



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
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	Page 1
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	Page 3
MATÉRIEL FOURNI	Page 3
MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI	Page 3
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 3
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 5
ELITe InGenius® and ELITe Be Genius®	Page 6
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 6
ELITe InGenius® PROCÉDURE	Page 8
ELITe BeGenius® PROCÉDURE	Page 14
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 19
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Page 30
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 30
PROCÉDURE	Page 31
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 40
Roche cobas z 480 analyzer	Page 45
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 45
PROCÉDURE	Page 46
CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	Page 51
BIBLIOGRAPHIE	Page 53
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 54
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 55
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 57
NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE	Page 58

APPLICATION

Le produit «**BKV ELITe MGB® Kit**» fait partie d'un test qualitatif et quantitatif d'amplification des acides nucléiques destiné à la **détection et la quantification de l'ADN du Polyomavirus humain BK**

BKV ELITe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

(BKV) à partir d'échantillons d'ADN extraits de plasma prélevés dans un tube EDTA, d'urine prélevée sans conservateurs et de liquide céphalo-rachidien (LCR).

Le produit est destiné à être utilisé, conjointement au tableau clinique du patient et aux résultats d'autres examens de laboratoire, dans le diagnostic et le monitoring de l'infection à BKV.

PRINCIPE DU TEST

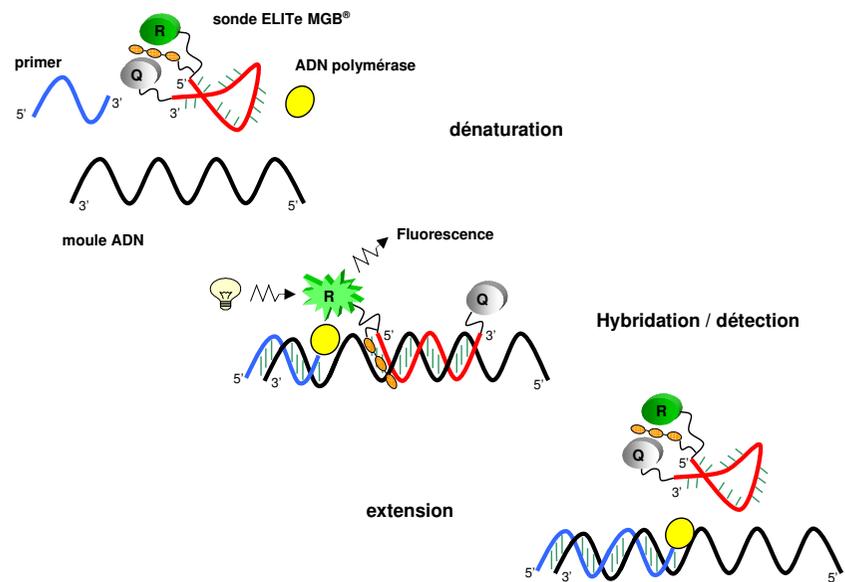
Le test est basé sur une réaction d'amplification en temps réel sur microplaque avec un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de la fluorescence (thermocycleur pour amplification en temps réel).

Dans chaque puits sont réalisées deux réactions d'amplification : une réaction spécifique pour la région du gène codant l'**antigène Large T** de BKV et une réaction spécifique pour la région du gène codant le **β-globine** humaine (contrôle interne d'inhibition) à partir de l'ADN extrait des échantillons à l'examen. La sonde à technologie ELITe MGB®, spécifique pour BKV marquée avec le fluorophore FAM est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification pour BKV. La sonde à technologie ELITe MGB® spécifique au Contrôle interne, marquée avec le fluorophore AP525 (équivalent à VIC) est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit de la réaction d'amplification pour le contrôle interne. L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure qu'augmentent les produits spécifiques de la réaction d'amplification et est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de révéler la présence et le titre de l'ADN de BKV dans l'échantillon initial.

Au terme de la session d'amplification, il est possible d'analyser la courbe de dissociation (melting curve) afin de déterminer la température de dissociation (melting température). La température de dissociation permet de confirmer la présence de la bonne cible, ou d'identifier des mutations.

Le test a été validé sur les systèmes présentés dans ce manuel d'instruction.

La figure ci-dessous synthétise le mécanisme d'activation et d'émission de la fluorescence de la sonde fabriquée avec la technologie ELITe MGB®. La sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification et elle peut donc être utilisée pour l'analyse de la courbe de dissociation.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit «**BKV ELiTe MGB® Kit**» contient le mélange "BKV Q - PCR Mix" pour l'amplification en temps réel. Ce mélange est complet, prêt à l'emploi, stabilisé dans une solution stabilisante et **pré-aliquoté en quatre tubes**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, une quantité suffisante pour **24 tests** en association avec les systèmes «**ELiTe InGenius®**» et «**ELiTe BeGenius®**» et pour **25 tests** en association avec les autres systèmes.

Les oligonucléotides d'amorçage et la sonde BKV (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore FAM et inactivée par le quencher non fluorescent) sont spécifiques à la région du gène codant l'**antigène Large T** de BKV.

Les amorces et la sonde pour le contrôle interne (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP525, un analogue à VIC), et inactivée par un quencher non fluorescent) sont spécifiques du **promoteur et de la région 5' UTR** du gène codant pour la **β-globine humaine**.

Le mélange de réaction fournit le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 utilisé en remplacement du ROX ou du Cy5 comme référence passive pour la normalisation de la fluorescence, l'enzyme Uracil N-glycosidase (UNG) pour l'inactivation des contaminations dérivant de produit d'amplification et l'enzyme ADN polymérase à activation thermique (hot start).

Le produit permet d'effectuer **96 tests en association avec les systèmes ELiTe InGenius et «ELiTe BeGenius®»**, en incluant les standards et les contrôles.

Le produit permet d'effectuer **100 tests en association avec d'autres systèmes**, en incluant les standards et les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des dangers
BKV Q - PCR Mix	mélange complet de réaction	4 x 540 µL	-

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants sans poudre, jetables en nitrile ou équivalent.
- Vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Eau ultra pure pour la biologie.
- Thermostat programmable couplé à un système optique de détection de la fluorescence, 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, calibré conformément aux recommandations du fabricant.
- Thermostat programmable avec analyseur cobas z 480, système de détection de fluorescence optique étalonné tel que fourni par le fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction d'ADN des échantillons à analyser, le contrôle positif d'extraction, le contrôle positif pour l'amplification, l'ADN standard à quantité connue et les consommables **ne sont pas** compris dans ce produit.

Pour l'extraction manuelle d'ADN des échantillons à analyser, il est nécessaire d'utiliser le produit

générique «**EXTRAblood**» (ELiTechGroup S.p.A., code EXTB01), un kit pour l'extraction d'ADN d'échantillons cellulaires et non-cellulaires.

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, avec l'automate «**ELiTe InGenius**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT030), il est nécessaire d'utiliser les produits génériques suivants: les cartouches d'extraction «**ELiTe InGenius® SP 200**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT032SP200) or «**ELiTe InGenius® SP 1000**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), et les consommables pour extraction et amplification à partir d'échantillons biologiques «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT032CS), «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (ELiTechGroup S.p.A., code F2102-000), «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT035PCR) et «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats des échantillons à analyser, sont nécessaires l'automate «**ELiTe InGenius**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT030), et les protocoles d'analyses spécifiques suivants (ELiTechGroup S.p.A.):

- pour le calibrateur «**BKV ELiTe STD**» or «**BKV ELiTe STD_1000_100**»,
- pour le contrôle positif de l'amplification «**BKV ELiTe PC**» or «**BKV ELiTe PC_1000_100**»,
- pour le contrôle négatif de l'amplification «**BKV ELiTe NC**» or «**BKV ELiTe NC_1000_100**»,
- pour les échantillons à analyser «**BKV ELiTe PL_200_100**», «**BKV ELiTe U_200_100**» et «**BKV ELiTe U_200_100**».

Pour l'analyse automatique des échantillons avec l'instrument "ELiTe BeGenius®" (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT040), les produits génériques suivants sont validés : les cartouches d'extraction "ELiTe InGenius® SP 200" (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), les consommables pour l'extraction et l'amplification des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques "ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set" (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT032CS), "ELiTe InGenius® Waste Box" (ELiTechGroup S.p.A., ref. F2102-000), "ELiTe InGenius® PCR Cassette" (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT035PCR) et "1000 µL Filter Tips Tecan" (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

- Pour l'extraction automatique de l'ADN, l'amplification et l'interprétation de l'analyse des échantillons, l'instrument "ELiTe BeGenius®" (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT040) et les protocoles de test spécifiques suivants (ELiTechGroup S.p.A.), sont nécessaires :
- pour les calibrateurs "BKV ELiTe_Be_STD",
- pour le contrôle positif de l'amplification "BKV ELiTe_Be_PC",
- pour le contrôle négatif de l'amplification "BKV ELiTe_Be_NC",
- pour l'analyse des échantillons "BKV ELiTe_Be_PL_200_100" et "BKV ELiTe_Be_U_200_100".

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «**ELiTe STAR 200 Extraction Kit**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT011EX), kit d'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques, avec l'instrument «**ELiTe STAR**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT010).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «**ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT021EX), kit d'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques, avec l'instrument «**ELiTe GALAXY**» (ELiTechGroup S.p.A., code INT020). L'automate «**ELiTe GALAXY**» peut également effectuer la distribution des réactifs de PCR. Pour l'extraction automatique d'ADN des échantillons à analyser, il est nécessaire d'utiliser les produits génériques **NucliSENS® easyMAG® Reagents** (bioMérieux SA, réf. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kits pour l'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, avec l'automate d'extraction **NucliSENS® easyMAG®** (bioMérieux SA, réf. 200111).

Pour l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à analyser, il est également conseillé d'utiliser le produit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236) et «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 37055), kit d'extraction des acides nucléiques d'échantillons biologiques, à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, codes 9001297, 9001301) et les produits génériques correspondants.

Pour l'extraction automatique d'ADN à partir des échantillons à analyser, le produit "MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit" (Roche, réf. 07658036001), kit d'extraction d'acide nucléique à partir d'échantillons biologiques, avec l'instrument "MagNA Pure 24 System" (Roche, réf. 07290519001) est également validé.

Lorsque l'instrument 7300 Real-Time PCR System est utilisé pour l'amplification d'ADN, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates**» (ELiTechGroup S.p.A., code RTSACC01), contenant des microplaques de 0,2 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Lorsque l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument est utilisé pour l'amplification d'ADN, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC02) contenant des microplaques de 0,1 mL et des film adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

Avec un instrument cobas z 480 analyzer, il est conseillé d'utiliser le produit générique «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, ref. 05232724001), contenant des microplaques de 0,3 mL et des films adhésifs, pour l'amplification en temps réel.

S'il est nécessaire de procéder à la révélation d'ADN de BKV (analyse qualitative), il est nécessaire d'utiliser le produit «**BKV - ELiTe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., code CTR175PLD), ou le produit produit «**BKV - ELiTe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., code CTR175PLD-R), contrôle positif d'ADN plasmidique

S'il est nécessaire de procéder à la révélation et à la quantification d'ADN de BKV (analyse quantitative), il est nécessaire d'utiliser le produit «**BKV ELiTe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., code STD175PLD), quatre dilutions d'ADN plasmidique de titre connu pour obtenir la courbe standard.

Comme contrôle positif d'extraction d'acides nucléique d'échantillons non-cellulaires et contrôle d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser des produits génériques «CPE - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., code CTRCPE), une solution stabilisée contenant deux ADN plasmidiques et l'ARN génomique du bactériophage MS2.

Un facteur de conversion permet d'exprimer les résultats quantitatifs dans les Unités Internationales de BKV du "1er Standard International OMS pour le virus à ADN BKV" (NIBSC code 14/212, United Kingdom).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est destiné à l'usage *in vitro* uniquement.

Avertissements et précautions

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être décontaminé à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant au moins 30 minutes ou autoclavé à 121°C pendant une heure avant d'être éliminé.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériaux utilisés pour le test comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Éviter le contact direct avec les réactifs. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés conformément aux normes de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Porter des vêtements de protection et des gants et protéger les yeux et le visage.

Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.

Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans l'environnement de travail.

Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies dans le produit avant de procéder au test.

Respecter scrupuleusement les consignes fournies dans le produit pendant l'exécution du test.

Respecter la date de péremption du produit.

N'utiliser que les réactifs présents dans le produit et ceux conseillés par le producteur.

Ne pas utiliser des réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques doivent être exécutées par un personnel compétent et ayant reçu une formation appropriée afin d'éviter tout risque de résultats erronés dus en particulier à la dénaturation des acides nucléiques ou à la contamination des échantillons par des produits d'amplification.

Lorsque la réaction d'amplification est effectuée manuellement, il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la réaction d'amplification est effectuée manuellement, il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification. Ne jamais transférer les blouses, gants et instruments de la zone dédiée à l'amplification / détection des produits d'amplification vers la zone dédiée à l'extraction / préparation des réactions d'amplification.

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Les échantillons ne doivent être utilisés que pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant des échantillons différents ne doivent jamais être ouverts simultanément. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, d'ADN et d'ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de façon à être utilisés au cours d'une seule étape. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase et RNase, d'ADN et d'ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de façon à en limiter le plus possible la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification ne doivent servir qu'à cet usage.

Avertissements et précautions concernant les composants

Le **BKV Q - PCR Mix** doit être conservée à l'abri de la lumière et à une température de -20° C.

Le **BKV Q - PCR Mix** ne doit pas être congelé et décongelé plus de **cinq fois**: Tout cycle de congélation / décongélation supplémentaire risque d'entraîner une perte des performances du produit.

ELiTe InGenius® and ELiTe BeGenius®**ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES****Échantillons**

Ce produit doit être utilisé avec des échantillons cliniques suivants:

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours, autrement ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant une période plus longue.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquots les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL de plasma avec l'**ELiTe InGenius®** et l'**ELiTe InGenius® Software version 1.3** (ou version suivante) suivre le protocole d'extraction **BKV ELiTe_PL_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE Internal Control** avec 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Remarque: lorsque l'extraction d'ADN à partir de 200 µL de plasma est effectuée avec le test **ELiTe BeGenius®** et le logiciel **ELiTe BeGenius® version 2.0** (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **BKV ELiTe_Be_PL_200_100** Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le contrôle interne CPE à 10 µL / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsqu'un tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Pour plus de détails sur la configuration et l'exécution de la procédure d'extraction, se reporter aux instructions d'utilisation du kit d'extraction.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN à partir de 1000 µL de plasma avec l'**ELiTe InGenius®** et l'**ELiTe InGenius® Software version 1.3** (ou version suivante) suivre le protocole d'extraction **BKV ELiTe_PL_1000_100**. Ce protocole utilise 1000 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE Internal Control** avec 10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Le tube primaire ne peut pas être utilisé en association avec le protocole d'extraction **BKV ELiTe_PL_1000_100**.

Urines prélevées sans conservateurs

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des conteneurs sans conservateurs, suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés et conservés à température ambiante (+18 / +25 °C) pendant un maximum de quatre heures. Autrement, ils peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant un maximum de trente jours ou à -70 °C pour une période de temps plus longue.

La congélation des échantillons d'urines entraîne souvent la formation de précipités qui peuvent compromettre les phases ultérieures de la méthode: pour l'extraction, utiliser uniquement le surnageant.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquots les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: lorsque l'extraction d'ADN à partir d'urine est effectuée avec l'**ELITe InGenius** et l'**ELITe InGenius Software version 1.3** (ou version suivante) suivre le protocole d'extraction **BKV ELITe_U_200_100**. Ce protocole utilise 200 µL d'échantillon, avec ajout de **CPE** a10 µL / extraction et élution des acides nucléiques dans 100 µL.

Remarque : lorsque l'extraction de l'ADN à partir de 200 µL d'urine est effectuée avec l'**ELITe BeGenius®** et le logiciel **ELITe BeGenius®** version 2.0 (ou versions équivalentes ultérieures), utiliser le protocole d'extraction **BKV ELITe_Be_U_200_100** Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute le contrôle interne **CPE** à 10 µL / extraction et élue les acides nucléiques dans 100 µL.

Lorsque le tube primaire est utilisé, le volume de l'échantillon varie en fonction du type de tube chargé. Se référer au mode d'emploi du kit d'extraction pour plus d'informations sur la façon de mettre en place et d'effectuer la procédure d'extraction.

Substances interférentes

L'ADN extrait de l'échantillon ne doit pas contenir d'héparine, ceci afin d'éviter des phénomènes d'inhibition et des résultats erronés.

Des quantités élevées d'ADN génomique humain dans l'ADN extrait de l'échantillon peuvent inhiber la réaction d'amplification.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antiviraux, antibiotiques, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Calibrateurs d'amplification et contrôles d'amplification

Avant chaque analyse d'échantillon, il est absolument obligatoire pour générer et approuver la courbe de calibration et les contrôles d'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification :

comme Calibrateurs, utilisez les quatre niveaux de concentration de **BKV ELITe Standard**, en association avec le protocole «**BKV ELITe_STD**» or «**BKV ELITe_STD_1000_100**» pour **ELITe InGenius®**, et "BKV ELITe_Be_STD" pour **ELITe BeGenius®**,

comme Contrôle positif d'amplification, utilisez le produit «**BKV - ELITe Positive Control**», en association avec le protocole «**BKV ELITe_PC**» or «**BKV ELITe_PC_1000_100**», pour **ELITe InGenius®**, et "BKV ELITe_Be_PC" pour **ELITe BeGenius®**,

comme Contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau ultra pure pour la biologie (non incluse dans le produit), en association avec le protocole «**BKV ELITe_NC**» or «**BKV ELITe_NC_1000_100**» pour **ELITe InGenius®**, et "BKV ELITe_Be_NC" pour **ELITe BeGenius®**.

Remarque: ELITe InGenius et **ELITe InGenius Software** permettent d'obtenir la courbe de calibration et la validation des résultats de contrôle de l'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification mémorisés dans sa base de données.

Les courbes de calibration approuvées et mémorisées dans la base de données expirent après **60 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de répéter la calibration.

La validation des résultats de contrôle de l'amplification, approuvés et mémorisés dans la base de données, expire après **15 jours**. À la date d'expiration, il est nécessaire de retester les contrôles positifs et négatifs.

Les calibrateurs et les contrôles d'amplification doivent être à nouveau testés dans l'un des cas suivants:

- Lancement d'un nouveau lot de réactif d'amplification

- Les résultats des analyses de contrôle de qualité (voir paragraphe suivant) ne s'inscrivent pas dans les spécifications
- Chaque intervention de maintenance principale est effectuée sur l'automate **ELITe InGenius**.

Contrôles de la qualité

Les contrôles extérieurs doivent être utilisés dans le respect de la législation locale ou nationale et des organismes d'accréditation fédéraux. Des contrôles de qualité externes sont disponibles sur le marché.

ELITe InGenius® PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du produit «**BKV ELITe MGB® Kit**» avec le système **ELITe InGenius®** se déroule en trois étapes :

- Vérification du système
- Configuration de l'analyse
- Évaluation et approbation des résultats

Vérification du système

Avant de lancer l'analyse, en suivant les consignes imparties dans la documentation de l'automate, il est nécessaire de:

- allumer l'automate **ELITe InGenius** et sélectionner le mode **FERME**
- vérifier (calibration) que les calibrateurs (**BKV Q-PCR Standard**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statut). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Calibration" dans la page d'accueil;
- vérifier (Contrôles) que les contrôles d'amplification (**BKV-Positive Control**, **BKV Negative Control**) sont exécutés, approuvés et qu'ils ne sont pas expirés (statuts). Ce contrôle peut être effectué à partir du menu "Control" dans la page d'accueil;
- choisir le type d'analyse et la mettre en œuvre suivant les instructions des protocoles des tests fournis par ELITechGroup. Ces protocoles IVD ont été validés de façon spécifique avec les kits **ELITe MGB** et l'automate **ELITe InGenius**.

Le protocole du test disponible pour le kit «**BKV ELITe MGB® Kit**» est illustré dans le tableau ci-dessous.

Protocole du test pour le kit «BKV ELITe MGB® Kit» et ELITe InGenius®			
Nom	Matrice	Unité	Caractéristiques
BKV ELITe_PL_200_100	Plasma	copies/mL ou UI / mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
BKV ELITe_PL_1000_100	Plasma	copies/mL ou UI / mL	Volume d'extraction initial: 1000 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL
BKV ELITe_U_200_100	Urine	copies/mL ou UI / mL	Volume d'extraction initial: 200 µL Volume de l'éluat: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume d'éluat utilisé pour la PCR: 20 µL

Si le protocole du test à réaliser n'est pas présent dans le système, contacter le Service clients local d'ELITechGroup.

Les protocoles d'analyse qualitative sont disponibles sur demande.

Configuration de l'étape

Le kit **BKV ELiTe MGB® Kit** associé à l'automate **ELiTe InGenius®** peut être utilisé pour effectuer :

- Cycle complet (Extraction + PCR)
- Cycle d'amplification (PCR uniquement)
- Cycle de calibration (PCR uniquement)
- Cycle d'amplification pour le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif (PCR uniquement)

Le profil thermique d'amplification est compris dans le protocole du test disponible sur l'automate et il est automatiquement rappelé lors de la sélection du protocole.

Remarque: le système ELiTe InGenius peut être raccordé au serveur d'information local (LIS), grâce auquel il est possible d'envoyer les données de configuration de la session de travail. Pour plus de détails, consulter le Manuel d'utilisation de l'automate.

Les principales étapes de configuration des quatre types de cycles sont décrites ci-dessous.

A Cycle complet

Pour configurer le cycle complet suivre les indications ci-après conformément au logiciel et son interface graphique **Graphical User Interface (GUI)**:

- Décongeler une quantité de tubes de BKV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler une quantité de tubes de CPE suffisante pour le cycle. Chaque tube permet la préparation de 12 extractions. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que l'"Extraction Input Volume" est réglé sur 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et que l'"Extracted Elute Volume" est réglé sur 100 µL.
- Pour chaque trace à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple BKV ELiTe_PL_200_100).
- Vérifier que le protocole affiché soit: "Extraction + PCR".
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne "Sample Position":
 - en cas d'utilisation d'un tube primaire, sélectionner "Primary Tube", le tube primaire ne peut être utilisé qu'à partir de 200 µL d'échantillon;
 - en cas d'utilisation d'un tube secondaire, sélectionner "Sonication Tube".Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le CPE et le BKV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les échantillons à extraire dans la position indiquée au point 8, ainsi que les cartouches d'extraction et les cassettes de PCR outre tous les consommables, en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'**ELiTe InGenius** permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat d'échantillon primaire peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction autre consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute

dispersion des produits de réaction.

Remarque: Le mélange PCR peut être utilisé pour 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélangez doucement et faites tourner le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session suivante.

B Cycle d'amplification

Pour configurer le cycle d'amplification, suivre les indications de l'interface graphique ci-après :

- Décongeler une quantité de tubes de BKV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet la préparation de 24 réactions dans des conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que l'"Extraction Input Volume" est réglé sur 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et que l'"Extracted Elute Volume" est réglé sur 100 µL.
- Pour chaque track à réaliser, renseigner le "SampleID" (SID) en saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole du test à utiliser dans la colonne "Assay" (par exemple BKV ELiTe_PL_200_100).
- Sélectionner "PCR only" dans la colonne "Protocol".
- Contrôler que la position de chargement de l'échantillon élué dans la colonne "Sample Position" soit "Extra Tube" (position 1)". Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le BKV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les échantillons des acides nucléiques extraits et la cassette PCR, en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'**ELiTe InGenius** permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat d'échantillon extrait peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction autre consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

Remarque: Le mélange PCR peut être utilisé pour 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélangez doucement et faites tourner le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session suivante.

C Cycle de calibration

Pour configurer le cycle de calibration, suivre les indications de l'interface graphique ci-après :

- Décongeler une quantité de tubes de BKV Q - PCR Mix suffisante pour réaliser le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler les tubes de BKV Q - PCR Standard (Cal1: BKV Q-PCR Standards 10², Cal2: BKV Q-PCR Standards 10³, Cal3: BKV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: BKV Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet la préparation de 8 réactions. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que l'"Extraction Input Volume" est réglé sur 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou

1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et que l'"Extracted Elute Volume" est réglé sur 100 µL.

- A partir de la track à réaliser, sélectionner le protocole de dosage à utiliser dans la colonne "Assay" (BKV ELiTe_STD) et indiquer le numéro du lot et la date d'expiration pour la BKV Q - PCR standard. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le BKV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger les tubes de calibration et la cassette PCR en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'ELiTe InGenius permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat de standard peut être retiré de l'automate, bouché et conservé à -20°C.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction autre consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

Remarque: Le mélange PCR peut être utilisé pour 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélangez doucement et faites tourner le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session suivante.

D. Cycle d'amplification pour le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif

Pour configurer le cycle d'amplification du Contrôle Positif, veuillez suivre les indications de l'interface graphique ci-après :

- Décongeler une quantité de tubes de BKV Q - PCR Mix suffisante pour le cycle. Chaque tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Décongeler le produit BKV - Positive Control pour l'amplification du Contrôle Positif. Décongeler un tube à température ambiante. Chaque tube permet la préparation de 4 cycles. Mélanger délicatement le contenu et centrifuger pendant 5 secondes.
- Transférer au moins 50 µL d'eau ultra pure nécessaire aux cycles dans un tube d'éluion fourni avec ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
- Sélectionner "Perform Run" dans la page d'accueil.
- Vérifier que l'"Extraction Input Volume" est réglé sur 200 µL pour traiter 200 µL d'échantillon ou 1000 µL pour traiter 1000 µL d'échantillon et que l'"Extracted Elute Volume" est réglé sur 100 µL.
- Pour le contrôle positif, sélectionnez BKV ELiTe_PC ou BKV ELiTe_PC_1000_100 et indiquez le numéro de lot et la date de péremption du contrôle positif BKV.
- Pour le contrôle négatif, sélectionnez BKV ELiTe_NC ou BKV ELiTe_NC_1000_100 et indiquez le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire..
- Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger le BKV Q-PCR Mix dans le gestionnaire de réactifs sélectionné en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger / contrôler les racks d'embouts dans la zone sélectionnée en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Charger la cassette PCR, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif en suivant les instructions de l'interface graphique. Cliquer sur "Next" pour poursuivre la configuration.
- Fermer la porte de l'automate.
- Appuyer sur "Start" pour lancer le cycle.

Au terme de la procédure, l'ELiTe InGenius permet d'afficher, approuver, mémoriser les résultats et d'imprimer et d'enregistrer le compte-rendu.

Remarque: Le Contrôle Positif et Contrôle Négatif doit être effectué comme contrôle d'amplification, pour configurer la carte de contrôle. Pour configurer le graphique, quatre (4) valeurs de Contrôle Positif et Contrôle Négatif de 4 séances différentes, sont requises. Au terme du paramétrage, les valeurs du contrôle positif et Contrôle Négatif sont enregistrées par l'automate et utilisées pour surveiller la phase d'amplification. Pour plus de détails, se reporter au Manuel d'Utilisation de l'automate.

Remarque: Au terme du cycle, le reliquat de Contrôle Positif peut être retiré de l'automate, bouché, identifié et conservé à -20°C. Manipuler l'échantillon avec précaution pour éviter tout risque de contamination.

Remarque: Au terme du cycle, les cassettes PCR avec les produits de réaction et autres consommables doivent être retirées de l'automate et éliminées en veillant à ne pas contaminer l'environnement. Éviter toute dispersion des produits de réaction.

Remarque: Le mélange PCR peut être utilisé pour 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé à bord dans le bloc réfrigéré jusqu'à 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélangez doucement et faites tourner le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session suivante.

Évaluation et approbation des résultats

Au terme du cycle, l'écran "Results Display" s'affiche automatiquement. Il affiche les résultats relatifs à échantillon / calibrateur / contrôle ainsi que les informations concernant le cycle. A partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les comptes-rendus ("Sample Report" ou "Track Report").

Remarque: Le système ELiTe InGenius peut être relié au "Location Information Server" (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les résultats des sessions de travail au centre de données du laboratoire. Reportez-vous au manuel de l'utilisateur de l'instrument pour plus de détails.

ELiTe InGenius génère les résultats avec le kit «BKV ELiTe MGB® Kit», en suivant cette procédure:

- Validation de la courbe de calibration
- Validation des résultats d'amplification du Contrôle Positif et Contrôle Négatif
- Validation des résultats de l'échantillon
- Élaboration du compte-rendu des résultats de l'échantillon

A. Validation de la courbe de calibration

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour BKV ("BKV") dans les réactions d'amplification du calibrateur sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole du test "BKV ELiTe_STD" et "BKV ELiTe_STD_1000_100".

La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, est mémorisée dans la base de données et peut être visualisée et approuvée par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions de l'interface graphique. La courbe de calibration, spécifique au lot du réactif d'amplification, expirera après 60 jours.

Avant d'analyser chaque échantillon, il est impératif d'élaborer et d'approuver la courbe de calibration pour le lot de réactif d'amplification utilisé. La disponibilité d'une courbe de calibration et les résultats du contrôle d'amplification "Approved" (Status) sont affichés dans la fenêtre "Calibration" du logiciel ELiTe InGenius.

Remarque: Lorsque la courbe de calibration ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'automate affiche le message "not passed" dans le menu "Calibration", et la courbe ne peut pas être approuvée. Les réactions d'amplification des calibrateurs doivent être répétées.

Remarque: Dans le cas où la courbe de calibration est chargée avec les échantillons et le résultat est invalide, l'ensemble de la session ne sera pas valide et l'amplification de tous les échantillons devra être répétée.

B. Validation des résultats d'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour BKV ("BKV"), dans les réactions d'amplification du Contrôle Positif et du Contrôle Négatif sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole du test "BKV ELiTe_PC", "BKV

ELITe_PC_1000_100", "BKV ELITe_NC" et "BKV ELITe_NC_1000_100".

Les résultats de l'amplification du contrôle Positif et du contrôle Négatif, spécifiques au lot du réactif d'amplification, sont mémorisés dans la base de données et peuvent être visualisés et approuvés (Controls) par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions GUI.

Les résultats de l'amplification du contrôle Positif et du contrôle Négatif, spécifiques au lot du réactif d'amplification, expireront après 15 jours.

Avant d'analyser un échantillon il est impératif d'élaborer et d'approuver le résultat de l'amplification du contrôle Positif et du contrôle Négatif pour le lot de réactif d'amplification utilisé. La disponibilité du résultat du contrôle Positif d'amplification "Approved" (Status) s'affiche dans la fenêtre "Controls" du logiciel ELITe InGenius. Si le contrôle positif d'amplification et les résultats de contrôles négatif sont manquants, les générer, comme décrit ci-dessus.

Remarque: Lorsque le contrôle Positif ou le contrôle Négatif ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'automate visualise le message "not passed" et le contrôle ne peut être approuvé. Les réactions d'amplification du contrôle positif doivent être répétées.

Remarque: Lorsque le contrôle positif ou le Contrôle Négatif est effectué comme contrôle d'amplification avec les échantillons et que le résultat n'est pas valide, toute l'étape est invalidée et l'amplification de tous les échantillons doit être répétée.

C. Validation des résultats de l'échantillon

Les signaux de fluorescence émis par la sonde spécifique pour BKV ("BKV") et par la sonde spécifique pour le Contrôle Interne ("IC") dans chaque réaction d'amplification, sont automatiquement analysés et interprétés par le logiciel de l'automate compte tenu des paramètres du protocole du test.

Remarque: Avant d'analyser chaque échantillon, il est impératif de générer et d'approuver la courbe de calibration et la validation des réactifs d'amplification pour le lot de réactif utilisé. La disponibilité d'une Courbe de calibration et d'amplification et les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif "Approved" (Statut) s'affichent dans les fenêtres "Calibration" et "Controls" du logiciel ELITe InGenius.

Les résultats sont décrits dans les rapports élaborés par l'automate ("Result Display").

Le cycle de l'échantillon est valide lorsque les trois conditions reportées dans le tableau ci-dessous sont réunies.

1) Courbe de calibration	Status
BKV Q-PCR Standard	APPROVED
2) Contrôle Positif	Status
BKV Positive Control	APPROVED
3) Contrôle Négatif	Status
BKV Negative Control	APPROVED

Pour chaque échantillon, le calcul de la charge virale est effectué automatiquement par le logiciel ELITe InGenius et par les paramètres du protocole de l'analyse.

Pour chaque échantillon, le calcul de la charge virale est effectué en automatique par le système. Comme défini dans le protocole du test, la mesure est exprimée en "copies / mL" ou "UI / mL".

Les éventuels messages relatifs au résultat d'un échantillon sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Résultat du cycle de l'échantillon	Interprétation
BKV: ADN détecté ; quantité égale à XXX copies / mL ou UI/mL	ADN de BKV détecté s'inscrit dans l'intervalle de mesure du test, quantité comme indiqué.
BKV: ADN détecté, quantité inférieure à LLoQ copies / mL o UI/mL	ADN de BKV détecté inférieur au seuil inférieur de quantification du test
BKV: ADN détecté, quantité supérieure à ULoQ copies / mL o UI/mL	ADN de BKV détecté supérieur au seuil supérieur de quantification du test
BKV: ADN non détecté, ou quantité inférieure à LoD copies / mL o UI/mL	ADN de BKV non détecté ou inférieur au seuil de détection du test

Invalid - Retest Sample	Résultat du test non valide suite à une erreur du contrôle interne (Extraction erronée ou présence d'un inhibiteur)
-------------------------	--

Les échantillons non conformes pour l'analyse sont indiqués comme "Invalid - Retest Sample" par le logiciel du système d'ELITe InGenius. Dans ce cas, il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne parce qu'il y avait des problèmes dans la phase d'amplification ou dans la phase d'extraction (dégradation de l'ADN, une perte d'ADN lors de l'extraction ou la présence d'inhibiteurs dans l'extrait) qui peuvent causer des résultats incorrects et des faux négatifs.

Lorsque le volume de l'échantillon extrait est suffisant, il peut faire l'objet d'un nouveau test à travers une amplification en mode cycle "PCR Uniquement". En présence d'un deuxième résultat invalide, l'échantillon doit être re-testé à partir de l'extraction, en utilisant le mode cycle "Extraction + PCR".

Les échantillons utilisés dans lesquels il n'a pas été possible de détecter l'ADN de BKV sont présentés comme: "BKV: DNA Not Detected or below LoD". Dans ce cas, il ne saurait être exclu que l'ADN de BKV présente un titre inférieur à la limite de détection du produit (voir «Caractéristiques de performance»).

Remarque: Les résultats obtenus avec ce dosage doivent être interprétés compte-tenu de toutes les données cliniques et les autres résultats des examens de laboratoire concernant le patient.

Les résultats du cycle de l'échantillon sont enregistrés dans la base de données et peuvent être visualisés et approuvés (Result Display) par le personnel qualifié comme "Administrateur" ou "Analyste", suivant les instructions de l'interface graphique. A partir de la fenêtre "Result Display" il est possible d'imprimer et d'enregistrer l'échantillon exécuté comme "Sample Report" et "Track Report".

D. Élaboration du compte-rendu des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont enregistrés dans la base de données et peuvent être visualisés comme "Sample Report" et "Track Report".

Le "Sample Report" montre les détails d'un cycle de l'échantillon sélectionné à travers le numéro de l'échantillon, par exemple du patient.

Le "Track Report" montre les détails d'une analyse pour une position définie.

Le "Sample Report" et le "Track Report" peut être imprimé et signé par le personnel autorisé.

ELITe BeGenius® PROCÉDURE

Paramétrage de la session

Le kit **BKV ELITe MGB Kit**, en association avec le système **ELITe BeGenius** peut être utilisé afin d'effectuer les opérations suivantes :

- Analyse d'échantillons (EXTR + PCR),
- Analyse d'amplification (PCR uniquement),
- Analyse d'étalement (PCR uniquement),
- Analyse des contrôles positif et négatif (PCR uniquement).

Tous les paramètres nécessaires pour la session sont inclus dans le protocole d'analyse disponible sur l'instrument et sont automatiquement rappelés lorsque le protocole d'analyse est sélectionné.

Remarque : le système ELITe BeGenius peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les informations relatives à la session de travail. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Les principales étapes du paramétrage des quatre types d'analyse sont décrites ci-dessous.

A. Analyse d'échantillons

Pour paramétrer l'analyse intégrée, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler des tubes de mélange BKV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

- Décongeler des tubes de CPE en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet d'effectuer 12 extractions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Retirer les portoirs de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
- Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'échantillons L5.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.

Remarque : Si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « Tube de 2 ml ». Si les tubes secondaires ne portent pas de codes-barres, saisir manuellement l'ID de l'échantillon.

- Vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'élution extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
- Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay) (c'est-à-dire HHV6 ELITe_Be_WB_200_100). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Si une deuxième extraction est exécutée, répéter les étapes 6 à 9 en utilisant le portoir d'échantillons L4.
- Charger les tubes d'élution à codes-barres dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élution L3.

Remarque : les tubes d'élution peuvent être étiquetés pour faciliter la traçabilité.

- Insérer le portoir d'élution L3 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Répéter les étapes 11 et 12 en utilisant le portoir de réactif/élution L2.
- Charger le CPE et le mélange BKV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
- Insérer le portoir de réactif L1 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir d'extraction avec les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter le déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, la « Cassette de PCR » (PCR Cassette) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et éliminés en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 7 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail

consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification avec des échantillons élués, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler des tubes de mélange BKV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
- Charger les échantillons dans la zone de refroidissement en commençant par le portoir d'élution L3.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'élution extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
- Sélectionner le protocole d'analyse à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay) (par ex. BKV ELITe_Be_PL_200_100). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le mélange BKV Q-PCR Mix dans la zone de refroidissement.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Cassette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant peut être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter le déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, la « Cassette de PCR » (PCR Cassette) contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et éliminée en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

C. Analyse d'étalonnage

Pour paramétrer l'analyse d'étalonnage avec les étalons Q-PCR Standards, effectuer les étapes suivantes en suivant la GUI :

- Décongeler des tubes de mélange BKV Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.

- Décongeler les tubes de BKV Q - PCR Standard (Ca1 : H BKV Q-PCR Standards 10², Ca2 : BKV Q-PCR Standards 10³, Ca3 : BKV Q-PCR Standards 10⁴, Ca4 : BKV Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
- Charger les tubes de calibrateur dans le portoir d'élué L3.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'élué extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
- Sélectionner le protocole d'analyse « BKV ELiTe_Be_STD » à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay). Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le mélange BKV Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/élué L2.
- Insérer le portoir de réactif/élué L2 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Casette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELiTe BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, les calibrateurs restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C. Éviter tout déversement des étalons Q-PCR Standards.

Remarque : au terme de l'analyse, la « Casette de PCR » (PCR Cassette) contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et mise au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

D. Analyse du contrôle positif et du contrôle négatif

Pour paramétrer l'analyse du contrôle positif et du contrôle négatif, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler des tubes de mélange HHV6 Q - PCR Mix en nombre suffisant pour la session. Chaque nouveau tube permet de préparer 24 réactions dans des conditions de consommation de réactif optimales. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler le produit HHV6 - ELiTe Positive Control, pour l'amplification du contrôle positif. Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Transférer au minimum 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire (à titre de contrôle négatif) pour les sessions d'analyse dans un (1) « Tube d'élué » (Elution tube) fourni dans le kit de consommables ELiTe InGenius SP Consumable Set.

- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Retirer les portoirs 1, 2 et 3 de l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit) et les placer sur la table de préparation.
- Sélectionner le « mode d'analyse » (run mode) : « PCR uniquement » (PCR only).
- Charger les tubes de contrôle positif et de contrôle négatif dans le portoir d'élué L3.
- Insérer le portoir dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Même si aucune extraction n'est réalisée, vérifier le volume d'extraction initial (Extraction Input Volume ; 200 µl) et le volume d'élué extrait (Extracted Elute Volume ; 100 µl).
- Sélectionner les protocoles d'analyse « HHV6 ELiTe_Be_PC » et « HHV6 ELiTe_Be_NC » à utiliser dans la colonne « Analyse » (Assay). Cliquer sur le bouton « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le mélange HHV6 Q-PCR Mix dans le portoir de réactif/élué L2.
- Insérer le portoir de réactif/élué L2 dans l'« Unité de refroidissement » (Cooler Unit). Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le portoir de PCR avec la « Casette PCR » (PCR Cassette) dans la Zone inventaire (Inventory Area) en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELiTe BeGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, le contrôle positif restant peut être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Éviter tout déversement des contrôles positifs.

Remarque : au terme de l'analyse, les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) contenant les produits de réaction doivent être retirées de l'instrument et mises au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : le PCR Mix peut être utilisé pendant 5 sessions de travail indépendantes de 3 heures chacune ou peut être conservé dans le bloc réfrigéré de l'instrument pendant un maximum de 3 sessions de travail consécutives de 3 heures chacune. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Affichage des résultats » (Results Display) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/du calibrateur/des contrôles et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les rapports [« Rapport échantillons » (Sample Report) ou « Rapport des positions » (Track Report)].

Note : Le système ELiTe BeGenius peut être relié au "Location Information Server" (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les résultats de la session de travail au centre de données du laboratoire. Reportez-vous au manuel de l'utilisateur de l'instrument pour plus de détails.

L'instrument **ELiTe BeGenius** génère les résultats à l'aide du produit HHV6 ELiTe MGB Kit en exécutant la procédure suivante :

- Validation de la courbe d'étalonnage,
- Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification,
- Validation des résultats de l'échantillon,
- Rapport des résultats de l'échantillon.

Remarque : Pour connaître les détails concernant le système **ELiTe InGenius**, se reporter aux chapitres correspondants relatifs à ce système.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité analytique: limite de détection

La sensibilité analytique de ce test, définie comme limite de détection (LoD) de l'amplification d'ADN, permet de détecter la présence d'environ 10 copies dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La limite de détection du test (LoD), a été testée à partir d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies / 20 µL dans de l'ADN génomique humain à un titre de 500 ng / 20 µL. Cet échantillon a été testé en 24 réplicats pour effectuer l'amplification des produits ELITechGroup S.p.A. sur deux instruments différents. Les résultats finaux sont récapitulés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	24	24	0

La sensibilité analytique du test avec les différentes matrices a été vérifiée à l'aide d'un panel de dilutions de BKV et en association avec ELITe InGenius. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Royaume-Uni) dans une matrice négative pour l'ADN de BKV. Le panel se composait de six points autour de la concentration limite et chaque point du panel a été testé en 12 répétitions en effectuant la procédure d'analyse complète, la préparation du coup, l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec ELITe InGenius et ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été réalisée avec la régression Probit. La limite de détection a été définie comme la concentration à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est égale à 95%.

Les résultats finaux pour chaque matrice sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection avec ELITe InGenius (UI / mL)				
Volume d'échantillon	Matrice	95% positivité	Intervalle de confiance de 95%	
			valeur inférieure	valeur supérieure
200 µL	urine	142 UI / mL	110 UI / mL	222 UI / mL
	plasma	215 UI / mL	168 UI / mL	319 UI / mL
1000 µL	plasma	44 UI/mL	35 UI / mL	64 UI / mL

La sensibilité analytique exprimée en copies / mL a été calculée en appliquant pour chaque matrice le facteur de conversion spécifique indiqué à la page. 20.

La sensibilité analytique pour chaque matrice en copies / mL est indiquée ci-dessous.

Limite de détection avec ELITe InGenius (copies / mL)				
Volume d'échantillon	Matrice	95% positivité	Intervalle de confiance de 95%	
			valeur inférieure	valeur supérieure
200 µL	urina	89 copies / mL	69 copies / mL	139 copies / mL
	plasma	165 copies / mL	129 copies / mL	245 copies / mL
1000 µL	plasma	26 copies / mL	21 copies / mL	38 copies / mL

La valeur de la LD calculée a été vérifiée en association avec ELITe InGenius et ELITe BeGenius en testant 20 réplicats de Plasma collecté en EDTA et 20 réplicats d'échantillons d'urine collectés sans conservateurs, dopés par le matériau de référence certifié BKV (1er standard international de l'OMS, NIBSC) à la concentration revendiquée. La LD est confirmée si au moins 18 des 20 répliques donnent un résultat positif conformément à la norme EP17-A du CLSI.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants.

Limite de détection avec Plasma et Urine samples et ELITe InGenius				
--	--	--	--	--

Sample	Titer	Target	N	Positive	Negative
Plasma collected in EDTA	215 IU / mL	BKV	20	18	2
Urine collected without preservatives	142 IU / mL	BKV	20	20	0

Limite de détection avec Plasma et Urine samples et ELITe BeGenius					
Sample	Titer	Target	N	Positive	Negative
Plasma collected in EDTA	215 IU / mL	BKV	20	20	0
Urine collected without preservatives	142 IU / mL	BKV	20	19	1

La valeur de la LD pour la cible BKV a été confirmée à 215 UI / mL pour le Plasma collecté en EDTA, à 142 UI / mL pour l'urine collectée sans conservateur.

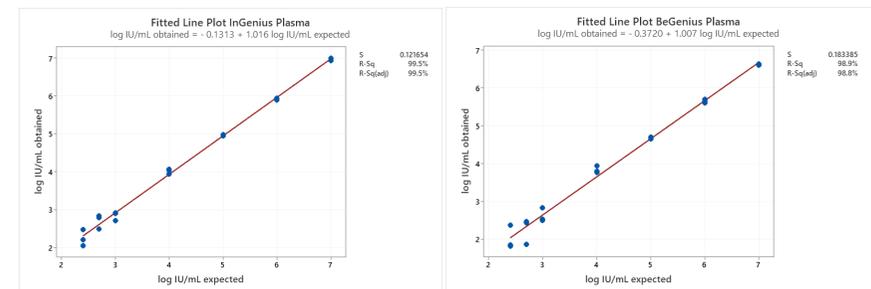
Intervalle de mesure linéaire et Limite de quantification

La linéarité du dosage avec les différentes matrices a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de BKV et en association avec ELITe InGenius et BeGenius. Le panel a été préparé en diluant le "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, Royaume-Uni) dans une matrice négative pour l'ADN de BKV. Le panneau avait 5 étapes de dilution de 1 Log de 10⁶ à 10² UI / mL. Le panel était composé de huit points de dilution (étapes de dilution de 1 log) de 10⁷ à 10² UI / mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 répétitions. L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a démontré que le test présente une réponse linéaire pour tous les niveaux de dilution.

Pour le plasma (volume de l'échantillon 200 µL) :

L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a démontré que le test en association avec le plasma collecté dans des échantillons EDTA présente une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation carré (R²) égal à 0,995 pour **ELITe InGenius** et 0,989 pour **ELITe BeGenius**.

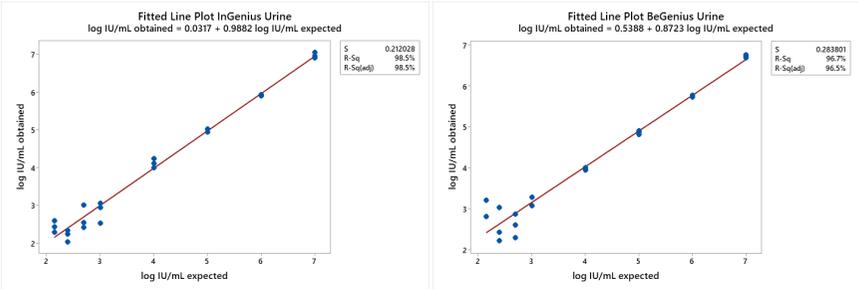
Les résultats sont présentés dans les graphiques suivants.



Pour l'urine (volume de l'échantillon 200 µL) :

L'analyse des données obtenues, réalisée par analyse de régression linéaire, a démontré que le test en association avec des échantillons d'urine collectés sans conservateurs présente une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation carré (R²) égal à 0,985 pour ELITe InGenius et 0,967 pour ELITe BeGenius.

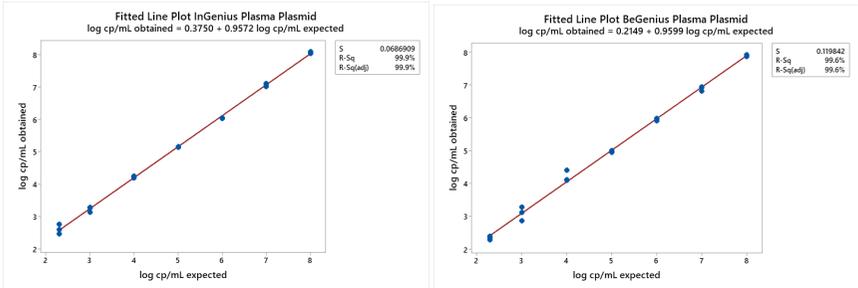
Les résultats sont présentés dans les graphiques suivants.



La gamme de mesure linéaire du kit BKV ELITE MGB® utilisé en association avec le plasma (volume de l'échantillon 200 µL) et les kits ELITE InGenius et ELITE BeGenius a été testée sur une plus large gamme de concentrations en utilisant un panel préparé en diluant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification du BKV dans une matrice négative d'ADN de BKV. Le panel était composé de huit points de dilution (étapes de dilution de 1 log) de 108 à 102 copies / mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 3 répétitions.

L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a démontré que le test en association avec des échantillons de plasma présente une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation carré (R2) égal à 0,999 pour ELITE InGenius et 0,996 pour ELITE BeGenius.

Les résultats sont présentés dans les graphiques suivants.



Pour le plasma (volume de l'échantillon 200 µL) :

La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été fixée à 215 UI / mL, la concentration la plus faible, qui donne des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2767 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et 0,3012 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,0098 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et 0,2569 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**).

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été fixée à 130 000 000 UI / mL, la plus forte concentration testée, qui donne des résultats quantitatifs précis (écart-type égal à 0,2159 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et 0,3357 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) et exacts (biais égal à -0,1606 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et -0,4406 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**).

La gamme de mesure linéaire en copies / mL pour le plasma est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 29.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Intervalle de mesure linéaire avec Plasma et ELITE InGenius et ELITE BeGenius (200 µL)		
Unité de mesure	Limite inférieure	Limite supérieure
IU / mL	215	130,000,000
copies / mL	165	100,000,000

Pour l'urine (volume de l'échantillon 200 µL) :

La limite inférieure de quantification (LLOQ) a été fixée à 142 UI / mL, la concentration de la LD qui donne des résultats quantitatifs précis (Écart-type = 0,2888 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et Écart-type = 0,4031 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) et exacts (Biais = 0,1562 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et Bias = -0,1668 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) à ±0,5 Log UI / mL.

La limite supérieure de quantification (ULOQ) a été fixée à 160 000 000 UI / mL, la concentration la plus élevée qui donne des résultats quantitatifs précis (écart-type = 0,2114 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et écart-type = 0,3132 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) et précis (Biais = -0,3240 Log UI / mL pour **ELITE InGenius** et Bias = -0,2860 Log UI / mL pour **ELITE BeGenius**) à ±0,5 Log UI / mL.

La gamme de mesure linéaire en tant que copies / mL pour l'urine collectée sans conservateurs est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 29.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant

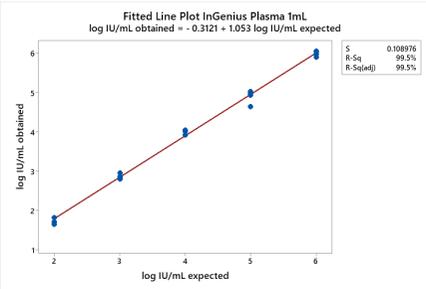
Intervalle de mesure linéaire avec Urine et ELITE InGenius et ELITE BeGenius (200 µL)		
Unité de mesure	Limite inférieure	Limite supérieure
IU / mL	142	160,000,000
copies / mL	89	100,000,000

Pour le plasma (volume de l'échantillon 1000 µL) :

La gamme de mesure linéaire du kit BKV ELITE MGB® utilisé en association avec le plasma recueilli en EDTA (volume de l'échantillon 1000 µL) et **ELITE InGenius** a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions du BKV. Le panel a été préparé en diluant le " 1er standard international de l'OMS pour l'ADN du virus BKV " (code NIBSC 14/212, Royaume-Uni) dans une matrice négative d'ADN BKV. Le panel était composé de cinq points de dilution (étapes de dilution de 1 log) de 106 à 102 UI / mL. Chaque échantillon du panel a été testé en 4 répétitions.

L'analyse des données obtenues, effectuée par régression linéaire, a démontré que le test en association avec des échantillons de plasma (volume de l'échantillon 1000 µL) présente une réponse linéaire pour toutes les dilutions avec un coefficient de corrélation carré (R2) égal à 0,995.

Les résultats sont présentés dans les graphiques suivants.



La gamme de mesure linéaire a été testée sur une plus large gamme de concentrations en analysant un panel de dilution du BKV préparé en diluant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dans une matrice négative en ADN BKV. Le panel comportait 6 étapes de dilution de 1 Log de 109 à 104 copies / mL. Chaque point du panel a été testé en 4 répétitions en effectuant toute la procédure d'analyse, la mise en place du run, l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec ELITE InGenius et ELITEchGroup S.p.A. L'analyse des données obtenues, effectuée avec la régression linéaire, a montré que le test a une réponse linéaire pour les points du panel de 108 à 104 copies / mL. Pour le point 109 copies / mL, il n'a pas été possible de calculer une valeur Ct en raison de la concentration très élevée.

La gamme de mesure linéaire en copies / mL pour le plasma recueilli dans l'EDTA est calculée en appliquant le facteur de conversion spécifique indiqué à la page 29.

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Intervalle de mesure linéaire avec Plasma et ELiTe InGenius (1000 µL)		
Unit of measure	lower limit	upper limit
IU / mL	100	170,000,000
copies / mL	59	100,000,000

Répétabilité

La répétabilité des résultats obtenus par le produit BKV ELiTe MGB Kit en association avec les systèmes **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de plasma collectés en EDTA. Le panel comprenait un échantillon négatif et deux échantillons dopés par le matériau de référence certifié BKV "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (code NIBSC 14/212, Royaume-Uni) à une concentration de 3 x LoD (environ 645 UI / mL) et de 10 x LoD (environ 2150 UI / mL).

La répétabilité intra-session sur **ELiTe InGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit répétitions, en deux passages par jour, avec le même lot de produit, avec le même instrument, par le même opérateur, le même jour. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires.

La répétabilité inter-session sur **ELiTe InGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit répétitions, en deux passages par jour, avec le même lot de produit, avec le même instrument, par le même opérateur, sur deux jours différents. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires.

Les valeurs Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le %CV afin d'évaluer la répétabilité comme imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Intra – Session Repeatability 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 Repeatability 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				

Dans le test de répétabilité sur **ELiTe InGenius**, le test a détecté la cible BKV comme prévu et a montré un faible %CV des valeurs Ct qui n'a pas dépassé 2% pour le BKV et 1,3% pour le contrôle interne.

La répétabilité intra-session sur **ELiTe BeGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit répétitions, dans une course par jour, avec le même lot de produit, avec le même instrument, le même jour. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires.

La répétabilité inter-session sur **ELiTe BeGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit réplicats, dans un cycle par jour, avec le même lot de produit, avec le même instrument, sur deux jours différents. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires.

Les valeurs Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le %CV afin d'évaluer la répétabilité comme imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Intra – Session Repeatability 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				

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Inter – Session Repeatability 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				

Dans le test de répétabilité sur **ELiTe BeGenius**, le test a détecté la cible BKV comme prévu et a montré un faible %CV des valeurs Ct qui n'a pas dépassé 1,9% pour le BKV et 1,7% pour le contrôle interne.

Reproductibilité

La reproductibilité des résultats obtenus par le produit BKV ELiTe MGB Kit en association avec les systèmes **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius** a été testée en analysant un panel d'échantillons de plasma. Le panel comprenait un échantillon négatif et deux échantillons enrichis avec le matériau de référence certifié BKV "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (code NIBSC 14/212, Royaume-Uni) à une concentration de 3 x LoD (environ 645 UI / mL) et de 10 x LoD (environ 2150 UI / mL).

La reproductibilité inter-instrument sur **ELiTe InGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit répétitions, dans une course par jour, en deux jours, avec deux instruments différents par deux opérateurs différents. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires sur le système **ELiTe InGenius** en mode "Extract + PCR".

La reproductibilité inter-lots sur **ELiTe InGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel en huit réplicats, en deux passages par jour, avec deux lots différents et le même instrument. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires sur le système **ELiTe InGenius** en mode "Extract + PCR".

Les valeurs de Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le %CV afin d'évaluer la reproductibilité comme imprécision.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Inter – Instrument Reproducibility 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 – Batch Repeatability 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				

Dans le test de reproductibilité sur **ELiTe InGenius**, le test a détecté la cible BKV comme prévu et a montré un faible %CV des valeurs Ct qui n'a pas dépassé 1,3% pour le BKV et 1,3% pour le contrôle interne.

La reproductibilité inter-instrument sur **ELiTe BeGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel dans huit répétitions, dans une course par jour, en deux jours, avec deux instruments différents par deux opérateurs différents. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires sur le système **ELiTe BeGenius** en mode "Extract + PCR".

La reproductibilité inter-lots sur **ELiTe BeGenius** a été obtenue par l'analyse d'échantillons de panel en huit répétitions, en deux passages par jour, avec deux lots différents et le même instrument. Les échantillons ont été traités dans des positions aléatoires sur le système **ELiTe BeGenius** en mode "Extract + PCR".

Les valeurs de Ct de la cible et du contrôle interne ont été utilisées pour calculer le %CV afin d'évaluer la reproductibilité comme imprécision.

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous.

Inter – Instrument Repeatability 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 Repeatability 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				

Dans le test de reproductibilité sur **ELiTe BeGenius**, le test a détecté la cible BKV comme prévu et a montré un faible %CV des valeurs Ct qui n'a pas dépassé 1,8 % pour le BKV et 2,3 % pour le contrôle interne.

Sensibilité analytique: reproductibilité avec un panel de matériel de référence certifié.

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériel de référence calibré le panel «BKV Molecular "Q" Panel» (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni). Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 2 réplicats pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec le système **ELiTe InGenius** et les produits ELiTechGroup S.p.A.

Les résultats, obtenu à partir de 200 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELiTe InGenius				
Échantillon	Titre nominal copies / mL	Titre nominal Log10 copies / mL	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log10 copies / 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	négatif	-	0/2	-

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de $\pm 0,5$ Log.

Les résultats, obtenu à partir de 1000 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELiTe InGenius				
Échantillon	Titre nominal copies / mL	Titre nominal Log10 copies / mL	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log10 copies / 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	négatif	-	0/2	-

Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés avec un titre qui s'inscrit dans l'intervalle de $\pm 0,5$ Log.

La sensibilité analytique du test a été évaluée en utilisant comme matériel de référence le panel «QCMD 2014 BK Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Royaume Uni), un panel de dilution de BKV dans la limite de concentration. Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats pour effectuer toute la

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELiTe InGenius** et les produits ELiTechGroup S.p.A.

Les résultats, obtenu à partir de 200 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELiTe InGenius				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ copies / mL	Déviati on standard	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log ₁₀ copies / 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	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,159
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,405
BKVDNA14-09	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	Non détecté

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés et sur huit échantillons positifs testés, sept ont été trouvés positifs. L'échantillon BKV DNA14-10 à 74 copies/mL n'a pas été détecté. Ceci peut être expliqué parce que le titre de l'échantillon est inférieur à la limite de détection. Quatre échantillons ont été quantifiés dans l'intervalle définie par l'étude Consensus ± 1 Déviati on standard (DS) et deux échantillons à ± 2 DS.

Les résultats, obtenu à partir de 1000 µL d'échantillon, sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tests avec matériel de référence certifié et ELiTe InGenius				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ copies / mL	Déviati on standard	Positifs / Réplicats	Moyenne des résultats Log ₁₀ copies / 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	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,280
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,459
BKVDNA14-09	négatif	N.A.	0/2	Non détecté
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	1,914

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été correctement détectés comme positifs. Quatre (4) échantillons ont été quantifiés dans l'intervalle défini par l'étude Consensus ± 1 écart type (DS) et quatre échantillons dans ± 2 SD.

Facteur de conversion en Unités Internationales

Le facteur de conversion à utiliser avec ce test pour transformer le résultat quantitatif des copies / mL en Unités Internationales / mL a été déterminé à l'aide d'un panel de matériel de référence calibré approuvé par l'OMS ("1st WHO international standard for BKV virus DNA" NIBSC code 14/212, Royaume-Uni) dans les différentes matrices négatives pour l'ADN de BKV et en association avec ELiTe InGenius. Le panneau avait 6 étapes de dilution de 0,5 Log. Chaque point de panel a été testé dans au moins 16 réplicats en effectuant l'ensemble de la procédure d'analyse, la préparation du coup, l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec ELiTe InGenius et ELiTechGroup S.p.A.

Un résumé des résultats est présenté dans les tableaux ci-dessous.

Conversion factor to International Units 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

Conversion factor to International Units Urine, 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

Conversion factor to International Units 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

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Conversion en Unités Internationales avec ELiTe InGenius		
Volume d'échantillon	Matrice	Fc (UI / copie)
200 µL	Plasma	1,3
200 µL	Urina	1,6
1000 µL	Plasma	1,7

Le facteur de conversion, pour convertir un résultat quantitatif de copies / mL en Unités Internationales / mL, a été vérifié pour **ELiTe InGenius** et aussi pour **ELiTe BeGenius** en analysant les résultats obtenus pendant le test de linéarité.

La précision de quantification cible, en tant que déviation standard de Log IU/mL, était inférieure à 0,5 Log pour le plasma et l'urine et répond aux critères d'acceptation pour **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius**.

La précision de quantification cible, comme différence entre les concentrations théoriques et mesurées en Log UI/mL, était inférieure à 0,5 Log pour le plasma et l'urine et répond aux critères d'acceptation pour **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius**.

Ces résultats ont confirmé les facteurs de conversion calculés pour chaque matrice avec **ELiTe InGenius**.

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, comme confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de plasma collecté en EDTA et d'urine collectée sans conservateurs positifs pour l'ADN du BKV en association avec **ELiTe InGenius**. Comme **ELiTe BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à **ELiTe InGenius**, on peut supposer que

les résultats de sensibilité diagnostique obtenus en association avec **ELiTe InGenius** sont également applicables à **ELiTe BeGenius**.

Le test, à partir de 200 µL d'échantillon, a été réalisé sur 30 échantillons de plasma collectés en EDTA positifs pour l'ADN du BKV et sur 30 échantillons d'urine collectés sans conservateurs et positifs pour l'ADN du BKV (testés avec un produit IVD CE d'amplification en temps réel).

Le test, à partir de 1000 µL d'échantillon, a été réalisé sur :

- 25 échantillons de plasma collectés en EDTA positifs pour l'ADN du BKV (testés avec un produit IVD CE d'amplification en temps réel).

- 30 échantillons de plasma collectés en EDTA négatifs pour l'ADN du BKV, qui ont été enrichis pour l'ADN du BKV en ajoutant "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (code NIBSC 14/212, Royaume-Uni).

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELiTe InGenius** et les produits ELiTechGroup S.p.A.

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de BKV	30	30	0
	Urines prélevé sans conservateurs positives pour l'ADN de BKV	30	30	0
1000 µL	Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de BKV	25	25	0
	Plasma prélevé sur EDTA rendu positif pour l'ADN de BKV	30	30	0

Tous les échantillons étaient valides et ont été confirmés positifs.

Dans ces tests, la sensibilité diagnostique totale du test était égale à 100%.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation d'échantillons négatifs, a été évaluée en analysant quelques échantillons cliniques de plasma collecté en EDTA et d'urine collectée sans conservateurs en association avec **ELiTe InGenius**. Comme **ELiTe BeGenius** a montré des performances analytiques équivalentes à **ELiTe InGenius**, on peut supposer que les résultats de spécificité du diagnostic obtenus en association avec **ELiTe InGenius** sont également applicables à **ELiTe BeGenius**.

Le test, à partir de 200 µL d'échantillon, a été réalisé sur :

- 30 échantillons de plasma collectés en EDTA qui étaient négatifs pour l'ADN du BKV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).

- 30 échantillons d'urine collectés sans conservateurs qui se sont révélés négatifs pour l'ADN du BKV (testés avec un produit d'amplification en temps réel CE IVD).

La spécificité diagnostique à partir de 1000 µL d'échantillon a été évaluée en utilisant 62 échantillons de plasma prélevés sur EDTA tous négatifs pour l'ADN de BKV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel).

Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec **ELiTe InGenius** et les produits ELiTechGroup S.p.A.

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Volume d'échantillon	Échantillons	N	positifs	négatifs
200 µL	Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV	30	2	28
	Urines prélevé sans conservateurs négatives pour l'ADN de BKV	30	0	30
1000 µL	Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV	62	2	60

Tous les échantillons d'urine étaient valides pour l'analyse et ont été confirmés négatifs.

Tous les échantillons de plasma étaient valides pour l'analyse.

Dans le cas où 200 µL d'échantillon ont été utilisés: vingt-huit (28) des 30 échantillons de plasma ont été confirmés négatifs pour l'ADN BKV, deux échantillons ont été positifs à bas titre (50 et 70 copies / mL, respectivement) et à en dessous de la limite de détection du test de référence.

Dans le cas où 200 µL d'échantillon ont été utilisés: soixante (60) échantillons de 62 sur 62 ont été confirmés négatifs pour l'ADN BKV, deux échantillons étaient positifs à faible titre (respectivement environ 5 et 55 copies / mL).

Dans ces tests, la sensibilité diagnostique totale du test était égale à 97%.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit avec les matrices et les instruments ont été enregistrés dans le Fascicule Technique de Produit "BKV ELITE MGB® Kit", FTP 175PLD.

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

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec l'ADN extrait à partir des échantillons cliniques suivants: plasma prélevé sur EDTA, urines prélevées sans conservateurs et liquide céphalorachidien.

Plasma prélevé dans un tube EDTA

Les échantillons de plasma destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être prélevés dans un tube EDTA et suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés à +2°C / +8°C et conservés à +2°C / +8°C pendant un maximum de trois jours, autrement ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant un maximum de trente jours ou à -70°C pendant une période plus longue.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquotes les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN avec le kit «EXTRAblood», suivre les indications fournies dans la Notice d'instructions et d'utilisation: partir d'un échantillon de 200 µL, ajouter au début de l'extraction 5µL de CPE pour le contrôle interne, éluer l'ADN dans 60 µL de tampon d'élution.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma, avec le kit «ELITE STAR» et version logicielle 3.4.13 (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction "UUNI_E100S200_ELI" qui utilise 200 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate «ELITE STAR». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 700 µL de chaque échantillon. Ajouter 200 µL de contrôle interne CPE dans le tube de la solution Protéinase-Carrier comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma, avec le kit «ELITE GALAXY» et version logicielle 1.3.1 (ou suivantes), suivre le protocole d'extraction xNA Extraction (Universal) qui utilise 300 µL d'échantillon et élue extrait dans 100 µL ou 200 µL. Dans le tube primaire, les échantillons peuvent être chargés directement sur l'automate «ELITE GALAXY». Il est toujours nécessaire de disposer d'un volume minimum de 400-650 µL de chaque échantillon. Préparer 10 µL de CPE pour chaque échantillon. CPE doit être ajoutée la solution IC + Carrier solution comme indiqué dans la Notice d'instructions et d'utilisation du kit d'extraction. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Remarque: lors de l'extraction d'ADN avec l'instrument «NucliSENS® easyMAG®», suivre le protocole d'extraction Generic 2.0.1 et les indications ci-dessous: distribuer 500 µL d'échantillon dans la bande de 8 puits, ajouter 5µL de CPE pour le contrôle interne avant d'ajouter NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica, récupérer l'ADN avec 100 µL de tampon d'élution.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de plasma à l'aide de l'instrument «QIASymphony® SP/AS» et du kit «QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi Kit», logiciel version 3.5, suivre le protocole d'extraction «Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC» et les consignes suivantes: l'instrument est en mesure d'utiliser directement le tube primaire, le volume d'échantillon prélevé pour l'extraction est de 500 µL, il est toujours nécessaire de disposer d'un volume mort de 100 µL minimum. Préparer la solution contenant le tampon AVE et l'ARN entraîneur (carrier) en suivant les instructions de la Notice d'utilisation du kit d'extraction. Ajouter à la solution 6 µL de CPE pour chaque échantillon demandé. Sur l'instrument, à la position "contrôle interne" prévue pour les tubes, charger les tubes contenant la solution, en suivant la Notice d'utilisation du kit; indiquer la position sur laquelle seront dispensés les éluas et préciser le volume d'élution à 85 µL. Pour tout détail sur la procédure d'extraction, suivre attentivement les indications fournies dans la Notice d'utilisation du kit.

Urine prélevée sans conservateurs

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des conteneurs sans conservateurs, suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés et conservés à température ambiante (+18 / +25 °C) pendant un maximum de quatre heures. Ils peuvent être

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température**:

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque: l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape d'hybridation à 60°C.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau suivant "**Cycle de température**";
- paramétrer le nombre de cycles à **45 cycles**;
- paramétrer un volume de réaction de **30 µL** pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume");
- option: ajouter la phase de dissociation (Add Dissociation Stage) et paramétrer les températures de **40°C à 80°C**.

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Décontamination	50° C	2 min.
Dénaturation initiale	94° C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.
Dissociation (option)	95° C	15 sec.
	40° C	30 sec.
	80° C	15 sec.

En cas d'utilisation de l'instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Avant de commencer, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut:

- allumer le thermocycleur pour amplification en temps réel, allumer l'ordinateur, lancer le logiciel dédié, ouvrir une étape de quantification absolue et paramétrer "Run mode: Fast 7500";
- paramétrer (Detector Manager) le "détecteur" pour la sonde de BKV avec le "reporter" = "FAM" et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "BKV";
- paramétrer (Detector Manager) le "détecteur" pour la sonde du contrôle interne avec le "reporter" = "VIC" (AP525 est un analogue à VIC) et le "quencher" = "none" (non fluorescent) et l'appeler "CI";
- pour chaque puits utilisé, paramétrer (Well Inspector) les "détecteurs" (type de fluorescence à mesurer), la "référence passive" = "Cy5" (AP593 est utilisé en remplacement du Cy5, normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, contrôle positif d'amplification ou standard en indiquant le titre). Reporter ces informations dans la **grille de travail** annexée à cette notice d'instructions et d'utilisation ou imprimer l'organisation de la microplaque. La **grille de travail** doit être suivie scrupuleusement pendant le transfert du mélange de réaction et des échantillons dans les puits.

Remarque: pour déterminer le titre de l'ADN dans l'échantillon initial, il est nécessaire de préparer une série de réactions avec les **Q - PCR standard** (10⁵ copies, 10⁴ copies, 10³ copies, 10² copies) pour obtenir la **Courbe standard**.

Le modèle d'organisation d'une analyse quantitative de 12 échantillons est illustré à titre d'exemple dans la section précédente concernant la procédure relative à l'instrument **7300 Real Time PCR System**.

A l'aide de la documentation de l'instrument, configurer sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) les paramètres du **cycle de température**:

- Ajouter à la phase d'amplification l'étape (Add Step) **d'extension à 72°C**;

Remarque: l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) doit être paramétrée lors de l'étape d'hybridation à 60°C.

- modifier les temps selon les valeurs fournies dans le tableau suivant "**Cycle de température**";
- paramétrer le nombre de cycles à **45 cycles**;
- paramétrer un volume de réaction de **30 µL** pour la simulation logicielle du transfert thermique à la réaction ("Sample volume");

- option: ajouter la phase de dissociation (Add Dissociation Stage) et paramétrer les températures de **40°C à 80°C**.

Cycle de température		
Phase	Températures	Temps
Décontamination	50° C	2 min.
Dénaturation initiale	94° C	2 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94° C	10 sec.
	60° C (acquisition de la fluorescence)	30 sec.
	72° C	20 sec.
Dissociation (option)	95° C	15 sec.
	40° C	1 min.
	80° C	15 sec.
	60° C	15 sec.

Préparation de l'amplification

(À effectuer dans la zone d'extraction / préparation de la réaction d'amplification)

Avant de commencer, il faut:

- prendre et décongeler les tubes contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler les tubes de **BKV Q - PCR Mix**. Chaque tube permet de préparer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre et décongeler les tubes de **BKV - Positive Control** ou les tubes de **BKV Q - PCR Standard** nécessaires. Agiter délicatement les tubes, les centrifuger pendant 5 secondes pour en reporter le contenu dans le fond et les conserver dans la glace;
- prendre l'**Amplification microplate** utilisée pendant l'étape. La manipuler avec des gants sans poudre et veiller à ne pas endommager les puits.

1. Déposer délicatement et sans faire de bulles, **20 µL** du mélange de réaction «**BKV Q - PCR Mix**», dans le fond de l'**Amplification microplate** en suivant l'organisation définie précédemment dans la **grille de travail**.

Remarque: Le reste de mélange de réaction doit être conservé à l'abri de la lumière, à -20°C et au maximum pendant un mois. Le mélange de réaction ne doit pas être congelé et décongelé plus que **5 FOIS**.

2. Conformément à la **grille de travail** transférer délicatement **20 µL** d'**ADN** du premier échantillon dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**. Mélanger soigneusement l'échantillon et pipeter trois fois le volume de 20 µL dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Procéder de la même façon avec tous les **ADN extraits**
3. Pour le contrôle négatif d'amplification déposer délicatement dans le mélange de réaction **20 µL** d'**eau ultra pure pour la biologie** (non incluse dans le produit), dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate** conformément à l'organisation définie précédemment dans la **grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle négatif et pipeter trois fois l'**eau ultra pure pour la biologie** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.
4. En fonction du type de résultat requis (qualitatif ou quantitatif), suivre une des deux étapes suivantes:

- Pour un résultat **qualitatif** (détection de l'ADN de BKV), déposer délicatement dans le mélange de réaction, **20 µL** de **BKV - Positive Control** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**, conformément à l'organisation définie précédemment dans la **Grille de travail**. Mélanger soigneusement le contrôle positif et pipeter trois fois le **BKV - Positive Control** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles.

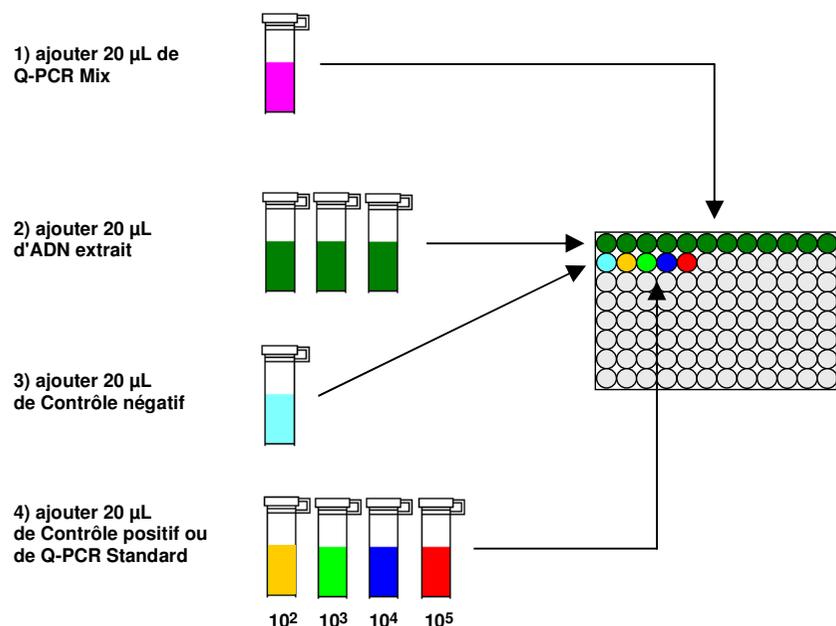
- Pour un résultat **quantitatif** (détection et dosage de l'ADN de BKV), déposer délicatement dans le mélange de réaction, **20 µL** de **BKV Q - PCR Standard 10²** dans le puits correspondant de l'**Amplification microplate**, conformément à l'organisation définie précédemment dans la **grille de travail**. Mélanger soigneusement le standard et pipeter trois fois le **BKV Q - PCR Standard 10²** dans le mélange de réaction. Ne pas faire de bulles. Faire de même avec les **BKV Q - PCR Standard 10³, 10⁴**,

10⁵.

- Sceller soigneusement l'**Amplification microplate** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet**.
- Transférer l'**Amplification microplate** dans le thermocycleur à temps réel placé dans la zone d'amplification / détection des produits d'amplification et lancer le cycle de température d'amplification en sauvegardant, avec un nom identifiable et ne pouvant prêter à confusion, les données de l'étape (p.ex. "année-mois-jour-BKV-EGSpA").

Remarque: Au terme du cycle d'amplification, l'**Amplification microplate** contenant les produits de réaction doit être retirée de l'instrument et jetée afin de ne pas contaminer l'environnement. **Ne jamais soulever l'Amplification Sealing Sheet de l'Amplification microplate** afin d'éviter toute fuite des produits de réaction.

La figure ci-dessous illustre la préparation d'une réaction d'amplification.



Remarque: si la préparation de l'amplification est effectuée à l'aide de l'instrument «**QIASymphony® SP/AS**», introduire la microplaque contenant les extraits, les réactifs ainsi que la microplaque d'amplification dans les logements prévus en utilisant les adaptateurs fournis et suivre les instructions de la notice d'utilisation du préparateur automatique et les étapes requises par le logiciel.

Remarque: si la préparation de l'amplification est effectuée à l'aide de l'instrument «**ELiTe GALAXY**», charger la microplaque contenant les extraits, le mélange complet de réaction et la microplaque d'amplification comme indiqué dans la Notice d'utilisation de l'instrument et suivre les étapes indiquées par l'interface graphique GUI.

Analyse qualitative des résultats

Les valeurs enregistrées de la fluorescence émise par la sonde spécifique au BKV (détecteur FAM "BKV") et par la sonde spécifique du Contrôle Interne (détecteur VIC "CI") dans les réactions d'amplification doivent être analysées à l'aide du logiciel de l'instrument.

Avant de procéder à l'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut:

- paramétrer manuellement (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervalle de calcul du

Niveau de fluorescence de base (Baseline) du cycle 6 au cycle 15;

Remarque: Pour un échantillon positif à titre de BKV élevé, la fluorescence FAM de la sonde spécifique au BKV peut commencer à augmenter avant le 15^{ème} cycle. Dans ce cas, l'intervalle de calcul du **Niveau de fluorescence de fond** doit être adapté. Il faut paramétrer l'intervalle de calcul du cycle 6 au cycle où la fluorescence FAM commence à augmenter (Results > Component).

En cas d'utilisation de l'instrument **7300 Real-Time PCR System**:

- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "BKV";
- programmer manuellement à **0,05** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

En cas d'utilisation d'un instrument **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- programmer manuellement à **0,2** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur FAM "BKV";
- programmer manuellement à **0,1** le **Seuil (Threshold)** pour le détecteur VIC "CI".

Les valeurs de fluorescence émises par les sondes spécifiques dans la réaction d'amplification et la valeur **Seuil** de fluorescence sont utilisées pour déterminer le **Cycle Seuil (Ct, Threshold Cycle)**, le cycle où la valeur **Seuil** de fluorescence a été atteinte.

Pour la réaction d'amplification avec le **Positive Control***, la valeur du **Ct** de BKV (Results > Report) sert à valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Réaction du Contrôle Positif détecteur FAM "BKV"	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou si le **Ct** de BKV est **Ct non interprétable (Undetermined)**, cela indique que l'ADN cible n'a pas été détecté correctement. Des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou du contrôle positif, dégradation du mélange de réaction ou du contrôle positif, paramétrage erroné de la position du contrôle positif ou du cycle de température) qui peuvent générer des résultats erronés. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

***Remarque:** Pour le dosage de l'ADN de BKV, le **contrôle positif** a été remplacé par les **Q - PCR Standard**. Dans ce cas, pour valider l'amplification et la détection, il est nécessaire de se référer aux résultats du **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Pour la réaction d'amplification du **Contrôle négatif**, la valeur du **Ct** de BKV (Results > Report) sert à valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Réaction du contrôle négatif détecteur FAM "BKV"	Résultat du test	Amplification / Détection
Ct Non interprétable	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Contrôle négatif** est différent de **Ct Non interprétable (Undetermined)**, cela indique que de l'ADN cible a été détecté et que des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification (contamination) pouvant engendrer des résultats erronés et des faux positifs. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Pour les **échantillons**, la valeur du **Ct** de BKV est utilisée pour détecter la présence de l'ADN cible alors que la valeur du **Ct** du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque: Vérifier à l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que le **Ct** est bien déterminé à partir d'une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et pas à partir de phénomènes de pic ou d'augmentation progressive du signal de fond (fond irrégulier ou élevé).

Ce produit est en mesure de révéler une quantité minimale de 10 copies d'ADN du gène codant l'antigène Large T de BKV par réaction d'amplification, correspondant aux génomes Équivalents par réaction (seuil de révélation du produit, voir Caractéristiques des performances).

Les **Ct** des réactions d'amplification de chaque **échantillon** (Results > Report) doivent être interprétés comme suit:

Réaction de l'échantillon		Conformité de l'échantillon	Résultat du test	ADN de BKV
détecteur FAM "BKV"	détecteur VIC "CI"			
Ct Non interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	non conforme	non valable	-
	Ct ≤ 35	conforme	valable, négatif	NON DETECTE
Ct Interprétable	Ct > 35 ou Ct Non interprétable	conforme	valable, positif	DETECTE
	Ct ≤ 35	conforme	valable, positif	DETECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour le BKV et **Ct > 35** ou **Ct Non interprétable** pour le Contrôle interne, cela indique que l'ADN du Contrôle interne n'a pas été détecté correctement et que des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou lors de l'extraction (altération de l'ADN, quantité de cellules insuffisante dans l'échantillon, perte de l'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs). Ces problèmes peuvent engendrer des résultats erronés et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas conforme, le test n'est pas valable et doit être recommencé à partir de l'extraction de l'échantillon.

Si le résultat d'un échantillon est **Ct Non interprétable** pour le BKV et **Ct ≤ 35** pour le Contrôle interne, cela indique que l'ADN de BKV n'a pas été détecté dans l'échantillon. Il ne faut pas exclure la possibilité que l'ADN de BKV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des résultats des autres examens de laboratoire du patient.

Remarque: Lorsque, dans la réaction d'amplification d'un échantillon, la présence de l'ADN de BKV a été détectée, le Contrôle interne peut avoir un Ct > 35 ou Ct Non interprétable. En effet, la réaction d'amplification à faible efficacité du Contrôle interne peut être annulée par la compétition avec la réaction d'amplification à haute efficacité de BKV. Dans ce cas, l'échantillon convient et le résultat positif du test est valable.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir analysé les résultats qualitatifs, il est possible de quantifier les échantillons positifs.

Pour les réactions d'amplification des quatre **Q - PCR standard**, les valeurs des **Ct** de BKV sont utilisées pour calculer la **Courbe standard** (Results > Standard Curve) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Courbe Standard détecteur FAM "BKV"	Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Détection
Coefficient de corrélation (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE

Si la valeur du **Coefficient de corrélation (R2)** ne s'inscrit pas dans les limites, cela indique la présence de problèmes pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou des standards, dégradation du mélange de réaction ou des standards, paramétrage erroné de la position des standards, paramétrage erroné du cycle de température) qui peuvent engendrer des résultats erronés. La session de travail n'est pas valide et doit être recommencée à partir de la phase d'amplification.

Les valeurs du **Ct** de BKV de l'échantillon et la **Courbe standard** (Results > Standard Curve) de la session sont utilisées pour calculer la **Quantité (Quantity)** d'ADN cible présente dans l'échantillon.

Ce produit est en mesure de quantifier de 1.000.000 à 10 copies d'ADN du gène codant l'antigène Large T de BKV par réaction d'amplification, correspondant aux génomes Équivalents par réaction (intervalle linéaire de mesure, voir Caractéristiques des performances), comme décrit dans le tableau ci-après:

Résultat de l'échantillon détecteur FAM "BKV"	génomés Équivalents de BKV par réaction
Quantité > 1 x 10 ⁶	SUPÉRIEURS À 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantité
Quantité < 1 x 10 ¹	INFÉRIEURS À 10

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (Results > Report) sont utilisés pour calculer le nombre de génomes Équivalents (**gEq**) de BKV présents dans l'échantillon initial (**Nc**) selon la formule:

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

Où:

Vc est la quantité d'échantillon utilisée dans l'extraction exprimé selon l'unité de mesure requise;

Ep est l'efficacité de la procédure, de l'extraction et de l'amplification, **exprimée en décimaux**;

Ve est le volume total obtenu de l'extraction **exprimé en µL**;

Va est le volume de produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification **exprimé en µL**;

Quantité est le résultat de la réaction d'amplification **exprimé en gEq par réaction**.

Lorsque l'on utilise des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA ou d'urines récoltées sans conservateurs et le kit d'extraction «**EXTRAblood**» en vue d'obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour plasma, urines et «EXTRAblood»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 15 \times \text{Quantité}$

Lorsque l'on utilise des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA ou d'urines récoltées sans conservateurs et le kit d'extraction «**ELite STAR**» en vue d'obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour plasma, urines et «ELITE STAR»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times \text{Quantité}$

Lorsque l'on utilise d'échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA ou urines récoltées sans conservateurs et le kit d'extraction «**ELite GALAXY**» et on veut obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour plasma, urines et «ELITE GALAXY »
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Quantité}$

Lorsque l'on utilise des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA, d'urines récoltées sans conservateurs et de liquide céphalo-rachidien, et le système d'extraction «**NucliSENS® easyMAG®**» en vue d'obtenir le résultat **exprimé en gEq / mL**, la formule est la suivante:

Formule simplifiée pour plasma, urines, liquide céphalo-rachidien et «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Quantité}$

Lors de l'utilisation d'échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA et le système d'extraction «**QIASymphony® SP/AS**», pour **obtenir le résultat en gEq / mL**, la formule devient:

Formule simplifiée pour plasma et «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Quantité}$

Calcul des seuils d'intervalle linéaire de mesure

Lorsque l'on utilise une méthode d'extraction particulière, les seuils de l'intervalle linéaire de mesure (comme gEq / mL d'échantillon) peuvent être calculés à partir de l'intervalle de mesure linéaire de la réaction d'amplification selon la formule:

$$\text{Seuil inférieur (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

$$\text{Seuil supérieur (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Lorsque l'on utilise le kit d'extraction «EXTRAblood» avec des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA ou d'urines récoltées sans conservateurs, la formule devient:

Seuils de l'intervalle linéaire de mesure (gEq / mL) avec «EXTRAblood»	
Seuil inférieur (gEq / mL) = 15 x 10 gEq	Seuil supérieur (gEq / mL) = 15 x 1.000.000 gEq
de 150 à 15.000.000 gEq / mL	

Lorsque l'on utilise le système «ELiTe STAR» avec des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA ou d'urines récoltées sans conservateurs la formule devient:

Limites de l'intervalle linéaire de mesure (gEq / mL) avec «ELiTe STAR»	
Seuil inférieur (gEq / mL) = 28 x 10 gEq	Seuil supérieur (gEq / mL) = 28 x 1.000.000 gEq
de 280 à 28.000.000 gEq / mL	

Lorsque l'on utilise le système «ELiTe GALAXY» avec des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA ou d'urines récoltées sans conservateurs la formule devient:

Limites de l'intervalle linéaire de mesure (gEq / mL) avec «ELiTe GALAXY »	
Seuil inférieur (gEq / mL) = 35 x 10 gEq	Seuil supérieur (gEq / mL) = 35 x 1.000.000 gEq
de 350 à 35.000.000 gEq / mL	

Lorsque l'on utilise le système d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» avec des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA, ou d'urines récoltées sans conservateurs ou de liquide céphalorachidien, la formule devient:

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «NucliSENS® easyMAG®»	
Seuil inférieur (gEq / mL) = 10 x 10 gEq	Seuil supérieur (gEq / mL) = 10 x 1.000.000 gEq
de 100 à 10.000.000 gEq / mL	

Lors de l'utilisation du système d'extraction «QIASymphony® SP/AS» avec des échantillons de plasma prélevés dans un tube EDTA, la formule devient :

Limites de l'intervalle de mesure linéaire (gEq / mL) avec «QIASymphony® SP/AS»	
Seuil inférieur (gEq / mL) = 12 x 10 gEq	Seuil supérieur (gEq / mL) = 12 x 1.000.000 gEq
de 120 à 12.000.000 gEq / mL	

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité analytique: seuil de détection

Ce test permet de détecter la présence d'environ 10 molécules d'ADN cible dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, ou le seuil de détection, a été testée à partir d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Le plasmide a été dilué à une concentration de 10 copies / 20 µL dans de l'ADN génomique humain à une concentration de 500 ng / 20 µL. Cet échantillon a été amplifié 50 fois, avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 500 ng d'ADN génomique humain	50	49	1

La sensibilité analytique du test a été vérifiée en utilisant un panel de dilutions de BKV dans la concentration limite, associé à des échantillons de plasma et d'urine et le système «ELiTe GALAXY». Le panel a été préparé en diluant l'échantillon JCBK11-06 du "QCMD 2011 JC virus and BK virus DNA EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni) dans des échantillons de plasma prélevé dans un tube EDTA négatifs pour l'ADN de BKV. La concentration virale varie de 10 gEq / mL à 560 gEq / mL. Chaque échantillon du panel a été utilisé dans 12 réplifications pour effectuer toute la procédure d'analyse, incluant l'extraction, l'amplification en temps réel et l'interprétation des résultats avec le système «ELiTe GALAXY» et les produits ELITechGroup S.p.A. L'analyse statistique a été effectuée par régression de Probit. Le seuil de détection a été défini comme concentration à laquelle la probabilité d'atteindre un résultat positif est de 95%.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant:

Limite de détection avec les échantillons de plasma et ELiTe GALAXY (gEq / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur supérieure
95% positivité	190 gEq / mL	122 gEq / mL	452 gEq / mL

Limite de détection avec les échantillons d'urine et «ELiTe GALAXY» (gEq / mL)			
Intervalle de confiance de 95 %			
		valeur inférieure	valeur inférieure
95% positivité	119 gEq / mL	75 gEq / mL	309 gEq / mL

Sensibilité analytique: intervalle linéaire de mesure

Ce test permet de quantifier de 1.000.000 à 10 molécules d'ADN cible dans les 20 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, ou l'intervalle linéaire de mesure, a été déterminée à partir d'un panel de dilutions (1 log₁₀ entre deux dilutions) d'ADN plasmidique. Le plasmide contient le produit d'amplification et sa concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. Les solutions contenant 107 molécules par réaction à 10¹ molécules par réaction ont été amplifiées 9 fois avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

L'analyse des résultats, réalisée par régression linéaire, a démontré que le test présente une linéarité pour tous les points du panel (coefficient de corrélation linéaire supérieure à 0,99).

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Le seuil supérieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à 10^6 molécules par réaction, correspondants aux génomes Équivalents par réaction, dans un logarithme de valeur des standards d'amplification Q - PCR Standard la plus concentrée (10^5 molécules / 20 μ L).

Le seuil inférieur de l'intervalle linéaire de mesure a été fixé à 10 molécules par réaction, correspondantes aux génomes Équivalents par réaction, dans un logarithme de valeur des standards d'amplification Q - PCR Standard la moins concentrée (10^2 molécules / 20 μ L).

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant:

Intervalle linéaire de mesure (gEq / réaction)	
Seuil supérieur	1.000.000 copies gEq / réaction
Seuil inférieur	10 copies gEq / réaction

À la page 28 sont indiquées les limites de l'intervalle linéaire de mesure exprimées en gEq / mL en fonction du kit d'extraction utilisé.

Sensibilité analytique: Précision et Fiabilité

La précision du test, ou la variabilité des résultats obtenus au cours d'une même session d'amplification avec différents répliquats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage moyen de Coefficient de Variation (CV%) de 30,4% pour l'intervalle compris entre 10^6 molécules et 10 molécules dans les 20 μ L d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'étude de la fiabilité du test, entendue comme différence entre la moyenne des résultats obtenus au cours d'une même étape d'amplification avec différentes répliquations d'un échantillon et la valeur théorique de la concentration de l'échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'imprécision moyen de 5,2% pour l'intervalle compris entre 10^6 molécules et 10 molécules dans les 20 μ L d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et la fiabilité ont été calculées à partir des données obtenues lors des essais pour l'étude de l'intervalle linéaire de mesure.

Sensibilité analytique: reproductibilité grâce à un panel certifié de matériel de référence

La sensibilité analytique du test, ou la reproductibilité des résultats comparés à ceux obtenus avec d'autres méthodes dans différents laboratoires, a été vérifiée avec un panel de matériel de référence.

Les essais ont été menés en utilisant, comme matériel de référence, un panel de dilutions de BKV dans la limite de concentration (QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 répliquats en effectuant toutes les étapes de la procédure d'analyse d'extraction avec «EXTRABlood» et l'amplification avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Essais avec produit de référence calibré				
Échantillon	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Déviat. standard	Positifs / Répliquats	Moyenne des résultats Log ₁₀ gEq / mL
JC.BK09-01	JCV-3B, 2,844	0,606	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-02	BKV-1B, 2,960	0,511	2 / 2	2,944
JC.BK09-03	JCV-2B, 2,682	0,612	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-04	Négatif, NA	NA	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-05	BKV, 2,565	0,579	2 / 2	2,185
JC.BK09-06	BKV, 2,853	0,603	2 / 2	2,544
JC.BK09-07	JCV-2B, 3,801	0,628	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-08	BKV, 3,451	0,533	2 / 2	3,364
JC.BK09-09	JCV-2B, 2,234	0,697	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-10	BKV, 4,462	0,576	2 / 2	4,254
JC.BK09-11	JCV-2B, 3,142	0,663	0 / 2	Non détecté
JC.BK09-12	BKV, 2,898	0,493	2 / 2	2,582

Tous les échantillons ont été correctement détectés. Les résultats quantitatifs obtenus s'inscrivent dans l'intervalle défini par le Consensus ± 1 Déviation standard.

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

D'autres tests ont été faits en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution de BKV (QCMD 2013 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en duplicate pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec «ELiTe STAR» et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats exprimés en gEq/mL sont résumés dans le tableau suivant:

Essais avec produit de référence calibré et «ELiTe STAR»				
Échantillon	Consensus des essais commerciaux Log ₁₀ conc. virale	Déviat. standard	Positifs / Répliquats	Moyenne des résultats 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	-

Tous les échantillons négatifs ont été détectés correctement. Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés et sont dans l'intervalle défini par le consentement des essais commerciaux.

D'autres tests ont été faits en utilisant comme matériel de référence un panel de dilution de BKV (QCMD 2012 JC Virus and BK Virus Proficiency Panel", Qnostics Ltd, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en duplicate pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec «ELiTe GALAXY» et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Essais avec produit de référence calibré et «ELiTe GALAXY»				
Échantillon	Consensus des essais commerciaux Log ₁₀ conc. virale	Déviat. standard	Positifs / Répliquats	Moyenne des résultats 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	Négatif	-	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

Tous les échantillons négatifs ont été détectés correctement. Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés et sont dans l'intervalle défini par le consentement des essais commerciaux.

Sensibilité diagnostique: efficacité de détection et quantification sur différents génotypes / sous-type.

La sensibilité diagnostique du test, ou l'efficacité de détection et de quantification sur différents génotypes / sous-types, a été évaluée en comparant les séquences à des banques de données nucléotidiques.

L'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente sur les séquences disponibles dans la banque de données du gène **codant l'antigène Large T de BKV**, a démontré leur conservation et

BKV ELITe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

l'absence de mutations significatives.

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, définie comme confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques positifs pour l'ADN de BKV.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 22 échantillons de plasma prélevé sur EDTA et 22 échantillons d'urine prélevés sans conservateurs, tous positifs pour l'ADN de BKV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, l'extraction avec «**EXTRAblood**» et l'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de BKV	22	22	0
Urine prélevée sans conservateurs positive pour l'ADN de BKV	22	22	0

La sensibilité diagnostique du test a été de 100%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de plasma prélevé sur EDTA positifs pour l'ADN de BKV et 30 échantillons d'urine prélevés sans conservateurs tous positifs pour l'ADN de BKV. Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, avec avec «**ELITe STAR**» et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de BKV	30	29	1
Urine positive pour l'ADN de BKV	30	30	0

Un échantillon de plasma s'est avéré négatif. Ce résultat écart peut être expliqué par le faible titre et la dégradation de l'échantillon.

La sensibilité diagnostique du test a été de 98,3%.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 9 échantillons de plasma prélevé sur EDTA de donneurs normaux, positifs pour l'ADN de BKV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel) et 30 échantillons de plasma prélevés sur EDTA négatifs rendus positifs à un titre proche de la limite de détection pour l'ADN de BKV, par ajout d'un échantillon calibré et certifié (QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Royaume Uni)

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 1 échantillon d'urine prélevé sans conservateurs d'un donneur, positif pour l'ADN de BKV (testé avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel) et 30 d'urine prélevé sans conservateurs rendus positifs à un titre proche de la limite de détection pour l'ADN de BKV, par ajout d'un échantillon calibré et certifié (QCMD 2011 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Royaume Uni).

Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction, d'amplification, de révélation et d'interprétation des résultats avec «**ELITe GALAXY**» et les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA positif pour l'ADN de BKV	9	9	0
Plasma prélevé sur EDTA rendu positif pour l'ADN de BKV	30	30	0
Urine prélevée sans conservateurs positive pour l'ADN de BKV	1	0	1
Urine prélevée sans conservateurs rendue positive pour l'ADN de BKV	30	29	1

La sensibilité diagnostique de ce test a été supérieure à 97%.

Spécificité analytique: absence de réactivité croisée avec des marqueurs potentiellement interférents

La spécificité analytique du test, ou l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée en comparant les séquences avec des banques de données

BKV ELITe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

nucléotidiques.

L'analyse de l'alignement des séquences des amorces et de la sonde fluorescente avec des séquences d'organismes différents de BKV, incluant celles du génome complet de JCV, le polyomavirus humain le plus semblables à BKV, a démontré leur spécificité et l'absence d'homologies significatives.

La spécificité analytique du test, ou l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été vérifiée en utilisant certains échantillons cliniques négatifs pour l'ADN de BKV mais positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes.

La spécificité analytique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 18 échantillons de plasma prélevé sur EDTA, négatifs pour l'ADN de BKV mais positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes comme JCV, HSV1 et HHV8 (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel). Chaque échantillon du panel a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec «**EXTRAblood**», et d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV et positif pour l'ADN d'autres agents pathogènes	18	0	18

La spécificité analytique du test, ou l'absence de réactivité croisée avec d'autres marqueurs potentiellement interférents, a été évaluée en utilisant un panel du matériel de référence.

La spécificité analytique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence calibré un panel comprenant des échantillons positifs pour JCV (QCMD 2009 JC Virus and BK Virus EQA Panel", Qnostics Ltd, Royaume Uni). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant toute la procédure (extraction, amplification et analyse) avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont reportés dans le paragraphe intitulé "Sensibilité analytique: reproductibilité grâce à un panel certifié de matériel de référence".

Aucune réactivité croisée n'a été relevée avec les échantillons positifs pour l'ADN d'autres agents pathogènes.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons négatifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques négatifs pour l'ADN de BKV.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériel de référence 22 échantillons de plasma prélevé sur EDTA et 22 échantillons d'urine prélevés sans conservateurs, tous négatifs pour l'ADN de BKV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel). Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec «**EXTRAblood**» et d'amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV	22	0	22
Urine prélevée sans conservateurs négative pour l'ADN de BKV	22	0	22

La spécificité diagnostique du test a été de 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de plasma prélevés sur EDTA, négatifs pour l'ADN de BKV et 30 échantillons d'urine prélevés sans conservateurs négatifs pour l'ADN de BKV. Chaque échantillon a été utilisé pour effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec «**ELITe STAR**» et amplification, avec les produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV	30	0	30
Urine prélevée sans conservateurs négative pour l'ADN de BKV	30	0	30

La spécificité diagnostique du test a été de 100%.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 38 échantillons de plasma prélevés sur EDTA négatifs pour l'ADN de BKV et 31 échantillons d'urine prélevés sans conservateurs, négatifs pour l'ADN de BKV (testés avec un produit CE IVD d'amplification en temps réel). Chaque échantillon a été utilisé pour

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

effectuer toute la procédure d'analyse, d'extraction avec «ELiTe GALAXY» et d'amplification, avec les produits ELiTechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N	positifs	négatifs
Plasma prélevé sur EDTA négatif pour l'ADN de BKV	38	0	38
Urine prélevée sans conservateurs négative pour l'ADN de BKV	31	0	31

La spécificité diagnostique du test a été de 100%.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit avec les matrices et les instruments ont été enregistrés dans le Fascicule Technique de Produit "BKV ELiTe MGB® Kit", FTP175PLD.

Roche cobas z 480 analyzer

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants :

Sang total prélevé sur EDTA

Les échantillons de sang total pour l'extraction de l'ADN doivent être prélevés sur de l'EDTA et être identifiés conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8°C et conservés entre +2 et +8°C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant trente jours au maximum ou à -70°C pour des périodes plus longues. Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de sang total à l'aide de l'instrument «MagNA Pure 24 System» et de la version du logiciel 1.0 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «Pathogen200» et suivez ces instructions: distribuer 350 µl d'échantillon dans le tube MagNA Pure de 2,0 ml, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du CPE à 20 µl/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µl. Le CPE doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivez scrupuleusement les instructions contenues dans le manuel d'utilisation du kit.

Plasma collecté dans EDTA

Les échantillons de plasma pour l'extraction d'acide nucléique doivent être collectés dans l'EDTA et être identifiés conformément aux directives de laboratoire. Ils doivent être transportés entre +2 et +8°C et conservés entre +2 et +8°C pendant trois jours au maximum. Sinon, ils doivent être congelés et conservés à -20°C pendant trente jours au maximum ou à -70°C pour des périodes plus longues. Il est recommandé de diviser les échantillons en aliquotes avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation et de décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler juste avant l'extraction afin d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Remarque: pour procéder à l'extraction de l'ADN des échantillons de plasma à l'aide de l'instrument «MagNA Pure 24 System» et de la version du logiciel 1.0 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction «Pathogen200» et suivez ces instructions: distribuer 350 µl d'échantillon dans le tube MagNA Pure de 2,0 ml, charger le tube dans l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon, l'ajout du CPE à 20 µl/extraction et l'élution des acides nucléiques dans 100 µl. Le CPE doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire. Pour plus de détails sur la procédure d'extraction, suivez scrupuleusement les instructions contenues dans le manuel d'utilisation du kit.

BKV ELiTe MGB® Kit
réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Urine prélevée sans conservateurs

Les échantillons d'urines destinés à l'extraction des acides nucléiques doivent être récoltés dans des contenueurs sans conservateurs, suivant les indications du laboratoire. Ils doivent être transportés et conservés à température ambiante (+18 / +25 °C) pendant un maximum de quatre heures. Ils peuvent être congelés et conservés à -20 °C pendant un maximum de trente jours ou à -70 °C pour une période de temps plus longue.

La congélation des échantillons d'urines entraîne souvent la formation de précipités qui peuvent compromettre les phases ultérieures de la méthode : pour l'extraction, utiliser uniquement le surnageant.

Il est conseillé de subdiviser en plusieurs aliquots les échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons juste avant l'extraction de façon à éviter la dégradation des acides nucléiques.

Remarque : lorsque vous effectuez une extraction d'ADN à partir d'échantillons d'urine avec l'instrument " MagNA Pure 24 System avec la version 1.0 du logiciel (ou des versions ultérieures équivalentes), utilisez le protocole d'extraction "Pathogen200" et suivez ces instructions : distribuez 350 µL d'échantillon dans le tube MagNA Pure de 2,0 ml, chargez le tube dans l'instrument et commencez l'extraction. l'instrument et commencer l'extraction. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute 20 µL de CPE / extraction. et élue les acides nucléiques dans 100 µL. Le CPE doit être dilué à 1:2 dans de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire. ultra-pure. Pour les détails de la procédure d'extraction, suivez les instructions contenues dans le manuel d'utilisation du kit.

Contrôles d'amplification

Il est absolument indispensable de valider chaque session d'amplification avec une réaction de contrôle négatif et une réaction de contrôle positif.

Pour le contrôle négatif, à la place de l'ADN extrait de l'échantillon, ajouter à la réaction de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire (non incluse dans le kit).

Pour le contrôle positif, utiliser le produit «BKV - ELiTe Positive Control» ou le produit «BKV ELiTe Standard».

Contrôles de qualité

Il est recommandé de valider l'ensemble de la procédure d'analyse de chaque session d'extraction et d'amplification en testant les contrôles du processus, c'est-à-dire un échantillon testé négatif et un échantillon testé positif ou du matériel de référence étalonné.

PROCÉDURE

Paramétrage de la session d'amplification en temps réel

(A effectuer dans la zone dédiée à l'amplification/la détection des produits d'amplification)

Lorsque l'instrument **cobas z 480 analyzer (Roche)** est utilisé:

Avant de commencer la session, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de:

- mettre l'ordinateur de contrôle et le thermocycleur en temps réel en marche. Ouvrir le logiciel dédié et, dans la fenêtre principale, ouvrir une session «New Experiment»;
- paramétrer le volume de la réaction («Reaction volume») à 40 µl;
- attribuer un identifiant à chaque échantillon («Sample editor»);
- définir le cycle thermique de la réaction conformément au tableau suivant:

cycle thermique		
Étape	Températures	Durée
Décontamination	50°C	2 min
Dénaturation initiale	94°C	2 min
Amplification et détection (45 cycles)	94°C	10 s
	60°C (acquisition de la fluorescence)	30 s
	72°C	20 s

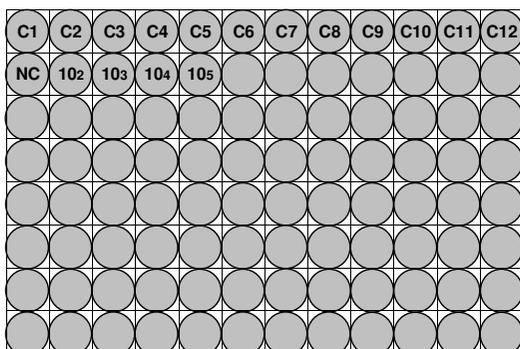
Dissociation (facultatif)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Remarque: l'acquisition de la fluorescence se produit individuellement; paramétrer la rampe (Ramp Rate) (°C/s) à 4,4°C/s.

- sélectionner les canaux de détection du signal: «detector» pour le capteur HSV avec le «channel FAM 465-510» et «detector» pour le capteur du contrôle interne (IC) avec le «channel VIC 540-580»;

Compléter le **Plan de travail** (Work Plan) joint à la fin du présent manuel d'utilisation, en renseignant ces informations ou en imprimant la disposition de la microplaque. Ce **Plan de travail** doit être scrupuleusement suivi pendant le transfert du mélange réactionnel et des échantillons dans les puits.

Remarque: afin de déterminer la concentration de l'ADN dans l'échantillon source, il est nécessaire d'exécuter un ensemble de réactions avec l'étalon **Q - PCR Standard** (10^5 copies, 10^4 copies, 10^3 copies, 10^2 copies) pour obtenir la **courbe d'étalonnage**. L'exemple ci-dessous montre comment organiser l'analyse quantitative de 12 échantillons.



Légende: C1 - C12: échantillons à analyser; NC: contrôle d'amplification négatif; 10^2 : étalon à 10^2 copies; 10^3 : étalon à 10^3 copies; 10^4 : étalon à 10^4 copies; 10^5 : étalon à 10^5 copies.

Paramétrage de l'amplification

(À effectuer dans la zone dédiée à l'extraction/la préparation de la réaction d'amplification)

Avant de commencer la session, il est nécessaire de:

- récupérer et décongeler les tubes à essai contenant les échantillons à analyser. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace;
- récupérer et décongeler les tubes à essai contenant le mélange **BKV Q - PCR Mix** requis pour la session, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **25 réactions**. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace;
- récupérer et décongeler les tubes à essai contenant l'étalon **BKV Q - PCR Standard**. Agiter délicatement les tubes, les placer dans la centrifugeuse pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond, puis les conserver sur de la glace;
- récupérer la **plaquette AD** devant être utilisée pour la session, en veillant à porter des gants anti-poussière pour la manipuler et à ne pas endommager les puits.

1. Sans introduire de bulles et en veillant à déposer le mélange avec précision au fond des puits, transférer **20 µl** de mélange réactionnel **BKV Q - PCR Mix** dans les puits de la **plaquette AD**, comme précédemment établi dans le **Plan de travail**.

Remarque: si le mélange réactionnel n'est pas utilisé en intégralité, conserver le mélange restant à -20°C pendant un mois au maximum. Congeler et décongeler le mélange réactionnel **5 FOIS** au maximum.

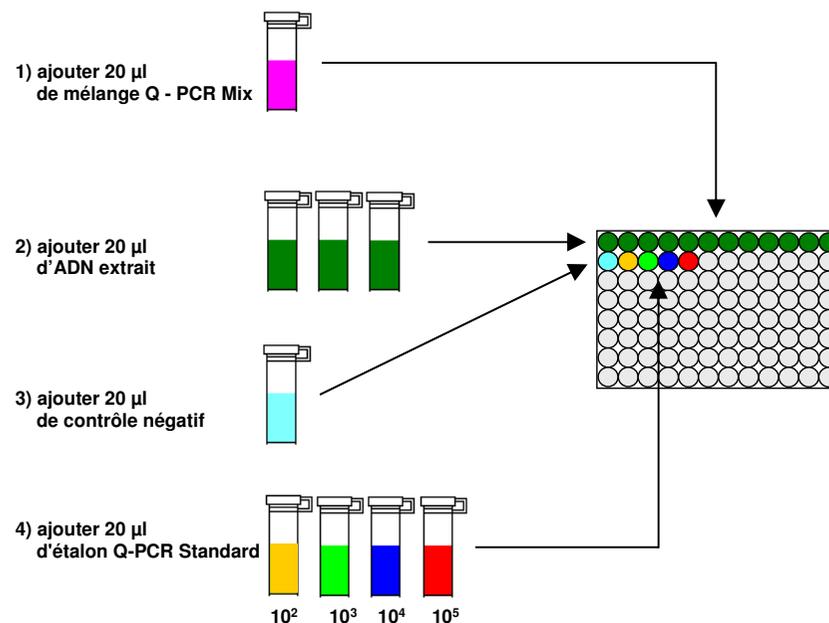
2. En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µl** de l'**ADN extrait** du

premier échantillon dans le puits correspondant de la **plaquette AD**, comme précédemment établi dans le **Plan de travail**. Bien mélanger l'échantillon en pipetant l'**ADN extrait** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles. Procéder de la même manière avec tous les autres **ADN extraits**.

- En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µl** d'eau ultra-pure de **qualité pour biologie moléculaire** (non fournie avec le produit) dans les puits de la **plaquette AD** contenant le contrôle d'amplification négatif, comme précédemment établi dans le **Plan de travail**. Bien mélanger le puits de contrôle négatif en pipetant l'**eau ultra-pure de qualité pour biologie moléculaire** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles.
- En le déposant avec précision dans le mélange réactionnel, transférer **20 µl** d'étalon **BKV Q - PCR Standard 10^2** dans les puits correspondant de la **plaquette AD**, comme précédemment établi dans le **Plan de travail** (Work Plan). Bien mélanger le puits contenant l'étalon en pipetant le **BKV Q - PCR Standard 10^2** à trois reprises dans le mélange réactionnel. Veiller à ne pas introduire de bulles. Procéder de la même manière avec les étalons **BKV Q - PCR Standard 10^3 , 10^4 , 10^5** .
- Sceller soigneusement la **plaquette AD** à l'aide du **film de scellage**.
- Transférer la **plaquette AD** dans le thermocycleur en temps réel installé dans la zone d'amplification/de détection des produits d'amplification et lancer le cycle thermique d'amplification, en enregistrant les paramètres de la session sous un identifiant unique et reconnaissable (par exemple, «année-mois-jour-ADV-EGSpA»).

Remarque: à la fin du cycle thermique, la **plaquette AD** et les produits de la réaction doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut via une procédure qui n'engendre aucune pollution environnementale. **Ne jamais retirer le film de scellage de la microplaque d'amplification** pour éviter toute fuite des produits de la réaction.

La figure suivante présente de manière synthétique la préparation de la réaction d'amplification.



Analyse qualitative des résultats

Les valeurs de la fluorescence émise enregistrées par le détecteur ADV et le détecteur du contrôle

interne (IC) pendant les réactions d'amplification doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

Sélectionner le menu «Analysis» et choisir «Absolute Quant/Fit Points» (Absolute Quant/Fit Points) (2 points).

Sélectionner le groupe d'échantillons à analyser.

Conformément à la documentation de l'instrument, avant de commencer l'analyse, il est nécessaire de:
- saisir manuellement la plage de calcul (bouton Background) du **Background Fluorescence Level** du cycle 2 au cycle 6.

Pour les échantillons de plasma :

- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «IC» VIC **du cycle 2 au cycle 6** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «BKV» FAM à **0,55** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «IC» VIC à **du cycle 6 au cycle 10**.
- paramétrer manuellement le **Threshold** et la **Noiseband** pour le détecteur «BKV» FAM à **0,55** ;

Les valeurs de la fluorescence émise par les détecteurs spécifiques dans la réaction d'amplification et les valeurs de fluorescence du **Threshold** et de la **Noiseband** sont utilisées pour déterminer le **Cycle seuil (Ct)** (Threshold Cycle [Ct]), c'est-à-dire le cycle pendant lequel le **seuil** de fluorescence est atteint.

Les valeurs **Ct** pour BKV dans les réactions d'amplification des quatre étalons **Q - PCR Standard** sont utilisées pour calculer la **courbe d'étalonnage** (Results > Standard Curve) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction Q - PCR Standard 10 ⁵ détecteur «BKV»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECT

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle positif** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** pour HSV1, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou du contrôle positif, dégradation du mélange réactionnel ou du contrôle positif, paramétrage incorrect de la position du contrôle positif, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

* **Remarque:** lorsque ce produit est utilisé pour la quantification de l'ADN de BKV, les réactions des étalons **Q - PCR Standard** sont paramétrées à la place de la réaction du **contrôle positif**. Dans ce cas, valider l'amplification et la détection en se reportant à la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10⁵** (**Ct ≤ 25**).

Pendant la réaction d'amplification du **contrôle négatif**, la valeur **Ct** pour BKV (fenêtre Analyse [Analysis]) est utilisée pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant:

Réaction du contrôle négatif détecteur «BKV»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct Indéterminé	NÉGATIF	CORRECT

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est autre que **Ct indéterminé** pour HHV6, la présence de la cible d'ADN a été détectée. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (contamination), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux-positifs. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Pendant les réactions d'amplification de chaque **échantillon**, la valeur **Ct** pour BKV est utilisée pour détecter la présence de la cible d'ADN, alors que la valeur **Ct** pour le contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque: à l'aide du logiciel de l'instrument (fenêtre Analyse [Analysis]), vérifier que le **Ct** est déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de la fluorescence, et non par des pics ou par une augmentation du signal de bruit de fond (bruit de fond irrégulier ou important).

Les résultats de type **Ct** de chacune des réactions d'amplification d'un **échantillon** (fenêtre Analyse

[Analysis]) sont utilisés comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction d'échantillon		Adéquation de l'échantillon	Résultat d'analyse	ADN de BKV
Détecteur «BKV»	Détecteur «IC»			
Ct Indéterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	non adéquat	non valide	-
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, négatif	NON DÉTECTÉ
Ct déterminé	Ct > 35 ou Ct indéterminé	adéquat	valide, positif	DÉTECTÉ
	Ct ≤ 35	adéquat	valide, positif	DÉTECTÉ

Si le résultat d'une réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour BKV et **Ct > 35** ou **Ct indéterminé** pour le contrôle interne, il n'a pas été possible de détecter efficacement l'ADN du contrôle interne. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification (amplification inefficace ou nulle) ou pendant l'étape d'extraction (ADN de l'échantillon dégradé, échantillon comportant un nombre de cellules insuffisant, perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs dans l'ADN extrait), ce qui peut générer des résultats incorrects et des faux-négatifs. L'échantillon n'est pas adéquat, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'extraction d'un nouvel échantillon.

Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Ct indéterminé** pour BKV et **Ct ≤ 35** pour le contrôle interne, l'ADN d'BKV n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon; toutefois, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ADN d'HHV6 soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du produit (se reporter à la section «Caractéristiques de performance»). Dans ce cas, le résultat constituerait un faux-négatif.

Les résultats obtenus avec cette analyse doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des résultats des autres analyses de laboratoire du patient.

Remarque: lorsque l'ADN de BKV est détecté pendant la réaction d'amplification d'un échantillon, l'amplification du contrôle interne peut générer un résultat **Ct > 35** ou **Ct indéterminé**. En fait, la réaction d'amplification du contrôle interne de faible efficacité peut être éliminée par compétition avec la réaction de BKV hautement efficace. Dans ce cas, l'échantillon est adéquat et le résultat d'analyse positif est valide.

Analyse quantitative des résultats

Après avoir effectué la procédure d'analyse qualitative, il est possible d'effectuer l'analyse quantitative des résultats de l'échantillon positif.

Si le résultat de la réaction d'amplification de l'étalon **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** ou si les valeurs **Ct** des quatre étalons **Q - PCR Standard** ne sont pas régulièrement ajustées sur la courbe d'étalonnage, la cible d'ADN n'a pas été détectée correctement. Des problèmes sont survenus pendant l'étape d'amplification ou de détection (distribution incorrecte du mélange réactionnel ou des étalons, dégradation du mélange réactionnel ou des étalons, paramétrage incorrect des positions des étalons, paramétrage incorrect du cycle thermique), ce qui peut générer des résultats incorrects. La session n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Les valeurs **Ct** pour BKV dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la **courbe d'étalonnage** (bouton **Standard Curve**) de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité** de la cible d'ADN présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Ce produit est capable de quantifier 1.000.000 à environ 10 copies par réaction, 25.000.000 à 250 copies par ml de sang total en utilisant le système d'extraction **MagNA Pure 24** (se reporter à la section «Caractéristiques de performance»), comme indiqué dans le tableau suivant:

Résultats de l'échantillon détecteur «BKV» FAM	Copies de BKV par réaction
Quantité > 1 x 10⁶	PLUS DE 1.000.000
1,0 x 10¹ ≤ Quantité ≤ 1 x 10⁶	= Quantité
Quantité < 1,0 x 10¹	MOINS DE 10

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

Les résultats (**Quantité**) de chaque **échantillon** (fenêtre Analysis) sont utilisés pour calculer les **copies** de BKV présentes dans l'échantillon source (**Nc**) selon la formule suivante:

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

dans laquelle:

Vc est la quantité d'échantillon utilisée dans l'extraction selon l'unité de mesure requise;

Ep est l'efficacité de la procédure, à savoir l'extraction et l'amplification, **exprimée en valeurs décimales**,

Ve est le volume total obtenu à partir de l'extraction **exprimé en µl**;

Va est le volume du produit d'extraction utilisé dans la réaction d'amplification **exprimé en µl**;

Quantité est le résultat de la réaction d'amplification de l'échantillon **exprimé en copies par réaction**.

En cas d'utilisation d'échantillons de sang total prélevé sur EDTA et du système

d'extraction **MagNA Pure 24**, et si le résultat doit être **exprimé en copies/ml**, la formule est alors:

Formule simplifiée pour le sang total et MagNA Pure 24

$$Nc \text{ (copies/ml)} = 25 \times \text{Quantité}$$

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE**Sensibilité analytique: limite de détection**

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, permet de détecter environ 10 copies dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique de ce test, en tant que limite de détection, a été testée en utilisant un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification dont la concentration initiale a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à une concentration de 10 copies/20 µl dans 150.000 copies de pBETAGLOBIN / 20 µl. Cet échantillon a été utilisé en 18 réplicats afin de réaliser une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
10 copies d'ADN plasmidique + 150.000 copies de bêta-globine	18	18	0

Sensibilité analytique: précision et exactitude

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) des valeurs Ct inférieur à 2 % dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision de ce test, en termes de variabilité des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage de coefficient de variation moyen (% CV) des quantités mesurées d'environ 12 % dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

L'exactitude de ce test, en termes de différence entre la moyenne des résultats obtenus dans la même session d'amplification en utilisant différents réplicats d'un échantillon et la valeur de la concentration théorique d'un échantillon, a permis d'obtenir un pourcentage d'inexactitude moyen de la quantité mesurée d'environ 1,9% dans la plage de 10⁶ molécules à 10¹ molécules dans 20 µl d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La précision et l'exactitude ont été déterminées en utilisant les données obtenues lors des expériences qui ont évalué la plage de mesure linéaire.

Sensibilité analytique: reproductibilité avec un matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, en tant que reproductibilité de la valeur d'un matériel de référence étalonné, a été évaluée en utilisant, à titre de matériel de référence, le panel «BKV Molecular 'Q' Panel»

BKV ELiTe MGB® Kit

réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF RTS175PLD

(Qnostics Ltd, UK). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète: une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests with calibrated reference materials and «MagNA Pure 24»

Sample	Nominal titre copies/mL	Nominal titre Log ₁₀ copies/mL	Positive / Replicates	Mean results Log ₁₀ copies / 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	negative	-	0/2	-

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

D'autres tests ont été effectués en utilisant les éléments suivants comme matériaux de référence QCMD 2017 BK Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Regno Unito). Chaque échantillon du panel a été testé en 2 réplicats en effectuant la procédure d'analyse complète: une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tests with calibrated reference materials and «MagNA Pure 24»

Sample	Consensus conc. Log ₁₀ copies/mL	Positive / Replicates	Mean results Log ₁₀ copies / 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	negative	0/2	-
BKVDNA17S-05	2.736	2/2	2.748
BKVDNA17S-06	4.734	2/2	4.833
BKVDNA17S-07	3.770	2/2	3.963
BKVDNA17S-08	4.727	2/2	4.810
BKVDNA17S-09	4.637	2/2	4.488
BKVDNA17S-10	4.874	2/2	5.090

Tous les échantillons négatifs ont été correctement détectés comme négatifs et tous les échantillons positifs ont été correctement détectés comme positifs avec un titre dans la fourchette définie par l'étude De Consensus ± 0,5 Log.

Sensibilité diagnostique: confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique a été évaluée à l'aide de 30 échantillons de sang total négatifs à l'EDH prélevés pour l'ADN de BKV, qui étaient positifs pour l'ADN de BKV en ajoutant l'échantillon "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, United Kingdom) et 30 Échantillons de urine négatifs pour l'ADN BKV, qui étaient positifs pour l'ADN HHV6 en ajoutant l'échantillon "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, United Kingdom).

Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète: une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA dopé par de l'ADN de BKV	30	30	0
Urine dopé par de l'ADN de BKV	30	30	0

Tous les échantillons étaient valides lors du premier test; ils ont été confirmés comme étant positifs pour l'ADN de BKV.

La sensibilité diagnostique totale du test était de 100%.

Spécificité diagnostique: confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 31 échantillons d'EDH présomptifs négatifs pour l'ADN de BKV et 32 échantillons de urine présumés négatifs pour l'ADN de BKV comme matériel de référence.

Chaque échantillon a été utilisé en effectuant la procédure d'analyse complète: une extraction en utilisant le système d'extraction automatisé **MagNA Pure 24** et une amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Sang total prélevé sur EDTA présumé négatif pour l'ADN de BKV	31	0	31
Urine présumé négatif pour l'ADN de BKV	32	0	32

Tous les échantillons de sang total et urine confirmés négatifs pour l'ADN de BKV.

La spécificité diagnostique du test en association avec la matrice de sang total dans ce test était égale à 100%.

Remarque: les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont présentés à la section 7 de la Fiche technique du produit «BKV ELITe MGB® Kit», FTP 175PLD

BIBLIOGRAPHIE

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

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Avec ce produit, utiliser uniquement l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants: plasma prélevé dans un tube EDTA, urines récoltées sans conservateurs et liquide céphalo-rachidien.

Ne pas utiliser de l'ADN extrait d'échantillons contenant de l'héparine: l'héparine inhibe la réaction d'amplification des acides nucléiques et engendre des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contaminé par de l'hémoglobine, du dextran, du Ficoll®, de l'éthanol ou du 2-propanol: ces substances inhibent la réaction d'amplification des acides nucléiques et peuvent engendrer des résultats erronés.

Ne pas utiliser de l'ADN contenant des quantités élevées d'ADN génomique humain car l'ADN génomique peut inhiber la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Aucune donnée n'est disponible pour les performances de ce produit avec de l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants: sang total prélevé dans un tube EDTA.

Aucune donnée n'est disponible concernant les éventuels phénomènes d'inhibition par des médicaments antiviraux, antibiotiques, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de la bonne exécution de l'identification, de la collecte, du transport, de la conservation et de la préparation des échantillons. Afin d'éviter tout résultat erroné, il est essentiel d'apporter tout le soin possible et de suivre attentivement les instructions fournies avec les produits d'extraction des acides nucléiques.

Compte tenu de sa forte sensibilité analytique, l'amplification en temps réel des acides nucléiques utilisée dans ce test, est sujette à la contamination par des échantillons cliniques positifs pour le BKV, par des contrôles positifs et par des produits de la même réaction d'amplification. Les contaminations engendrent des résultats faux positifs. Le protocole du produit a été élaboré afin de limiter les contaminations; cependant, ces phénomènes ne peuvent être évités qu'avec une bonne pratique des techniques de laboratoire et le respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, ce test doit être réalisé par un personnel compétent et formé à la manipulation d'échantillons biologiques (pouvant transmettre des agents infectieux) et de produits chimiques dangereux.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, le port de vêtements de travail et l'accès à des locaux adaptés à la manipulation d'échantillons biologiques (pouvant transmettre des agents infectieux) et des produits chimiques dangereux sont requis.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats erronés, ce produit doit être manipulé par un personnel compétent et formé aux procédures de biologie moléculaire (extraction, amplification et détection d'acides nucléiques).

Afin d'éviter d'obtenir des faux positifs, il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction / préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification / détection des produits d'amplification.

Afin d'éviter d'obtenir des faux positifs, il est nécessaire de porter de vêtements de travail et d'utiliser des instruments dédiés à l'extraction / préparation des réactions d'amplification ou à l'amplification / détection des produits d'amplification.

Les différentes technologies présentant des différences intrinsèques, avant de passer à un nouveau produit il est conseillé de procéder à des études de corrélation pour estimer ces différences.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit indique que de l'ADN de BKV n'a pas été détecté. Il ne faut pas exclure que de l'ADN de BKV soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances, page 16); dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Un résultat non valable obtenu avec ce produit indique qu'il n'a pas été possible de relever efficacement l'ADN du Contrôle Interne; dans ce cas, l'analyse de l'échantillon devra être répétée à partir de l'extraction avec d'éventuels retards dans l'obtention du résultat.

Les polymorphismes éventuels de la région du génome viral dans lequel hybrident les oligonucléotides d'amorçage et la sonde du produit pourraient compromettre la détection et la quantification de l'ADN de BKV.

Comme tous les autres tests de diagnostics, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoire du patient.

Comme tous les autres tests de diagnostic, ce produit présente un risque résiduel de résultats non valables, de faux positifs et de faux négatifs. Ce risque ne peut être ni supprimé ni diminué. Dans certaines situations, ce risque peut contribuer à la prise de décisions erronées pouvant avoir des conséquences graves pour le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans la réaction du Positive Control ou des Q - PCR Standard ou le Coefficient de corrélation de la Courbe standard n'est pas valide	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans la microplaque.	Distribuer soigneusement les réactifs dans la microplaque en suivant la grille de travail. Vérifier le volume du mélange de réaction distribué. Vérifier le volume du contrôle positif ou des standards distribués.
Configuration incorrecte de la session sur ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier les volumes du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Dégradation de la sonde.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Dégradation du contrôle positif ou du standard.	Utiliser un nouveau tube de contrôle positif ou de standard.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position du contrôle positif ou des standards. Vérifier le paramétrage du cycle de température.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

L'ADN cible est détecté dans la réaction du Contrôle négatif	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans la microplaque.	Éviter de répandre le contenu des tubes d'échantillons. Changer toujours d'embout entre deux échantillons Distribuer soigneusement les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif (ou les standards) dans la microplaque en suivant la grille de travail.
Configuration incorrecte de la session sur ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel ou des contrôle négatif. Vérifier les volumes du mélange réactionnel ou des contrôle négatif.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position des échantillons, du contrôle négatif et du contrôle positif (ou des standards).
Microplaque mal scellée.	Sceller méticuleusement la microplaque.
Contamination de l'eau ultra pure par la biologie.	Utiliser un nouveau tube d'eau.
Contamination du mélange de réaction.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Contamination de la zone d'extraction / préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux. Laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

L'ADN cible et le contrôle interne ne sont pas détectés dans les réactions de l'échantillon.	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Évitez de renverser le contenu du tube à essai de l'échantillon. Changez toujours d'embout entre un échantillon et un autre. Faites attention lorsque vous distribuez les échantillons dans les puits de la microplaque et respectez la fiche de travail.
Configuration incorrecte de la session sur ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifier les volumes du mélange réactionnel ou des échantillons.
Dégradation du contrôle interne.	Utilisez de nouvelles aliquotes de Contrôle Interne.
Inhibition due à des substances interférant avec l'échantillon.	Répéter l'amplification avec une dilution 1:2 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire de l'échantillon élué dans une session "PCR seulement". Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon.
Stockage incorrect des réactifs.	Vérifier que le mélange réactionnel n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes.
Problèmes pendant l'extraction	Vérifier la qualité et la concentration de l'ADN extrait.
Erreur d'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Une Présence de fluorescence de base irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution de l'échantillon.	Mélanger soigneusement, en pipetant trois fois, les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif (ou les standards) dans le mélange de réaction. Éviter les bulles.
Erreur de paramétrage de la fluorescence de base	Paramétrer l'intervalle de calcul de la "Baseline" entre les cycles où la fluorescence de base est déjà stabilisée (contrôler les enregistrements "Results", "Component") et où la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à croître, par exemple du cycle 6 au cycle 15. Paramétrer le calcul automatique de la fluorescence de base en sélectionnant l'option "Auto Baseline".

Présence d'une courbe de dissociation anormale	
Causes éventuelles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini mais différent de celui des autres échantillons et des standards ou contrôle positif	Contrôler que le Ct du détecteur FAM soit inférieur à 30. Des quantités élevées de produit d'amplification présentes à la fin de la réaction peuvent interférer avec l'analyse de la courbe de dissociation Répéter l'amplification de l'échantillon pour confirmer la présence d'un ADN cible avec une mutation possible. Pour confirmer la présence d'une mutation, l'ADN cible présent dans l'échantillon devrait être séquencé.

Avec ELITe InGenius: Erreur 30103	
Causes éventuelles	Solutions
Concentration élevée de la cible dans l'échantillon.	Si l'on observe une amplification significative dans le plot PCR : - répéter l'amplification avec l'échantillon dilué dans de l'eau ultra-pure pour biologie moléculaire, en sélectionnant l'étape "PCR only", ou - répéter l'extraction en diluant l'échantillon primaire dans de l'eau ultra-pure pour biologie moléculaire et en sélectionnant l'étape "Extract + PCR".

LÉGENDE DES SYMBOLES

REF Référence du catalogue.

 Seuil supérieur de température.

LOT Numéro de lot.

 Date de péremption (dernier jour du mois).

IVD Diagnostic *in vitro*.

CE Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*.

 Contenu suffisant pour "N" tests.

 Attention, consulter le mode d'emploi.

CONT Contenu.

 Conserver à l'abri de la lumière solaire.

 Fabriqué par.

NOTE POUR L'ACQUEREUR: LICENCE LIMITEE

Ce produit contient des réactifs sous licence de LTC.

Ce produit est vendu sous licence dans le cadre d'un accord passé entre ELITechGroup S.p.A et ses sociétés affiliées et LTC. Le prix d'achat de ce produit comprend les droits, limités et non transférables, d'utilisation de la quantité de produit achetée, et, ceci, exclusivement dans le domaine d'application de l'analyse médicale humaine. Afin d'obtenir des informations sur l'achat d'une licence d'utilisation de ce produit dans d'autres domaines d'applications que celui mentionné ci-dessus, veuillez contacter Life Technologies, Inc., Licensing Department, LTC Corporation, 5791 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefon: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@LTC.com.

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont protégés aux Etats-Unis par un ou plusieurs brevets déposés sous les numéros 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 et brevets EP n. 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 ainsi que par les dépôts de brevets en cours d'homologation.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité légale ayant acquis ce produit de l'utiliser, ainsi que tous les résultats obtenus d'une telle utilisation, exclusivement dans le domaine de l'analyse médicale humaine. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses partenaires concédant des licences n'accordent expressément ou de façon implicite une licence pour d'autres utilisations.

"ELITe MGB®", le logo "ELITe MGB®", ELITe InGenius® et ELITe BeGenius® sont des marques commerciales enregistrées pour l'Union européenne.

ELITe InGenius® est une marque d enregistrée de ELITechGroup

«NucliSENS® easyMAC®» sont des marques déposées de bioMérieux.

«QIASymphony®» est une marque déposée de QIAGEN GmbH.

Ficol® est une marques enregistrée de 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>

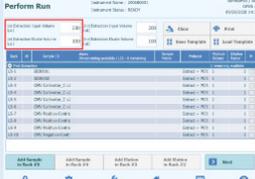
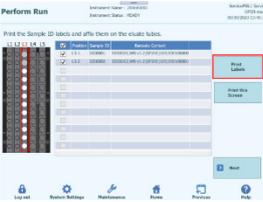
L. Procedures ELITE BeGenius

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

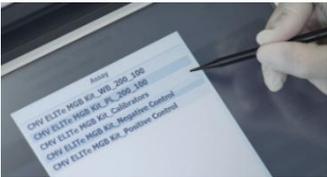
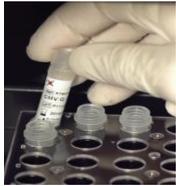
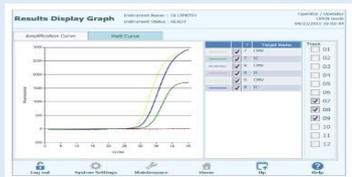
I. Procedures

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

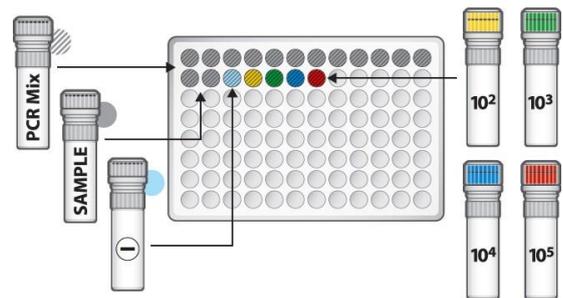
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition 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
	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 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	BKV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

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

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

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

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

B. Amplified sequence

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

C. Validated matrix

- › **Urine**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

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

F. Performance

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

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

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

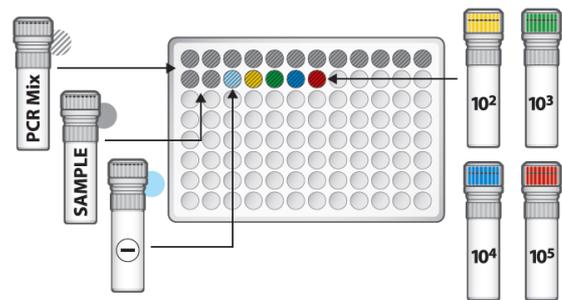
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

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

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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