



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:*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Change in Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *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

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «BKV ELITe MGB® Kit» faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN de Poliovírus BK (BKV) humano** em amostras de ADN extraídas de plasma colhido em EDTA, urina negativa colhida sem conservantes e líquido cefalorraquidiano (CSF).

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de BKV, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

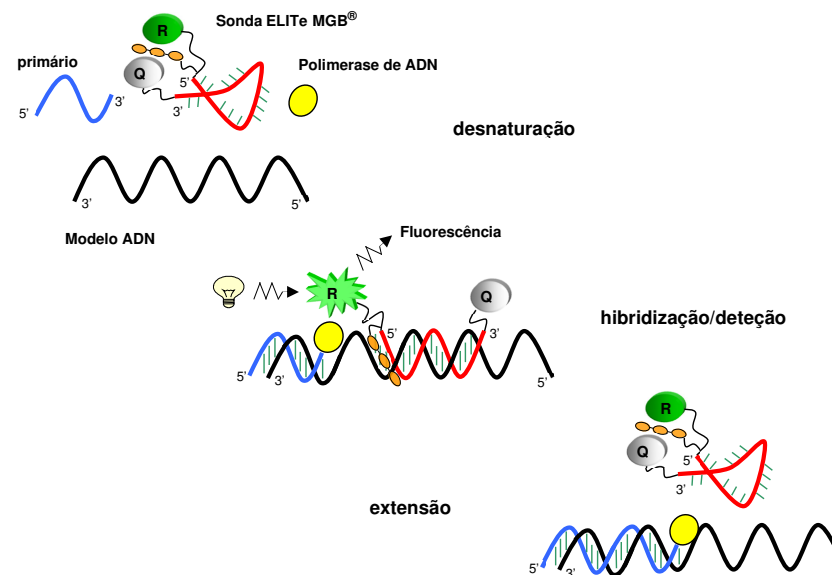
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência.

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para a região do gene **antígeno T grande** de BKV e uma reação específica para a região do gene **beta Globin** humano (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do BKV com tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do BKV. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VCI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do Controlo Interno. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados permite detetar a presença e o título do ADN de BKV na amostra inicial.

No final da sessão de amplificação, pode ser realizada a análise da curva de dissociação (curva de fusão) para determinar a temperatura de dissociação (temperatura de fusão) e para confirmar a presença do alvo correto ou para identificar a presença de mutações.

O ensaio é validado com os sistemas descritos nestas instruções de utilização.

Na imagem seguinte é sinteticamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITe MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante o ciclo de amplificação, pelo que pode ser usada para a análise da curva de dissociação.



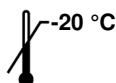
BKV ELITe MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD



IVD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

AVISOS E PRECAUÇÕES

ELITE INGENIUS® e ELITE BEGENIUS®

AMOSTRAS E CONTROLOS

ELITE INGENIUS® PROCEDIMENTO

ELITE BEGENIUS® PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

REFERÊNCIAS

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

SÍMBOLOS

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

página 2

página 2

página 3

página 3

página 3

página 3

página 5

página 6

página 6

página 8

página 14

página 19

página 29

página 29

página 31

página 39

página 45

página 45

página 46

página 50

página 53

página 53

página 54

página 56

página 57

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**BKV ELITE MGB® Kit**» fornece a mistura completa **pronta a usar** Mistura BKV Q-PCR para amplificação em tempo real numa solução de estabilização, **aliquotada em quatro tubos de teste descartáveis**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes (através do processamento de pelo menos 2 amostras por sessão)** em associação com o «**ELITE InGenius®**» e «**ELITE BeGenius®**» e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primários e a sonda específica do BKV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para a região do gene **antígeno T grande** do BKV.

Os primários e a sonda específica do Controlo Interno (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo AP525, semelhante ao VIC, e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos do **promotor e da região 5' UTR** do gene **beta Globin** humano.

A mistura de reação fornece tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou CY5 como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação, a enzima de polimerase de ADN de "arranque a quente".

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o «ELITE InGenius®»** e «**ELITE BeGenius®**», incluindo normas e comandos.

O produto é suficiente para **100 testes em associação com outros sistemas**, incluindo normas e comandos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
BKV Q - PCR Mix	mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas sem pó de nitrilo descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de qualidade para biologia molecular.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7300 Real-Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems Inc) calibrado de acordo com as instruções do fabricante.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência, analisador cobas z 480, calibrado de acordo com as instruções do fabricante..

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para a extração de ADN de amostras, o Positive Control da extração, o Positive Control da amplificação, as normas de ADN de quantidade conhecida e os consumíveis não estão incluídos neste produto.

Para a extração de ADN manual das amostras a serem analisadas, é necessária a utilização do produto genérico «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), kit para a extração de ADN de amostras celulares e não celulares.

Para a análise automática da amostra com o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: os cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200) ou «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos de amostras

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

biológicas.

«**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000), «**Cassete de PCR ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) e «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

Para a extração de ADN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra, é necessário o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A):

- para os calibradores «**BKV ELITE STD**» ou «**BKV ELITE STD_1000_100**»,
- para o Positive Control da amplificação «**BKV ELITE_PC**» ou «**BKV ELITE_PC_1000_100**»,
- para o Negative control da amplificação «**BKV ELITE_NC**» ou «**BKV ELITE_NC_1000_100**»,
- para análises de amostras «**BKV ELITE_PL_200_100**», «**BKV ELITE_PL_1000_100**» e «**BKV ELITE_U_200_100**».

Para uma análise automática da amostra com o instrumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) está validada a utilização doproduto genérico: os cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas «**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 Cassete**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) e «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Suíça, ref. 30180118).

Para a extração de ADN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra, é necessário o instrumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A):

- para os calibradores «**BKV ELITE_Be STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**BKV ELITE_Be_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**BKV ELITE_Be_NC**»,
- para análise de amostras «**BKV ELITE_Be_WB_200_100**» e «**BKVELITE_Be_PL_200_100**».

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, é necessário usar o produto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT011EX), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT010).

Para extração de ADN automática e preparação de microplacas para amplificação de amostras a serem analisadas, é necessário usar o produto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT021EX), kit para extração do ADN e ARN de amostras não celulares e celulares com o instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

Para extração de ADN automática de amostras a serem analisadas, é necessário usar os produtos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, ref. 200111).

Para extração de ADN automática de amostras a serem analisadas, são necessários os produtos «**QIAsymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236) e «**QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 37055), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**QIAsymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) e produtos genéricos afins.

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, o produto «**MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, ref. 07658036001), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**MagNA Pure 24 System**» (Roche, ref. 07290519001) também está validado.

Quando for usado o 7300 Real-Time PCR System para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), microplacas com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), microplacas com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado um analisador cobas z 480, é necessário usar o produto genérico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, ref. 05232724001), microplacas com furos de 0,3 mL e folhas vedantes adesivas

para amplificação em tempo real.

Se for necessária a deteção de ADN de BKV para análise qualitativa, use o produto «**BKV - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR175PLD) ou o produto «**BKV - ELITE Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR175PLD-R), Positive Control composto por ADN de plasmídeo.

Se for necessária a deteção e quantificação de ADN de BKV para análise quantitativa, use o produto «**BKV ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD175PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

Como Positive Control da extração de ácido nucleico a partir de amostras não celulares e controlo da inibição, é necessário o uso do produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE), uma solução estabilizada que contém dois ADNs plasmídeos e o ARN genómico do fago MS2.

Um fator de conversão permite exprimir os resultados da análise quantitativa em Unidades Internacionais do BKV da "1".³

Norma Internacional da OMS para ADN do Vírus BK" (NIBSC código 14/212, Reino Unido).

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in-vitro*.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os desperdícios devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas no produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas no produto.

Não use o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos no produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

As amostras devem ser usadas exclusivamente para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob um exaustor de fluxo de ar laminar. Os tubos contendo amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob um exaustor de fluxo de ar laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de amplificação devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de produtos de amplificação devem ser usadas exclusivamente para este fim.

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **BKV Q - PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A **BKV Q - PCR Mix** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **cinco sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácidos nucleicos devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Recomenda-se a separação das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITE InGenius®** e com o **Software ELITE InGenius®** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **BKV ELITE_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o Controlo interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Nota: quando a extração de ADN a partir de sangue completo for realizada com o **ELITE BeGenius** e com o **ELITE BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **BKV ELITE_Be_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o Controlo Interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Quando for usado o tubo principal, o volume das amostras varia de acordo com o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

Nota: quando a extração de ADN de 1000 µL de plasma for realizada com o **ELITE InGenius®** e com o **Software ELITE InGenius®** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **BKV ELITE_PL_1000_100**. Este protocolo processa 1000 µL da amostra, adiciona o Controlo interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

O tubo primário **NÃO** pode ser usado em associação com o protocolo do ensaio **BKV ELITE_PL_1000_100**.

Urina colhida sem conservantes

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) e guardadas à temperatura ambiente (+18 / +25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

Se possível, evite congelar amostras de primeira urina. A congelação pode causar a precipitação de inibidores e a perda de título de ADN.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Nota: quando a extração de ADN de urina for realizada com o **ELITE InGenius** e com o **Software ELITE InGenius** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **BKV ELITE_U_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o Controlo interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Nota: quando a extração de ADN a partir de plasma for realizada com o **ELITE BeGenius** e com o **ELITE BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **BKV ELITE_Be_U_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o Controlo Interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Quando for usado o tubo principal, o volume das amostras varia de acordo com o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

Substâncias interferentes

A amostra não deve conter heparina, para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a curva de calibração e os controlos de amplificação para cada lote do reagente de amplificação:

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **BKV ELITE Standard**, em associação com o protocolo «**BKV ELITE_STD**» ou «**BKV ELITE_STD_1000_100**» para **ELITE InGenius** e «**BKV ELITE_Be_STD**» para **ELITE BeGenius**,

como Positive Control da amplificação use o **BKV - ELITE Positive Control**, em associação com o protocolo «**BKV ELITE_PC**» ou «**BKV ELITE_PC_1000_100**» para **ELITE InGenius** e «**BKV ELITE_Be_PC**» para **ELITE BeGenius**,

como Negative control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**BKV ELITE_NC**» ou «**BKV ELITE_NC_1000_100**»

para **ELITE InGenius** e «**BKV ELITE_Be_NC**» para **ELITE BeGenius**.

Nota: o **ELITE InGenius** com o **Software ELITE InGenius** permite a criação da curva de calibração e a validação dos Controlos da amplificação para cada lote do reagente da amplificação a ser guardado na respetiva base de dados.

As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de expiração será necessário voltar a executar a definição do calibrador.

Os resultados do controlo de validação da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após **15 dias**. Na data de expiração será necessário voltar a executar os Controlos positivo e negativo.

Os Calibradores e os Controlos da amplificação devem ser novamente testados se ocorrer algum dos seguintes eventos:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de Controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção significativa no instrumento **ELITE InGenius**.

Controlos da qualidade

Os controlos de qualidade externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável. Os controlos de qualidade externos estão disponíveis no mercado.

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

ELITE InGenius® PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do «**BKV ELITE MGB® Kit**» com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema
- preparação da sessão
- revisão e aprovação de resultados

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão de análise da amostra, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo «**CLOSED**» (Fechado);
- verificar se os Calibradores (**BKV Q - PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Status). Pode verificar esta situação no menu «Calibração» na página inicial;
- verificar se os controlos da amplificação (**BKV - Positive Control, BKV Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Status). Pode verificar esta situação no menu «Controlo» na página inicial;
- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo **ELITEchGroup**. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITE MGB**, matrizes e o instrumento **ELITE InGenius**.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**BKV ELITE MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o « BKV ELITE MGB® Kit »			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
BKV ELITE_PL_200_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
BKV ELITE_PL_1000_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 1000 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
BKV ELITE_U_200_100	Urina	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

Se o Protocolo de ensaio de interesse não estiver no sistema, contacte o serviço de Apoio ao cliente **ELITEchGroup** na sua localidade.

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O **BKV ELITE MGB® Kit** em associação com o **ELITE InGenius** pode ser usado para:

- Execução integrada (Extract + PCR),
- Execução de amplificação (PCR only),
- Execução da calibração (PCR only),
- Execução de amplificação para execução de Positive Control e negativo (PCR only).

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: o sistema ELITE InGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos quatro tipos de execução.

A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada, execute os passos seguintes de acordo com a Interface gráfica do utilizador (GUI) do SW.

- Descongele um número suficiente de tubos da Mistura BKV Q-PCR para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, BKV ELITE_PL_200_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Posição da amostra":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Primary Tube". O Tubo primário apenas pode ser usado a partir de amostras de 200 µL;
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Extraction Tube".Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a Mistura BKV Q-PCR no Bloco de inventário selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a "PCR Cassette", os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" ou "ELITE InGenius SP1000", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE InGenius** permite ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, a Cassete PCR com os produtos de reação e os consumíveis deve ser removida do instrumento e eliminada sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A mistura PCR pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 16 horas no total (máximo de 5 sessões ou 1 sessão noturna seguida de apenas 1 configuração).

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução de amplificação

Para preparar a execução de amplificação efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

- Descongele um número suficiente de tubos da Mistura BKV Q-PCR para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse introduza a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, BKV ELITE_PL_200_100).
- Selecione "PCR only" na coluna "Protocol".
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra eluída na coluna "Sample Position" é "ExtraTube (bottom row)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a Mistura BKV Q-PCR no Bloco de inventário selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE InGenius** permite ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as Cassetes PCR com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

Para preparar a execução de calibração efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

- Descongele um número suficiente de tubos da Mistura BKV Q-PCR para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele os tubos 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). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Começando a partir do Rastreo de interesse, selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (BKV ELITE_STD ou BKV ELITE_STD_1000_100) e preencha com o número do lote e a data de expiração para o BKV Q - PCR Standard. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a Mistura BKV Q-PCR no Bloco de inventário selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue os tubos do Calibrador e as Cassetes PCR, seguindo as instruções na GUI. Clique em

"Next" para continuar a preparação. Tenha o cuidado de carregar os fluidos PCR Standard nos rastreiros corretos como indicado na GUI.

9. Feche a porta do instrumento.
10. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução os restantes Calibradores podem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C.

Nota: No final da execução a Cassete PCR com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de amplificação para Positive Control e Negative control

Para preparar a execução de Positive Control e Negative control da amplificação, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos da Mistura BKV Q-PCR para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele o produto BKV - Positive Control, para amplificação de Positive Control. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o Conjunto de consumíveis ELITe InGenius SP.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
6. Para o Positive Control, selecione BKV ELITe_PC ou BKV ELITe_PC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade do Positive Control BKV.
7. Para o Negative control, selecione BKV ELITe_NC ou BKV ELITe_NC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a Mistura BKV Q-PCR no Bloco de inventário selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue as Cassetes PCR da amplificação, o Positive Control e/ou o Negative control, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe InGenius** permite ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: O Positive Control e o Negative control devem ser executados como controlo da amplificação, para preparar o "Gráfico de controlo". São necessários quatro resultados de Positive Control e Negative control, de 4 execuções diferentes, para preparar o gráfico de controlo. Após isso, os resultados do Positive Control e do Negative control são usados para monitorização do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: No final da execução, o restante Positive Control pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as "PCR Cassettes" com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos

produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Result Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Calibrador/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou Track Report").

Nota: O sistema ELITe InGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (LIS) através do qual é possível enviar os resultados das sessões de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consultar o manual do utilizador do instrumento para mais detalhes.

O **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o **BKV ELITe MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação da Curva de calibração,
- B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative control da amplificação,
- C. Validação dos resultados da amostra,
- D. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda BKV específica ("BKV") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio "BKV ELITe_STD" e "BKV ELITe_STD_1000_100".

A Curva de calibração, específica para o lote do reagente de amplificação, é guardada na base de dados após a aprovação pelo "Administrator" ou "Analyst" seguindo as instruções na GUI.

A Curva de calibração, específica para o lote de reagente de amplificação, irá expirar após 60 dias.

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração para o lote do reagente de amplificação. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração com "Approved" (Status) é mostrada na janela "Calibração" do software ELITe InGenius.

Nota: Quando a Curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "não passou" no menu "Calibração" e não é possível aprovar a mesma. Têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

Nota: Quando a Curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida e deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative control da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica BKV ("BKV") nas reações de amplificação de Positive Control e Negative control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio "BKV ELITe_PC", "BKV ELITe_PC_1000_100", "BKV ELITe_NC" e "BKV ELITe_NC_1000_100".

Os resultados do Positive Control e Negative control da amplificação, específicos para o lote do reagente de amplificação, são guardados na base de dados (Controlos) após a aprovação pelo "Administrator" ou "Analyst" seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar após 15 dias.

Antes da análise de qualquer amostra e após a aprovação da Curva de calibração, é absolutamente obrigatório gerar e aprovar os resultados de Positive Control e Negative control de uma amplificação para o lote de reagente da amplificação usado. A disponibilidade de resultados de Positive Control e Negative control de uma amplificação com "Approved" (Status) é mostrada na janela "Controlos" do software ELITe InGenius. Se os resultados do Positive Control e Negative control da amplificação estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

Nota: Quando o resultado do Positive Control ou Negative control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "não passou" no menu "Controlos" e não é possível aprovar o mesmo. Tem de ser repetida a reação de amplificação do Positive Control ou Negative control.

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Nota: Quando o Positive Control ou Negative control for executado em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida e deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

C. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda BKV específica ("BKV") e pela sonda de Controlo Interno específica ("CI") em cada reação de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio.

Nota: Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração e os Controlos de amplificação para o lote do reagente usado. É recomendado, mas opcional, executar o Positive Control e negativo em conjunto com os Calibradores. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração e de Positive Control e negativo da amplificação com "Approved" (Status) é mostrada nas janelas "Calibração" e "Controlos" do software ELITE InGenius.

Os resultados são descritos nos relatórios gerados pelo instrumento ("Result Display").

A execução da Amostra é válida quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

1) Curva de calibração	Estado
BKV Q - PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
BKV - Positive Control	APROVADO
3) Negative control	Estado
BKV - Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o cálculo da carga viral é automaticamente realizado pelo **Software ELITE InGenius** como estabelecido pelo algoritmo e os parâmetros do protocolo de ensaio.

O sistema efetua automaticamente o cálculo da carga viral para cada amostra. A medição exprime-se em "cópias/mL" ou "IU/mL", conforme definido no protocolo do ensaio. Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado de uma Amostra.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
BKV: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL ou IU/mL	ADN BKV detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
BKV: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL ou IU/mL	ADN BKV detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
BKV: ADN detetado, quantidade além de ULQ cópias/mL ou IU/mL	ADN BKV detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
BKV: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL ou IU/mL	ADN BKV não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado da amostra não válido devido a falha do Controlo Interno (Extração incorreta ou transferência do inibidor).

As amostras não adequadas para análise são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **software ELITE InGenius**. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado devido a potenciais problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode resultar em falsos negativos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR only". No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras adequadas para análise em que não foi possível detetar ADN BKV são reportadas como: "BKV: ADN não detetado ou inferior ao LoD". Neste caso não pode excluir-se que o ADN BKV está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "desempenho e características").

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Result Display) pelo "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da Amostra como "Sample Report" e "Track Report".

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma execução de uma amostra ordenada pela Sample ID (SID).

O Track Report" apresenta os detalhes de um rastreio de execução da amostra pelo rastreio selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

ELITE BeGenius® PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do «**BKV ELITE MGB® Kit**» com o sistema ELITE InGenius consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema
- preparação da sessão
- revisão e aprovação de resultados

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão de análise da amostra, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo "CLOSED" (Fechado);
- verificar se os Calibradores (**BKV Q - PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Status). Pode verificar esta situação no menu "Calibração" na página inicial;
- verificar se os controlos da amplificação (**BKV - Positive Control, BKV Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Status). Pode verificar esta situação no menu "Controlo" na página inicial;
- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELITechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB, matrizes e o instrumento ELITE InGenius.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**BKV ELITE MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «BKV ELITE MGB® Kit»			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
BKV ELITE_PL_200_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
BKV ELITE_PL_1000_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 1000 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

BKV ELITe_U_200_100	Urina	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
----------------------------	-------	--------------------	---

Se o Protocolo de ensaio de interesse não estiver no sistema, contacte o serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup na sua localidade.

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O **BKV ELITe MGB Kit** em associação com o **ELITe BeGenius** pode ser usado para:

- Execução da amostra (EXTR + PCR),
- Execução de amplificação (apenas PCR),
- Execução da calibração (apenas PCR),
- Execução de Controlo positivo e negativo (apenas PCR).

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema ELITe BeGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível carregar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos quatro tipos de execução.

A. Sample run

Para preparar a execução integrada, efetue os passos a seguir em conformidade com a **GUI**:

- Descongele um número suficiente de tubos da BKV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o "run mode": "Extração + PCR".
- Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de amostras L5.
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

Nota: Se forem carregados tubos secundários, assinale "Tubo de 2 mL". Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a ID da amostra.

- Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, BKV ELITe_Be_WB_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 6 a 9 utilizando o suporte de amostras L4.
- Carregue os tubos de eluição com código de barras na área de refrigeração, a partir do suporte de eluição L3.

Nota: Os tubos de eluição podem ser etiquetas para melhorar a rastreabilidade.

- Insira o suporte de eluição L3 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Repita os passos 11 e 12 utilizando o Suporte de reagente/eluição L2.
- Carregue o CPE e a BKV Q-PCR Mix na área de refrigeração.

- Insira o suporte de reagente L1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Suporte de extração com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação e os consumíveis deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A Mistura PCR pode ser utilizada para 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Amplification run

Para preparar a execução de amplificação, com amostras eluídas, efetue os passos a seguir em conformidade com a **GUI**:

- Descongele um número suficiente de tubos da BKV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o "run mode": "PCR Only".
- Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de eluição L3.
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., BKV ELITe_Be_PL_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a BKV Q-PCR Mix na área de refrigeração.
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

Para preparar a execução de calibração, com os Q-PCR Standards, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos da BKV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele os tubos 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). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos do Calibrador no Suporte de eluição L3.
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o protocolo de ensaio "BKV ELITe_Be_STD" a ser usado na coluna "Assay". Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a BKV Q-PCR Mix no Suporte de reagente/eluição L2.
11. Insira o Suporte de reagente/eluição L2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, os restantes Calibradores podem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C. Evite derramar os Q-PCR Standards.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Execução de Controlo positivo e Controlo negativo

Para preparar a execução de Positive Control e Negative Control, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos da BKV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é

suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

2. Descongele o produto BKV - ELITe Positive Control, para amplificação de Positive Control. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "run mode": "PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no Suporte de eluição L3.
8. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
10. Selecione o protocolo de ensaio "BKV ELITe_Be_PC" e "BKV ELITe_Be_NC" a ser usado na coluna "Assay". Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue a BKV Q-PCR Mix no Suporte de reagente/eluição L2.
12. Insira o Suporte de reagente/eluição L2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
15. Feche a porta do instrumento.
16. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, o restante Positive Control pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar os Positive Controls.

Nota: No final da execução, as "PCR Cassettes" com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Calibrador/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report").

Nota: O sistema ELITe BeGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (LIS) através do qual é possível enviar os resultados das sessões de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consultar o manual do utilizador do instrumento para mais detalhes.

O **ELITe BeGenius** gera os resultados utilizando o BKV ELITe MGB Kit através do seguinte procedimento:

- A. Validação da Curva de calibração,
- B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- C. Validação dos resultados da amostra,
- D. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Nota: Consulte os mesmos capítulos do **ELITe InGenius** para obter mais informações.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: Limite de detecção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de detecção (LoD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL no ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Esta amostra foi testada em 24 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	0

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com diferentes matrizes e o **ELITE InGenius** foi verificada com um painel de diluições de BKV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (NIBSC código 14/212, Reino Unido) em ADN BKV - matriz negativa. O painel era constituído por seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de detecção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção com o ELITE InGenius (IU/mL)				
Volume da amostra	Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
			limite inferior	limite superior
200 µL	urina	142 IU/mL	110 IU/mL	222 IU/mL
	plasma	215 IU/mL	168 IU/mL	319 IU/mL
1000 µL	plasma	44 IU/mL	35 IU/mL	64 IU/mL

A sensibilidade analítica como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 19.

A sensibilidade analítica como cópias/mL está reportada a seguir.

Limite de detecção com o ELITE InGenius (cópias/mL)				
Volume da amostra	Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
			Limite inferior	Limite superior
200 µL	urina	89 cópias/mL	69 cópias/mL	139 cópias/mL
	plasma	165 cópias/mL	129 cópias/mL	245 cópias/mL
1000 µL	plasma	26 cópias/mL	21 cópias/mL	38 cópias/mL

O valor calculado do LoD foi verificado em associação ao ELITE InGenius e ao ELITE BeGenius, testando 20 réplicas de Plasma recolhidas em EDTA e 20 réplicas de Urina recolhidas sem amostras de conservantes perfuradas por material de referência certificado pela BKV (1ª Norma Internacional da OMS, NIBSC) na concentração alegada. O LoD é confirmado se pelo menos 18 das 20 réplicas derem um resultado positivo de acordo com a norma CLSI EP17-A.

Os resultados são relatados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção com plasma, urina e o ELITE InGenius					
Sample	Titer	Target	N	Positive	Negative
Plasma recolhidas em EDTA	215 IU / mL	BKV	20	18	2
Urina recolhidas sem amostras de conservantes	142 IU / mL	BKV	20	20	0

Limite de detecção com plasma, urina e o ELITE BeGenius					
amostra	Titer	Target	N	Positive	Negative
Plasma recolhidas em EDTA	215 IU / mL	BKV	20	20	0
Urina recolhidas sem amostras de conservantes	142 IU / mL	BKV	20	19	1

O valor de LoD para o alvo BKV foi confirmado em 215 IU / mL para Plasma recolhido em EDTA, em 142 IU / mL para Urina recolhida sem conservantes.

Intervalo de medição linear e Limite de quantificação

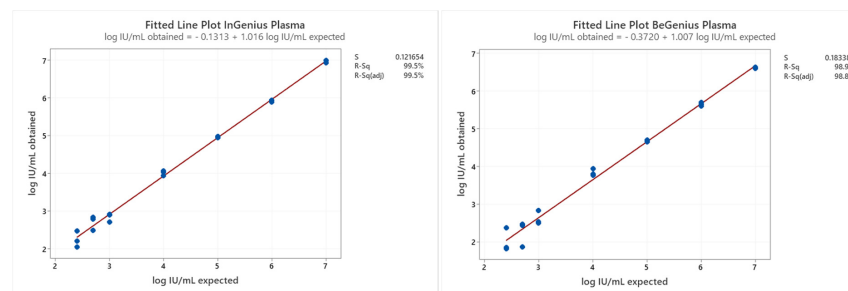
A gama de medição linear do BKV ELITE MGB® Kit utilizado em associação com Plasma e Urina (volume de amostra 200 µL) e **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificada utilizando um painel de diluições BKV. O painel foi preparado diluindo a "1ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (código NIBSC 14/212, Reino Unido) em ADN BKV - matriz negativa. O painel consistiu em oito pontos de diluição (1 etapas de diluição de log) de 107 a 102 IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição.

Para Plasma (volume de amostra 200 µL):

A análise dos dados obtidos, realizada por análise de regressão linear, demonstrou que o ensaio em associação com Plasma recolhido em amostras EDTA mostra uma resposta linear para todas as diluições com um Coeficiente de Correlação Quadrado (R2) igual a 0,995 para ELITE InGenius e 0,989 para ELITE BeGenius.

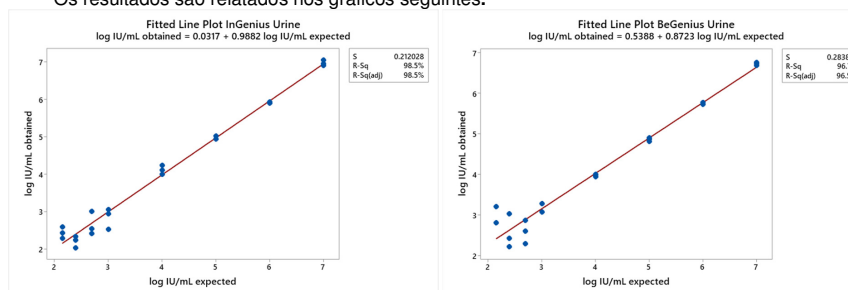
Os resultados são relatados nos gráficos seguintes.



Para Urina (volume de amostra 200 µL):

A análise dos dados obtidos, realizada por análise de regressão linear, demonstrou que o ensaio em associação com urina colhida sem amostras de conservantes mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,985 para ELITE InGenius e 0,967 para ELITE BeGenius.

Os resultados são relatados nos gráficos seguintes.



BKV ELITE MGB® Kit

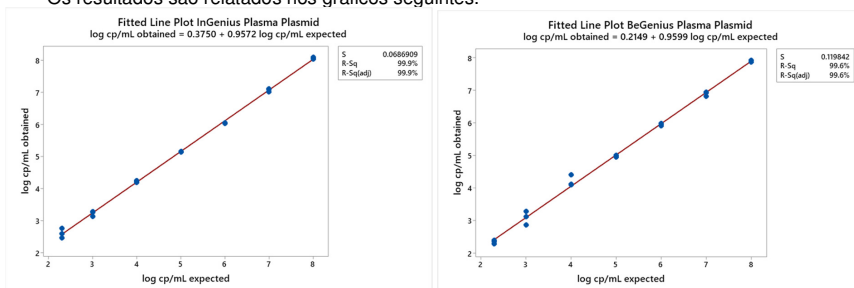
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

A gama de medição linear do BKV ELITE MGB® Kit utilizado em associação com Plasma (volume de amostra 200 µL) e ELITE InGenius e ELITE BeGenius foi testada com uma gama mais ampla de concentrações utilizando um painel preparado por diluição de um DNA plasmídeo contendo o produto de amplificação BKV em ADN BKV - matriz negativa. O painel consistiu em oito pontos de diluição (1 etapas de diluição em log) de 108 a 102 cópias / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise de regressão linear, demonstrou que o ensaio em associação com amostras de Plasma mostra uma resposta linear para todas as diluições com um Coeficiente de Correlação Quadrado (R2) igual a 0,999 para ELITE InGenius e 0,996 para ELITE BeGenius.

Os resultados são relatados nos gráficos seguintes.



Para Plasma (volume de amostra 200 µL):

O Limite Inferior de Quantificação (LLOQ) foi fixado em 215 IU / mL, a concentração LoD, que dá resultados quantitativos precisos (Desvio Padrão igual a 0,2767 IU de Log / mL para ELITE InGenius e 0,3012 IU de Log / mL para ELITE BeGenius) e precisos (Viés igual a -0,0098 IU de Log / mL para ELITE InGenius e 0,2569 IU de Log / mL para ELITE BeGenius).

O Limite Superior de Quantificação (ULOQ) foi fixado em 130.000.000 IU / mL, a concentração mais elevada testada, que dá resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2159 IU de log / mL para ELITE InGenius e 0,3357 IU de log / mL para ELITE BeGenius) e precisos (Desvio padrão igual a -0,1606 IU de log / mL para ELITE InGenius e -0,4406 IU de log / mL para ELITE BeGenius).

O intervalo de medição linear como cópias / mL para Plasma é calculado aplicando o factor de conversão específico relatado na página 29.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE BeGenius (200 µL)		
Unidade do relatório	Limite inferior	Limite superior
IU / mL	215	130,000,000
copies / mL	165	100,000,000

Para Urina (volume de amostra 200 µL):

O Limite Inferior de Quantificação (LLOQ) foi fixado em 142 UI / mL, a concentração LoD que dá resultados quantitativos precisos (Desvio Padrão = 0,2888 UI / mL para o ELITE InGenius e Desvio Padrão = 0,4031 UI de log / mL para ELITE BeGenius) e precisos (Viés = 0,1562 UI de log / mL para ELITE InGenius e Viés = -0,1668 UI de log / mL para ELITE BeGenius) dentro de ±0,5 UI de log / mL.

O Limite Superior de Quantificação (ULOQ) foi fixado em 160.000.000 IU / mL a concentração mais alta que dá resultados quantitativos precisos (Desvio Padrão = 0,2114 IU / mL para o ELITE InGenius e Desvio Padrão = 0,3132 UI de log / mL para o ELITE BeGenius) e precisos (Viés = -0,3240 UI de log / mL para o ELITE InGenius e Viés = -0,2860 UI de log / mL para o ELITE BeGenius) dentro de ±0,5 UI de log / mL.

O intervalo de medição linear como cópias / mL para Urina recolhida sem conservantes é calculado através da aplicação do factor de conversão específico relatado na página 29.

BKV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

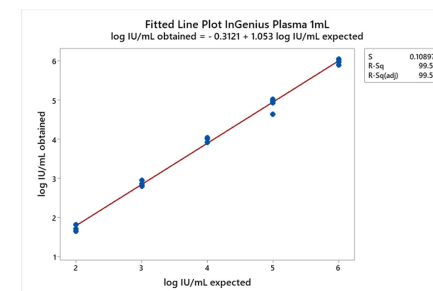
Intervalo de medição linear para amostras de urina e o ELITE BeGenius (200 µL)		
Unidade do relatório	Limite inferior	Limite superior
IU / mL	142	160,000,000
copies / mL	89	100,000,000

Para plasma (volume de amostra 1000 µL):

A gama de medição linear do BKV ELITE MGB® Kit utilizado em associação com Plasma recolhido em EDTA (volume de amostra 1000 µL) e ELITE InGenius foi verificada utilizando um painel de diluições de BKV. O painel foi preparado diluindo a "1ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (código NIBSC 14/212, Reino Unido) em ADN BKV - matriz negativa. O painel consistiu em cinco pontos de diluição (1 etapas de diluição de log) de 106 a 102 IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise de regressão linear, demonstrou que o ensaio em associação com amostras de Plasma (volume de amostra 1000 µL) mostra uma resposta linear para todas as diluições com um Coeficiente de Correlação Quadrado (R2) igual a 0,995.

Os resultados são relatados no gráfico seguinte.



A gama de medição linear foi testada com uma gama mais ampla de concentrações através da análise de um painel de diluição BKV preparado pela diluição de um DNA plasmídeo contendo o produto de amplificação em matriz BKV DNA-negativo. O painel tinha 6 etapas de diluição de 1 Log de 109 a 104 cópias / mL. Cada ponto do painel foi testado em 4 réplicas, realizando todo o procedimento de análise, montagem do ensaio, extracção, amplificação em tempo real e interpretação dos resultados com ELITE InGenius e ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada com a regressão linear, mostrou que o ensaio tem uma resposta linear para os pontos do painel de 108 a 104 cópias / mL. Para os 109 exemplares / mL de ponto, não foi possível calcular um valor Ct devido à concentração muito elevada.

O intervalo de medição linear como cópias / mL para Plasma recolhido em EDTA é calculado aplicando o factor de conversão específico relatado na página 29.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Gama de medição linear para amostras de Plasma e ELITE InGenius (1000 µL)		
Unidade do relatório	Limite inferior	Limite superior
IU / mL	100	170,000,000
copies / mL	59	100,000,000

Repetibilidade

A repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto BKV ELITE MGB Kit em associação com os sistemas ELITE InGenius e ELITE BeGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de Plasma recolhidas no EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras com o material de referência certificado por BKV "1st WHO international standard for BKV virus DNA" (código NIBSC 14/212, Reino Unido) na concentração de 3 x LoD (cerca de 645 IU / mL) e de 10 x LoD (cerca de 2150 IU / mL).

A Intra - Repetibilidade da Sessão no ELITE InGenius foi obtida através da análise de amostras de

BKV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto, com o mesmo instrumento, pelo mesmo operador, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

O Inter - Session Repeatability no ELITE InGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, em duas corridas por dia, com o mesmo lote de produto, com o mesmo instrumento, pelo mesmo operador, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram utilizados para calcular a %CV, a fim de avaliar a repetibilidade como imprecisão.

Um resumo dos resultados é apresentado nos quadros abaixo.

Intra - Repetibilidade da Sessão ELITE InGenius Lot U0121-047								
Amostra	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 - Repetibilidade da Sessão ELITE InGenius Lot U0121-047								
Amostra	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				

No teste de repetibilidade no ELITE InGenius, o ensaio detectou o alvo BKV como esperado e mostrou baixos %CV de valores Ct que não excederam 2% para BKV e 1,3% para Controlo Interno.

O Intra - Session Repeatability on ELITE BeGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, numa corrida por dia, com o mesmo lote de produto, com o mesmo instrumento, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

O Inter - Session Repeatability no ELITE BeGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, numa tiragem por dia, com o mesmo lote de produto, com o mesmo instrumento, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram utilizados para calcular a %CV a fim de avaliar a repetibilidade como imprecisão.

Um resumo dos resultados é apresentado nos quadros abaixo.

Intra - Repetibilidade da Sessão ELITE BeGenius Lot U0121-047								
Amostra	BKV				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	29.92	0.41	1.37
3 x LoD	8 / 8	37.09	0.52	1.40				
10 x LoD	8 / 8	35.45	0.31	0.88				

Inter - Repetibilidade da Sessão ELITE BeGenius Lot U0121-047								
Amostra	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				

No teste de repetibilidade no ELITE BeGenius, o ensaio detectou o objectivo de BKV como esperado e mostrou baixos valores de %CV de Ct que não excederam 1,9% para BKV e 1,7% para Controlo Interno.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto BKV ELITE MGB Kit em associação com os sistemas ELITE InGenius e ELITE BeGenius foi testada através da análise de amostras de Plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras com material de referência certificado BKV

BKV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

"1st WHO international standard for BKV virus DNA" (código NIBSC 14/212, Reino Unido) na concentração de 3 x LoD (cerca de 645 IU / mL) e de 10 x LoD (cerca de 2150 IU / mL).

A Inter - Reprodutibilidade de Instrumentos no ELITE InGenius foi obtida através da análise de amostras de painel em oito réplicas, numa execução por dia, em dois dias, com dois instrumentos diferentes por dois operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE InGenius em modo "Extracto + PCR".

O Inter - Batch Reproducibility no ELITE InGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, em duas corridas por dia, com dois lotes diferentes e o mesmo instrumento. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE InGenius em modo "Extracto + PCR".

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram utilizados para calcular a %CV a fim de avaliar a Reprodutibilidade como imprecisão.

Um resumo dos resultados é apresentado no quadro abaixo.

Inter - Reprodutibilidade do instrumento 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 - Repetibilidade de Lotes 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				

No teste de reprodutibilidade no ELITE InGenius, o ensaio detectou o objectivo de BKV como esperado e mostrou baixos valores de %CV de Ct que não excederam 1,3% para BKV e 1,3% para Controlo Interno.

O Inter - Instrument Reproducibility on ELITE BeGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, numa corrida por dia, em dois dias, com dois instrumentos diferentes por dois operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE BeGenius em modo "Extracto + PCR".

O Inter - Batch Reproducibility no ELITE BeGenius foi obtido através da análise de amostras de painel em oito réplicas, em duas séries por dia, com dois lotes diferentes e o mesmo instrumento. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE BeGenius em modo "Extracto + PCR".

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram utilizados para calcular a %CV a fim de avaliar a Reprodutibilidade como imprecisão.

Um resumo dos resultados é apresentado no quadro abaixo.

Inter - Reprodutibilidade do instrumento 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 - Repetibilidade de Lotes 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				

No teste de reprodutibilidade no ELITE BeGenius, o ensaio detectou o objectivo de BKV como esperado e mostrou baixos valores de %CV de Ct que não excederam 1,8% para BKV e 2,3% para Controlo

Interno.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel "Q" molecular de BKV (Qnostics, Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o «ELiTe InGenius» e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELiTe InGenius»				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal cópias/mL Registo ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópias/mL Registo ₁₀
BKVMQP01-Alto	100000	5,000	2/2	5,237
BKVMQP01-Médio	10000	4,000	2/2	4,243
BKVMQP01-Baixo	1000	3,000	2/2	3,187
BKVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

Todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

Os resultados, obtidos a partir de 1000 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELiTe InGenius»				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal cópias/mL Registo ₁₀	Positivo/répl icas	Resultados médios Cópias/mL Registo ₁₀
BKVMQP01-Alto	100000	5,000	2/2	5,271
BKVMQP01-Médio	10000	4,000	2/2	4,377
BKVMQP01-Baixo	1000	3,000	2/2	3,120
BKVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

Todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA ADN do vírus QCMD 2014 BK (Qnostics Ltd, UK), um painel de diluições BKV dentro da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o ELiTe InGenius e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELiTe InGenius»				
Amostra	Conc. consenso Cópias/mL Registo ₁₀	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópias/mL Registo ₁₀
BKVDNA14-01	2,330	0,540	2/2	2,713
BKVDNA14-02	3,632	0,416	2/2	3,973
BKVDNA14-03	4,420	0,410	2/2	4,610
BKVDNA14-04	4,630	0,365	2/2	5,056
BKVDNA14-05	3,620	0,389	2/2	4,191
BKVDNA14-06	negativo	N.A.	0/2	Não detetado
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,159
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,405
BKVDNA14-09	negativo	N.A.	0/2	Não detetado
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	Não detetado

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e 7 em 8 amostras positivas foram corretamente detetadas como positivas. O BKVDNA14-10 de amostra a 74 cópias/mL foi detetado como negativo. Isto pode explicar-se pelo facto de o título de amostra estar abaixo do limite de detecção. Cinco (5) amostras foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Desvio Padrão Consenso EQA ± 1 e 2 amostras foram quantificadas dentro do SD 2.

Os resultados, obtidos a partir de 1000 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELiTe InGenius»				
Amostra	Conc. consenso Cópias/mL Registo ₁₀	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópias/mL Registo ₁₀
BKVDNA14-01	2,330	0,540	2/2	2,794
BKVDNA14-02	3,632	0,416	2/2	4,165
BKVDNA14-03	4,420	0,410	2/2	4,684
BKVDNA14-04	4,630	0,365	2/2	5,132
BKVDNA14-05	3,620	0,389	2/2	4,118
BKVDNA14-06	negativo	N.A.	0/2	Não detetado
BKVDNA14-07	2,788	0,544	2/2	3,280
BKVDNA14-08	3,024	0,406	2/2	3,459
BKVDNA14-09	negativo	N.A.	0/2	Não detetado
BKVDNA14-10	1,870	0,617	0/2	1,914

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram corretamente detetadas como positivas. Quatro (4) amostras foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Desvio Padrão Consenso EQA ± 1 e quatro (4) amostras foram quantificadas dentro do SD 2.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão, para converter um resultado quantitativo de cópias/mL para Unidades internacionais/mL, foi calculado utilizando um painel de, pelo menos, seis diluições (0,5 Registo₁₀ entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV", NIBSC código 14/212, Reino Unido) em diferentes matrizes testadas negativas para ADN de BKV. Cada ponto do painel foi testado em 16 réplicas realizando toda a análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o ELiTe InGenius e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Um resumo dos resultados é apresentado nos quadros abaixo.

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

Os resultados para cada matriz são relatados na tabela seguinte.

Conversão para unidade internacional com o ELITE InGenius		
Volume da amostra	Matriz	Fc (IU/cópias)
200 µL	Plasma	1,3
200 µL	Urina	1,6
1000 µL	Plasma	1,7

O factor de conversão, para converter um resultado quantitativo de cópias / mL para Unidades Internacionais / mL, foi verificado para **ELITE InGenius** e também para **ELITE BeGenius** analisando os resultados obtidos durante o teste de Linearidade.

A precisão da quantificação alvo, como Desvio Padrão de Log IU/mL, foi inferior a 0,5 Log tanto para Plasma como para Urina e cumpre os critérios de aceitação para **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

A precisão da quantificação alvo, como diferença entre as concentrações teóricas e medidas em Log IU / mL, foi inferior a 0,5 Log tanto para Plasma como para Urina e cumpre os critérios de aceitação para **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

Estes resultados confirmaram os factores de conversão calculados para cada matriz com o ELITE InGenius.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de plasma colhido em EDTA e urina colhida sem conservantes positiva para ADN de BKV em associação com o **ELITE InGenius**. Como o **ELITE BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, pode presumir-se que os resultados da sensibilidade diagnóstica obtidos em associação com o **ELITE InGenius** são também aplicáveis ao **ELITE BeGenius**.

O teste iniciado a partir de 200 µL de amostra foi realizado em 30 amostras de plasma colhido em EDTA positivo para ADN de BKV e em 30 amostras de urina colhidas sem conservantes e positivas para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

O teste iniciado a partir de 1000 µL de amostra foi realizado em:

- 25 amostras de plasma colhidas em EDTA positivo para ADN BKV (testado com um produto IVD CE de amplificação em tempo real).

- 30 amostras de plasma recolhidas em EDTA negativo para ADN BKV, que foram multiplicadas para ADN BKV adicionando "1ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (código NIBSC 14/212, Reino Unido).

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação de resultados com o «**ELITE InGenius**» e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Tipo de amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	30	30	0
	Urina colhida sem conservantes e positiva para ADN de BKV	30	30	0
1000 µL	Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	25	25	0
	Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de BKV	30	30	0

Todas as amostras foram válidas para análise e confirmadas como positivas.

Nestes testes, a sensibilidade de diagnóstico total do ensaio foi igual a 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade diagnóstica do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de plasma colhido em EDTA e urina colhida sem conservantes em associação com o **ELITE InGenius**. Como o **ELITE BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, pode assumir-se que os resultados da especificidade diagnóstica obtidos em associação com o **ELITE InGenius** são também aplicáveis ao **ELITE BeGenius**.

O teste, a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 30 amostras de plasma recolhidas em EDTA que foram negativas para ADN BKV (testadas com um produto de amplificação CE IVD em tempo real).

- 30 amostras de urina colhidas sem conservantes que foram negativas para ADN BKV (testadas com um produto de amplificação CE IVD em tempo real).

O teste iniciado a partir de 1000 µL de amostra foi realizado em 62 amostras de plasma colhido em EDTA negativo para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação de resultados com o «**ELITE InGenius**» e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Tipo de amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de BKV	30	2	28
	Urina colhida sem conservantes e negativa para ADN de BKV	30	0	30
1000 µL	Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de BKV	62	2	60

Todas as amostras de urina foram válidas para análise e confirmadas como negativas.

Todas as amostras de plasma foram válidas para a análise.

Para amostras com amostras de 200 µL: vinte e oito (28) de 30 amostras de plasma foram confirmadas como negativas para ADN - BKV, duas amostras foram discrepantes positivas com um título baixo (respetivamente cerca de 50 e 70 cópias/mL) e abaixo do limite de deteção do método de referência.

Para amostras com amostras de 1000 µL: sessenta (60) de 62 amostras de plasma foram confirmadas como negativas para ADN - BKV, duas amostras foram discrepantes positivas com um título baixo (respetivamente cerca de 5 e 55 cópias/mL).

Nestes testes, a especificidade de diagnóstico total do ensaio foi igual a 97%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BKV ELITE MGB® Kit", FTP 175PLD.

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser usado com **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas: plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e líquido cefalorraquidiano.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácidos nucleicos devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN utilizando o kit «**EXTRABlood**», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno no Home screen da extração, recupere o ADN em **60 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o «**ELITE STAR**» e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração «**UUNI_E100S200_EL1**», que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELITE STAR**». É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de **CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o «**ELITE GALAXY**» com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **XNA Extraction (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL ou 200 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELITE GALAXY**». É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra** de **CPE**. O CPE deve ser adicionado à solução de **Cl + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar o **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, recupere o ADN com **100 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN de plasma com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» e o kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» com **software versão 3.5**, utilize o protocolo de extração «**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**» e siga estas instruções: o instrumento é capaz de utilizar um tubo primário, o volume de amostra necessário para a extração é **500 µL**, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 µL. Prepare a solução que contém o tampão AVE e o ARN de acordo com o manual de instruções do kit de extração. Adicione **6 µL/amostra** de **CPE** à solução para cada amostra necessária. Carregue no instrumento, na ranhura do "controlo interno", os tubos que contém a solução, como indicado no manual de instruções de utilização do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **85 µL**. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de instruções de utilização do kit.

Urina colhida sem conservantes

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas à temperatura ambiente (+18°/+25 °C) e guardadas à temperatura ambiente (+18 / +25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

A congelação de amostras de urina resulta frequentemente na formação de precipitados que podem comprometer fases subsequentes do ensaio: utilize apenas o sobrenadante para a extração.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN utilizando o kit «**EXTRABlood**», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno no Home screen da extração, recupere o ADN em **60 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de urina com o «**ELITE STAR**» e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração «**UUNI_E100S200_EL1**», que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELITE STAR**». É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de **CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de urina com o «**ELITE GALAXY**» com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **XNA Extraction (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL ou 200 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELITE GALAXY**». É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra** de **CPE**. O CPE deve ser adicionado à solução de **Cl + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar o **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, recupere o ADN com **100 µL** de tampão de eluição.

Líquido cefalorraquidiano

As amostras de líquido cefalorraquidiano para extração de ácidos nucleicos devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais evitando a contaminação pelo sangue do doente, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar o **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**, recupere o ADN com **100 µL** de tampão de eluição.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de Negative control e uma reação de Positive Control.

Para o Negative control, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este produto) adicionada à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o Positive Control, utilize o produto «BKV - ELITE Positive Control» ou o produto «BKV ELITE Standard».

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação)

Quando é usado um instrumento **7300 Real-Time PCR System**:

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta";
- definir (Detector Manager) o "detector" para a sonda BKV com o "reporter" = "FAM" e o "quencher" = "none" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "BKV";
- definir (Detector Manager) o "detector" para a sonda de controlo interno com o "reporter" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "quencher" = "none" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Well Inspector) o "detector" (tipo de fluorescência a ser medida), a "passive reference" = "ROX" (é usado AP593 em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (sample, negative amplification control, positive amplification control or known quantity standard). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (10⁵ cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) para obter a **Curva standard**.

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode organizar as análises quantitativas de 12 amostras.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Legenda: S1 - S12: Amostras a serem analisadas; NC: Negative control da amplificação; 10²: 10² cópias standard; 10³: 10³ cópias standard; 10⁴: 10⁴ cópias standard; 10⁵: 10⁵ cópias standard.

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à fase de amplificação o passo (Add Step) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve ser definida durante o passo de hibridização a 60 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**";
- defina o número de ciclos para **45**;
- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Sample volume") para **30 µL**;
- opcional: adicione a fase de dissociação (Add Dissociation Stage) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	94 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	30 seg.
	80 °C	15 seg.

Quando é usado um **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Run mode: Fast 7500";
- definir (Detector Manager) o "detector" para a sonda BKV com o "reporter" = "FAM" e o "quencher" = "none" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "BKV";
- definir (Detector Manager) o "detector" para a sonda de controlo interno com o "reporter" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "quencher" = "none" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Well Inspector) o "detector" (tipo de fluorescência a ser medida), a "passive reference" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (sample, negative amplification control, positive amplification control or known quantity standard). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (10⁵ cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) para obter a **Curva standard**.

A preparação de uma análise quantitativa de 12 amostras é mostrada, a título de exemplo, no parágrafo anterior a descrever o procedimento para o instrumento **7300 Real-Time PCR System**.

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à fase de amplificação o passo (Add Step) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve ser definida durante o passo de hibridização a 60 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**";
- defina o número de ciclos para **45**;
- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Sample volume") para **30 µL**;
- opcional: adicione a fase de dissociação (Add Dissociation Stage) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	94 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
Dissociação (opcional)	60 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongelar os tubos da **BKV Q - PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele o **BKV - Positive Control** ou os tubos **BKV Q - PCR Standard**. Misture-os suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- pegue na **Amplification microplate** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.

- Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL** da mistura de reação **BKV Q - PCR Mix** no fundo dos furos da **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas

Nota: Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde o volume restante num local escuro e a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação até um máximo de **5 VEZES**.

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **Amplification microplate** do Negative control da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o Negative control introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas

- Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

- quando for necessário um resultado **qualitativo** da análise (deteção de ADN de BKV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **BKV - Positive Control** no furo correspondente na **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o Positive Control introduzindo com a pipeta o **BKV - Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas

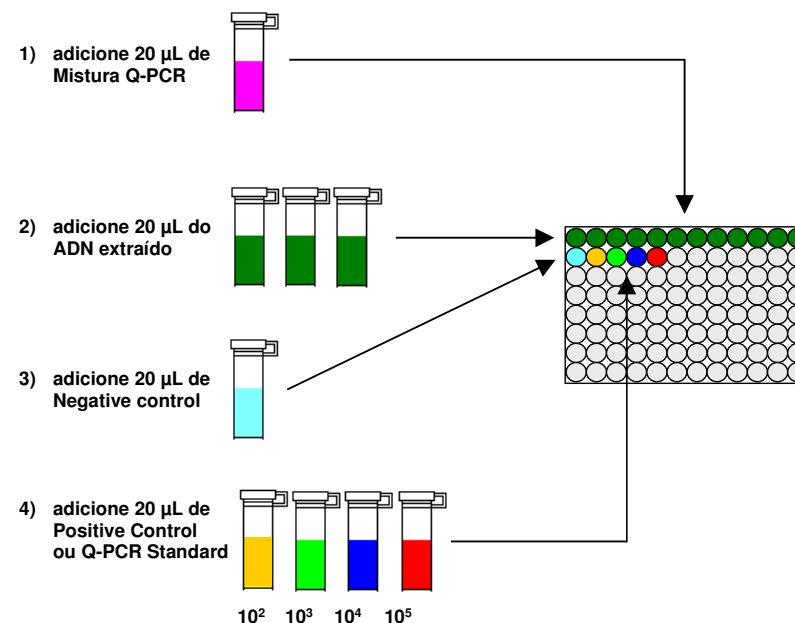
- quando for necessário um resultado **quantitativo** da análise (quantificação de ADN de BKV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **BKV Q - PCR Standard 10²** no furo correspondente na **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **BKV Q - PCR Standard 10²** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os **BKV Q - PCR Standards**

10³, 10⁴, 10⁵.

- Vede com precisão a **Amplification microplate** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
- Transfira a **Amplification microplate** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-BKV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico a **Amplification microplate** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha vedante da amplificação não deve ser removida da Amplification microplate**.

A figura seguinte mostra resumidamente a preparação da reação de amplificação.



Nota: se a preparação da amplificação for realizada com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**», introduza a microplaca que contém os extratos, os reagentes e a microplaca de amplificação nas ranhuras dedicadas, utilizando os adaptadores especiais; em seguida, siga as indicações no manual de instruções de utilização do módulo de configuração e os passos exigidos pelo software.

Nota: se a preparação da reação de amplificação for realizada com o instrumento «**ELITE GALAXY**», carregue a microplaca de eluição, a mistura de reação completa e a microplaca de amplificação tal como indicado no manual do utilizador do instrumento e seguindo os passos exigidos pela GUI.

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do BKV (detectorFAM "BKV") e pela sonda específica do Controlo Interno (detectorVCI "CI") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Antes de iniciar a análise, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- definir manualmente (Results > Amplification plot > delta Fn vs Cycle) o intervalo de cálculo para a **Linha de base (nível de fundo de fluorescência)** do ciclo 6 ao ciclo 15;

Nota: No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de BKV, a fluorescência FAM da sonda específica do BKV pode começar a aumentar antes do ciclo 15. Neste caso, o intervalo de cálculo para

a **Linha de base** deve ser adaptada desde o ciclo 6 até ao ciclo em que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar, como detetado pelo software do instrumento (Results > Component).

Quando é usado um instrumento **7300 Real-Time PCR System**:

- defina manualmente o **Limiar** para o detectorFAM "BKV" para **0,1**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detectorVIC "CI" para **0,05**.

Quando é usado um **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- defina manualmente o **Limiar** para o detectorFAM "BKV" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detectorVIC "CI" para **0,1**.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**.

Na reação de amplificação **Positive Control***, o valor de **Ct** do BKV (Results > Report) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detector de reação de Positive Control FAM "BKV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** para BKV, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do Positive Control, degradação da mistura de reação ou do Positive Control, definição incorreta da posição do Positive Control, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

***Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de BKV, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)**.

Na reação de amplificação **Negative control**, o valor de **Ct** do BKV (Results > Report) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detector de reação de Negative control FAM "BKV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Negative control** for diferente de **Ct não determinado** para BKV, o ADN alvo não foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do BKV é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que o **Ct** foi determinado por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos ou um aumento do fundo (fundo irregular ou alto).

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene antigénio T grande do BKV na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (limite de deteção para o produto, consulte o parágrafo Características de desempenho).

Os resultados como **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Results > Report) são usados como descrito na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de BKV
Detector FAM "BKV"	Detector VIC "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	inadequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o BKV e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o BKV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do BKV não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do BKV ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte o parágrafo sobre as Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Nota: Quando o ADN do BKV é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Controlo Interno pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Controlo Interno pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do BKV. Neste caso, a amostra é contudo adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise quantitativa dos resultados

Após a realização do procedimento de análise qualitativa dos resultados, é possível realizar a análise quantitativa dos resultados das amostras positivas.

Nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR standards**, os valores de **Ct** do BKV são usados para calcular a **Curva Standard** (Results > Standard Curve) para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detector FAM "BKV" da curva standard	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

Se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que pode causar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Os valores de **Ct** do BKV na reação de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** (Results > Standard Curve) da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 a 10 cópias de ADN do gene antigénio T grande do BKV na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear do produto, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

DetectorFAM "BKV" do resultado da amostra	Equivalentes do genoma BKV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 ⁶ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁵	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ⁵	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Results > Report) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do BKV presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medição exigida;

Ep é a eficiência do procedimento, extração e amplificação, **expressa em decimais**;

Ve é o volume total do produto de extração **expresso em µL**;

Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação **expresso em µL**;

Quantidade é o resultado da reação de amplificação da amostra **expressa em gEq por reação**.

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado «**ELITE STAR**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado «**ELITE GALAXY**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» com amostras de plasma colhido em EDTA, amostras de urina colhida sem conservantes ou amostras de líquido cefalorraquidiano e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado o kit de extração «**QIASymphony® SP/AS**» com amostras de plasma colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 12 \times \text{Quantidade}$$

Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

Quando é usado um método de extração em particular, os limites do intervalo de medição linear, como gEq/mL da amostra, podem ser calculados a partir do intervalo de medição linear da reação de amplificação de acordo com esta fórmula:

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

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

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) com «EXTRAblood»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 15 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 15 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 150 a 15.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o «**ELITE STAR**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «ELITE STAR»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 28 \times 10 \text{ cópias} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 28 \times 1.000.000 \text{ cópias} \\ &\text{de 280 a 28.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o «**ELITE GALAXY**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de urina colhida sem conservantes, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «ELITE GALAXY»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 35 \times 10 \text{ cópias} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 35 \times 1.000.000 \text{ cópias} \\ &\text{de 350 a 35.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» com amostras de plasma colhido em EDTA, amostras de urina colhida sem conservantes ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) com «NucliSENS® easyMAG®»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 10 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 10 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 100 a 10.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

BKV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Quando é usado o kit de extração «**QIASymphony® SP/AS**» com amostras de plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «QIASymphony® SP/AS»
Limite inferior (gEq/mL) = 12 x 10 gEq
Limite superior (gEq/mL) = 12 x 1.000.000 gEq
de 120 a 12.000.000 gEq/mL

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a deteção da presença de cerca de 10 moléculas de ADN alvo nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica do ensaio, como limite de deteção, foi testado usando o ADN plasmídico que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL no ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Esta amostra foi testada em 50 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
10 cópias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	49	1

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e urina e o «**ELITE GALAXY**» foi verificada com um painel de diluições de BKV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra JCBK11-06 ("Painel EQA ADN do vírus QCMD 2011 JC e do vírus BK", Qnostics Ltd, RU) em ADN de BKV - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o «**ELITE GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e «ELITE GALAXY» (gEq/mL)			
intervalo de 95% de confiança			
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	190 gEq/mL	122 gEq/mL	452 gEq/mL

Limite de deteção para amostras de urina e «ELITE GALAXY» (gEq/mL)			
intervalo de 95% de confiança			
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	119 gEq/mL	75 gEq/mL	309 gEq/mL

BKV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a quantificação desde 1.000.000 a 10 moléculas de ADN alvo nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica do ensaio, enquanto intervalo de medição linear, foi determinada com recurso a um painel de diluições (1 registro, entre uma diluição e a seguinte) de ADN plasmídico contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁶ moléculas por reação, o que corresponde ao genoma Equivalentes por reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ moléculas/20 µL).

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a 10 moléculas por reação, o que corresponde ao genoma Equivalentes por reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10² moléculas/20 µL).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear (gEq/reação)	
Limite superior	1.000.000 gEq/reação
Limite inferior	10 gEq/reação

Os limites do intervalo de medição linear como gEq/mL referentes ao kit de extração usado são calculados a partir da página 29.

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão de amplificação, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 30,4% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão de amplificação e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 5,2% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão e a exatidão foram determinadas utilizando dados obtidos para o estudo do intervalo de medição linear.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com painel de material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como capacidade de reprodução dos resultados comparada com os resultados obtidos com recurso a outros ensaios e em diferentes laboratórios, foi verificada através de testes a um painel de material de referência certificado.

Os testes foram realizados utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de BKV dentro da concentração limite ("Painel EQA do vírus QCMD 2009 JC e do vírus BKV", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração com «**EXTRABlood**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com material de referência certificado e «EXTRAblood»				
Amostra	Consenso Vírus Registro ₁₀ conc.	Desvio Padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registro ₁₀
JC.BK09-01	JCV-3B, 2,844	0,606	0 / 2	Não detetado
JC.BK09-02	BKV-1B, 2,960	0,511	2 / 2	2,944
JC.BK09-03	JCV-2B, 2,682	0,612	0 / 2	Não detetado
JC.BK09-04	Negativo, NA	N/A	0 / 2	Não detetado
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	Não detetado
JC.BK09-08	BKV, 3,451	0,533	2 / 2	3,364
JC.BK09-09	JCV-2B, 2,234	0,697	0 / 2	Não detetado
JC.BK09-10	BKV, 4,462	0,576	2 / 2	4,254
JC.BK09-11	JCV-2B, 3,142	0,663	0 / 2	Não detetado
JC.BK09-12	BKV, 2,898	0,493	2 / 2	2,582

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Todos os resultados quantitativos obtidos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão ± 1 do consenso.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de BKV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do vírus QCMD 2013 JC e do vírus BKV", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração com «ELITE STAR» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em gEq/mL são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITE STAR»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Vírus Registro ₁₀ conc.	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registro ₁₀
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	-

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas em conformidade com os resultados quantitativos definidos pelo consenso dos ensaios comerciais.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de BKV dentro do limite de concentração ("Painel de proficiência do vírus QCMD 2012 JC e do vírus BKV", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o «ELITE GALAXY» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITE GALAXY»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Vírus Registro ₁₀ conc.	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registro ₁₀
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	Negativo	-	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

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas. Quatro (4) amostras foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Desvio Padrão Consenso EQA ± 1 e uma amostra foi quantificada dentro do SD 2.

Sensibilidade de diagnóstico: eficiência de detecção e quantificação com diferentes genótipos/subtipos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de detecção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos foi avaliada por comparação de sequências com bases de dados de nucleótidos.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene antigénio T grande de BKV revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas positivas para ADN de BKV.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 22 amostras de plasma colhido em EDTA e em 22 amostras de urina colhidas sem conservantes, todas positivas para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração com «EXTRAblood» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de BKV	22	22	0
Urina colhida sem conservantes positiva para ADN de BKV	22	22	0

A sensibilidade de diagnóstico neste teste foi igual a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada através de 30 amostras de plasma colhido em EDTA positivas para ADN de BKV e 30 amostras de urina positivas para ADN de BKV. Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «ELITE STAR» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de BKV	30	29	1
Urina positiva para ADN de BKV	30	30	0

Uma amostra de plasma deu um resultado negativo, provavelmente devido a um baixo título e a degradação da amostra.

A sensibilidade de diagnóstico neste teste foi igual a 98,3%.

BKV ELITe MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 9 amostras de plasma colhido em EDTA de doadores, positivas para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 30 amostras de plasma negativo colhido em EDTA que foram reforçadas para um título próximo do limite de detecção para ADN de BKV com uma amostra de referência calibrada e certificada ("Painel EQA do vírus QCMD 2011 JC e vírus BK", Qnostics Ltd, RU).

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 1 amostras de urina colhida sem conservantes, de um dador, positiva para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 30 amostras de urina negativa colhida sem conservantes que foram reforçadas para um título próximo do limite de detecção para ADN de BKV com uma amostra de referência calibrada e certificada ("Painel EQA do vírus QCMD 2011 JC e vírus BK", Qnostics Ltd, RU).

Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o «**ELITe GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma positivo para ADN de BKV colhido em EDTA	9	9	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de BKV	30	30	0
Urina positiva para ADN de BKV colhida sem conservantes	1	0	1
Urina colhida sem conservantes reforçada para ADN de BKV	30	29	1

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio nestes testes foi superior a 97%.

Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi avaliada por comparação de sequências com bases de dados de nucleótidos.

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do BKV, incluindo o genoma completo JCV, o Poliomavírus humano, que é mais semelhante ao BKV, revelou a respetiva especificidade e a ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada utilizando algumas amostras clínicas negativas para ADN de BKV e positivas para ADN de outros patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 18 amostras de plasma colhido em EDTA, que foram negativas para ADN de BKV mas positivas para ADN de outros patogénicos como JCV, HSV1 e HHV8 (testadas com produtos de amplificação CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração com «**EXTRABlood**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de BKV e positivo para ADN de outros patogénicos	18	0	18

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada através de testes a um painel de material de referência certificado.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel que inclui amostras positivas de JCV ("Painel EQA do vírus QCMD 2009 JC e do vírus BKV", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados obtidos são comunicados no parágrafo "Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com painel de material de referência certificado".

Não foi detetada qualquer reatividade cruzada com amostras positivas para ADN de outros patogénicos.

BKV ELITe MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas negativas para BKV.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 22 amostras de plasma colhido em EDTA e em 22 amostras de urina colhidas sem conservantes, todas negativas para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração com «**EXTRABlood**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de BKV	22	0	22
Urina colhida sem conservantes negativa para ADN de BKV	22	0	22

A especificidade de diagnóstico neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada através de 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de BKV e 30 amostras de urina negativas para ADN de BKV. Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de BKV	30	0	30
Urina negativa para ADN de BKV	30	0	30

A especificidade de diagnóstico neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 38 amostras de plasma colhido em EDTA que foram negativas para ADN de BKV e 31 amostras de urina colhida sem conservantes que foram negativas para ADN de BKV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o «**ELITe GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma negativo para ADN de BKV colhido em EDTA	38	0	38
Urina negativa para ADN de BKV colhida sem conservantes	31	0	31

A especificidade de diagnóstico neste teste foi igual a 100%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas:

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN de amostras de plasma com o instrumento “**MagNA Pure 24 System**” com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração “**Pathogen200**” siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Urina

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas à temperatura ambiente (+18°/+25 °C) e guardadas à temperatura ambiente (+18 / +25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias. Se possível, evite congelar amostras de primeira urina. A congelação pode causar a precipitação de inibidores e a perda de título de ADN.

É recomendado separar as amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante períodos mais longos.

Nota: quando realizar a extração de ADN de amostras de urina com o instrumento “**MagNA Pure 24 System**” com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração “**Pathogen200**” siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de Negative control e uma reação de Positive Control.

Para o Negative control, adicione água de qualidade para biologia molecular ultra pura (não fornecida com este kit) à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o Positive Control, utilize o produto “**BKV - ELITE Positive Control**» ou, em alternativa, o produto “**BKV - ELITE Positive Control RF**» ou o produto «**BKV ELITE Standard**».

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação através de testes a Controlos do processo, isto é, uma amostra testada negativa e uma amostra testada positiva ou um material de referência calibrado.

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação)

Quando for utilizado o instrumento **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

- Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:
- ligar o computador de controlo e o ciclo térmico em tempo real. Abra o software dedicado e, na janela principal, abra uma sessão “Nova experiência”;
- defina o volume de reação (“Volume de reação”) para 40 µL;
- atribua um identificador a cada amostra (“Editor da amostra”);
- defina o Ciclo térmico da reação de acordo com a seguinte tabela:

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Períodos
Descontaminação	50 °C	2 mins.
Desnaturação inicial	94 °C	2 mins.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	30 seg.
	80 °C	15 seg.

Nota: a aquisição de fluorescência ocorre individualmente, defina a Taxa Ramp (°C/seg.) para 4,4 °C/seg.

- seleccione os canais de deteção do sinal: “detector”para o sensor de BKV com “FAM 465-510 de canal” e “detector”para o sensor de controlo interno C1 com “VIC 540-580 de canal”;

Preencha o **Plano de trabalho** anexado no final deste Manual do utilizador, transcrevendo esta informação ou imprimindo a disposição da microplaca. O **Plano de trabalho** deve ser atentamente seguido aquando da transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: para determinar a concentração de ADN na amostra inicial, deverá realizar uma série de reações com o **Q - PCR Standard** (10⁵ cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) para obter a **Curva standard**.

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode organizar as análises quantitativas de 12 amostras.

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
NC	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Legenda: C1 - C12: Amostras a serem analisadas; NC: Controlo de amplificação negativo; 10²: 10² cópias standard; 10³: 10³ cópias standard; 10⁴: 10⁴ cópias standard; 10⁵: 10⁵ cópias standard.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm a **BKV Q - PCR Mix** necessária para a sessão, sem esquecer que o conteúdo de cada tubo é suficiente para realizar **25 reações**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm o **BKV - Positive Control** ou, em alternativa, o **BKV - ELITE Positive Control RF** ou **BKV Q - PCR Standard**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar a **AD-platea** ser utilizada na sessão, certificando-se de que usa luvas sem poeiras para a manusear e que não danifica os furos.

1. Sem criar quaisquer bolhas e depositando exatamente no fundo, transfira **20 µL** da mistura de reação **BKV Q - PCR Mix** para os furos na **AD-plate** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**.

Nota: Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde qualquer mistura restante a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação um máximo de **5 VEZES**.

2. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** do **ADN extraído** da primeira amostra para o furo correspondente na **AD-plate** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas. Proceda da mesma forma com todo o restante **ADN extraído**.

3. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** (não fornecida com o produto) para o furo na **AD-plate** que contém o controlo de amplificação negativo, como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem o Negative control introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas.

4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

- quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de BKV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **BKV - Positive Control** ou, em alternativa, **BKV - ELITE Positive Control RF** no furo correspondente da **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o Positive Control introduzindo com a pipeta o **BKV - Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas

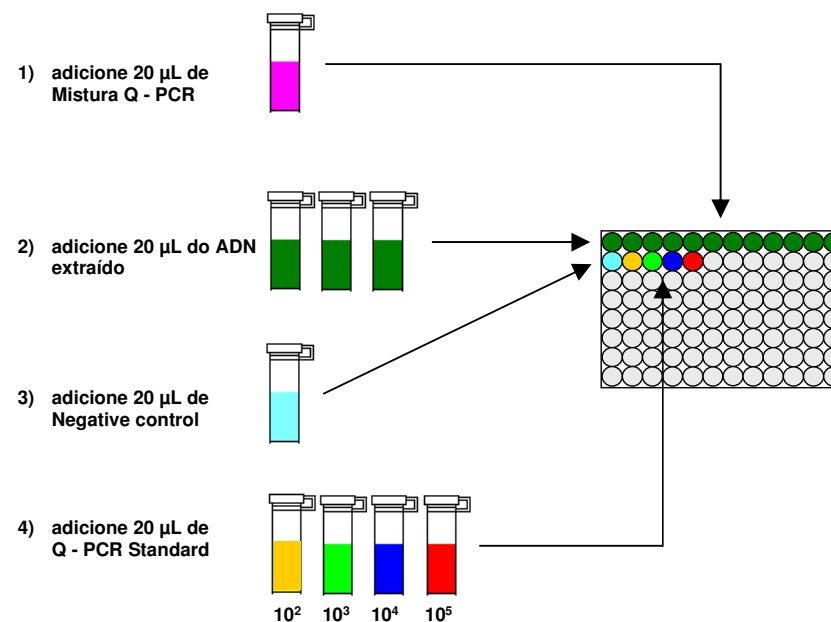
- quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de Adenovírus): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **BKV Q - PCR Standard 10²** no furo correspondente na **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **BKV Q - PCR Standard 10²** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas Proceda da mesma forma com os outros **BKV Q - PCR Standards (10³, 10⁴, 10⁵)**.

5. Vede cuidadosamente a **AD-plate** utilizando a **Película vedante**.

6. Transfira a **AD-plate** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico da amplificação, guardando as definições da sessão com um identificador único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-BKV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico, a **AD-plate** e os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados de uma forma que não cause poluição ambiental. **Nunca retire a Película vedante da Amplification microplate**, para evitar qualquer fuga dos produtos de reação.

A figura seguinte mostra resumidamente a preparação da reação de amplificação.



Análise dos resultados qualitativos

Os valores de fluorescência emitidos pelo detector de BKV e o detector de Controlo Interno (CI) durante as reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Selecione o menu "Analysis" e escolha "Absolute Quant/Fit Points" (2 pontos)

Selecione o grupo de amostras a serem analisadas

De acordo com a documentação do instrumento, antes de iniciar a análise deve:

- introduzir manualmente o intervalo de cálculo (Botão de fundo) para o **Nível de fluorescência de fundo** para o detector FAM "BKV" **desde o ciclo 2 até ao ciclo 6**.

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detector FAM "BKV" para **0,55**;

- introduzir manualmente o intervalo de cálculo (Botão de fundo) para o **Nível de fluorescência de fundo** para o detector VIC "IC" **desde o ciclo 6 até ao ciclo 10**.

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detector VIC "CI" para **0,55**;

Os valores de fluorescência emitidos pelos detetores específicos na reação de amplificação e os valores de fluorescência do **Limiar** e **Banda de ruído** são usados para determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, ou seja, o ciclo em que é alcançado o **Limiar** de fluorescência.

Os valores **Ct** para BKV nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR Standard** são usados para calcular a **Curva Standard** (Results > Standard Curve) dessa sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como mostrado na tabela seguinte:

Reação Q - PCR Standard 10 ⁵ Detector "BKV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO
Curva Standard Detector "BKV"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,99 ≤ R2 ≤ 1,0	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação para o **Q - PCR Standard 10⁵ for Ct > 25 ou Ct não determinado** ou se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Durante a reação de amplificação **Negative control**, o valor de **Ct** do BKV (Janela de análise) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Reação de Negative control Detector "BKV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Negative control** for diferente de **Ct não determinado** para BKV, foi detetada a presença do ADN alvo. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Durante as reações de amplificação para cada **amostra**, o valor de **Ct** do BKV é usado para determinar a presença do ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** para o Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Janela de análise) que o **Ct** foi determinado por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos ou um aumento do sinal de fundo (fundo irregular ou ruidoso).

Os resultados como o **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Janela de análise) são usados como mostrado na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de BKV
Detector "BKV"	Detector "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	não adequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para BKV e **Ct > 35 ou Ct não determinado** para o Controlo Interno, não foi possível detetar eficientemente o ADN do Controlo Interno. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de amplificação (amplificação ineficiente ou nula) ou na fase de extração (ADN da amostra degradado, amostra com números insuficientes de células, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio não é válido e deve ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para BKV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, o ADN do BKV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do BKV estar presente a uma concentração inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado constituiria um falso negativo.

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os resultados de outros testes laboratoriais relativos ao doente.

Nota: Quando for detetado o ADN do BKV durante a reação de amplificação de uma amostra, a amplificação do Controlo Interno pode produzir um resultado de Ct > 35 ou Ct não determinado. Na realidade, a reação de amplificação do Controlo Interno de baixa eficiência pode ser eliminada da competição com a reação de BKV de elevada eficiência. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise dos resultados quantitativos

Após ter realizado o procedimento de análise qualitativa, pode efetuar a análise quantitativa dos resultados relacionados com a amostra positiva.

Se o resultado da reação de amplificação para o **Q - PCR Standard 10⁵ for Ct > 25 ou Ct não determinado** ou se os valores de **Ct** dos quatro **Q - PCR standards** não se ajustarem regularmente à curva standard, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores de **Ct** para o BKV nas reações de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** (botão **Curva standard**) da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação relacionadas com as amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 até cerca de 10 cópias por reação, desde 25.000.000 a 250 cópias por mL utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

DetectorFAM "BKV" do resultado da amostra	Cópias BKV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) relacionados com cada **amostra** (Janela de análise) são usados para calcular as **cópias** de BKV presentes na amostra de origem (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medida exigida;
Ep é a eficiência do procedimento, extração e amplificação, **expressa em decimais**,
Ve é o volume total obtido da extração **expresso em µL**;
Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação **expresso em µL**;
Quantidade é o resultado da reação de amplificação relacionado com a amostra **expressa em cópias por reação**.

Quando utilizar amostras de plasma colhido em EDTA e urina e o sistema de extração **MagNA Pure 24** e o resultado tiver de ser **expresso em cópias/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 25 \times \text{Quantidade}$$

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, permite a deteção de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, foi testado usando um ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida usando um espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 10 cópias/20 µL em 150.000 cópias de pBETAGLOBIN/20 µL. Esta amostra foi utilizada em 18 réplicas para realizar a amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
10 cópias de ADN de plasmídeo + 150.000 cópias de Beta-globina	18	18	0

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel “Q” molecular de BKV (Qnostics, Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MAGNA Pure 24»				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal cópias/mL Registo ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópia/mL Registo ₁₀
BKVMQP01-Alto	100000	5,000	2/2	4,936
BKVMQP01-Médio	10000	4,000	2/2	3,899
BKVMQP01-Baixo	1000	3,000	2/2	2,748
BKVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registo $\pm 0,5$.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA ADN do vírus QCMD 2017 BK (Qnostics Ltd, UK), um painel de diluições BKV dentro da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MAGNA Pure 24»			
Amostra	Conc. consenso Cópia/mL Registo ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópia/mL Registo ₁₀
BKVDNA17S-01	3,758	2/2	3,775
BKVDNA17S-02	3,821	2/2	3,776
BKVDNA17S-03	4,771	2/2	4,824
BKVDNA17S-04	negativo	0/2	-
BKVDNA17S-05	2,736	2/2	2,748
BKVDNA17S-06	4,734	2/2	4,833
BKVDNA17S-07	3,770	2/2	3,963
BKVDNA17S-08	4,727	2/2	4,810
BKVDNA17S-09	4,637	2/2	4,488
BKVDNA17S-10	4,874	2/2	5,090

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram corretamente detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registo $\pm 0,5$.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN do BKV que foram reforçadas para o ADN do BKV através da adição da "1.ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (NIBSC código 14/212, Reino Unido) e 30 amostras de urina negativas para ADN do BKV que foram reforçadas para o ADN do BKV através da adição da "1.ª norma internacional da OMS para ADN do vírus BKV" (NIBSC código 14/212, Reino Unido).

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de BKV	30	30	0
Urina reforçada para ADN de BKV	30	30	0

Todas as amostras foram confirmadas positivas para ADN do BKV. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de plasma e urina foi de 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada através de 31 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de BKV e 32 amostras de urina presumivelmente negativas para ADN de BKV.

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de BKV	31	0	31
Urina presumivelmente negativa para ADN de BKV	32	0	32

Todas as amostras de plasma e urina foram válidas no primeiro teste e confirmadas negativas para ADN de BKV. A especificidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de plasma e urina foi de 100%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

REFERÊNCIAS

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e líquido cefalorraquidiano.

Não use o ADN extraído de amostras que contêm heparina com este produto: a heparina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não use ADN extraído que esteja contaminado com hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol com este produto: estas substâncias inibem a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados inválidos.

Não use com este produto ADN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: sangue completo colhido em EDTA.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras clínicas positivas do BKV, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar as contaminações cruzadas; no entanto, estas apenas podem ser evitadas com boas práticas laboratoriais e seguindo cuidadosamente este manual de instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN do BKV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN do BKV ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno e exigir um novo teste, começando pela extração; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do genoma viral abrangido pelos primários do produto e a sonda podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN do BKV.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, como o diagnóstico de urgência, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

ADN alvo não detetado nas reações de Positive Control ou Q - PCR Standard ou coeficiente de correlação inválido da Curva standard	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do Positive Control ou standard distribuído.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação, do Positive Control ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do Positive Control ou dos standards.
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do Positive Control ou standard.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para as reações de Positive Control ou standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

ADN alvo detetado na reação de Negative control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou do Negative control. Verifique os volumes da mistura de reação ou do Negative control.
Erro durante a definição do instrumento.	Verifique as definições de posição das amostras, dos controlos negativos, dos controlos positivos ou dos standards no instrumento.
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Use uma nova alíquota de água esterilizada.
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação das reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.



ADN alvo e de controlo interno não detetado nas reações da amostra	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou das amostras. Verifique os volumes da mistura de reação ou das amostras.
Degradação do Controlo Interno.	Utilize novas alíquotas de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração e amplificação da amostra.
Armazenamento incorreto do reagente.	Verifique se a mistura de reação não foi exposta a uma temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
Problemas durante a extração.	Verifique a qualidade e a concentração do ADN extraído.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Auto Baseline".

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas diferente do de outras amostras e dos standards ou do Positive Control.	Procure um detector FAM Ct inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do ADN alvo com uma possível mutação. O ADN alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

Erro 30103 no ELITe InGenius	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no lote PCR: - repita a amplificação da amostra eluída em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "PCR only" ou - repita a extração com uma diluição da amostra primária em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Extract + PCR".

SÍMBOLOS

-  Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
-  Código do lote.
-  Usar até (último dia do mês).
-  Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*.
-  Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98\79\CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.
-  Contém suficiente para "N" testes.
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
-  Conteúdo.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes com licença do LTC.

Este produto é vendido ao abrigo de acordos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. as respetivas sucursais e o LTC. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies, Inc, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@LTC.com.

Os reagentes de deteção ELITe MGB são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 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 e 9.169.256, bem como pedidos que estejam atualmente pendentes e números de patente EP 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1235938, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

ELITe MGB®, o logótipo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão registados como marcas comerciais na União Europeia.

«NucliSENS® easyMAG®» são marcas comerciais registadas da bioMérieux.

«QIASymphony®» é uma marca comercial registada da QIAGEN GmbH.

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare.

BKV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS175PLD



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

A. Intended use

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

B. Amplified sequence

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

C. Validated matrix

› **Plasma EDTA**

› **Urine**

D. Kit content

BKV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

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

F. ELITE InGenius and BeGenius protocol

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

G. Performance

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

*confirmed samples/ tested samples

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

H. Reference material tested

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

*confirmed samples/ tested samples

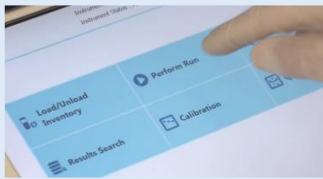
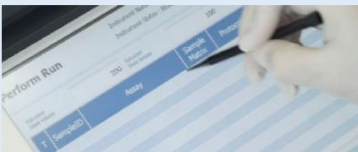

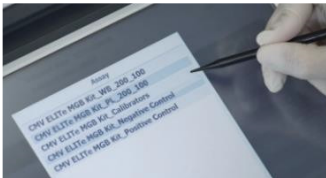

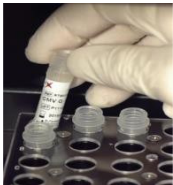



I. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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



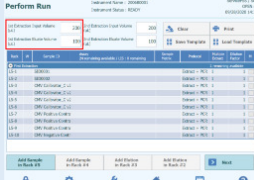
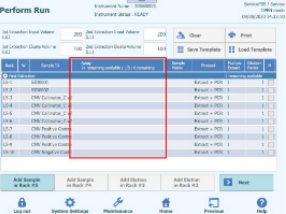
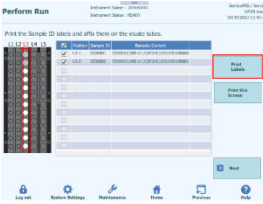



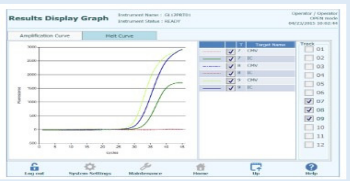
L. Procedures ELITE BeGenius

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

BKV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

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

B. Amplified sequence

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

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL



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

E. Material required not provided in the kit

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

F. ELITE InGenius protocol

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

G. Performance

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

**confirmed samples/ tested samples*

H. Reference material tested

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

**confirmed samples/ tested samples*

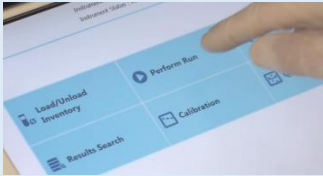
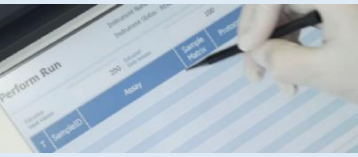

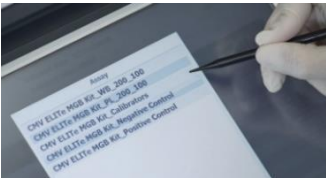

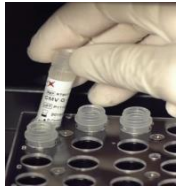



I. Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

BKV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

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

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

B. Amplified sequence

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

C. Validated matrix

› Urine

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

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

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

F. Performance

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

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

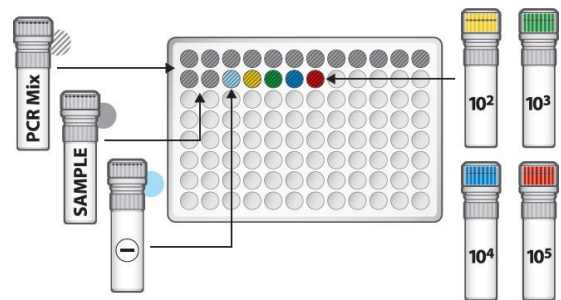
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

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

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

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

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

Code: RTS175PLD



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

A. Intended use

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

B. Amplified sequence

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

C. Validated matrix

- › **Urine**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

BKV Q-PCR Master Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

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

F. Performance

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

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

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

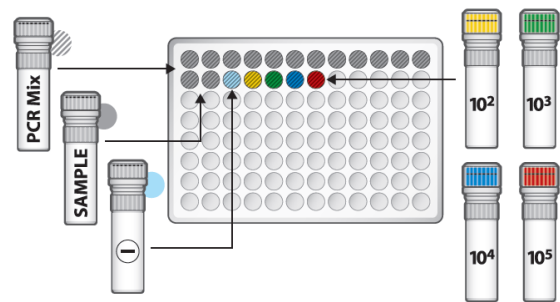
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "BKV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

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

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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