an zwei Tagen mit zwei verschiedenen Geräten bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITe BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die chargenübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITe BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, mit zwei verschiedenen Chargen und mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITe BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITe BeGenius** erkannte der Assay die HHV6-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 2,6 % bei HHV6 und 2,8 % bei der internen Kontrolle nicht überstiegen.

Lauf für die Positivkontrolle und Negativkontrolle

Gehen Sie zum Einrichten des Laufs für die Positivkontrolle und Negativkontrolle wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhren HHV6 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhren

reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

2. Das Produkt HHV6 - ELITe Positive Control für die Amplifikation der Positivkontrolle auftauen. Jedes Röhren reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (wie Negativkontrolle) in ein Elutionsröhren (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
6. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR)
7. Die Röhren für die Positiv- und Negativkontrolle in das Elutionsrack L3 laden.
8. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
10. Das zu verwendende Assay Protocol „HHV6 ELITe_Be_PC“ und „HHV6 ELITe_Be_NC“ in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. HHV6 Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
12. Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Die Spitzenstände in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
14. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
15. Die Gerätetür schließen.
16. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITe BeGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige Positivkontrolle aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der Positivkontrollen vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/Kalibrator-/Kontrollergebnisse sowie die Informationen zum Lauf angezeigt. Über diesen Bildschirm kann das Ergebnis genehmigt und können die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden.

ELITe BeGenius generiert Ergebnisse mithilfe des HHV6 ELITe MGB Kit und geht dabei folgendermaßen vor:

- A. Validierung der Kalibrationskurve,
- B. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positiv- und die Negativkontrolle,
- C. Validierung der Probenergebnisse,
- D. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

Hinweis: Einzelheiten sind den entsprechenden Kapiteln des **ELITE InGenius** Handbuchs zu entnehmen

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) der DNA-Amplifikation, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien / 20 µl in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng / 20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 24 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. auf zwei verschiedenen Geräten durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA	24	24	0

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit verschiedenen Matrices und **ELITE InGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von BKV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for BKV virus DNA“ (NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) in BKV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus sechs Punkten rund um die Grenzkonzentration. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Laufeinrichtung, Extraktion von Nucleinsäuren, Echtzeit-Amplifikation und Dateninterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse für jede Matrix sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze mit ELITE InGenius (IU/ml)				
Probenvolumen	Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
			Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
200 µl	Urin	142 IU/ml	110 IU/ml	222 IU/ml
	Plasma	215 IU/ml	168 IU/ml	319 IU/ml
1000 µl	Plasma	44 IU/ml	35 IU/ml	64 IU/ml

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 19 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze mit ELITE InGenius (Kopien/ml)				
Probenvolumen	Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
			Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
200 µl	Urin	89 Kopien/ml	69 Kopien/ml	139 Kopien/ml
	Plasma	165 Kopien/ml	129 Kopien/ml	245 Kopien/ml
1000 µl	Plasma	26 Kopien/ml	21 Kopien/ml	38 Kopien/ml

Der berechnete LoD-Wert wurde in Verbindung mit **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verifiziert, indem 20 Replikate von in EDTA gesammelten Plasmaproben und 20 Replikate von Urinproben ohne Konservierungsstoffe getestet wurden, die mit BKV-zertifiziertem Referenzmaterial (1. internationaler WHO-Standard, NIBSC) in der angegebenen Konzentration dotiert waren. Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten ein positives Ergebnis gemäß CLSI-Standard EP17-A liefern.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasma- und Urinproben und ELITE InGenius					
Sample	Titer	Target	N	Positive	Negative
in EDTA gesammelten Plasmaproben	215 IU / mL	BKV	20	18	2
Urinproben ohne Konservierungsstoffe getestet	142 IU / mL	BKV	20	20	0

Nachweisgrenze für Plasma- und Urinproben und ELITE BeGenius					
Sample	Titer	Target	N	Positive	Negative
in EDTA gesammelten Plasmaproben	215 IU / mL	BKV	20	20	0
Urinproben ohne Konservierungsstoffe getestet	142 IU / mL	BKV	20	19	1

Der LoD-Wert für das BKV-Target wurde mit 215 IE/ml für in EDTA gesammeltes Plasma und mit 142 IE/ml für ohne Konservierungsmittel gesammelten Urin bestätigt.

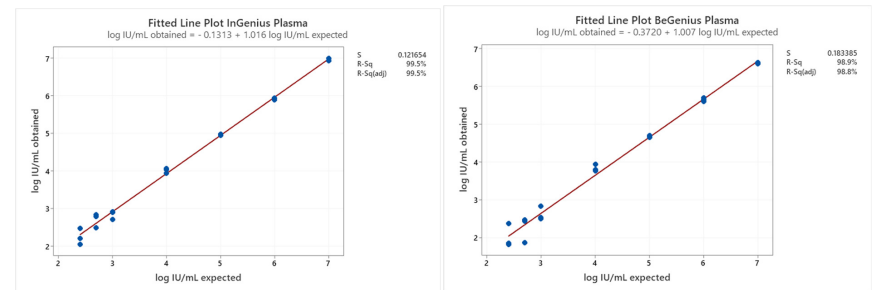
Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen

Der lineare Messbereich des BKV ELITE MGB® Kits in Verbindung mit Plasma und Urin (Probenvolumen 200 µL) sowie **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** wurde anhand eines Panels von BKV-Verdünnungen überprüft. Das Panel wurde durch Verdünnung des "1. internationalen WHO-Standards für BKV-Virus-DNA" (NIBSC-Code 14/212, Vereinigtes Königreich) in BKV-DNA-negativer Matrix hergestellt. Das Panel bestand aus acht Verdünnungspunkten (1-Log-Verdünnungsstufen) von 107 bis 102 IU / mL. Jede Probe des Panels wurde in 3 Wiederholungen getestet. Die Analyse der erhaltenen Daten, die mittels linearer Regression durchgeführt wurde, zeigte, dass der Test für alle Verdünnungsstufen eine lineare Reaktion zeigt.

Für Plasma (Probenvolumen 200 µL):

Die Analyse der erhaltenen Daten, die mittels linearer Regressionsanalyse durchgeführt wurde, zeigte, dass der Assay in Verbindung mit Plasma, das in EDTA-Proben gesammelt wurde, eine lineare Reaktion für alle Verdünnungen mit einem quadratischen Korrelationskoeffizienten (R²) von 0,995 für **ELITE InGenius** und 0,989 für **ELITE BeGenius** zeigt.

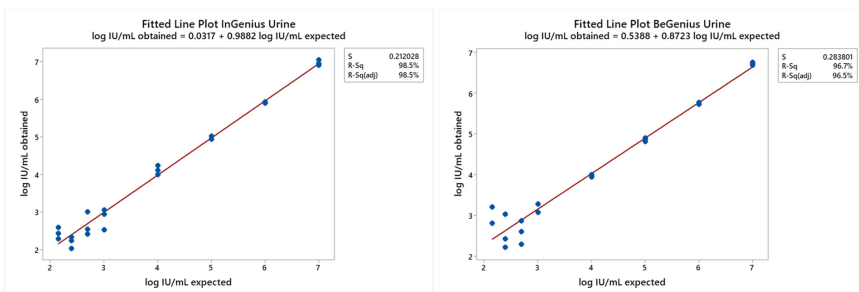
Die Ergebnisse sind in den folgenden Schaubildern dargestellt.



Für Urin (Probenvolumen 200 µL):

Die Analyse der erhaltenen Daten, die mittels linearer Regressionsanalyse durchgeführt wurde, zeigte, dass der Test in Verbindung mit Urinproben ohne Konservierungsstoffe eine lineare Reaktion für alle Verdünnungen mit einem quadratischen Korrelationskoeffizienten (R²) von 0,985 für **ELITE InGenius** und 0,967 für **ELITE BeGenius** zeigt.

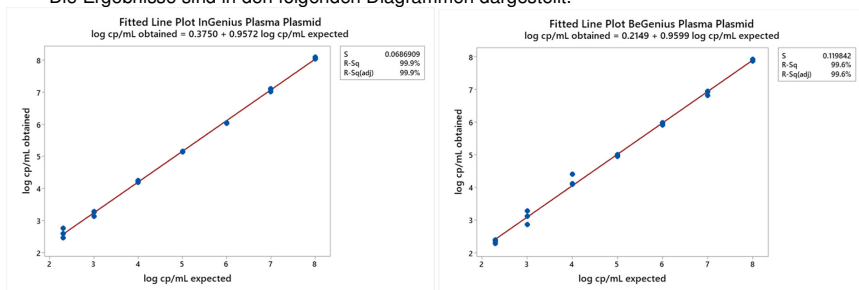
Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen dargestellt.



Der lineare Messbereich des BKV ELITE MGB® Kits, der in Verbindung mit Plasma (Probenvolumen 200 µL) und **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verwendet wird, wurde anhand eines Panels, das durch Verdünnung einer Plasmid-DNA, die das BKV-Amplifikationsprodukt enthält, in einer BKV-DNA-negativen Matrix hergestellt wurde, in einem breiteren Konzentrationsbereich getestet. Das Panel bestand aus acht Verdünnungspunkten (1-Log-Verdünnungsschritte) von 108 bis 102 Kopien / mL. Jede Probe des Panels wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten, die mittels linearer Regressionsanalyse durchgeführt wurde, zeigte, dass der Test in Verbindung mit Plasmaproben eine lineare Reaktion für alle Verdünnungen mit einem quadratischen Korrelationskoeffizienten (R²) von 0,999 für **ELITE InGenius** und 0,996 für **ELITE BeGenius** zeigt.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen dargestellt.



Für Plasma (Probenvolumen 200 µL):

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde auf 215 IE/ml festgelegt, die LoD-Konzentration, die quantitative Ergebnisse präzise (Standardabweichung gleich 0,2767 Log IE/ml für **ELITE InGenius** und 0,3012 Log IE/ml für **ELITE BeGenius**) und genau (Abweichung gleich -0,0098 Log IE/ml für **ELITE InGenius** und 0,2569 Log IE/ml für **ELITE BeGenius**) liefert.

Die obere Grenze der Quantifizierung (ULOQ) wurde auf 130.000.000 IE / mL festgelegt, die höchste getestete Konzentration, die quantitative Ergebnisse präzise (Standardabweichung gleich 0,2159 Log IE / mL für **ELITE InGenius** und 0,3357 Log IE / mL für **ELITE BeGenius**) und genau (Bias gleich -0,1606 Log IE / mL für **ELITE InGenius** und -0,4406 Log IE / mL für **ELITE BeGenius**) liefert.

Der lineare Messbereich als Kopien / mL für Plasma wird durch Anwendung des auf Seite 29 angegebenen spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITE InGenius und ELITE BeGenius(200 µL)		
Maßeinheit	Untergrenze	Obergrenze
IU / mL	215	130,000,000
copies / mL	165	100,000,000

Für Urin (Probenvolumen 200 µL):

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde auf 142 IU / mL festgelegt, die LoD-Konzentration, die quantitative Ergebnisse präzise (Standardabweichung = 0,2888 Log IU / mL für **ELITE InGenius** und Standardabweichung = 0. 4031 Log IU / mL für **ELITE BeGenius**) und genau (Bias = 0,1562 Log IU / mL für **ELITE InGenius** und Bias = -0,1668 Log IU / mL für **ELITE BeGenius**) innerhalb von ±0,5 Log IU / mL.

Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) wurde auf 160.000.000 IU / mL festgelegt, die höchste Konzentration, die präzise quantitative Ergebnisse liefert (Standardabweichung = 0,2114 Log IU / mL für **ELITE InGenius** und Standardabweichung = 0. 3132 Log IU / mL für **ELITE BeGenius**) und genau (Bias = - 0,3240 Log IU / mL für **ELITE InGenius** und Bias = -0,2860 Log IU / mL für **ELITE BeGenius**) innerhalb von ±0,5 Log IU / mL.

Der lineare Messbereich in Kopien / mL für Urin, der ohne Konservierungsstoffe gesammelt wurde, wird durch Anwendung des auf Seite 29 angegebenen spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

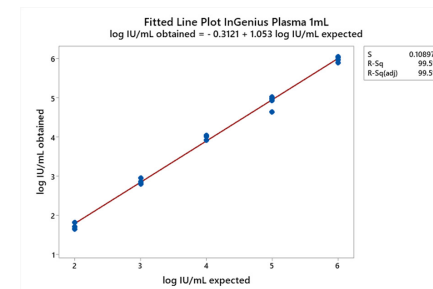
Linearer Messbereich für Urinproben und ELITE InGenius und ELITE BeGenius (200 µL)			Linearer Messbereich für Urinproben und ELITE InGenius und ELITE BeGenius (200 µL)
Maßeinheit	Untergrenze	Obergrenze	
IU / mL	142	160,000,000	
copies / mL	89	100,000,000	

Für Plasma (Probenvolumen 1000 µL):

Der lineare Messbereich des BKV ELITE MGB® Kits in Verbindung mit in EDTA gesammeltem Plasma (Probenvolumen 1000 µL) und **ELITE InGenius** wurde anhand eines Panels von BKV-Verdünnungen überprüft. Das Panel wurde durch Verdünnung des "1. internationalen WHO-Standards für BKV-Virus-DNA" (NIBSC-Code 14/212, Vereinigtes Königreich) in BKV-DNA-negativer Matrix hergestellt. Das Panel bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1-Log-Verdünnungsstufen) von 10⁶ bis 10² IU / mL. Jede Probe des Panels wurde in 4 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten durch lineare Regressionsanalyse zeigte, dass der Test in Verbindung mit Plasmaproben (Probenvolumen 1000 µl) eine lineare Reaktion für alle Verdünnungen mit einem quadratischen Korrelationskoeffizienten (R²) von 0,995 zeigt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Grafik dargestellt.



Der lineare Messbereich wurde mit einem breiteren Konzentrationsbereich getestet, indem ein BKV-Verdünnungspanel analysiert wurde, das durch Verdünnung einer Plasmid-DNA, die das Amplifikationsprodukt enthält, in einer BKV-DNA-negativen Matrix hergestellt wurde. Das Panel umfasste 6 Verdünnungsstufen von 1 Log von 10⁹ bis 10⁴ Kopien / mL. Jeder Panel-Punkt wurde in 4 Wiederholungen getestet, indem das gesamte Analyseverfahren, die Einrichtung des Laufs, die Extraktion, die Echtzeit-Amplifikation und die Interpretation der Ergebnisse mit **ELITE InGenius** und **ELITEchGroup S.p.a.** durchgeführt wurden. Die Analyse der erhaltenen Daten, die mit der linearen Regression durchgeführt wurde, zeigte, dass der Assay eine lineare Reaktion für die Panel-Punkte von 10⁸ bis 10⁴ Kopien / mL hat. Für den Punkt 10⁹

Kopien / mL war es aufgrund der sehr hohen Konzentration nicht möglich, einen Ct-Wert zu berechnen.

Der lineare Messbereich als Kopien / mL für in EDTA gesammeltes Plasma wird durch Anwendung des auf Seite 29 angegebenen spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITE InGenius (1000 µL)		
Maßeinheit	Untergrenze	Obergrenze
IU / mL	100	170,000,000
copies / mL	59	100,000,000

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit der mit dem BKV ELITE MGB Kit in Verbindung mit den **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** Systemen erzielten Ergebnisse wurde durch die Analyse eines Panels von in EDTA gesammelten Plasmaproben getestet. Das Panel umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die mit BKV-zertifiziertem Referenzmaterial "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) in einer Konzentration von 3 x LoD (ca. 645 IU / mL) und von 10 x LoD (ca. 2150 IU / mL) dotiert waren.

Die Intra-Session-Wiederholbarkeit des **ELITE InGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Durchläufen pro Tag, mit der gleichen Produktcharge, mit dem gleichen Gerät, durch den gleichen Bediener, am gleichen Tag ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen bearbeitet.

Die Inter-Session-Wiederholbarkeit mit **ELITE InGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen in zwei Durchläufen pro Tag mit derselben Produktcharge, mit demselben Gerät, durch denselben Bediener und an zwei verschiedenen Tagen ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen bearbeitet.

Die Ct-Werte des Targets und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des %CV verwendet, um die Wiederholbarkeit als Ungenauigkeit zu bewerten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den nachstehenden Tabellen enthalten.

Intra-Session-Wiederholbarkeit ELITE InGenius Lot U0121-047								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	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				

Inter-Session-Wiederholbarkeit ELITE InGenius Lot U0121-047								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	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				

Im Wiederholbarkeitstest auf dem **ELITE InGenius** wies der Test das BKV-Target wie erwartet nach und zeigte einen niedrigen %CV der Ct-Werte, der 2 % für BKV und 1,3 % für die interne Kontrolle nicht überstieg.

Die Intra-Session-Wiederholbarkeit mit dem **ELITE BeGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen in einem Durchgang pro Tag mit derselben Produktcharge, mit demselben Gerät und am selben Tag ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen bearbeitet.

Die Inter-Session-Wiederholbarkeit des **ELITE BeGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, mit der gleichen Produktcharge, mit dem gleichen Gerät, an zwei verschiedenen Tagen ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen bearbeitet.

Die Ct-Werte des Targets und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des %CV verwendet, um die Wiederholbarkeit als Ungenauigkeit zu bewerten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den nachstehenden Tabellen enthalten.

Intra-Session-Wiederholbarkeit ELITE BeGenius Lot U0121-047								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	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				

Inter-Session-Wiederholbarkeit ELITE BeGenius Lot U0121-047								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	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				

Im Wiederholbarkeitstest auf **ELITE BeGenius** wies der Test das BKV-Target wie erwartet nach und zeigte einen niedrigen %CV der Ct-Werte, der 1,9 % für BKV und 1,7 % für die interne Kontrolle nicht überstieg.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der mit dem BKV ELITE MGB Kit in Verbindung mit den **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** Systemen erzielten Ergebnisse wurde durch die Analyse eines Panels von Plasmaprobe getestet. Das Panel umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die mit BKV-zertifiziertem Referenzmaterial "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) in einer Konzentration von 3 x LoD (ca. 645 IU / mL) und von 10 x LoD (ca. 2150 IU / mL) dotiert waren.

Die Inter-Instrumenten-Reproduzierbarkeit auf dem **ELITE InGenius**-System wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Replikaten in einem Lauf pro Tag an zwei Tagen mit zwei verschiedenen Instrumenten von zwei verschiedenen Bedienern ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen auf dem **ELITE InGenius**-System im Modus "Extract + PCR" bearbeitet.

Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit auf dem **ELITE InGenius**-System wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, mit zwei verschiedenen Chargen und demselben Gerät ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen auf dem **ELITE InGenius**-System im Modus "Extract + PCR" verarbeitet.

Die Ct-Werte des Ziels und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des %CV verwendet, um die Reproduzierbarkeit als Ungenauigkeit zu bewerten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der nachstehenden Tabelle enthalten.

Inter - Instrument Reproduzierbarkeit ELITE InGenius								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26.88	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				

Inter-Chargen- Reproduzierbarkeit ELITE InGenius								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26.83	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				

Im Reproduzierbarkeitstest mit dem **ELITE InGenius** wies der Assay das BKV-Target erwartungsgemäß nach und zeigte einen niedrigen %CV der Ct-Werte, der 1,3 % für BKV und 1,3 % für die interne Kontrolle nicht überstieg.

Die Inter-Instrumenten-Reproduzierbarkeit des **ELITE BeGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, an zwei Tagen, mit zwei verschiedenen Geräten und von zwei verschiedenen Bedienern ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen auf dem **ELITE BeGenius**-System im Modus "Extract + PCR" bearbeitet.

Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit auf dem **ELITE BeGenius** wurde durch die Analyse von Panel-Proben in acht Replikaten in zwei Durchläufen pro Tag mit zwei verschiedenen Chargen und demselben Gerät ermittelt. Die Proben wurden in randomisierten Positionen auf dem **ELITE BeGenius**-System im Modus "Extract + PCR" bearbeitet.

Die Ct-Werte des Targets und der internen Kontrolle wurden zur Berechnung des %CV verwendet, um die Reproduzierbarkeit als Ungenauigkeit zu bewerten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der nachstehenden Tabelle enthalten.

Inter - Instrument Reproduzierbarkeit ELITE BeGenius								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	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				

Inter - Batch Reproduzierbarkeit ELITE BeGenius								
Sample	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	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				

Im Reproduzierbarkeitstest auf **ELITE BeGenius** wies der Test das BKV-Target wie erwartet nach und zeigte einen niedrigen %CV der Ct-Werte, der 1,8 % für BKV und 2,3 % für die interne Kontrolle nicht überstieg.

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe „BKV Molecular “Q” Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit „**ELITE InGenius**“ und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die ab 200 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE InGenius“				
Probe	Nennititer Kopien/ml	Nennititer log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	-	0/2	-

Alle positiven Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log nachgewiesen.

Die ab 1000 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE InGenius“				
Probe	Nenntiter Kopien/ml	Nenntiter log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	-	0/2	-

Alle positiven Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 Log nachgewiesen.

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial QCMD 2014 BK Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von BKV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die ab 200 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE InGenius“				
Probe	Konsensus Konz. log ₁₀ Kopien/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	-	0/2	nicht erkannt
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,159
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,405
BKVDNA14-09	negativ	-	0/2	nicht erkannt
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	nicht erkannt

Alle negativen Proben wurden richtig als negativ und 7 von 8 positiven Proben wurden richtig als positiv erkannt. Die Probe BKVDNA14-10 wurde bei 74 Kopien/ml als negativ erkannt. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Proben-titer unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Fünf (5) Proben wurden innerhalb des vom EQA-Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert und 2 Proben wurden innerhalb von 2 SD quantifiziert.

Die ab 1000 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE InGenius“				
Probe	Konsensus Konz. log ₁₀ Kopien/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	-	0/2	nicht erkannt
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,280
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,459
BKVDNA14-09	negativ	-	0/2	nicht erkannt
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	1,914

Alle negativen Proben wurden richtig als negativ und alle positiven Proben wurden richtig als positiv erkannt. Vier (4) Proben wurden innerhalb des vom EQA-Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert und vier (4) Proben wurde innerhalb von 2 SD quantifiziert.

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der Umrechnungsfaktor zur Umrechnung eines quantitativen Ergebnisses von Kopien/ml in internationale Einheiten (International Units, IU) / ml wurde mithilfe einer Reihe von mindestens sechs Verdünnungen (0,5 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for BKV virus DNA“, NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in verschiedenen, negativ auf BKV-DNA getesteten Matrices berechnet. Jeder Punkt der Reihe wurde in 16 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die gesamte Analyse, Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den nachstehenden Tabellen enthalten.

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Plasma (200 µL), Fc = 1.3 IU / copy						
Sample			Result			Log difference (ref. - test)
IU / mL	Log IU / mL	N	Mean c. / mL	Mean IU / mL	Mean Log IU / 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

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Urin, Fc = 1.6 IU / copy						
Sample			Result			Log difference (ref. - test)
IU / mL	Log IU / mL	N	Mean c. / mL	Mean IU / mL	Mean Log IU / 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

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Plasma (1000 µL), Fc = 1.7 IU / copy						
Sample			Result			Log difference (ref. - test)
IU / mL	Log IU / mL	N	Mean c. / mL	Mean IU / mL	Mean Log IU / 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

Die Ergebnisse für jede Matrix sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei ELITE InGenius		
Probenvolumen	Matrix	Umrechnungsfaktor Fc (IU/Kopien)
200 µl	Plasma	1,3
200 µl	Urin	1,6
1000 µl	Plasma	1,7

Der Umrechnungsfaktor zur Umrechnung eines quantitativen Ergebnisses von Kopien / mL in Internationale Einheiten / mL wurde sowohl für **ELITE InGenius** als auch für **ELITE BeGenius** überprüft, indem die während des Linearitätstests erhaltenen Ergebnisse analysiert wurden.

Die angestrebte Quantifizierungspräzision, als Standardabweichung von Log IU/mL, war sowohl für Plasma als auch für Urin kleiner als 0,5 Log und erfüllte die Akzeptanzkriterien für **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius**.

Die angestrebte Quantifizierungsgenauigkeit, d. h. die Differenz zwischen der theoretischen und der gemessenen Konzentration in Log IU / mL, lag sowohl für Plasma als auch für Urin unter 0,5 Log und erfüllte die Akzeptanzkriterien für **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius**.

Diese Ergebnisse bestätigen die mit **ELITE InGenius** für jede Matrix berechneten

Umrechnungsfaktoren.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays zur Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch die Analyse einiger klinischer Proben von in EDTA gesammeltem Plasma und von ohne Konservierungsmittel gesammeltem Urin, die in Verbindung mit ELITE InGenius positiv auf BKV-DNA waren, bewertet. Da **ELITE BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITE InGenius** zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der diagnostischen Sensitivität, die in Verbindung mit **ELITE InGenius** erzielt wurden, auch für **ELITE BeGenius** gelten.

Der Test wurde ab 200 µl Probe an 30 in EDTA gesammelten Plasmaproben, die positiv für BKV-DNA waren, und an 30 Urinproben, die ohne Konservierungsmittel gesammelt wurden und positiv für BKV-DNA waren (getestet mit einem CE IVD-Produkt mit Echtzeit-Amplifikation), durchgeführt.

Der Test wurde ausgehend von 1000 µL Probe durchgeführt:

- 25 in EDTA gesammelten Plasmaproben, die positiv für BKV-DNA waren (getestet mit einem CE IVD-Produkt mit Echtzeit-Amplifikation).

- 30 in EDTA gesammelte Plasmaproben, die negativ für BKV-DNA waren und mit dem "1. internationalen WHO-Standard für BKV-Virus-DNA" (NIBSC-Code 14/212, Vereinigtes Königreich) auf BKV-DNA aufgestockt wurden.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit „**ELITE InGenius**“ und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Probentyp	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	30	30	0
	Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-positiver Urin	30	30	0
1000 µl	In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	25	25	0
	In EDTA entnommenes, BKV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle Proben waren zur Analyse valide und wurden als positiv bestätigt.

Die diagnostische Gesamtsensitivität des Assays betrug bei diesen Tests 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als Bestätigung negativer Proben wurde durch die Analyse einiger klinischer Proben von in EDTA gesammeltem Plasma und von ohne Konservierungsstoffe gesammeltem Urin in Verbindung mit **ELITE InGenius** bewertet. Da **ELITE BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITE InGenius** zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der diagnostischen Spezifität, die in Verbindung mit **ELITE InGenius** erzielt wurden, auch für **ELITE BeGenius** gelten.

Der Test wurde ausgehend von 200 µL Probe durchgeführt:

- 30 in EDTA gesammelten Plasmaproben, die negativ auf BKV-DNA waren (getestet mit einem CE IVD Real-Time-Amplifikationsprodukt).

- 30 Urinproben, die ohne Konservierungsmittel gesammelt wurden und negativ auf BKV-DNA waren (getestet mit einem CE-IVD-Echtzeit-Amplifikationsprodukt).

Der Test ab 1000 µl Probenvolumen wurde an 62 in EDTA entnommenen, BKV-DNA-negativen (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) Plasmaproben durchgeführt.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit „**ELITE InGenius**“ und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Probentyp	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	30	2	28
	Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-negativer Urin	30	0	30
1000 µl	In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	62	2	60

Alle Urinproben waren zur Analyse valide und wurden als negativ bestätigt.

Alle Plasmaproben waren zur Analyse valide.

Bei Proben mit 200-µl-Proben: Achtundzwanzig (28) von 30 Plasmaproben wurden als BKV-DNA-negativ bestätigt, zwei Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer (jeweils etwa 50 bzw. 70 Kopien/ml) und lagen unter der Nachweisgrenze der Referenzmethode.

Bei Proben mit 1000-µl-Proben: Sechzig (60) von 62 Plasmaproben wurden als BKV-DNA-negativ bestätigt, zwei Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer (jeweils etwa 5 bzw. 55 Kopien/ml).

Die diagnostische Gesamtspezifität des Assays betrug bei diesen Tests 97 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizen und Geräten durchgeführten Prüfungen sind in der Technischen Produktmappe "BKV ELITE MGB® Kit", FTP 175PLD, festgehalten.

Robustheit: ungültige Ergebnisse klinischer Proben

Die Robustheit des Assays als Bewertung von ungültigen Ergebnissen klinischer Proben bei der ersten Analyse wurde durch die Analyse klinischer Proben verschiedener Matrices verifiziert.

Die Anzahl ungültiger Proben wurde mithilfe der Ergebnisse von mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. BKV-DNA-negativ und BKV-DNA-positiv getesteten klinischen Proben verifiziert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	Ungültiges Ergebnis	%
Plasma	177	2	1,13
Urin	60	1	1,67

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

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden: in EDTA entnommenes Plasma, ohne Konservierungsmittel entnommener Urin und Liquor.

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion mit dem Kit „EXTRABlood“ durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probe, fügen Sie zu Beginn der Extraktion **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzu und fangen Sie die DNA mit **60 µl** Elutionspuffer auf.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit „ELITE STAR“ und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „ELITE STAR“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit „ELITE GALAXY“ und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)**, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl bzw. 200 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „ELITE GALAXY“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **10 µl / Probe von CPE** hinzufügen. Der CPE muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion mit dem Gerät „NucliSENS® easyMAG“ durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und befolgen Sie diese Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend das the **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen und die DNA mit **100 µl** Elutionspuffer auffangen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät „QIASymphony® SP/AS“ und dem Kit „QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit“ mit der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC** und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **500 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Lösung mit dem AVE-Puffer und dem RNA-Träger gemäß der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits ansetzen. Für jede angeforderte Probe **6 µl/Probe CPE** zur Lösung hinzufügen. Die Röhrchen mit der Lösung wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angegeben in das Fach „internal control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **85 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Ohne Konservierungsmittel entnommener Urin

Die Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Beim Einfrieren von Urinproben kommt es häufig zur Präzipitatbildung, die nachfolgende Stadien des Assays beeinträchtigen kann: Für die Extraktion nur Überstand verwenden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion mit dem Kit „EXTRABlood“ durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probe, fügen Sie zu Beginn der Extraktion **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzu und fangen Sie die DNA mit **60 µl** Elutionspuffer auf.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Urin mit „ELITE STAR“ und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „ELITE STAR“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Urin mit „ELITE GALAXY“ und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)**, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl bzw. 200 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „ELITE GALAXY“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **10 µl / Probe von CPE** hinzufügen. Der CPE muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion mit dem Gerät „NucliSENS® easyMAG“ durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und befolgen Sie diese Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend das the **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen und die DNA mit **100 µl** Elutionspuffer auffangen.

Liquor

Die Liquorproben für die Nukleinsäureextraktion müssen unter Vermeidung einer Kontamination mit Patientenblut gemäß den Laborrichtlinien entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion mit dem Gerät „NucliSENS® easyMAG“ durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und befolgen Sie diese Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend das the **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen und die DNA mit **100 µl** Elutionspuffer auffangen.

Störende Substanzen

Die aus der Probe extrahierte DNA darf kein Heparin, Hämoglobin, Dextran, Ficoll®, Ethanol oder 2-Propanol enthalten, um das Problem einer Inhibition und die Möglichkeit häufiger ungültiger Ergebnisse zu verhindern.

Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch antivirale, antibiotische, chemotherapeutische oder immunsupprimierende Medikamente vor.

Amplifikationskontrollen

Es ist unbedingt erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Bei der Negativkontrolle muss statt der aus der Probe extrahierten DNA hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt „BKV - ELITE Positive Control“ oder das Produkt „BKV ELITE Standard“ verwenden.

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

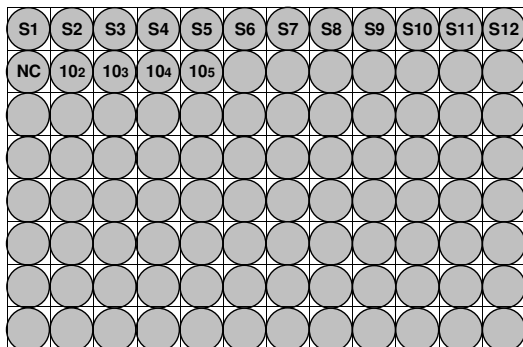
(Im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten durchzuführen)

Bei Verwendung des Geräts **7300 Real-Time PCR System**:

- Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
 - Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen und einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
 - im Detector Manager den Detektor („detector“) für die BKV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „BKV“ nennen.
 - im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
 - für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „ROX“ (AP593 wird statt ROX verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen des DNA-Titers in der Ausgangsprobe eine Reaktionsreihe mit den **Q - PCR Standards** (10s Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

Nachfolgend ist beispielhaft aufgeführt, wie die quantitative Analyse von 12 Proben organisiert werden kann.



Legende: S1 - S12: Zu analysierende Proben; NC: Negativkontrolle der Amplifikation; 102: 102-Standardkopien; 103: 103-Standardkopien; 104: 104-Standardkopien; 105: 105-Standardkopien.

Gemäß der Gerätedokumentation in der dedizierten Software („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Temperaturprofil)) die Parameter des **Temperaturzyklus** festlegen:

- zur Amplifikationsphase den Schritt zur **Verlängerung bei 72 °C** hinzufügen („Add Step“ (Schritt hinzufügen));

Hinweis: Die Fluoreszenzerfassung („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Einstellungen > Datenerfassung)) muss während des Hybridisierungsschritts auf 60 °C eingestellt sein.

- die Zeitsteuerung wie in der Tabelle „**Temperaturzyklus**“ angegeben ändern;
- die Anzahl Zyklen auf **45** einstellen;
- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion („Sample volume“ (Probenvolumen)) auf **30 µl** einstellen;

- optional: die Dissoziationsphase hinzufügen („Add Dissociation Stage“) und den Temperaturbereich von **40 °C** bis **80 °C** einstellen.

Temperaturzyklus		
Phase	Temperaturen	Zeitsteuerung
Dekontamination	50 °C	2 min
Erste Denaturierung	94 °C	2 min
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	94 °C	10 s
	60 °C (Fluoreszenzerfassung)	30 s
	72 °C	20 s
Dissoziation (optional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Bei Verwendung eines **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
 - Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen und „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;
 - im Detector Manager den Detektor („detector“) für die BKV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „BKV“ nennen.
 - im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ähnelt VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen;
 - für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „Cy5“ (AP593 wird statt Cy5 verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen des DNA-Titers in der Ausgangsprobe eine Reaktionsreihe mit den **Q - PCR Standards** (10s Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

Ein Beispiel für den Aufbau einer quantitativen Analyse von 12 Proben ist im vorigen Abschnitt angegeben, der das Verfahren für das Gerät **7300 Real Time PCR System** beschreibt.

Gemäß der Gerätedokumentation in der dedizierten Software („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Temperaturprofil)) die Parameter des **Temperaturzyklus** festlegen:

- zur Amplifikationsphase den Schritt zur **Verlängerung bei 72 °C** hinzufügen („Add Step“ (Schritt hinzufügen));

Hinweis: Die Fluoreszenzerfassung („Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection“ (Gerät > Thermocycler-Protokoll > Einstellungen > Datenerfassung)) muss während des Hybridisierungsschritts auf 60 °C eingestellt sein.

- die Zeitsteuerung wie in der Tabelle „Temperaturzyklus“ angegeben ändern;
- die Anzahl Zyklen auf **45** einstellen;
- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion („Sample volume“ (Probenvolumen)) auf **30 µl** einstellen;

- optional: die Dissoziationsphase hinzufügen („Add Dissociation Stage“) und den Temperaturbereich von **40 °C bis 80 °C** einstellen.

Temperaturzyklus		
Phase	Temperaturen	Zeitsteuerung
Dekontamination	50 °C	2 min
Erste Denaturierung	94 °C	2 min
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	94 °C	10 s
	60 °C (Fluoreszenzerfassung)	30 s
	72 °C	20 s
Dissoziation (optional)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min
	80 °C	15 s
Dissoziation (optional)	60 °C	15 s

Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Röhrcchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrcchen auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Röhrcchen **BKV Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass jedes Röhrcchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrcchen auf Eis lagern;
- die **BKV - Positive Control** oder die **BKV Q - PCR Standard** Röhrcchen auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrcchen auf Eis lagern;
- die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Mikrotiterplatte** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und darauf achten, dass die Vertiefungen nicht beschädigt werden.

1. **20 µl BKV Q - PCR Mix** Reaktionsgemisch präzise auf den Boden der Vertiefungen in der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

Hinweis: Wenn das Reaktionsgemisch nicht vollständig aufgebraucht wird, das Restvolumen maximal einen Monat bei -20 °C dunkel aufbewahren. Das Reaktionsgemisch maximal **5** Gefrier- und Auftauzyklen unterziehen.

2. **20 µl extrahierte DNA** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen Proben **extrahierter DNA** auf die gleiche Weise verfahren.

3. **20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** der Negativkontrolle der Amplifikation mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

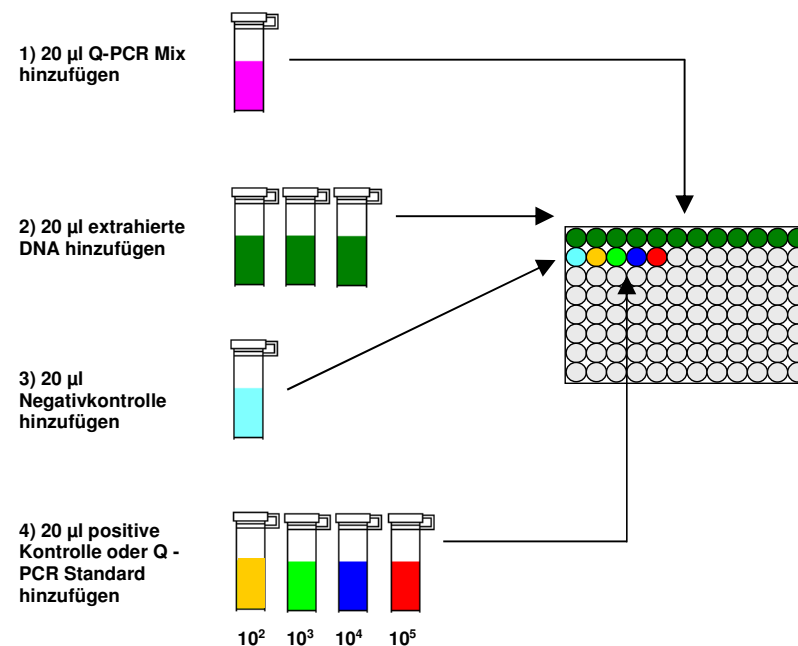
- Wenn ein **qualitatives** Analyseergebnis benötigt wird (Nachweis von BKV-DNA): **20 µl BKV - Positive Control** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **BKV - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

- Wenn ein **quantitatives** Analyseergebnis benötigt wird (Quantifizierung von BKV-DNA): **20 µl BKV Q - PCR Standard 102** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **BKV Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den **BKV Q - PCR Standards 103, 104, 105** auf die gleiche Weise verfahren.

5. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit der **Amplifikations-Dichtungsfolie** dicht verschließen.
6. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-BKV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus muss die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt beseitigt werden. Um ein Verschütten der Reaktionsprodukte zu vermeiden **darf die Amplifikations-Dichtungsfolie nicht von der Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernt werden.**

In der folgenden Abbildung ist die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion zusammengefasst dargestellt.



Hinweis: Wenn die Amplifikation mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ vorbereitet wird, die Mikrotiterplatte, welche die Extrakte, die Reagenzien und die Amplifikations-Mikrotiterplatte enthält, mithilfe der Spezialadapter in die dafür vorgesehenen Fächer einsetzen, anschließend die Angaben in der Gebrauchsanweisung des Einrichtmoduls und die von der Software geforderten Schritte befolgen.

Hinweis: Wenn die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion mit dem Gerät „**ELITE GALAXY**“ durchgeführt wird, die Elutions-Mikrotiterplatte, das komplette Reaktionsgemisch und die Amplifikations-Mikrotiterplatte wie in der Gebrauchsanweisung des Geräts angegeben laden und die Schritte auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.

Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen BKV-Sonde (FAM-Detektor „BKV“) und der spezifischen Sonde für die interne Kontrolle (VIC-Detektor „IC“) in den Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
 - manuell („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus)) den Berechnungsbereich für die **Grundlinie (Fluoreszenz-Hintergrundniveau)** von Zyklus 6 auf Zyklus 15 ändern;

Hinweis: Bei einer positiven Probe mit einem hohen BKV-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der BKV-spezifischen Sonde bereits vor dem Zyklus 15 beginnen anzusteigen. In diesem Fall muss der Berechnungsbereich für die **Grundlinie** vom Zyklus 6 auf den von der Gerätesoftware („Results > Component“ (Ergebnisse > Komponente)) erkannten Zyklus, bei dem die FAM-Fluoreszenz der Probe anzusteigen beginnt, angepasst werden.

Bei Verwendung des Geräts **7300 Real-Time PCR System:**

- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den FAM-Detektor „BKV“ auf **0,1** einstellen;
- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,05** einstellen;

Bei Verwendung eines **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument:**

- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den FAM-Detektor „BKV“ auf **0,2** einstellen;
- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,1** einstellen;

Die Werte der von den spezifischen Sonden in der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz und der **Schwellenwert („Threshold“)** der Fluoreszenz ermöglichen die Bestimmung des **Schwellenwertzyklus („Threshold cycle (Ct)“)**, d. h. des Zyklus, in dem die Fluoreszenz den **Schwellenwert** erreicht.

In der Amplifikationsreaktion der **Positivkontrolle*** dient der **Ct-Wert** von BKV („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Positivkontrolle FAM-Detektor „BKV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positivkontrolle** bei BKV **Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikations- oder des Detektionsschritts Probleme aufgetreten sind (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrolle, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrolle, falsche Einstellung der Position der Positivkontrolle, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

* **Hinweis:** Wenn dieses Produkt zur Quantifizierung von BKV-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positivkontrolle** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)** beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negativkontrolle** dient der **Ct-Wert** von BKV („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negativkontrolle FAM-Detektor „BKV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negativkontrolle** bei BKV **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist, wurde die Ziel-DNA nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion jeder **Probe** dient der **Ct-Wert** von BKV zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct-Wert** der internen Kontrolle zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

Hinweis: Überprüfen Sie mithilfe der Gerätesoftware („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus)), dass der **Ct-Wert** anhand eines schnellen und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenzwerte und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrunds (unregelmäßiger oder hoher Hintergrund) ermittelt wurde.

Dieses Produkt ist in der Lage, eine Mindestmenge von zirka 10 Kopien von DNA des großen T-Antigen-Gens von BKV in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen, die den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (Nachweisgrenze für das Produkt, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

Die Ergebnisse als **Ct** der Amplifikationsreaktionen jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) werden wie in der folgenden Tabelle beschrieben verwendet:

Probenreaktion		Eignung der Probe	Assayergebnis	BKV-DNA
FAM-Detektor „BKV“	VIC-Detektor „IC“			
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	ungeeignet	ungültig	-
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, negativ	NICHT ERKANNT
Ct Determined (Ct bestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	geeignet	gültig, positiv	ERKANNT
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, positiv	ERKANNT

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei BKV und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die interne Kontrolle effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder nicht vorhandene Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei BKV und **Ct ≤ 35** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass die BKV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der BKV-DNA unter der Nachweisgrenze des Produkts (siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“) liegt. In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Hinweis: Wird in der Amplifikationsreaktion einer Probe die BKV-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der internen Kontrolle „Ct > 35“ oder „Ct Undetermined“ (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der internen Kontrolle durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei BKV-DNA verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe dennoch geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

Quantitative Analyse der Ergebnisse

Nach Durchführung des Verfahrens für die qualitative Analyse der Ergebnisse kann die quantitative Analyse der Ergebnisse der positiven Proben durchgeführt werden.

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** ermöglichen die **Ct-Werte** für BKV die Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) für den Amplifikationslauf sowie die Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Standardkurve FAM-Detektor „BKV“	Akzeptanzbereich	Amplifikation/Detektion
Korrelationskoeffizient (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	KORREKT

Wenn der Wert des **Korrelationskoeffizienten (R2)** außerhalb der Bereichsgrenzen liegt, heißt dies, dass während des Amplifikations- oder des Detektionsschritts Probleme aufgetreten sind (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Position der Standards, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

Die BKV-Ct-Werte in der Amplifikationsreaktion der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) des Amplifikationslaufs dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, zwischen 1.000.000 und 10 Kopien von DNA des großen T-Antigen-Gens von BKV in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich des Produkts, siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Probenergebnis FAM-Detektor „BKV“	BKV-Genomäquivalente pro Reaktion
Menge > 1 x 10 ⁶	MEHR ALS 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Menge ≤ 1 x 10 ⁶	= Menge
Menge < 1 x 10 ¹	WENIGER ALS 10

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) dienen zur Berechnung der Genomäquivalente (**gEq**) von BKV, die in der bei der Extraktion verwendeten Probe vorhanden sind (**Nc**), gemäß dieser Formel:

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

Dabei ist:

Vc die Menge der bei der Extraktion verwendeten Probe im Verhältnis zur gewünschten Maßeinheit;

Ep die Effizienz des Verfahrens, der Extraktion und der Amplifikation, **ausgedrückt als Dezimalzahl**;

Ve das Gesamtvolumen des extrahierten Produkts **ausgedrückt in µl**;

Va das Volumen des in der Amplifikationsreaktion verwendeten Extraktionsprodukts **ausgedrückt in µl**;

Menge ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der Probe **ausgedrückt in gEq pro Reaktion**.

Wird das Extraktionskit „**EXTRABlood**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml** **ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 15 \times \text{Menge}$$

Wird „**ELITE STAR**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml** **ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 28 \times \text{Menge}$$

Wird „**ELITE GALAXY**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml** **ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 35 \times \text{Menge}$$

Wird das Extraktionssystem „**NucliSENS® easyMAG®**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben, ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben oder Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml** **ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 10 \times \text{Menge}$$

Wird das Extraktionssystem „**QIASymphony® SP/AS**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml** **ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 12 \times \text{Menge}$$

Berechnung der linearen Messbereichsgrenzen

Bei Verwendung einer bestimmten Extraktionsmethode können die linearen Messbereichsgrenzen als gEq/ml der Probe anhand des linearen Messbereichs der Amplifikationsreaktion gemäß dieser Formel berechnet werden:

$$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Wird das Extraktionskit „**EXTRABlood**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 15 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 15 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{von 150 bis 15.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird „**ELITE STAR**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 28 \times 10 \text{ Kopien} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 28 \times 1.000.000 \text{ Kopien} \\ &\text{von 280 bis 28.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird „**ELITE GALAXY**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 35 \times 10 \text{ Kopien} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 35 \times 1.000.000 \text{ Kopien} \\ &\text{von 350 bis 35.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird das Extraktionssystem „**NucliSENS® easyMAG®**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben, ohne Konservierungsmittel entnommenen Urinproben oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 10 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 10 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{von 100 bis 10.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird das Extraktionssystem „**QIASymphony® SP/AS**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei „QIASymphony® SP/AS“
Untere Grenze (gEq/ml) = 12 x 10 gEq
Obere Grenze (gEq/ml) = 12 x 1.000.000 gEq
von 120 bis 12.000.000 gEq/ml

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Ziel-DNA-Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität des Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe einer Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien / 20 µl in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng / 20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 50 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA	50	49	1

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasma- und Urinproben und „**ELITE GALAXY™**“ verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von BKV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der JCBK11-06-Probe („QCMD 2011 JC virus and BK virus DNA EQA Panel“, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in BKV-DNA-negativem EDTA-Plasma zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 gEq/ml und 560 gEq/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit „**ELITE GALAXY™**“ und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und „ELITE GALAXY™“ (gEq/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
	Untere Grenze	Obere Grenze	
95 %-Positivität	190 gEq/ml	122 gEq/ml	452 gEq/ml

Nachweisgrenze für Urinproben und „ELITE GALAXY™“ (gEq/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
	Untere Grenze	Obere Grenze	
95 %-Positivität	119 gEq/ml	75 gEq/ml	309 gEq/ml

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Die analytische Sensitivität dieses Assays ermöglicht die Quantifizierung von 1.000.000 bis 10 Ziel-DNA-Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität des Assays als linearer Messbereich wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit den Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen

Verdünnungen eine lineare Reaktion aufweist (Quadrat des Korrelationskoeffizienten über 0,99).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10⁶ Molekülen pro Reaktion, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10⁵ Moleküle / 20 µl).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf 10 Moleküle pro Reaktion festgelegt, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10² Moleküle / 20 µl).

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich (gEq/Reaktion)	
Obere Grenze	1.000.000 gEq/Reaktion
Untere Grenze	10 gEq/Reaktion

Die linearen Messbereichsgrenzen in gEq/ml in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 26 berechnet.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Amplifikationslaufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 30,4 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit des Assays als die Differenz zwischen dem mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Amplifikationslaufs getesteten Probe erhaltenen Mittelwert der Ergebnisse und der theoretischen Konzentrationswert der Probe ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit (% Ungenauigkeit) von zirka 5,2 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision und die Genauigkeit wurden anhand von für die Untersuchung des linearen Messbereichs gewonnenen Daten ermittelt.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit Reihe von zertifiziertem Referenzmaterial

Die analytische Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, die verglichen wurden mit Ergebnissen, die mit anderen Assays und in verschiedenen Laboren erhalten wurden, wurde durch Testen von zertifiziertem Referenzmaterial überprüft.

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von BKV innerhalb der Grenzkonzentration als zertifiziertes und kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit „**EXTRAblood™**“ und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit zertifiziertem Referenzmaterial und „EXTRAblood™“				
Probe	Konsensus log ₁₀ Viruskonz.	Standard-abweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
JC.BK09-01	JCV-3B, 2,844	0,606	0/2	nicht erkannt
JC.BK09-02	BKV-1B, 2,960	0,511	2/2	2,944
JC.BK09-03	JCV-2B, 2,682	0,612	0/2	nicht erkannt
JC.BK09-04	Negativ, n. z.	n. z.	0/2	nicht erkannt
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	nicht erkannt
JC.BK09-08	BKV, 3,451	0,533	2/2	3,364
JC.BK09-09	JCV-2B, 2,234	0,697	0/2	nicht erkannt
JC.BK09-10	BKV, 4,462	0,576	2/2	4,254
JC.BK09-11	JCV-2B, 3,142	0,663	0/2	nicht erkannt

JC.BK09-12	BKV, 2,898	0,493	2/2	2,582
------------	------------	-------	-----	-------

Alle Proben wurden richtig erkannt. Alle erhaltenen quantitativen Ergebnisse liegen innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von BKV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2013 JC Virus and BK Virus EQA Panel“, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit „**ELITE STAR**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse in gEq/ml sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE STAR“				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse 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	-

In Übereinstimmung mit den vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben wurden richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von BKV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2012 JC Virus and BK Virus Proficiency Panel“, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit „**ELITE GALAXY**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „ELITE GALAXY“				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse 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	Negativ	-	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

In Übereinstimmung mit den vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben wurden richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt.

Diagnostische Sensitivität: Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nukleotid-Datenbanken bewertet.

Die Analyse der für die Hybridisierung der Primer und des Fluoreszenzmarkers ausgewählten Regionen in der Anordnung der in der Datenbank für das großen T-Antigen-Gen von BKV verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde mithilfe einiger BKV-DNA-positiver klinischer Proben getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 22 in EDTA entnommene Plasmaproben und 22 ohne Konservierungsmittel entnommene Urinproben, die alle BKV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation), verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde die gesamte Analyse, die Extraktion mit „**EXTRABlood**“ und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	22	22	0
Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-positiver Urin	22	22	0

Die diagnostische Sensitivität betrug bei diesem Test 100 %.

Die diagnostische Sensitivität wurde mithilfe von 30 in EDTA entnommenen, BKV-DNA-positiven Plasmaproben und 30 BKV-DNA-positiven Urinproben bewertet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit „**ELITE STAR**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	30	29	1
BKV-DNA-positiver Urin	30	30	0

Eine Plasmaprobe ergab ein negatives Ergebnis, was wahrscheinlich auf den niedrigen Titer und den Abbau der Probe zurückzuführen war.

Die diagnostische Sensitivität betrug bei diesem Test 98,3 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 30 in EDTA entnommene, negative Plasmaproben, die mit einer kalibrierten und zertifizierten Referenzprobe („QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich) auf einen Titer nahe der Nachweisgrenze für BKV-DNA dotiert wurde, und 30 ohne Konservierungsmittel entnommene Urinproben, die mit einer kalibrierten und zertifizierten Referenzprobe („QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich) auf einen Titer nahe der Nachweisgrenze von BKV-DNA dotiert wurden, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit „**ELITE GALAXY**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
BKV-DNA-positives Plasma, gesammelt in EDTA	9	9	0
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	30	30	0
Ohne Konservierungsmittel entnommenes, BKV-DNA-positiver Urin	1	0	1
Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-dotierter Urin	30	29	1

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesen Tests (siehe die beiden vorigen Tabellen) über 97 %.

Analytische Spezifität: Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Markern

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nukleotid-Datenbanken bewertet.

Die Analyse der Anordnung der Sequenzen der Primer und des Fluoreszenzmarkers mit den in Datenbanken für andere Organismen als BKV, darunter das komplette JCV-Genom, verfügbaren Sequenzen ergab, dass das humane Polyomavirus, das BKV am meisten ähnelt, deren Spezifität und die Abwesenheit einer signifikanten Homologie aufzeigte.

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde anhand einiger negativ auf BKV-DNA und positiv auf die DNA anderer Pathogene getesteter klinischer Proben überprüft.

Für die Überprüfung der analytischen Spezifität wurden 18 in EDTA entnommene, BKV-DNA-negative, jedoch positiv auf die DNA anderer Pathogene, wie JCV, HSV1 und HHV8 getestete (getestet mit CE-IVD-Produkten zur Echtzeit-Amplifikation) Plasmaprobe als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde die gesamte Analyse, die Extraktion mit „EXTRAblood“ und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives und auf die DNA anderer Pathogene positiv getestetes Plasma	18	0	18

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch Testen einer Reihe zertifizierter Referenzmaterialien überprüft.

Die analytische Spezifität wurde anhand einer Reihe zertifizierter und kalibrierter Referenzmaterialien einschließlich JCV-positiver Proben („QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich) überprüft. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Abschnitt „Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit Reihe von zertifiziertem Referenzmaterial“ aufgeführt.

Bei Proben, die positiv auf die DNA anderer Pathogene getestet wurden, war keine Kreuzreaktivität nachzuweisen.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer klinischer Proben wurde mithilfe einiger BKV-negativer klinischer Proben getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden als Referenzmaterial 22 in EDTA entnommene Plasmaprobe und 22 ohne Konservierungsmittel entnommene Urinproben, die alle BKV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation), verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde die gesamte Analyse, die Extraktion mit „EXTRAblood“ und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	22	0	22
Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-negativer Urin	22	0	22

Die diagnostische Spezifität betrug bei diesem Test 100 %.

Die diagnostische Spezifität wurde mithilfe von 30 in EDTA entnommenen, BKV-DNA-negativen Plasmaprobe und 30 BKV-DNA-negativen Urinproben bewertet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit „ELITE STAR“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	30	0	30
BKV-DNA-negativer Urin	30	0	30

Die diagnostische Spezifität betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 38 in EDTA entnommene, BKV-DNA-negative Plasmaprobe sowie 31 ohne Konservierungsmittel entnommene, BKV-DNA-negative Urinproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte

Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit „ELITE GALAXY“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	38	0	38
Ohne Konservierungsmittel entnommener, BKV-DNA-negativer Urin	31	0	31

Die diagnostische Spezifität betrug bei diesem Test 100 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Dokumentation „BKV ELITE MGB® Kit“, FTP175PLD, aufgeführt.

Roche cobas z 480 analyzer

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden:

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaprobe für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasmaprobe mit dem Gerät „MagNA Pure 24 System“ und der Softwareversion 1.0 (oder entsprechenden späteren Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „Pathogen200“ und befolgen Sie diese Anweisungen: **350 µl** Probe in das MagNA Pure Tube 2.0 mL dispensieren, das Röhrchen in das Gerät einsetzen und mit der Extraktion beginnen. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt **CPE** bei 20 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl. Der **CPE** muss im Verhältnis 1:2 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie verdünnt werden. Nähere Details zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Urin

Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie bei +2 bis +8 °C für maximal drei Tage aufbewahrt werden. Falls möglich, das Einfrieren von Morgenurinproben vermeiden. Das Einfrieren kann die Fällung von Inhibitoren und den Verlust des DNA-Titers verursachen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen, und maximal dreißig Tage bei -20 °C bzw. länger bei -70 °C aufzubewahren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Urinproben mit dem Gerät „MagNA Pure 24 System“ und der Softwareversion 1.0 (oder entsprechenden späteren Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „Pathogen200“ und befolgen Sie diese Anweisungen: **350 µl** Probe in das MagNA Pure Tube 2.0 mL dispensieren, das Röhrchen in das Gerät einsetzen und mit der Extraktion beginnen. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt **CPE** bei 20 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl. Der **CPE** muss im Verhältnis 1:2 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie verdünnt werden. Nähere Details zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Störende Substanzen

Die aus der Probe extrahierte DNA darf kein Heparin, Hämoglobin, Dextran, Ficoll®, Ethanol oder 2-

Propanol enthalten, um Inhibitionsprobleme und die Möglichkeit häufiger ungültiger Ergebnisse zu verhindern. Eine große Menge humaner genomischer DNA in der aus der Probe extrahierten DNA kann die Amplifikationsreaktion hemmen.

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch antivirale, antibiotische, chemotherapeutische oder immunsupprimierende Medikamente vor.

Amplifikationskontrollen

Es ist unbedingt erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Bei der Negativkontrolle muss statt der aus der Probe extrahierten DNA hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang des Kits enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt „**BKV - ELITE Positive Control**“ oder alternativ das Produkt „**BKV - ELITE Positive Control RF**“ oder das Produkt „**BKV ELITE Standard**“ verwenden.

Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren für jeden Extraktions- und Amplifikationslauf durch Testen von Prozesskontrollen, d. h. einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

(Im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten durchzuführen)

Bei Verwendung des Geräts **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

- Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
- den Steuerrechner und den Echtzeit-Thermocycler einschalten; Die dedizierte Software öffnen und im Hauptfenster unter „New Experiment“ (Neuer Versuch) einen Lauf öffnen;
 - das Reaktionsvolumen („Reaction volume“) auf 40 µl einstellen;
 - jeder Probe im Probeneditor („Sample editor“) eine ID zuweisen;
 - den Temperaturzyklus der Reaktion gemäß der folgenden Tabelle definieren:

Temperaturzyklus		
Phase	Temperaturen	Dauern
Dekontamination	50 °C	2 min
Erste Denaturierung	94 °C	2 min
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	94 °C	10 s
	60 °C (Fluoreszenzerfassung)	30 s
	72 °C	20 s
Dissoziation (optional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Hinweis: Die Fluoreszenzerfassung erfolgt einzeln; die Heizrate (°C/s) auf 4,4°C/s einstellen.

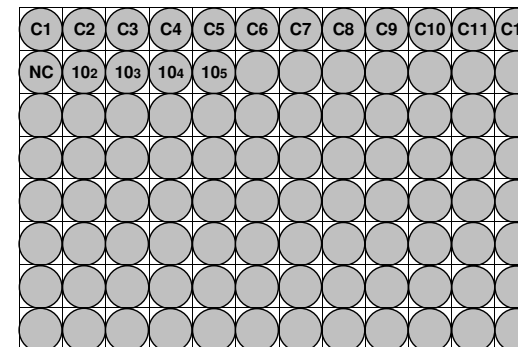
- die Kanäle der Signalerfassung auswählen: „detector“ (Detektor) für den BKV-Sensor mit „channel FAM 465-510“ und „detector“ für den IC-Sensor mit „channel VIC 540-580“;

Das am Ende dieses Benutzerhandbuchs angehängte **Arbeitsblatt** ausfüllen; dazu diese Informationen übertragen oder das Layout der Mikrotiterplatte ausdrucken. Dieses **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen der Konzentration von DNA in der Ausgangsprobe müssen Sie eine Reaktionsreihe mit dem **Q - PCR Standard** (10⁵ Kopien, 10⁴ Kopien, 10³ Kopien und 10² Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

Nachfolgend ist beispielhaft aufgeführt, wie die quantitative Analyse von 12 Proben organisiert werden

kann.



Legende: C1 - C12: Zu analysierende Proben; NC: Negative Amplifikationskontrolle; 10²: Standard 10² Kopien; 10³: Standard 10³ Kopien; 10⁴: Standard 10⁴ Kopien; 10⁵: Standard 10⁵ Kopien.

Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Teströhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Teströhrchen mit dem **BKV Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass der Inhalt jedes Röhrchen für **25 Reaktionen** ausreicht. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- das Teströhrchen mit **BKV - Positive Control** oder alternativ **BKV - ELITE Positive Control RF** oder die Teströhrchen mit **BKV Q - PCR Standard** auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigte **AD-Platte** bereitlegen; darauf achten, dass sie nur mit puderfreien Handschuhen angefasst wird und die Vertiefungen nicht beschädigt werden.

1. **20 µl** des Reaktionsgemischs **BKV Q - PCR Mix** unter Vermeidung von Bläschenbildung präzise auf den Boden der Vertiefungen der **AD-Platte** überführen, wie zuvor auf dem **Arbeitsblatt** festgelegt.

Hinweis: Wenn das Reaktionsgemisch nicht vollständig aufgebraucht wird, das restliche Gemisch maximal einen Monat bei -20 °C aufbewahren. Das Reaktionsgemisch maximal **5** Gefrier- und Auftauzyklen unterziehen.

2. **20 µl extrahierte DNA** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor auf dem **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden. Mit der übrigen **extrahierten DNA** auf die gleiche Weise verfahren.

3. **20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch überführen, das zuvor im **Arbeitsblatt** als negative Amplifikationskontrolle festgelegt wurde. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden.

4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

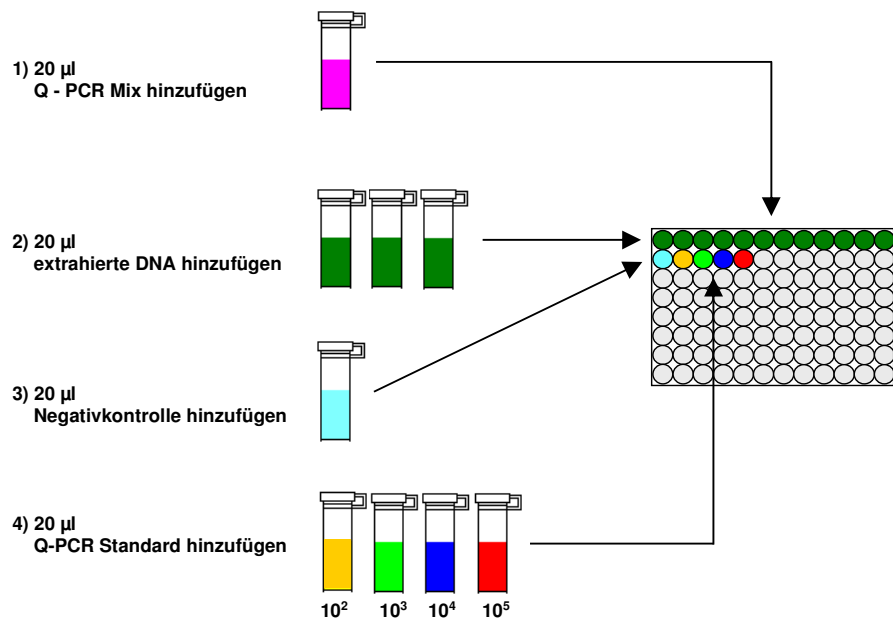
- Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von BKV-DNA): **20 µl BKV - Positive Control** oder alternativ **BKV - ELITE Positive Control RF** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **BKV - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von Adenovirus-DNA): **20 µl BKV BKV Q - PCR Standard 102** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **BKV Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **BKV Q - PCR Standards (103, 104, 105)** auf die gleiche Weise verfahren.

- Die **AD-Platte** vorsichtig mit der **Dichtungsfolie** dicht verschließen.
- Die **AD-Platte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellungen mit einer eindeutigen und wiedererkennbaren ID (z. B. „Jahr-Monat-Tag-BKV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus müssen die **AD-Platte** und die Reaktionsprodukte aus dem Gerät entfernt und umweltgerecht entsorgt werden. **Niemals** die Dichtungsfolie von der **Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernen**, um ein Entweichen der Reaktionsprodukte zu vermeiden.

In der folgenden Abbildung ist die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion zusammengefasst dargestellt.



Analyse der qualitativen Ergebnisse

Die Werte der ausgesendeten Fluoreszenz, die vom BKV-Detektor und dem IC-Detektor während der Amplifikationsreaktionen aufgezeichnet wurden, müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Im Menü „Analysis“ (Analyse) „Absolute Quant/Fit Points“ (Absolute Quant./Anpass.Punkte) auswählen (2 Punkte)

Die Gruppe der zu analysierenden Proben auswählen

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:

- manuell den Berechnungsbereich (Schaltfläche „Background“ (Hintergrund)) für das Fluoreszenz-Hintergrundniveau („**Background Fluorescence Level**“) für den FAM-Detektor „BKV“ von **Zyklus 2 bis Zyklus 6 eingeben**.
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „BKV“ auf **0,55** einstellen;
- manuell den Berechnungsbereich (Schaltfläche „Background“ (Hintergrund)) für das Fluoreszenz-Hintergrundniveau („**Background Fluorescence Level**“) von **Zyklus 6 bis Zyklus 10** eingeben.
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,55** einstellen.

Die Werte der von den spezifischen Detektoren in der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz sowie der Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) der Fluoreszenz

dienen zur Bestimmung des Schwellenwertzyklus („**Threshold Cycle (Ct)**“), d. h. des Zyklus, in dem der **Fluoreszenzschwellenwert** erreicht wird.

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** dienen die **Ct-Werte** für BKV zur Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) dieses Amplifikationslaufs sowie zur Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle gezeigt:

Reaktion Q - PCR Standard 10 ⁵ Detektor „BKV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT
Standardkurve Detektor „BKV“	Akzeptanzbereich	Amplifikation/Detektion
Korrelationskoeffizient (R2)	0,99 ≤ R2 ≤ 1,0	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10⁵ Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist oder der Wert des Korrelationskoeffizienten (R2) („**Correlation Coefficient (R2)**“) außerhalb der Grenzen des Akzeptanzbereichs liegt, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Während der Amplifikations- oder der Detektionsphase sind Probleme aufgetreten (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardpositionen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion der **Negativkontrolle** dient der **Ct-Wert** von BKV (Fenster „Analysis“ (Analyse)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negativkontrolle Detektor „BKV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negativkontrolle** für BKV nicht **Ct Undetermined**, wurde das Vorhandensein der Ziel-DNA nachgewiesen. Während der Amplifikationsphase sind Probleme aufgetreten (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Bei den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** dient der **Ct-Wert** für BKV zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct-Wert** für die interne Kontrolle zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

Hinweis: Überprüfen Sie mithilfe der Gerätesoftware (Fenster „Analysis“ (Analyse)), dass der **Ct-Wert** anhand eines schnellen und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenzwerte und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrundsignals (unregelmäßiger oder rauschender Hintergrund) ermittelt wurde.

Ergebnisse, wie der **Ct-Wert**, aus den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** (Fenster „Analysis“) werden wie in der folgenden Tabelle dargestellt verwendet:

Probenreaktion		Eignung der Probe	Assayergebnis	BKV-DNA
Detektor „BKV“	Detektor „IC“			
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	ungeeignet	ungültig	-
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, negativ	NICHT ERKANNT
Ct Determined (Ct bestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	geeignet	gültig, positiv	ERKANNT
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, positiv	ERKANNT

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) für BKV

und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** für die interne Kontrolle, konnte die interne Kontroll-DNA nicht effizient nachgewiesen werden. In diesem Fall sind während der Amplifikationsphase (ineffiziente oder Null-Amplifikation) oder während der Extraktionsphase (abgebaute Proben-DNA, Probe mit zu niedriger Zellzahl, Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei BKV und **Ct ≤ 35** bei der internen Kontrolle, wurde die BKV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die BKV-DNA in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“) vorliegt. In diesem Fall wäre das Ergebnis falsch-negativ.

Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Hinweis: Wird während der Amplifikationsreaktion einer Probe BKV-DNA nachgewiesen, kann die Amplifikation der internen Kontrolle zu einem Ergebnis von Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt) führen. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der internen Kontrolle durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten BKV-Reaktion verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Assay-Ergebnis gültig.

Analyse der quantitativen Ergebnisse

Nach Durchführung des Verfahrens für die qualitative Analyse kann die quantitative Analyse der Ergebnisse der positiven Probe durchgeführt werden.

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10⁵ Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist oder die Ct-Werte der vier Q-PCR Standards nicht im Bereich der Standardkurve liegen, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Während der Amplifikations- oder der Detektionsphase sind Probleme aufgetreten (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardpositionen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Die **Ct-Werte** für BKV in den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** (Schaltfläche **Standard Curve**) aus dem Amplifikationslauf dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, von 1.000.000 bis zirka 10 Kopien pro Reaktion bzw. von 25.000.000 bis 250 Kopien pro ml mit dem Extraktionssystem **MagNA Pure 24** zu quantifizieren (siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Probenergebnis FAM-Detektor „BKV“	BKV-Kopien pro Reaktion
Menge > 1 x 10 ⁶	ÜBER 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Menge ≤ 1 x 10 ⁶	= Menge
Menge < 1,0 x 10 ¹	WENIGER ALS 10

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** (Fenster „Analysis“ (Analyse)) dienen zur Berechnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen **Kopien** von BKV (**Nc**) gemäß dieser Formel:

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

Dabei ist:

- Vc** die Menge der bei der Extraktion verwendeten Probe im Verhältnis zur gewünschten Maßeinheit;
- Ep** die Effizienz des Verfahrens, der Extraktion und der Amplifikation, **ausgedrückt als Dezimalzahl**;
- Ve** das aus der Extraktion erhaltene Gesamtvolumen **ausgedrückt in µl**;
- Va** das Volumen des in der Amplifikationsreaktion verwendeten Extraktionsprodukts **ausgedrückt in µl**;
- Menge** das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der Probe **ausgedrückt in Kopien pro Reaktion**.

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und das Extraktionssystem **MagNA Pure 24** verwendet

und muss das Ergebnis in **Kopien/ml** ausgegeben werden, so ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 25 \times \text{Menge}$$

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 10 Kopien / 20 µl in 150.000 Kopien von pBETAGLOBIN / 20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 18 Wiederholungen zur Durchführung der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
10 Kopien Plasmid-DNA + 150.000 Kopien beta-Globin	18	18	0

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe „BKV Molecular “Q” Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „MagNA Pure 24“				
Probe	Nenntiter Kopien/ml	Nenntiter log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	-	0/2	-

Alle negativen Proben wurden richtig als negativ erkannt und alle positiven Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log erkannt.

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial QCMD 2017 BK Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von BKV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „MagNA Pure 24“			
Probe	Konsensus Konz. log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/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	negativ	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

BKV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD

BKVDNA17S-09	4,637	2/2	4,488
BKVDNA17S-10	4,874	2/2	5,090

Alle negativen Proben wurden richtig als negativ und alle positiven Proben richtig als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts $\pm 0,5$ log erkannt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität wurde mithilfe von 30 in EDTA entnommenen, BKV-DNA-negativen Plasmaproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO international standard for BKV virus DNA“ (NIBSC-Code 14/212, Vereinigtes Königreich) BKV-DNA-dotiert wurden und 30 BKV-DNA-negativen Urinproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO international standard for BKV virus DNA“ (NIBSC-Code 14/212, Vereinigtes Königreich) BKV-DNA-dotiert wurden, bewertet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **Magna Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0
BKV-DNA-dotierter Urin	30	30	0

Alle Proben wurden als BKV-DNA-positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Plasma- und Urinproben betrug 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität wurde mithilfe von 31 in EDTA entnommenen, vermutlich BKV-DNA-negativen Plasmaproben und 32 vermutlich BKV-DNA-negativen Urinproben bewertet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **Magna Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, vermutlich BKV-DNA-negatives Plasma	31	0	31
Vermutlich BKV-DNA-negativer Urin	32	0	32

Alle Plasma- und Urinproben waren beim ersten Test gültig und wurden als BKV-DNA-negativ bestätigt. Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Plasma- und Urinproben betrug 100 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Dokumentation „BKV ELITE MGB® Kit“, FTP 175PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

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

GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf ausschließlich aus folgenden klinischen Proben extrahierter DNA verwendet werden: in EDTA entnommenes Plasma, ohne Konservierungsmittel entnommener Urin und Liquor.

Keine aus heparinisierten Proben extrahierte DNA zusammen mit diesem Produkt verwenden: Heparin hemmt die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren und führt zu ungültigen Ergebnissen.

Keine mit Hämoglobin, Dextran, Ficoll®, Ethanol oder 2-Propanol kontaminierte extrahierte DNA zusammen mit diesem Produkt verwenden: Diese Stoffe hemmen die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren und können zu ungültigen Ergebnissen führen.

Mit diesem Produkt keine extrahierte DNA verwenden, die große Mengen an humaner genomischer DNA enthält, da diese die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren hemmen kann.

Es liegen keine Daten zur Produktleistung mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben

BKV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS175PLD

extrahiert wurde: in EDTA entnommenes Vollblut.

Es liegen keine Daten zu einer Inhibition durch antivirale, antibiotische, chemotherapeutische oder immun supprimierende Medikamente vor.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von einer angemessenen Identifizierung, Entnahme, Transportierung, Aufbewahrung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es daher notwendig, bei diesen Schritten vorsichtig vorzugehen und die den Produkten für die Nukleinsäureextraktion beiliegenden Gebrauchsanweisungen sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Methode zur Echtzeit-Amplifikation empfindlich für Kreuzkontaminationen durch BKV-positive klinische Proben, die Positivkontrollen und die gleichen Amplifikationsprodukte. Kreuzkontaminationen führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch das Produktformat werden Kreuzkontaminationen begrenzt; trotzdem können Kreuzkontaminationen nur durch Einhaltung der guten Laborpraxis und sorgfältige Beachtung der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen Unfälle mit möglicherweise ernsten Folgen für den Anwender und andere Personen vermieden werden.

Die Verwendung dieses Produkts erfordert Arbeitskleidung und Arbeitsbereiche, die für den Umgang mit potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich klassifizierten chemischen Präparaten geeignet sind, um Unfälle mit möglicherweise ernsten Folgen für den Anwender und andere Personen zu vermeiden.

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen falsche Ergebnisse vermieden werden.

Eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten ist zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Für die Verwendung des Produkts werden Spezialkleidung und Instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vor einer Umstellung auf eine neue Technologie sollten die Anwender aufgrund von inhärenten Unterschieden zwischen verschiedenen Technologien Korrelationsstudien zu den Methoden durchführen, um die Unterschiede zwischen den Technologien abschätzen zu können.

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis bedeutet, dass die BKV-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter dem Detektionslimit des Produkts liegt (siehe „Leistungsmerkmale“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein und eine Wiederholung des Tests erfordern. Eine erneute Testung ab der Extraktion kann zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen.

Etwaige Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion des viralen Genoms können den Nachweis und die Quantifizierung der BKV-DNA beeinträchtigen.

Wie bei allen diagnostischen Produkten müssen bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen, falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen, wie in der Notfalldiagnostik, kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen Auswirkungen auf den Patienten beitragen.

FEHLERBEHEBUNG

Ziel-DNA nicht in der Positivkontrolle oder den Q - PCR Standard Reaktionen erkannt oder ungültiger Korrelationskoeffizient der Standardkurve

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reaktionen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle oder des dispensierten Standards kontrollieren.
Falscher Sitzungs Aufbau am ELITE InGenius	Überprüfen Sie die Position von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards. Prüfen Sie die Volumina der Reaktionsmischung, der Positivkontrolle oder der Standards.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Positivkontrolle oder Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Positionseinstellungen für die Positivkontrolle oder Standardreaktionen des Geräts überprüfen. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.
Instrumentenfehler.	Wenden Sie sich an den technischen Service der ELITechGroup.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negativkontrolle erkannt

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen oder Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Falscher Sitzungs Aufbau am ELITE InGenius	Überprüfen Sie die Position der Reaktionsmischung oder der Negativkontrolle. Prüfen Sie die Volumina der Reaktionsmischung oder der Negativkontrolle.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen oder Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot sterilen Wassers verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.
Instrumentenfehler.	Wenden Sie sich an den technischen Service der ELITechGroup.

Target- und Internal Control-DNA nicht in den Probenreaktionen nachgewiesen

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Mikroplatten-Vertiefungen.	Vermeiden Sie es, den Inhalt des Probenröhrchens zu verschütten. Wechseln Sie immer die Spitzen zwischen einer Probe und einer anderen. Gehen Sie beim Dispensieren von Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorsichtig vor und beachten Sie das Arbeitsblatt.
Falscher Sitzungs Aufbau am ELITE InGenius	Überprüfen Sie die Position der Reaktionsmischung oder der Negativkontrolle. Prüfen Sie die Volumina der Reaktionsmischung oder der Negativkontrolle.
Abbau der internen Kontrolle.	Verwenden Sie neue Aliquote der Internen Kontrolle.
Inhibierung durch probenstörende Substanzen.	Wiederholen Sie die Amplifikation mit einer 1:2-Verdünnung in molekularbiologischem Wasser der eluierten Probe in einer "PCR only"-Sitzung. Wiederholen Sie die Extraktion und Amplifikation der Probe.
Falsche Lagerung der Reagenzien.	Stellen Sie sicher, dass die Reaktionsmischung nicht länger als 30 Minuten der Raumtemperatur ausgesetzt war.
Probleme bei der Extraktion	Überprüfen Sie die Qualität und Konzentration der extrahierten DNA.
Instrumentenfehler.	Wenden Sie sich an den technischen Service der ELITechGroup.

Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsche Dispensierung der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negativ- und Positivkontrollen oder Standards in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
Einstellfehler der Grundlinie.	Bereich für die Grundlinienberechnung innerhalb von Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat (die Daten unter „Results“ (Ergebnisse), „Component“ (Komponente) überprüfen) und die Zunahme des Fluoreszenzsignals noch nicht begonnen hat, z. B. von Zyklus 6 auf Zyklus 15. Die automatische Grundlinienberechnung durch Aktivieren der Option „Auto Baseline“ verwenden.

Anomale Dissoziationskurve

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Fehlen eines definierten Peaks. Definierter Peak, der sich jedoch von dem der anderen Proben und der Standards oder Positivkontrolle unterscheidet.	Kontrollieren, ob der Ct-Wert des FAM-Detektors unter 30 liegt. Große Menge an Amplifikationsprodukt am Ende der Reaktion kann die Schmelzkurvenanalyse beeinträchtigen. Die Probenamplifikation wiederholen, um das Vorhandensein von Ziel-DNA mit einer möglichen Mutation zu bestätigen. Die Ziel-DNA der Probe sollte sequenziert werden, um die Mutation zu bestätigen.

Bei ELITe InGenius: Fehler 30103	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe.	Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist: - Amplifikation der eluierten Probe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen oder - die Extraktion mit einer Verdünnung der Primärprobe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.

SYMBOLE



Katalognummer.



Temperaturobergrenze.



Chargenbezeichnung.



Verwendbar bis (letzter Tag des Monats).



In-vitro-Diagnostikum.



Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.



Genügend für „n“ Tests.



Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.



Inhalt.



Vor Sonneneinstrahlung schützen.



Hersteller.

HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

Dieses Produkt enthält von LTC lizenzierte Reagenzien.

Dieses Produkt wird im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S.p.A. und deren Tochtergesellschaften und LTC vertrieben. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Life Technologies, Inc., 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA.
Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-Mail: outlicensing@LTC.com.

ELITe MGB Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 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 und 9,169,256, durch anhängige Patentanmeldungen und EP-Patente mit den Nummern 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1235938, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256 und 2714939 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz gestattet es der natürlichen oder juristischen Person, der dieses Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt zu verwenden und die mithilfe des Produkts generierten Daten nur für humandiagnostische Zwecke zu verwenden. Weder die ELITechGroup S.p.A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

„ELITe MGB®“, das „ELITe MGB®-Logo“, „ELITe InGenius®“ und „ELITe BeGenius®“ sind in der Europäischen Union als Marken eingetragen.

„NucliSENS® easyMAG®“ sind eingetragene Marken von bioMérieux.

„QIASymphony®“ ist eine eingetragene Marke der QIAGEN GmbH.

Ficoll® ist eine eingetragene Marke von 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

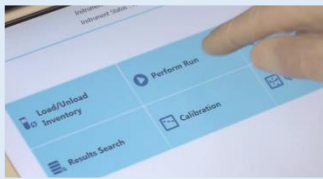
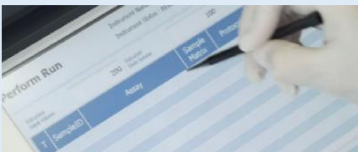

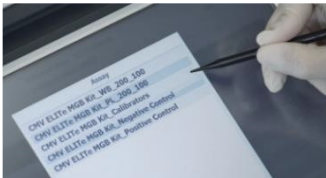

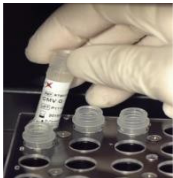

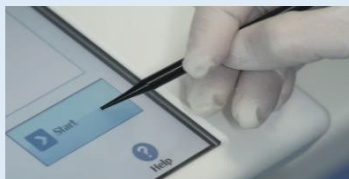

I. Procedures ELITE InGenius

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>



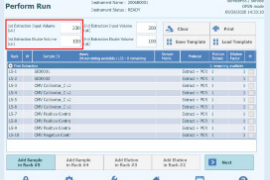
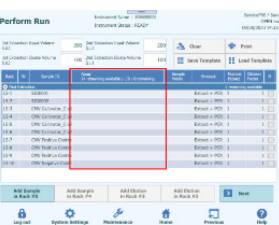
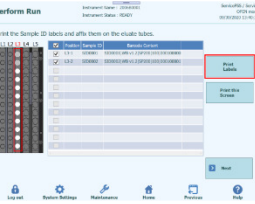



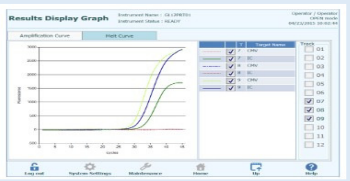
L. Procedures ELITE BeGenius

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

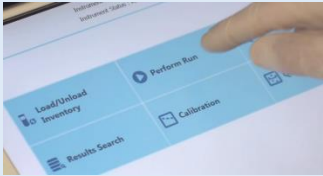
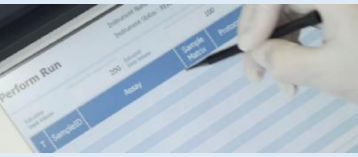

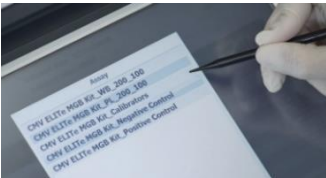

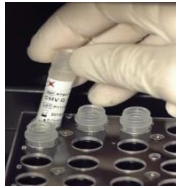

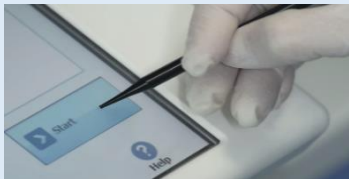

I. Procedures

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

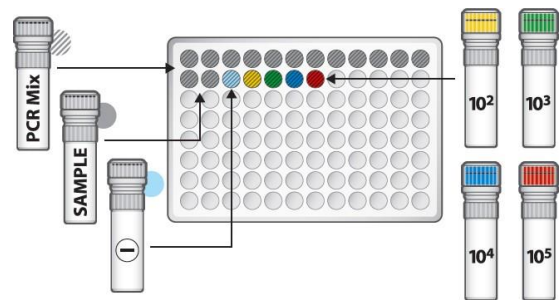
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition 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

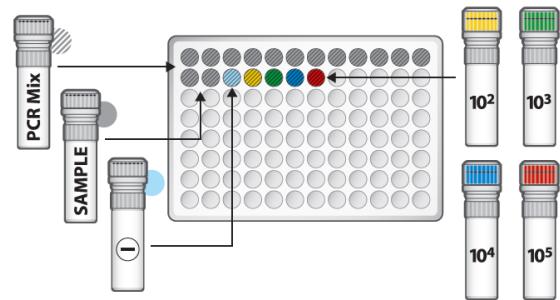
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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.