Istruzioni per l'uso

BKV ELITe MGB® Kit

reagenti per la Real-Time PCR del DNA

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS175PLD

UDI 08033891483654

CE 0123

IVD

CRONOLOGIA REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aaaa)
22–R	Estensione dell'utilizzo del prodotto in associazione con lo strumento MyGenius PRO (cod. INT050) con matrice di plasma. Estensione dell'uso del prodotto in associazione con gli strumenti ELITe InGenius® ed ELITe BeGenius® e matrice di sangue intero raccolto in EDTA (EDTA-WB). Aggiornamento delle appendici: dettagli sulla procedura di congelamento/scongelamento.	05/10/2026
21–R	Correzione di errori tipografici: Ripetibilità inter-sessione su ELITe BeGenius (Tabella 20) e limite di rilevabilità per i campioni di plasma ed ELITe GALAXY (Tabella 38).	15/05/2026
20–R	Estensione dell'utilizzo del prodotto in associazione con lo strumento MyGenius PRO (cod. INT050) con matrice delle urine. Aggiornamento del paragrafo "Avviso per l'acquirente: licenza limitata". Aggiornamento alla versione "Modello 2 versione 4.0.2" dei protocolli di analisi per gli strumenti ELITe InGenius® (cod. INT030) ed ELITe BeGenius® (cod. INT040).	26/02/2026
19–R	Aggiornamento per la conformità ai requisiti del Regolamento (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVDR). Incremento delle prestazioni analitiche e diagnostiche nel paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI Aggiornamento dell'uso previsto: • Validazione del prodotto in associazione con gli strumenti ELITe InGenius® (cod. INT030) ed ELITe BeGenius® (cod. INT040) con plasma raccolto in EDTA e Urine raccolta senza matrici conservanti. • Validazione dei prodotti in associazione con plasma raccolto in matrice EDTA e i seguenti strumenti: ELITe GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR **NOTA** La composizione del prodotto rimane invariata Nuova grafica e impostazione del contenuto delle Istruzioni per l'uso (IFU).	26/09/2024
18	Estensione dell'utilizzo del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius®». Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI: • Modifica del Limite di rilevabilità (LoD) • Variazione dell'intervallo di misurazione lineare • Aggiunta della Ripetibilità • Aggiunta della Riproducibilità	22/10/2021
17	Aggiunta del riferimento al nuovo prodotto "BKV – ELITe Positive Control RF" (cod. CTR175PLD-R). Estensione dell'utilizzo del prodotto in associazione con la piattaforma Roche cobas z 480.	25/01/2021
16	Correzione del valore CV% riportato nella tabella "Precisione con campioni di plasma ed ELITe InGenius (volume del campione 1000 µl)".	01/08/2019
15	Modifica dei valori LoD e LoQ per il plasma e le urine in associazione con lo strumento ELITe InGenius®.	11/06/2019
14	Estensione dell'utilizzo con il kit di estrazione ELITe InGenius® SP 1000	05/07/2018
13	Aggiornamento delle Caratteristiche delle prestazioni (ULoQ).	27/04/2018

12	Aggiornamento delle Caratteristiche delle prestazioni (LoD e Linearità)	22/12/ 2017
00 — 11	Sviluppo di nuovi prodotti e modifiche correlate	-

INDICE

1 USO PREVISTO 5
2 PRINCIPIO DEL SAGGIO 5
3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO 5
4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO 6
5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO 6
6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI 6
7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI 8
8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO 9
9 PROCEDURA ELITe InGenius 13
10 PROCEDURA ELITe BeGenius 20
11 PROCEDURA MyGenius PRO 25
12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO 30
13 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 42
14 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 43
15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 49
16 BIBLIOGRAFIA 53
17 LIMITI DELLA PROCEDURA 53
18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 55
19 LEGENDA DEI SIMBOLI 62
20 AVVISO PER L'UTILIZZATORE 63
21 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA 63
Appendix A QUICK START GUIDE 64
Appendix B QUICK START GUIDE 69
Appendix C QUICK START GUIDE 72

1 USO PREVISTO

Il prodotto **BKV ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione del **DNA del Polyomavirus BK (BKV) umano**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA, urina raccolta senza conservanti e sangue intero raccolto in EDTA.

Il saggio è stato validato anche in associazione con lo strumento **MyGenius PRO®** (nome registrato ELIVERSE®), sistema automatizzato e integrato per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA e urina raccolta senza conservanti.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real-Time PCR denominata **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da BKV in pazienti con sospetta infezione da BKV o sottoposti a monitoraggio per tale infezione.

I risultati devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche e agli esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio è una Real-Time PCR quantitativa per la rilevazione del DNA di BKV isolato da campioni e amplificato utilizzando il reagente BKV Q-PCR Mix che contiene primer e sonde con tecnologia ELITe MGB®.

Le sonde ELITe MGB vengono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITe InGenius**Gli strumenti **ELITe BeGenius** ed **MyGenius PRO** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La quantità di BKV è calcolata sulla base di una curva di calibrazione memorizzata.

La piattaforma **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** misura e registra l'incremento di emissione di fluorescenza. La successiva elaborazione dei dati consente la rilevazione e la quantificazione del BKV nel campione primario.

Nelle sonde ELITe MGB i fluorofori non emettono segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante la PCR e può esse utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting.

3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** fornisce il reagente del saggio **BKV PCR Mix**, ossia una miscela PCR ottimizzata e stabilizzata che contiene i primer e le sonde specifici per:

- una regione del gene dell'**antigene Large T** di BKV, rilevata nel canale **BKV**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher®, e marcata con il fluoroforo FAM.
- Internal Control, specifico per la**regione del promotore e della 5' UTR**del**gene della beta-globina umana**, rilevato nel canale**IC**; la sonda è stabilizzata dal gruppo MGB, inattivata dall'Eclipse Dark Quencher, e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525).

La**BKV Q-PCR Mix**contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato, il fluoroforo AP593 (utilizzato al posto del ROX o del Cy5) come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start). Il prodotto**BKV ELITe MGB Kit**contiene reagenti sufficienti per eseguire**96 test**su**ELITe InGenius**,**ELITe BeGenius**e**MyGeniusPRO**utilizzando**20 µL**per reazione.

Il prodotto**BKV ELITe MGB Kit**contiene reagenti sufficienti per**100 test su altri sistemi,** utilizzando**20 µL**per reazione.

NOTA
È necessario un fattore di conversione per esprimere i risultati dell'analisi quantitativa in Unità Internazionali di BKV, in conformità al "1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus BK" (codice NIBSC 14/212, Regno Unito).

4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
BKV Q-PCR Mix cod. RTS175PLD	Miscela di reagenti per Real-Time PCR in provetta con tappo NEUTRO	**4 x 540 µL**	**-**

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti non talcati monouso in nitrile o simili.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (circa 5.000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (circa 13.000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (intervallo di volume: 0,5-1000 µL).
- Tubi sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.694.005).
- Tubi sterili da 0,5 mL con tappo a vite (Sarstedt, cod. 72.730.005).
- Acqua per biologia molecolare.

6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA del campione, il controllo interno di estrazione e inibizione, i controlli positivi e negativi di amplificazione, gli standard di DNA e i materiali di consumo **non sono** inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati dei campioni, sono richiesti i seguenti prodotti:

Tabella 2

Strumenti e software	Prodotti e reagenti
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA cod. INT030) **ELITe InGenius Software** versione 1.4.0 (o successiva) **BKV ELITe_STD**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei Calibratori **BKV ELITe_Be _PC**, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control. **BKV ELITe _NC**, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control **BKV ELITe_PL_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di plasma **BKV ELITe_U_200_100**, Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di urina **BKV ELITe_WB_200_100** , Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, cod. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, cod. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, cod. CTRCPE) **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** Consumable Sets (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius).
ELITe BeGenius (EG SpA cod. INT040) **ELITe BeGenius Software** versione 2.3.0 (o successiva) **BKV ELITe_Be_STD**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei Calibratori **BKV ELITe_Be_PC**, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control **BKV ELITe_Be_NC,** Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control **BKV ELITe_Be_PL_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di plasma **BKV ELITe_ Be_U_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di urina **BKV ELITe_Be_WB_200_100**, Assay Protocols con parametri per l'analisi dei campioni di sangue intero	
MyGenius PRO (EG SpA cod.: INT050) **MyGenius PRO Software** versione BB-04 (o successiva) **BKV ELITe_My_STD**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei Calibratori **BKV ELITe_My_STD**, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Positive Control **BKV ELITe_My_STD**, Assay Protocol con parametri per l'analisi del Negative Control **BKV ELITe_My_U_IU_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di urina e risultati in IU/mL **BKV ELITe_My_U_cmL_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi dei campioni di urina e risultati in copie/mL **BKV ELITe_My_PL_IU_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi di campioni di plasma e risultati in IU/mL **BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100**, Assay Protocol con parametri per l'analisi di campioni di plasma e risultati in copie/mL	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, cod. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, cod. CTR175PLD) **Negative Control** (EG SpA, cod. CTRNEG) **Internal Control Maxi** (EG SpA, cod. ICMAXI) **MyGenius PRO** Consumable Sets (vedere le Istruzioni per l'uso di MyGenius PRO)
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985) **ELITe GALAXY** (EG SpA, cod. INT020) con **versione software 1.3.1** (o successiva). Extraction Protocol per ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universale)	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, cod. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, cod. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, cod. CTRCPE) **ELITe GALAXY** Consumable Sets (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe GALAXY) **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, cod. 4346906), micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli sigillanti adesivi per l'amplificazione Real-Time.

7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso in vitro.

7.1 Avvertenze e precauzioni generali

- Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Provette, puntali e altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici devono essere trattati per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirli.
- Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).
- Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
- Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
- Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.
- Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite. con il prodotto.
- Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
- Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti della PCR.

Non spostare mai i camici, guanti o strumenti da laboratorio dall'area designata per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione all'area designata per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione.

Quando la sessione di amplificazione deve essere eseguita con lo strumento 7500 Fast Dx Real Time PCR, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione. Non introdurre mai un prodotto della reazione di amplificazione nell'area designata per l'estrazione/preparazione delle reazioni di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi. Manipolare i campioni sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei campioni solo per questo specifico scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

I prodotti per l'estrazione devono essere manipolati in modo da impedirne la dispersione nell'ambiente ed evitare la contaminazione dell'area di lavoro dello strumento.

La cassetta per la PCR deve essere maneggiata con cura e non deve mai essere aperta per evitare la diffusione dei prodotti della PCR e la contaminazione da trasferimento.

7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Tabella 3

Componente	Temperatura di conservazione	Uso dopo la prima apertura	Cicli di congelamento/scongelamento	Stabilità sullo strumento (ELITe InGenius ed ELITe BeGenius)	Stabilità sullo strumento (MyGenius PRO)
BKV Q-PCR Mix	-20 °C o inferiore (al riparo dalla luce)	60 giorni	Fino a cinque	Fino a cinque sessioni indipendenti* di tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare la terza sessione)	Fino a 7 ore consecutive o fino a 3 ore consecutive per cinque volte*

* con congelamento intermedio.

8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO

8.1 Campioni e protocolli di analisi

Questo prodotto è destinato all'uso su **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** e **MyGenius PRO** con i rispettivi campioni clinici convalidati identificati e manipolati secondo le linee guida di laboratorio, e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni:

Tabella 4

Campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Plasma	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
Urine	Senza conservanti	≤4 ore	≤1g	≤30 gg	≤30 gg
Sangue intero	EDTA	≤1 g	≤3 gg	≤30 gg	≤30 gg

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorno.

Sebbene siano possibili periodi di conservazione più lunghi a -70 °C, come ampiamente riportato dalla letteratura scientifica, è opportuno che l'applicazione di tali periodi venga valutata internamente dagli utenti finali di questo prodotto.

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per l'analisi di campioni su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** è necessario utilizzare gli Assay Protocol indicati di seguito. Si tratta di protocolli per dispositivi diagnostici in vitro (IVD) appositamente validati per l'uso specifico con i prodotti ELITe MGB Kit e gli strumenti **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** con le matrici indicate.

Tabella 5

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Plasma in EDTA	ELITe InGenius	BKV ELITe_PL_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius,	BKV ELITe_Be_PL_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Urine	ELITe InGenius	BKV ELITe_U_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius,	BKV ELITe_Be_UL_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Sangue intero	ELITe InGenius	BKV ELITe_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluato estratto: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume di campione immesso nella PCR: 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_WB_200_100	copie/mL o IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluato estratto: 100 µL Internal Control: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume di campione immesso nella PCR: 20 µL

IU - International Units: Unità Internazionali dell'OMS.

Per l'analisi sullo strumento **MyGenius PRO** si devono utilizzare gli Assay Protocol indicati di seguito. Si tratta di protocolli per dispositivi diagnostici in vitro (IVD) appositamente validati per l'uso specifico con i prodotti ELITe MGB Kit e lo strumento **MyGenius PRO** con le matrici indicate.

Tabella 6 Assay Protocol per BKV ELITe MGB Kit e MyGeniusPRO

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Urine	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_IU_200_100	IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Urine	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_cmL_200_100	Copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluizione: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_IU_200_100	IU/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluato estratto: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume di campione immesso nella PCR: 20 µL
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_cmL_200_ 100	copie/mL	Volume di estrazione in ingresso: 200 µL Volume di eluato estratto: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume di PCR Mix: 20 µL Volume di campione immesso nella PCR: 20 µL

NOTA

Verificare che la provetta primaria e il volume del campione siano compatibili con ELITe InGenius, ELITe BeGenius o MyGenius PRO attenendosi alle istruzioni per l'uso dei rispettivi strumenti.

Il volume del campione in una provetta primaria varia in base al tipo di provetta caricato. Consultare le istruzioni per l'uso del kit di estrazione per maggiori informazioni sulla preparazione e l'esecuzione della procedura di estrazione.

Se richiesto, si devono trasferire 200 µL di campione in un Extraction Tube (per ELITe InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITe BeGenius) e 260 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL (per MyGenius PRO).

NOTA

Il trasferimento con pipette dei campioni nell'**Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione.** Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni contenute nella sezione "7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 8".

Gli acidi nucleici purificati possono essere lasciati a temperatura ambiente per 16 ore e conservati a -20 °C o a temperatura inferiore per un periodo non superiore a un mese.

Per controllare i dati relativi alle sostanze interferenti, fare riferimento a “Sostanze potenzialmente interferenti” nella sezione 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30.

8.2 Calibratori e controlli per PCR

La curva di calibrazione deve essere generata e approvata per ogni lotto di reagente per PCR.

- Per la Curva di Calibrazione, utilizzare il prodotto **BKV ELITe Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocol**BKV ELITe_STD**, **BKV ELITe_Be_STD** o **BKV ELITe_My_STD.**

NOTA

La concentrazione dei quattro prodotti Q – PCR Standard è espressa in copie/reazione (10^5 copie/reaz., 10^4 copie/reaz., 10^3 copie/reaz., 10^2 copie/reaz.) Fare riferimento al paragrafo “Incertezza della curva standard” nella sezione 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30.

I risultati dei controlli per PCR devono essere generati e approvati per ogni lotto di reagente per PCR.

- Per il Positive Control, utilizzare il prodotto **BKV – ELITe Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocol **BKV ELITe_PC**, **BKV ELITe_Be_PC** o **BKV ELITe_My_PC.**
- Per il Negative Control, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) con gli Assay Protocol **BKV ELITe_NC**, **BKV ELITe_Be_NC** oppure utilizzare il **Negative Control** (non fornito in questo kit) con l’Assay Protocol **BKV ELITe_My_NC**.

NOTA

Gli strumenti **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** e **MyGenius PRO** consentono di generare e memorizzare la curva di calibrazione e la validazione dei controlli della PCR per ogni lotto di reagente per PCR.

NOTA

Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni**; trascorso questo termine, è necessario ripetere la calibrazione.

I risultati dei controlli per PCR scadono dopo**15 giorni**; trascorso questo termine, è necessario rianalizzare i controlli positivo e negativo.

I calibratori e i controlli per PCR devono essere rianalizzati ogni volta che si verifica uno degli eventi seguenti:

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti;
- i risultati delle analisi di controllo della qualità (vedere paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche;
- quando vengono eseguiti interventi di manutenzione o assistenza importanti sugli strumenti**ELITe InGenius**, **ELITe BeGeniuseMyGeniusPRO**.

8.3 Controlli di qualità

Si consiglia la verifica programmata della procedura di estrazione e amplificazione.Si possono utilizzare campioni archiviati o materiale di riferimento certificato.Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali.

9 PROCEDURA ELITe InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **BKV ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe InGenius** si articola in due fasi:

Tabella 7

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- nel menu "Calibrations" nella home page, verificare che i calibratori (**Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di**PCR Mix**da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di**PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;
- nel menu "Controls" della home page, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control**,**Negative Control**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di PCR Mix da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di**PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- Selezionare il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica utente (GUI) la configurazione della sessione e utilizzare gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 9).

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

9.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe InGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)

C. Sessione di calibrazione (PCR Only)

D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR only)

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi negli Assay Protocol disponibili sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

NOTA

Lo strumento **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.

NOTA
Proteggere la miscela **PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

Per impostare uno dei quattro tipi di sessione, procedere come segue facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI:

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	**B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)**
1	**Identificare i campioni** e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o un blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato. **Scongelare** le **provette contenenti CPE** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o un blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.	**Scongelare** a temperatura ambiente la **provetta di eluizione** contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.
2	Nella schermata “Home”, selezionare "**Perform Run**”.	Nella schermata “Home”, selezionare "**Perform Run**”.
3	Verificare che “Extraction Input Volume” sia 200 µL e che “Extracted Elute Volume” sia 100 µL.	Verificare che “Extraction Input Volume” sia 200 µL e che “Extracted Elute Volume” sia 100 µL.
4	Per ogni campione, assegnare un “Track” e compilare il “SampleID” (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un “Track” e compilare il “SampleID” (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
5	Nella colonna “Assay” **selezionare** l’**Assay Protocol** da utilizzare (vedere “Campioni e controlli).	Nella colonna “Assay” selezionare l’**Assay Protocol** da utilizzare (vedere “Campioni e controlli).
6	Verificare che il protocollo visualizzato sia: “Extract + PCR”.	Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only".
7	Nella colonna “Sample Position” selezionare “Primary tube” o “Extraction tube” come posizione da cui caricare il campione. Verificare che “**Dilution factor**” sia “**1**”.	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position” sia "Elution Tube (bottom row)”. Verificare che “**Dilution factor**” sia “**1**”.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	**Caricare il CPE** e la **PCR Mix** nell’“Inventory Block” (area reagenti) facendo riferimento alla “Load List” e inserire il numero di lotto di CPE e PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	**Caricare** la **PCR Mix** nell’“Inventory Block” facendo riferimento alla “Load List” e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack dei puntali se necessario.	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack dei puntali se necessario.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	**Caricare** la PCR Cassette, le cartucce per estrazione ELITe InGenius SP 200 e tutti i materiali di consumo richiesti e i campioni da estrarre.	**Caricare** la PCR Cassette e le provette di eluizione con i campioni estratti.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	**B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)**
15	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
16	Premere “Start”.	Premere “Start”.

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	**Scongelare** le **provette di Q-PCR Standard** necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.	Scongelare le **provette di controllo positivo** a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo. **Preparare** il **controllo negativo** trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Per il Q-PCR Standard, assegnare il "Track", **selezionare** l'**Assay Protocol** (vedere "Campioni e controlli") nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto reagente e la data di scadenza.	Nella colonna "Assay" **selezionare** l'**Assay Protocol** da utilizzare (vedere "Campioni e controlli). Inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo positivo e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" (Protocollo) sia selezionato "PCR Only".
6	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".	Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)".
7	**Caricare** la **PCR Mix** nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.	**Caricare** la **PCR Mix** nell'"Inventory Block" facendo riferimento alla "Load List" e inserire il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazione per ogni provetta.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" e sostituire i rack se necessario.
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	**Caricare** la PCR Cassette e le provette di Q-PCR Standard.	**Caricare** la PCR Cassette, il Positive Control e il Negative Control.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

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

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nella **provetta di eluizione**, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento la **PCR Mix** tapparla e conservarla a -20 °C o temperatura inferiore oppure conservarla a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione); mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

NOTA
Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il**Q-PCR Standard**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del Q-PCR Standard.

NOTA
Il**Q-PCR Standard**può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA
Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il**Positive Control**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del controllo positivo. Smaltire il**Negative Control**residuo.

NOTA
Il**Positive Control**può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA
Alla fine della sessione, smaltire la**PCR Cassette**e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

9.3 FASE 3 - Esame e approvazione dei risultati

Lo strumento **ELITe InGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare le curve della PCR che vengono poi interpretate ed espresse nei risultati.

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata, sono mostrati i risultati e i dati relativi alla sessione analitica. Da questa schermata è possibile approvare i risultati, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA
Lo strumento **ELITe InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) che consente di caricare i risultati della sessione nel centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Lo strumento **ELITe InGenius** utilizza il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** per generare risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione della curva di calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
4. Refertazione dei risultati del campione

9.3.1 Validazione della curva di calibrazione

L'**ELITe InGenius software** interpreta i risultati della PCR per il target del calibratore con i parametri dell'Assay Protocol **ELITe_STD**. Il rapporto tra il Ct risultante e la concentrazione genera la curva di calibrazione.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente per PCR, vengono registrate nel database ("Calibration") e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

La curva di calibrazione scade **dopo 60 giorni**.

NOTA

se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata “Calibration” appare il messaggio “Failed”. In questo caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le reazioni di amplificazione del calibratore. Inoltre, se inclusi nella sessione, i campioni non vengono quantificati e devono essere ripetuti per generare risultati quantitativi.

9.3.2 Validazione dei risultati dell’amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

L’ELITe InGenius **software** interpreta i risultati della PCR per il target delle reazioni del controllo positivo e del controllo negativo con i parametri degli Assay Protocol **HCV ELITe_PC** ed **HCV ELITe_NC**. I valori di Ct risultanti sono convertiti in concentrazione e devono essere usati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del controllo positivo e del controllo negativo, specifici per il lotto dei reagenti per PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di “Administrator” o “Analyst”, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Positive Control e del Negative Control scadono **dopo 15 giorni**.

Il programma ELITe InGenius software elabora i risultati del Positive Control e del Negative Control e genera i “Control Charts” (Grafici di controllo). L’approvazione del Positive Control si basa sulla valutazione della quantità logaritmica ottenuta che dovrebbe rientrare nell'intervallo di quantità logaritmica previsto (Grafico PC). Questo assicura che le prestazioni del sistema rientrino nei criteri di accettazione. Il secondo grafico (Grafico L-J) è dedicato esclusivamente al monitoraggio dell’andamento del Positive Control nel tempo. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

Se il risultato del controllo positivo o del controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata “Controls” (Controlli) appare il messaggio "Failed" (Fallito). In tal caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le sessioni del controllo positivo e del controllo negativo.

NOTA

Se il risultato del controllo positivo e del controllo negativo non è valido e i campioni erano inclusi nella medesima sessione, i campioni possono essere approvati ma i loro risultati non sono validati. In tal caso, il(i) controllo (i) fallito(i) e i campioni devono essere ripetuti.

9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni

Il programma **ELITe InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target (canale **BKV**) e per l’Internal Control (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocols **BKV ELITe_PL_200_100**, **BKV ELITe_U_200_100** o **BKV ELITe_WB_200_100**. I valori di Ct del target risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati sono mostrati sulla schermata “Results Display”.

I risultati del campione possono essere approvati quando sono vere le tre condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Curva di calibrazione	**Stato**
BKV Q-PCR Standard	APPROVED (APPROVATO)
2) Controllo positivo	**Stato**
BKV Positive Control	APPROVED (APPROVATO)
3) Controllo negativo	**Stato**
BKV Negative Control	APPROVED (APPROVATO)

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dall'**ELITe InGenius Software** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se sono stati rilevati i DNA dei patogeni.

Risultato di una sessione sul campione	**Interpretazione**
BKV:DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU/mL (BKV:DNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL o IU/mL)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione entro l'intervallo di misurazione del saggio, alla concentrazione indicata.
BKV:DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU/mL (BKV:DNA Rilevato, quantità minore di "LLoQ" copie/mL o IU/mL)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione, la sua concentrazione è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
BKV:DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU/mL (BKV:DNA Rilevato, quantità maggiore di "ULoQ" copie/mL o IU/mL)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione, la sua concentrazione è oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
BKV:DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU/mL (BKV:DNA non Rilevato o minore di "LoD" copie/mL o IU/mL)	Il **DNA di BKV non è stato rilevato** nel campione**.** Il campione è negativo per il DNA di BKV oppure la sua concentrazione è al di sotot del Limite di Rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid-Retest Sample (Non valido - Ripetere il campione)	**Risultato del saggio non valido** per un errore dell'Internal Control (dovuto per esempio a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che hanno riportato il risultato "Invalid - Retest Sample" (Non valido - Ripetere il campione): in questo caso, il DNA dell'Internal Control non è stato rilevato in modo efficace, probabilmente a causa di problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione o PCR (ad es. campionamento non corretto, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Se ne rimane un volume sufficiente, l'eluato può essere rianalizzato (tal quale oppure diluito) mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere nuovamente analizzato partendo dall'estrazione di un nuovo campione in modalità "Extract + PCR" (vedere 18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 55).

I campioni segnalati come "BKV:DNA Not Detected or below "LoD" copies/mL or IU/mL" (BKV:DNA non Rilevato o minore di "LoD" copie/mL o IU/mL), sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il BKV. In questo caso, il campione può essere negativo per il DNA del BKV oppure il DNA del BKV è presente in una concentrazione inferiore rispettto al limite di rilevabilità del saggio (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV a una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità (e al limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, vengono segnalati come "BKV: DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL or IU/mL" (BKV: DNA Rilevato, quantità minore di "LLoQ" copie/mL o IU/mL) (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV che rientrano nell'intervallo di misurazione lineare vengono rilevati e segnalati come "BKV:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL or IU/mL" (BKV:DNA Rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL o IU/mL) (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV che sono al di sopra del limite superiore di quantificazione vengono segnalati come "BKV:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL or IU/mL" (BKV:DNA Rilevato, quantità maggiore di "ULoQ" copie/mL o IU/mL) e non sono idonei per la quantificazione (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche ed esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

I risultati del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di “Administrator” o “Analyst”, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra “Results Display” è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di “Sample Report” e “Track Report”.

9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati sotto forma di “Sample Report” e “Track Report”.

Il “Sample Report” mostra i dettagli dei risultati per campione selezionato (SID).

Il “Track Report” mostra i dettagli dei risultati per track selezionato.

Entrambi i rapporti possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

10 PROCEDURA ELITe BeGenius

La procedura per l’uso del prodotto **BKV ELITe MGB Kit** con lo strumento **ELITe BeGenius** si articola in due fasi:

Tabella 8

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- Accendere lo strumento **ELITe BeGenius** e selezionare la modalità “**CLOSED**”,
- nel menu “Calibrations” nella home page, verificare che i calibratori (**Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di **PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;
- nel menu “Controls” nella home page, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano approvati e validi (Stato) per il lotto di**PCR Mix**da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di**PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- Selezionare il tipo di sessione analitica, seguendo le istruzioni visualizzate sull’interfaccia grafica utente (GUI) la configurazione della sessione e utilizzare gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 9).

Se l’Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

10.2 STEP 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **ELITe BeGenius** per eseguire:

A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)

B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)

C. Sessione di calibrazione (PCR Only)

D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR only)

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

NOTA

Lo strumento **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.

NOTA

Proteggere la miscela **PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

Per impostare uno dei quattro tipi di sessione, procedere come segue facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sulla GUI:

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	**B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)**
1	**Identificare i campioni** e, ne necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o un blocco freddo. Se richiesto, trasferire 200 µL di campione in una provetta Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettata. **Scongelare** le **provette contenenti CPE** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerle su ghiaccio o un blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni.	**Scongelare** a temperatura ambiente la **provetta di eluizione** contenente gli acidi nucleici estratti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.
2	Nella schermata "Home", selezionare "**Perform Run**".	Nella schermata "Home", selezionare "**Perform Run**".
3	Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": "Extract + PCR".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	Caricare i campioni nel "Sample Rack". (Nota: quando si caricano provette secondarie "2 mL Tubes", utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	Caricare i campioni nell'"Elution Rack".
6	Inserire il "**Sample Rack**" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, inserire il "Sample ID" (SID) per ogni "Position" utilizzata. (Se si caricano provette secondarie, contrassegnare con "2 mL Tube". Se le provette secondarie non hanno codice a barre, digitare manualmente il "Sample ID").	**Inserire l'"Elution Rack"** nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire il "Sample ID", la "Sample matrix", l'"Extraction kit" e l'"Extracted eluate vol." (volume eluato).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Non applicabile.

	A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)	B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
9	Nella colonna “Assay” selezionare l’Assay Protocol da utilizzare (vedere “Campioni e controlli).	Nella colonna “Assay” selezionare l’Assay Protocol da utilizzare (vedere “Campioni e controlli).
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
12	Caricare gli “Elution Tube” nell’“Elution Rack” (gli Elution Tube possono essere etichettati con il codice a barre per una miglior tracciabilità).	Non applicabile.
13	Inserire l’“Elution Rack” nella “Cooler Unit” a partire dalla “Lane 3” (L3). Quando si processano più di 12 campioni, ripetere la procedura utilizzando la “Lane 2” (L2).	Non applicabile.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile.
15	Caricare il CPE e la PCR Mix nel “Reagent/Elution Rack”.	Caricare la PCR Mix nel “Reagent/Elution Rack”.
16	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e/o CPE, inserire “S/N” (numero di serie), “Lot No.” (numero di lotto), “Exp. Date” (data di scadenza) e “T/R” (numero di reazioni).	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire “S/N” (numero di serie), “Lot No.” (numero di lotto), “Exp. Date” (data di scadenza) e “T/R” (numero di reazioni).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi “Tip Racks” dell’“Inventory Area” e sostituire i rack se necessario.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il “PCR Rack” con la “PCR Cassette” nell’Inventory Area.	Caricare il “PCR Rack” con la “PCR Cassette” nell’Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
22	Caricare l’“Extraction Rack” con le cartucce di estrazione “ELITe InGenius SP 200” e i materiali di consumo per l’estrazione richiesti.	Non applicabile.
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere “Start”.	Premere “Start”.

	C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)	D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)
1	**Scongelare** le **provette di Q-PCR Standard** necessarie (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.	Scongelare le **provette di controllo positivo** a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo. **Preparare** il **controllo negativo** trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita in dotazione con l'ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".	Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
3	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i "Rack" dalle "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "run mode": PCR Only".	Selezionare il "run mode": "PCR Only".
5	**Caricare le provette di Q-PCR** Standard nell'"Elution Rack".	**Caricare** le **provette di controllo positivo e controllo negativo** nell'"Elution Rack".
6	**Inserire** l'**"Elution Rack"** nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	**Inserire** l'**"Elution Rack"** nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" inserire "Reagent name" e "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Nella colonna "Assay" selezionare l'**Assay Protocol** da utilizzare (vedere "Campioni e controlli).	Nella colonna "Assay" selezionare l'**Assay Protocol** da utilizzare (vedere "Campioni e controlli).
9	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
10	**Caricare** la **PCR Mix** nel "Reagent/Elution Rack".	**Caricare** la **PCR Mix** nel "Reagent/Elution Rack".
11	**Inserire** il "**Reagent/Elution Rack**" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" a partire dalla "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix, inserire "S/N" (numero di serie), "Lot No." (numero di lotto), "Exp. Date" (data di scadenza) e "T/R" (numero di reazioni).
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.	Controllare i puntali negli appositi "Tip Racks" dell'"Inventory Area" (area reagenti) e sostituire i rack se necessario.
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
15	**Caricare** il "**PCR Rack"** con la "**PCR Cassette**" nell'Inventory Area.	**Caricare** il "**PCR Rack"** con la "**PCR Cassette**" nell'Inventory Area.
16	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
17	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
18	Premere "Start".	Premere "Start".

Una volta completata la sessione, **ELITe BeGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare, salvare i risultati, stampare e salvare il report.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nella **provetta di eluizione**, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 ± 10 °C per non più di un mese. Evitare di provocare la fuoriuscita del campione estratto.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento la **PCR Mix** tapparla e conservarla a -20 °C o temperatura inferiore oppure conservarla a bordo nel blocco freddo per un massimo di 7 ore (per 2 sessioni di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione); mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il**Q-PCR Standard**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del Q-PCR Standard.

NOTA

Il**Q-PCR Standard**può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 2 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il**Positive Control**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del**Positive Control**. Smaltire il**Negative Control**residuo.

NOTA

Il**Positive Control**può essere utilizzato per 4 sessioni indipendenti da 3 ore ciascuna.

NOTA

Alla fine della sessione, smaltire la**PCR Cassette**e gli altri materiali di consumo secondo le disposizioni legali e ambientali vigenti. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

Lo strumento **ELITe BeGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare le curve della PCR che vengono poi interpretate ed espresse nei risultati.

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata, sono mostrati i risultati e i dati relativi alla sessione analitica. Da questa schermata è possibile approvare i risultati, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

Lo strumento **ELITe BeGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) che consente di caricare i risultati della sessione nel centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

ELITe BeGenius utilizza il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione della curva di calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
4. Refertazione dei risultati del campione

NOTA
Per i dettagli, fare riferimento allo stesso paragrafo della **Procedura ELITe InGenius**

11 PROCEDURA MyGenius PRO

La procedura per l'uso del prodotto **BKV ELITe MGB Kit** con lo strumento **MyGenius PRO** si articola in tre fasi:

Tabella 9

FASE 1	Verifica che il sistema sia pronto	
FASE 2	Impostazione della sessione	A) Sessione di analisi dei campioni (Extract + PCR)
		B) Sessione di analisi dei Calibratori (PCR Only)
		C) Sessione di analisi del Positive Control e del Negative Control (PCR only)
FASE 3	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati del campione
		4) Refertazione dei risultati del campione

FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione di analisi:

- accendere lo strumento MyGenius PRO ed effettuare il login; l'unità si avvierà in modalità STAND-BY.
- nel menu "Calibrations" nella schermata Home, verificare che i calibratori (**Q-PCR Standard**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di**PCR Mix**da utilizzare. Se non ci sono calibratori validi disponibili per il lotto di**PCR Mix**, eseguire la calibrazione come descritto nelle sezioni seguenti;
- nel menu "Controls" nella schermata Home, verificare che i controlli per PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano approvati e validi (Status) per il lotto di**PCR Mix**da utilizzare. Se non ci sono controlli per PCR validi disponibili per il lotto di**PCR Mix**, eseguire i controlli per PCR come descritto nelle sezioni seguenti;
- seguire le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica utente (GUI) per l'impostazione della sessione e utilizzare gli Assay Protocol forniti da EG SpA (vedere "Campioni e controlli").

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

FASE 2 – Configurazione del flusso di lavoro sul sistema

Il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** può essere utilizzato su **MyGenius PRO** per eseguire:

A. Sessione di analisi dei campioni (Extract + PCR)

B. Sessione di analisi dei Calibratori (PCR Only)

C. Sessione di analisi del Positive Control e del Negative Control (PCR only)

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui li si seleziona.

Prima di configurare una sessione di analisi:

Scongelare le provette di **PCR Mix** necessarie a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Agitare delicatamente la provetta, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenerla su ghiaccio o un blocco freddo.

NOTA
Proteggere la miscela **PCR Mix** dalla luce durante lo scongelamento perché questo reagente è fotosensibile.

Per impostare uno dei tre tipi di sessione di analisi, procedere come indicato di seguito, facendo riferimento alle istruzioni visualizzate sull'interfaccia GUI:

	A. Sessione di analisi dei campioni (Extract + PCR)	**B. Sessione di analisi dei Calibratori (PCR Only)**	**C.Sessione di analisi del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)**
1	Identificare i campioni e, se necessario, scongelare a temperatura ambiente, agitare delicatamente, centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Se la provetta primaria è compatibile con i rack di MyGenius PRO, inserire la provetta con i campioni nei rack; se ciò non è possibile,**trasferire 260 µL di campione in una provetta secondaria (2 mL) precedentemente etichettata.** **Scongelare**le provette necessarie diInternal Control Maxi**(IC MAXI)**a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, quindi centrifugare il contenuto per 5 secondi. Ciascuna provetta contiene un volume sufficiente per 72 test.	**Scongelare**le provette necessarie di**Q-PCR Standard**(Cal1: Q- PCR Standard 102, Cal2: Q-PCR Standard 103, Cal3: Q-PCR Standard 104, Cal4: Q-PCR Standard 105) a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di**Positive Control**a temperatura ambiente per 30 minuti. Agitare delicatamente, quindi centrifugare per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere in ghiaccio o in blocco freddo. Centrifugare le provette di**NegativeControl**per 5 secondi.
2	Se lo strumento è collegato al LIS, i codici a barre dei campioni vengono letti e riconosciuti automaticamente da MyGenius PRO quando vengono posizionati nell'Area campioni. Se lo strumento non è collegato al LIS, assegnare manualmente i campioni utilizzando le funzioni**ASSIGN TEST** (Assegna test) o**ASSIGN SAMPLE** (Assegna campione) nella pagina "Sample List" dell'interfaccia grafica, prima di caricarli nello strumento. Queste funzioni consentono anche di assegnare il protocollo di prova corretto a ciascun campione.	Caricare la PCR Mix e le provette di Q-PCR Standard nel carosello refrigerato per reagenti.	Caricare la PCR Mix e le provette di Positive Control e Negative Control nel carosello refrigerato per reagenti.
3	In modalità**STAND-BY**verificare che vi sia una quantità sufficiente di materiali di consumo per completare il test e che i livelli dei rifiuti solidi e liquidi siano adeguati al funzionamento dello strumento. Se necessario, caricare i materiali di consumo richiesti negli appositi cassetti e svuotare il contenitore dei rifiuti e il serbatoio dei liquidi. Per le procedure di caricamento dettagliate, consultare il manuale d'uso dello strumento.	In modalità**STAND-BY**verificare che vi sia una quantità sufficiente di materiali di consumo per completare il test e che i livelli dei rifiuti solidi e liquidi siano adeguati al funzionamento dello strumento. Se necessario, caricare i materiali di consumo richiesti negli appositi cassetti e svuotare il contenitore dei rifiuti e il serbatoio dei liquidi. Per le procedure di caricamento dettagliate, consultare il manuale d'uso dello strumento.	In modalità**STAND-BY**verificare che vi sia una quantità sufficiente di materiali di consumo per completare il test e che i livelli dei rifiuti solidi e liquidi siano adeguati al funzionamento dello strumento. Se necessario, caricare i materiali di consumo richiesti negli appositi cassetti e svuotare il contenitore dei rifiuti e il serbatoio dei liquidi. Per le procedure di caricamento dettagliate, consultare il manuale d'uso dello strumento.
4	Premere Start nella pagina iniziale e attendere che lo strumento passi allo stato 'Preparation' (Preparazione) e quindi 'Operation' (Funzionamento).	Premere Start nella pagina iniziale e attendere che lo strumento passi allo stato 'Preparation' (Preparazione) e quindi 'Operation' (Funzionamento).	Premere Start nella pagina iniziale e attendere che lo strumento passi allo stato 'Preparation' (Preparazione) e quindi 'Operation' (Funzionamento).

	A. Sessione di analisi dei campioni (Extract + PCR)	B. Sessione di analisi dei Calibratori (PCR Only)	C.Sessione di analisi del Positive Control e del Negative Control (PCR Only)
5	Caricare la PCR Mix nel carosello refrigerato per reagenti.	Nella schermata Home, selezionare il pulsante “Calibration” (Calibrazione).	Nella schermata Home, selezionare il pulsante “Controls” (Controlli).
6	Prenotare l’apertura dello sportello dell’area Auto Sampler e caricare i campioni e IC MAXI.	Nella pagina Calibration selezionare la provetta di Q-PCR Standard caricata nel punto 2, quindi premere “Order” (Ordina).	Nella pagina Control selezionare il Positive Control e il Negative Control caricati nel punto 2 e quindi premere “Order” (Ordina).
7	Chiudere lo sportello dell’Auto Sampler e la sessione di analisi avrà inizio.		

Alla fine della sessione di analisi, rimuovere dallo strumento il**Q-PCR Standard**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del Q-PCR Standard.

NOTA

Al termine della sessione di analisi, è possibile rimuovere la**PCRMix**dallo strumento, chiuderla con il tappo e conservarla a una temperatura di -20 °C o inferiore, oppure lasciarla nel carosello per reagenti per un massimo di 7 ore.

Non appena si ottiene un risultato, **MyGenius PRO**consente agli utenti di visualizzare, approvare, archiviare i risultati e salvare il report finale.

NOTA

Il**Q- PCRStandard**può essere utilizzato per 4 calibrazioni, lasciandolo sullo strumento per un massimo di 2 ore per ciascuna calibrazione.

NOTA

Alla fine della sessione di analisi, rimuovere dallo strumento il**Positive Control**residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C o a temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita del**Positive Control**. Smaltire il**Negative Control**residuo.

NOTA

Il**Positive Control**può essere utilizzato per 4 calibrazioni lasciandolo a bordo dello strumento per un massimo di 3 ore per ogni calibrazione.

NOTA

Quando necessario o quando lo strumento lo richiede, rimuovere dal cassetto dello strumento la**PCR Cassette** gli altri materiali di consumo, che devono essere smaltiti in conformità a tutte le normative di legge nazionali e ambientali. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

NOTA

Lo strumento**MyGenius PRO**può essere collegato al “Laboratory Information System” (LIS) tramite il quale è possibile scaricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

Lo strumento **MyGenius PRO** monitora i segnali di fluorescenza del target e dell’Internal Control per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri del Protocol Assay per generare le curve della PCR che vengono poi interpretate ed espresse nei risultati.

Una volta completata l'analisi di ciascun campione, i risultati possono essere visualizzati nella schermata 'Results', che mostra i risultati e le informazioni relative ai campioni. Da questa schermata è possibile approvare i risultati e salvare i report. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Lo strumento **MyGenius PRO** utilizza il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** per generare i risultati tramite la seguente procedura:

1. Validazione della curva di calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati ottenuti sul campione
4. Refertazione dei risultati del campione

Validazione della curva di calibrazione

Il programma con **ELITe InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target del calibratore con i parametri dell'Assay Protocol **BKV ELITe_My_STD**. Il rapporto tra il Ct risultante e la concentrazione genera la curva di calibrazione.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto di reagente per PCR, vengono registrate nel database (Calibrations) Esse possono essere visionate e approvate dall'utente, selezionando la calibrazione di interesse e la sezione "View chart" (Visualizza grafico).

La curva di calibrazione scade **dopo 60 giorni**.

NOTA

Se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" (Calibrazione) appare il messaggio "Error" (Errore). In questo caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le reazioni di amplificazione del calibratore. Inoltre, se nella sessione di analisi sono stati inclusi dei campioni, questi non vengono quantificati: in tal caso, dopo la ripetizione della calibrazione, tutti i risultati devono essere interpretati e approvati (vedere la sezione dedicata ai risultati dei campioni).

Validazione dei risultati di amplificazione del Positive Control e del Negative Control

Il programma con **MyGenius PRO Software** interpreta i risultati della PCR per il target del Positive Control e per il target dell'Internal Control (canale **IC**) delle reazioni del Negative Control con i parametri degli Assay Protocol **BKV ELITe_My_PC** e **BKV ELITe_My_NC.** I valori di Ct risultanti sono convertiti in concentrazione e utilizzati per verificare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo, specifici per il lotto dei reagenti per PCR, sono memorizzati nel database (Controls) Esse possono essere visionate e approvate dall'utente, selezionando la calibrazione di interesse e la sezione "View chart" (Visualizza grafico).

I risultati del Positive Control e del Negative Control scadono **dopo 15 giorni**.

Il programma con **MyGenius PRO Software** elabora i risultati del Positive Control e del Negative Control e genera i grafici dei controlli. I risultati vengono analizzati dal software per garantire che le prestazioni del sistema rientrino nei criteri di accettazione, riportati nei tracciati dei grafici di controllo. Consultare il manuale di istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

NOTA

Se il risultato del Positive Control o del Negative Control non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" (Controlli) appare il messaggio "Error" (Errore). In tal caso, i risultati non possono essere approvati e si devono ripetere le sessioni del Positive Control o del Negative Control.

NOTA

Se il risultato del Positive Control o del Negative Control non è valido e i campioni erano inclusi nella medesima sessione, non è possibile approvare i campioni. In questo caso, dopo la ripetizione dei controlli, è necessario interpretare e approvare tutti i risultati (vedere la sezione dedicata ai risultati dei campioni).

Validazione dei risultati del campione

Il programma **ELITe InGenius Software** interpreta i risultati della PCR per il target (canale **BKV**) e per l'Internal Control (canale **IC**) con i parametri degli Assay Protocols **BKV ELITe_My_U_IU_200_100 e BKV ELITe_My_U_cmL_200_100, BKV ELITe_My_PL_IU_200_100 e BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100**. I valori di Ct del target risultanti vengono convertiti in concentrazione.

I risultati vengono riportati nella schermata "Results".

I risultati del campione possono essere approvati quando sono vere le tre condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Curva di calibrazione	**Stato**
BKV Q-PCR Standard	APPROVED (APPROVATO)
2) Positive Control	**Stato**
BKV Positive Control	APPROVED (APPROVATO)
3) Negative Control	**Stato**
BKV Negative Control	APPROVED (APPROVATO)

I risultati dei campioni vengono interpretati automaticamente dal programma mediante **MyGenius PRO Software** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol se i risultati della calibrazione e dei controlli correlati sono stati approvati. campioni non sono presenti calibrazioni e controlli validi e approvati, i campioni non possono essere interpretati e approvati: in questo caso, le calibrazioni e i controlli devono essere approvati e successivamente ogni campione deve essere interpretato nella sezione "sample list" (elenco campioni) ed approvato nella sezione "Results" (Risultati) utilizzando gli appositi pulsanti.

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema indica una combinazione dei seguenti messaggi specificando se sono stati rilevati i DNA dei patogeni.

Risultato di una sessione sul campione	**Interpretazione**
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES / ML OR IU/ML (BKV:DNA RILEVATO, QUANTITÀ PARI A "XXX" COPIE/ML O IU/ML)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione entro l'intervallo di misurazione del saggio, alla concentrazione indicata.
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BELOW "LLOQ" COPIES / ML OR IU/ML (BKV:DNA RILEVATO, QUANTITÀ MINORE DI "LLOQ" COPIE/ML O IU/ML)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione, la sua concentrazione è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio.
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND "ULOQ" COPIES / ML OR IU/ML (BKV:DNA RILEVATO, QUANTITÀ MAGGIORE DI "ULOQ" COPIE/ML O IU/ML)	Il **DNA di BKV è stato rilevato** nel campione, la sua concentrazione è oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
BKV:DNA NOT DETECTED OR BELOW "LOD" COPIES / ML OR IU/ML (BKV:DNA NON RILEVATO O MINORE DI "LOD" COPIE/ML O IU/ML)	Il **DNA di BKV non è stato rilevato** nel campione**.** Il campione è negativo per il DNA di BKV oppure la sua concentrazione è al di sotto del Limite di Rilevabilità (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample (Non valido – Ripetere il campione)	**Risultato del saggio non valido** per un errore dell'Internal Control (dovuto per esempio a errata estrazione o effetto carryover degli inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che hanno riportato il risultato "Invalid - Retest Sample" (Non valido - Ripetere il campione): in questo caso, il DNA dell'Internal Control non è stato rilevato in modo efficace, probabilmente a causa di problemi nella fase di campionamento, pretrattamento, estrazione o PCR (ad es. campionamento non corretto, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati. In questo caso il campione deve essere nuovamente analizzato partendo dall'estrazione di un nuovo campione.

I campioni segnalati come “BKV: DNA NOT DETECTED OR BELOW “LOD” COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA NON RILEVATO O MINORE DI “LOD” COPIE/ML O IU/ML) sono idonei per l’analisi, ma non è stato possibile rilevare il BKV. In questo caso, il campione può essere negativo per il DNA del BKV, oppure il DNA del BKV è presente in una concentrazione inferiore rispetto al limite di rilevabilità del saggio (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV a una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità (e al limite di quantificazione inferiore) del saggio, se rilevati, vengono segnalati come “BKV: DNA DETECTED, QUANTITY BELOW “LLOQ” COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA RILEVATO, QUANTITÀ MINORE DI “LLOQ” COPIE/ML O IU/ML) (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV che rientrano nell’intervallo di misurazione lineare vengono rilevati e segnalati come “BKV: DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA RILEVATO, QUANTITÀ PARI A “XXX” COPIE/ML O IU/ML) (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30).

I campioni positivi per il DNA del BKV che sono al di sopra del limite superiore di quantificazione vengono segnalati come “BKV: DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND “ULOQ” COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA RILEVATO, QUANTITÀ MAGGIORE DI “ULOQ” COPIE/ML O IU/ML) e non sono idonei per la quantificazione (vedere 12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o della PCR e analizzato nuovamente per ottenere risultati che rientrino nell'intervallo di misurazione lineare del saggio.

NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche ed esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

I risultati del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Results Display) da personale avente la qualifica di “Administrator” o “Analyst”, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra “Results Display” è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di “Sample Report” e “Track Report”.

Report con i risultati del campione

I risultati del campione vengono memorizzati nel database e possono essere esportati sotto forma di “Sample Report” e “Track Report”.

Il “Details Report” mostra i dettagli dei risultati per campione selezionato (SID).

Il “Summary Report” mostra i risultati dell'interpretazione per tutti i campioni selezionati (SID).

Sia il “Details Report” che il "Summary Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO

12.1 Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) del saggio in associazione alle matrici di plasma EDTA, urina e sangue intero EDTA è stato determinato sugli strumenti ELITe InGenius o ELITe BeGenius analizzando un pannello di matrici negative al BKV positivizzate con materiale di riferimento del BKV (1° Standard Internazionale dell’OMS per il DNA del virus BK, codice NIBSC 14/212, Regno Unito). È stata eseguita l'analisi di regressione con modello Probit sui risultati ed è stato stimato il LoD come concentrazione corrispondente a una probabilità del 95% di un risultato positivo.

I risultati per entrambe le matrici sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 10 Limite di Rilevabilità con ELITe InGenius (IU/mL)

Matrice	LoD	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Urina	142 IU/mL	110 IU/mL	222 IU/mL
Plasma	215 IU/mL	168 IU/mL	319 IU/mL
Sangue intero	538 IU/mL	337 IU/mL	1128 IU/mL

La sensibilità analitica espressa in copie/mL è stata calcolata applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato nel paragrafo 11.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 27. 12.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 37

Si riporta di seguito la sensibilità analitica espressa in copie/mL.

Tabella 11 Limite di Rilevabilità (LoD) con ELITe InGenius (copie/mL)

Matrice	LoD	Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Urina	89 copie/mL	69 copie/mL	139 copie/mL
Plasma	165 copie/mL	129 copie/mL	245 copie/mL
Sangue intero	117 copie/mL	73 copie/mL	245 copie/mL

Il valore LoD calcolato è stato verificato per ciascuna matrice analizzando su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius un pool di ciascuna matrice inoculato con materiale di riferimento certificato di BKV alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti hanno confermato la concentrazione dichiarata per il target del prodotto BKV ELITe MGB Kit sia su ELITe InGenius che su ELITe BeGenius per ciascuna matrice.

I valori di LoD calcolati su ELITe InGenius e matrici di urina e plasma sono validi anche per MyGenius PRO.

12.2 Inclusività: Efficienza di rilevazione su differenti ceppi e isolati

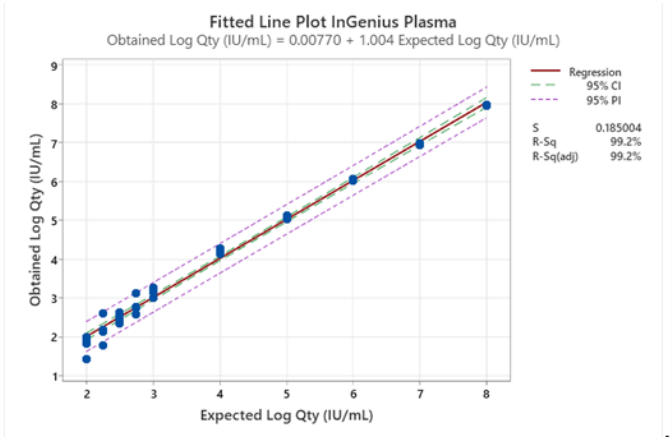
L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione su genotipi differenti di BKV è stata valutata mediante analisi in silico delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha dimostrato la conservazione della sequenza e l'assenza di mutazioni significative. Pertanto, ci si aspetta un rilevamento efficiente per la maggior parte dei ceppi o isolati.

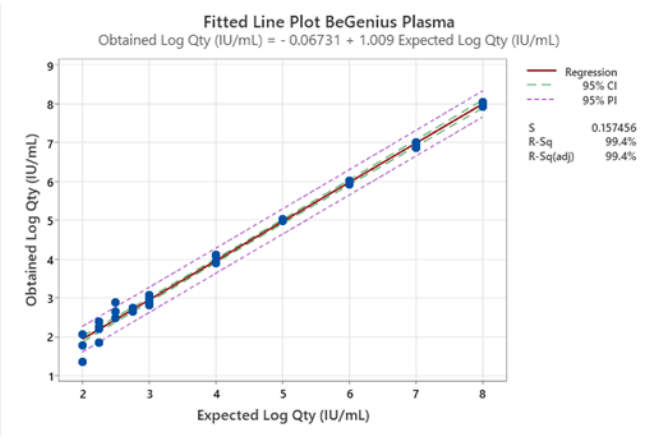
12.3 Intervallo di misurazione lineare e limiti di quantificazione

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato determinato in associazione alle matrici Plasma EDTA, Urina e Sangue Intero EDTA su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** utilizzando un pannello di diluizioni di materiale di riferimento per BKV (BKV Virus Culture Fluid, Heat inactivated, ZeptoMetrix) in matrici negative per il DNA di BKV.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Plasma:





L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per il Plasma EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico indicato nel paragrafo 12.9 . pagina 37

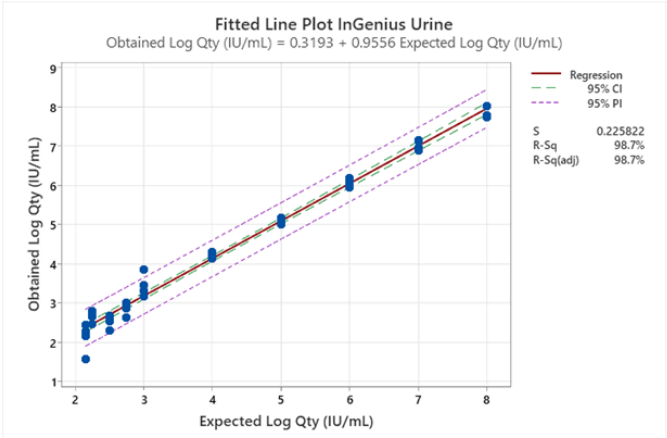
I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

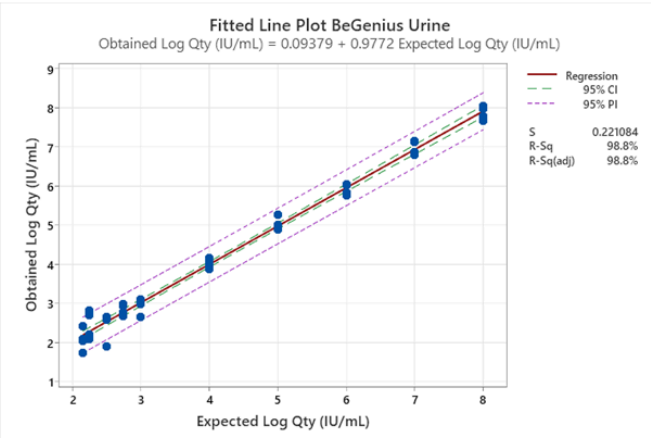
Tabella 12 Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	215	130.000.000
copie/mL	165	100.000.000

L'intervallo di misurazione lineare determinato per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius e la matrice di plasma è valido anche per MyGenius PRO.

Urine:





L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL per le urine viene calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo 12.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 37

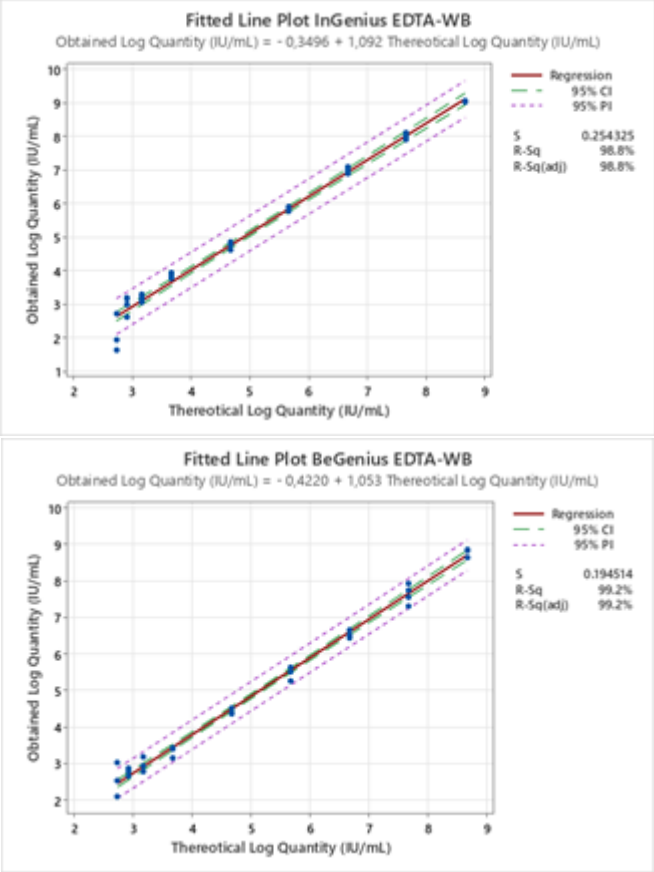
I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 13 Intervallo di misurazione lineare per campioni di urine con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	142	160.000.000
copie/mL	89	100.000.000

L'intervallo di misurazione lineare determinato per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius e la matrice delle urine è valido anche per MyGenius PRO.

Sangue intero



L'intervallo di misurazione lineare in IU/mL per EDTA-WB è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico indicato nel paragrafo 12.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 37

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 14 Intervallo di misurazione lineare per campioni EDTA-WB con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

Unit	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	538	460000000
copie/mL	117	100.000.000

12.4 Incertezza della curva dello standard

Il valore di incertezza della curva dello Standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) delle quantificazioni di tutti i livelli e moltiplicando per il fattore di copertura k = 2 (incertezza combinata estesa) ed è pari a 0,2146 Log copie/reazione.

Tabella 15

Livelli della curva standard	Teorico	Misurata	Imprecisio-ne	SD	Incertezza combinata estesa
	Log copie/reaz.	Log copie/reaz.			
BKV Q - PCR Standard 10^5	5,0000	4,9845	0,0155	0,0417	0,2146
BKV Q - PCR Standard 10^4	4,0000	4,0022	-0,0022	0,0349	
BKV Q - PCR Standard 10^3	3,0000	3,0051	-0,0051	0,0500	
BKV Q - PCR Standard 10^2	2,0000	2,0471	-0,0471	0,0778	

12.5 Microrganismi potenzialmente interferenti Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con altri organismi non intenzionali del prodotto BKV ELITe MGB Kit è stata valutata mediante analisi in silico delle sequenze disponibili nel database dei nucleotidi EBI ENA. L'analisi non ha evidenziato alcuna omologia significativa con altri organismi non intenzionali (virus, batteri e funghi). Pertanto, non sono previste cross-reattività o interferenze.

12.6 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di sostanze interferenti (endogene ed esogene) che potrebbero essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante l'analisi di un pannello di sostanze a concentrazioni rilevanti in campioni positivi per il BKV.

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 16 Plasma

Sostanza	Pos./Rep.	Esito
Azitromicina	5/5	Nessuna interferenza
Ganciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Ribavirina	5/5	Nessuna interferenza
Abacavir	5/5	Nessuna interferenza
Cidofovir	5/5	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	5/5	Nessuna interferenza
Bilirubina	5/5	Nessuna interferenza
EDTA	5/5	Nessuna interferenza
Eparina	5/5	Nessuna interferenza

Le sostanze analizzate non interferiscono con l'amplificazione dell'BKV o dell'Internal Control.

Tabella 17 Urine

Sostanza	Pos./Rep.	Esito
Azitromicina	5/5	Nessuna interferenza
Bilirubina	5/5	Nessuna interferenza

Tabella 17 Urine (segue)

Sostanza	Pos./Rep.	Esito
Sangue intero	5/5	Nessuna interferenza
Fenazopiridina cloridrato	5/5	Nessuna interferenza

Le sostanze analizzate non interferiscono con l'amplificazione dell'BKV o dell'Internal Control.

Tabella 18 Sangue intero

Sostanza	Pos./Rep.	Esito
Emolisi alta	5/5	Nessuna interferenza
Emolisi moderata	5/5	Nessuna interferenza
Emolosi lieve	5/5	Nessuna interferenza
Trigliceridi	5/5	Nessuna interferenza
Bilirubina	5/5	Nessuna interferenza
Eparina	5/5	Nessuna interferenza
Ganciclovir	5/5	Nessuna interferenza
Cidofovir	5/5	Nessuna interferenza
Ribavirina	5/5	Nessuna interferenza
Azitromicina	5/5	Nessuna interferenza
Vancomicina	5/5	Nessuna interferenza
Amoxicillina	5/5	Nessuna interferenza
Fluconazolo	5/5	Nessuna interferenza
Idrocortisone	5/5	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	5/5	Nessuna interferenza

Le sostanze analizzate non interferiscono con l'amplificazione dell'BKV o dell'Internal Control.

12.7 Ripetibilità

La ripetibilità Intra-Sessione e Inter-Sessione del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius ed ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma raccolto in EDTA, contenente un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per BKV (1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus BKV, codice NIBSC 14/212, Regno Unito).

Un esempio dei risultati di ripetibilità intra-sessione (in un giorno) è illustrato nelle tabelle seguenti.

Tabella 19 Ripetibilità intra-sessione con ELITe InGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,66	0,45	0,82	100%
10 x LoD	8	34,88	0,56	1,33	100%

Tabella 20 Ripetibilità intra-sessione con ELITe BeGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	37,09	0,52	1,40	100%
10 x LoD	8	35,45	0,31	0,88	100%

Un esempio dei risultati di ripetibilità Inter-Sessione è riportato nelle tabelle seguenti.

Tabella 21 Ripetibilità inter-sessione con ELITe InGenius

Campione	BKV- giorni 1-2				
	N	Media Ct	SD Ct	% CV Ct	% di Concordanza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,36	0,52	1,43	100%
10 x LoD	16	34,40	0,68	1,96	100%

Tabella 22 Ripetibilità inter-sessione con ELITe BeGenius

Campione	BKV - giorni 1-2				
	N	Media Ct	SD Ct	% CV Ct	% di Concordanza
Negativi	16	-	-	-	100%
3 x LoD	16	36,68	0,71	1,94	100%
10 x LoD	16	34,98	0,55	1,57	100%

Nel test di Ripetibilità, il prodotto BKV ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa con una % CV inferiore al 5%.

12.8 Riproducibilità

La Riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITe BeGenius ed ELITe InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di plasma raccolti in EDTA negativi o positivizzati con BKV (1° Standard Internazionale per il DNA del virus BKV, codice NIBSCe 14/212, Regno Unito).

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-strumento (su due strumenti).

Tabella 23 Riproducibilità inter-strumento con ELITe InGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,72	0,30	0,82	100%
10 x LoD	8	30,89	0,41	1,33	100%

Tabella 24 Riproducibilità inter-strumento con ELITe BeGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,87	0,58	1,56	100%
10 x LoD	8	34,86	0,25	0,72	100%

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi della riproducibilità inter-lotto (su due lotti).

Tabella 25 Riproducibilità inter-lotto con ELITe InGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,94	0,36	0,82	100%
10 x LoD	8	35,07	0,28	1,33	100%

Tabella 26 Riproducibilità inter-lotto con ELITe BeGenius

Campione	BKV				
	N	Media Ct	SD	% CV	% di Concordanza
Negativi	8	-	-	-	100%
3 x LoD	8	36,81	0,66	1,56	100%
10 x LoD	8	35,01	0,41	0,72	100%

Nel test di Riproducibilità, il prodotto BKV ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct con una % CV inferiore al 5%.

12.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi da copie/mL in Unità Internazionali (IU)/mL è stato calcolato per ciascuna matrice utilizzando il materiale di riferimento calibrato certificato del “1° Standard Internazionale dell’OMS per il DNA del virus BKV” (codice NIBSC 14/212, Regno Unito).

I risultati per ciascuna matrice sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 27 Fattore di conversione alle Unità Internazionali

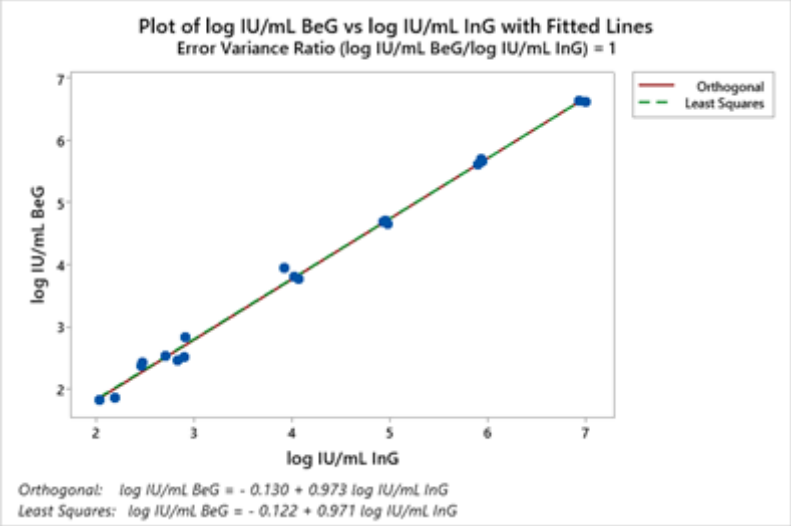
Matrice	Fc (IU/copie)
Plasma	1,3
Urine	1,6
Sangue intero	4,6

I fattori di conversione in Unità Internazionali (IU) calcolati per ELITe InGenius e per le matrici di urina e plasma sono validi anche per MyGenius PRO.

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi in Unità Internazionali/mL a partire da copie/mL è stato verificato sugli strumenti **ELITE InGenius** ed **ELITe BeGenius** utilizzando il materiale di riferimento calibrato certificato (1° Standard Internazionale dell'OMS, NIBSC). I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare allo scopo di calcolare la correlazione.

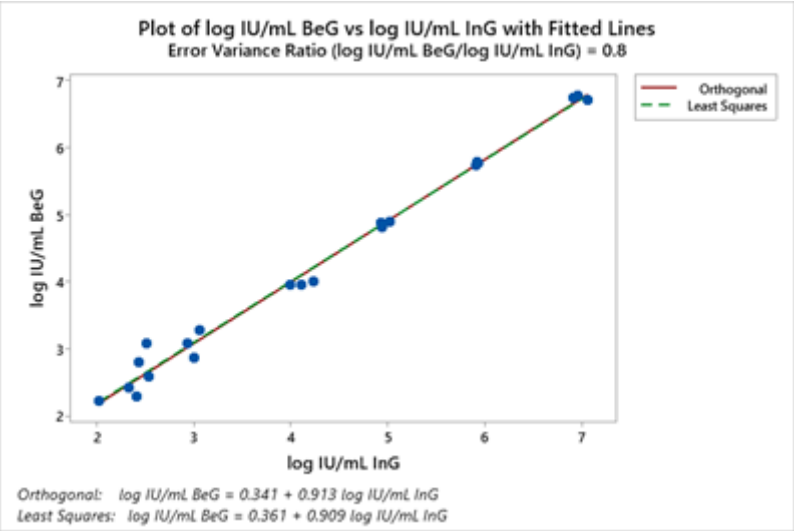
I risultati per ciascuna matrice sono riportati nei paragrafi seguenti.

Plasma



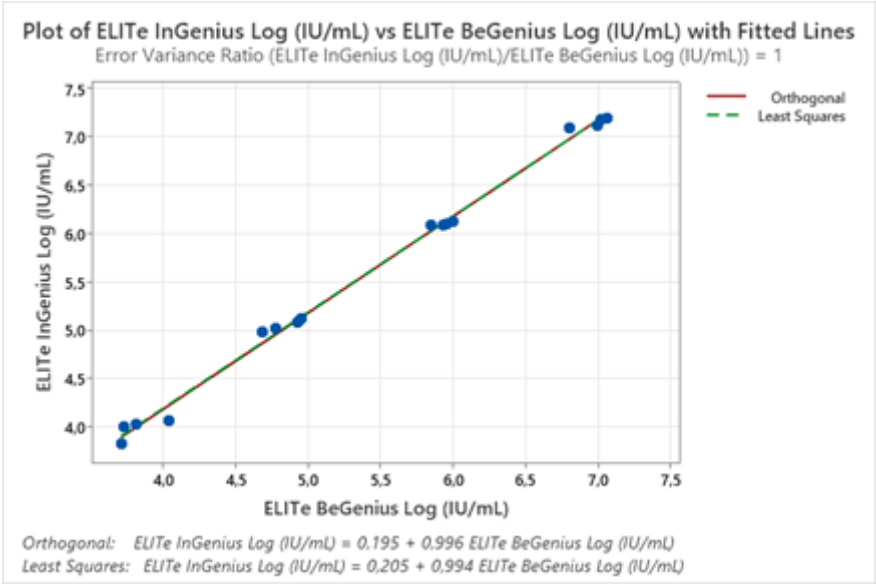
L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0,130 (intervallo di confidenza del 95%: -0,263 – 0,002) e una pendenza pari a 0,973 (intervallo di confidenza del 95%: 0,944 - 1,001).

Urine:



L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0,341 (intervallo di confidenza del 95%: 0,152 – 0,529) e una pendenza pari a 0,913 (intervallo di confidenza del 95%: 0,872 - 0,954).

Sangue intero



L'analisi di regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0,195 (intervallo di confidenza al 95%: 0,0174; 0,3733) e una pendenza pari a 0,996 (intervallo di confidenza al 95%: 0,9639; 1,0284).

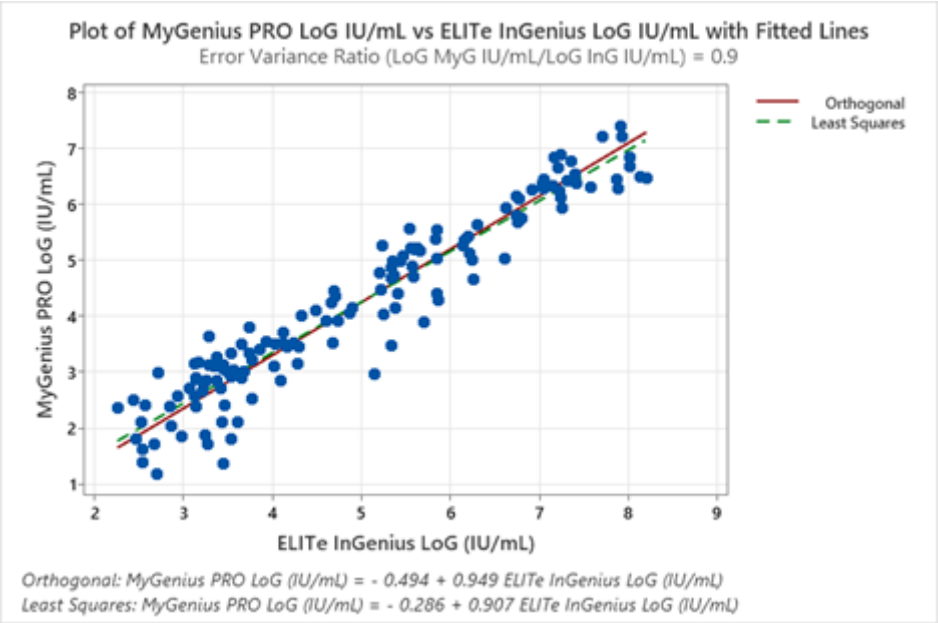
12.10 MyGenius PRO: correlazione dei metodi

L'analisi di correlazione dei diversi metodi è stata valutata su MyGenius PRO analizzando campioni di BKV provenienti da pazienti la cui carica virale rientrava nell'intervallo di misurazione dei metodi di riferimento (ELITe InGenius). I risultati ottenuti con MyGenius PRO e il metodo di riferimento (ELITe InGenius) sono stati analizzati mediante la regressione lineare e la regressione di Deming.

Urina

Lo studio di correlazione è stato condotto in un unico sito su 137 campioni clinici di urine certificati positivi al DNA del BKV o inoculati con materiale di riferimento utilizzando ELITe InGenius come comparatore.

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.

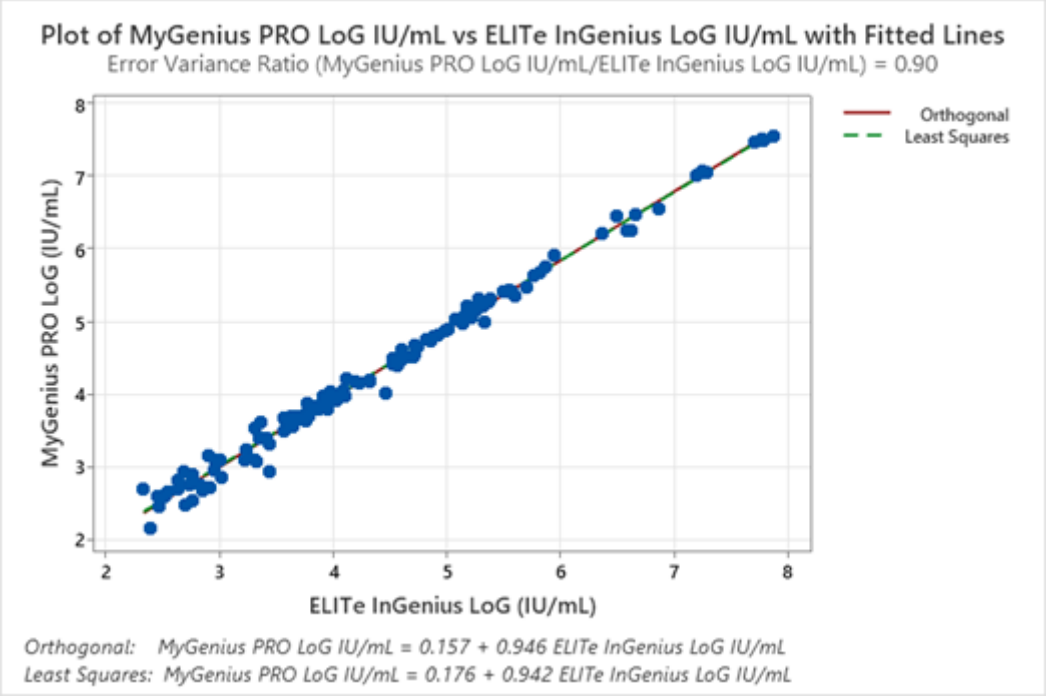


L'analisi di regressione di Deming ha generato un'intercetta pari a -0,494 (95% CI -0,7502; -0,2371) e una pendenza pari a 0,949 (95% CI: 0,8996; 0,9982). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,913.

Plasma

Lo studio di correlazione è stato condotto in un unico sito su 122 campioni clinici di plasma certificato positivo al DNA di BKV o inoculato con materiale di riferimento utilizzando ELITe InGenius come comparatore.

I risultati sono sintetizzati nelle figure sottostanti.



L'analisi di regressione Deming ha generato un'intercetta pari a 0,1573 (intervallo di confidenza al 95%: 0,0829; 0,2316) e una pendenza pari a 0,9464 (intervallo di confidenza al 95%: 0,9304; 0,9624). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,991.

12.11 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione con **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius,** analizzando campioni clinici, certificati negativi o presunti negativi per il DNA di BKV. Poiché **ELITe BeGenius** ha dimostrato di fornire prestazioni analitiche equivalenti a quelle di **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio su entrambi gli strumenti sono considerate anch'esse equivalenti. Pertanto, la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius e viceversa.

Poiché **MyGenius PRO** ha dimostrato di fornire prestazioni analitiche equivalenti a quelle di ELITe InGenius in associazione alla matrice di urina e alla matrice di plasma, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti con urina e plasma sono da considerarsi equivalenti. Pertanto, la specificità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è applicabile anche a MyGenius PRO.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 28 Specificità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Plasma raccolto in EDTA , negativo per DNA di BKV	79	3	76	**96,2%**
Urine raccolte senza conservanti, negative per DNA di BKV	68	0	68	**100%**
Sangue intero raccolto in EDTA, negativo per il DNA di BKV	80	0	80	100%

Il valore di cut-off del Ct per il Controllo Interno (IC) è fissato a 35 per i campioni di plasma raccolto in EDTA e di urina raccolta senza conservanti, quando analizzati con ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO.

Il valore di cut-off del Ct per il Controllo Interno (IC) è fissato a 35 per i campioni di sangue intero raccolto in EDTA, quando analizzati con ELITe InGenius ed ELITe BeGenius.

12.12 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con **ELITe InGenius** o **ELITe BeGenius** , analizzando campioni clinici certificati positivi per il DNA di BKV o positivizzati con materiale di riferimento. Poiché **ELITe BeGenius** ha dimostrato di fornire prestazioni analitiche equivalenti a quelle di **ELITe InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio su entrambi gli strumenti sono considerate anch'esse equivalenti. Pertanto, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è applicabile anche a ELITe BeGenius e viceversa.

Poiché **MyGenius PRO** ha dimostrato di fornire prestazioni analitiche equivalenti a quelle di ELITe InGenius in associazione a matrice di urina e matrice di plasma, anche le prestazioni diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti con urina e plasma sono da considerarsi equivalenti. Pertanto, la sensibilità diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITe InGenius è applicabile anche a MyGenius PRO.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 29 Sensibilità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Plasma raccolto in EDTA e positivo per il DNA di BKV	34	34	0	100%
Plasma raccolto in EDTA e positivizzato per BKV	24	24	0	
Totale	58	58	0	
Urine senza conservanti, positive per il DNA di BKV	67	67	0	100%

Tabella 29 Sensibilità diagnostica (segue)

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Sangue intero raccolto in EDTA e positivo per il DNA di BKV	52	52	0	100%
Sangue intero raccolto in EDTA e positivizzato per BKV	28	28	0	

NOTA

I dati e i risultati completi dei test eseguiti per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico del prodotto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP175PLD.

13 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

13.1 Campioni

I seguenti campioni e metodi di estrazione dell'acido nucleico sono convalidati per l'uso con il prodotto **BKV ELITe MGB Kit** utilizzando la piattaforma ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tabella 30

Tipo di campione	Kit/Metodo di estrazione	Protocollo	Volume di input (µL)	Volume di eluizione (µL)	Volume minimo nella provetta primaria (µL)	Istruzioni specifiche
Plasma	ELITe GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	Aggiungere 10 µL/campione di CPE alla soluzione IC + Carrier

13.2 Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo al fine di evitare problemi di inibizione e la possibilità di frequenti risultati non validi.

La presenza di un'alta quantità di DNA genomico umano nel DNA estratto dal campione può inibire la reazione di amplificazione.

Non sono disponibili dati riguardanti l'inibizione conseguente alla somministrazione di antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

Non utilizzare campioni raccolti in eparina, che è un noto inibitore di trascrizione inversa e PCR.

13.3 Controlli di amplificazione

È obbligatorio convalidare ogni sessione di amplificazione con una reazione del Negative Control e una reazione del Positive Control.

Per il Negative Control, utilizzare acqua di grado biologico molecolare (non fornita con questo kit) aggiunta alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il Positive Control, utilizzare il prodotto **BKV - ELITePositive Control** o il prodotto **BKV - ELITe Standard**.

13.4 Controlli di qualità

Si raccomanda la verifica della procedura di estrazione e della PCR. Si possono utilizzare campioni archiviati o materiale di riferimento certificato. Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e federali.

14 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

14.1 Preparazione di una sessione di amplificazione real time

(da effettuare nell'area destinata ai prodotti della reazione di amplificazione/rilevazione dell'amplificazione)

Quando si utilizza lo strumento **7300 Real-Time PCR System**.

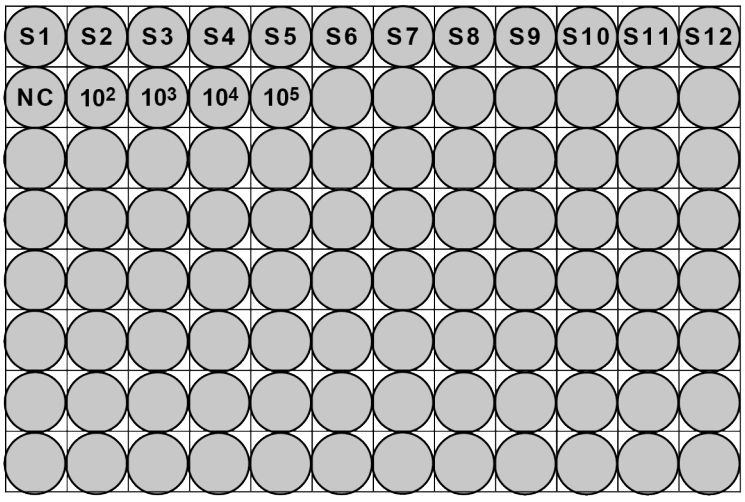
Prima di iniziare la sessione, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il termociclatore in tempo reale, accendere il computer, avviare il software dedicato e aprire una sessione di “quantificazione assoluta”;
- Impostare (in Detector Manager) il “detector” per la sonda per BKV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "BKV";
- impostare (Detector Manager) il “rilevatore” per la sonda dell’Internal Control con il “reporter” = “VIC” (AP525 è analogo a VIC) e il “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e chiamarlo “IC”;
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (in Well Inspector) il “detector” (tipo di fluorescenza da misurare), il “passive reference” = “ROX” (viene utilizzato AP593 invece di ROX, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo di amplificazione negativo, controllo di amplificazione positivo o standard con la relativa quantità nota). Riportare questi dati sul**Work Sheet**(Scheda di lavoro) accluso in fondo al presente manuale oppure stampare le impostazioni della micropiastra. Attenersi rigorosamente al**Work Sheet**durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

NOTA

Per determinare il titolo del DNA nel campione iniziale, impostare una serie di reazioni con il componente**Q - PCR Standards**(10^5copie, 10^4copie, 10^3copie, 10^2copie) per ottenere la**curva standard**.

Di seguito viene illustrato, tramite un esempio, come impostare l'analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: S1-S12: Campioni da analizzare;**NC**:Negative Controldi amplificazione;

10^2: 10^2copie standard;**10^3**: 10^3copie standard;**10^4**: 10^4copie standard;**10^5**: 10^5copie standard.

Con l'ausilio della documentazione fornita con lo strumento, impostare sul software specifico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del**ciclo termico**:

- aggiungere alla fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di**estensionea72°C**;

NOTA

L'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 60 °C.

- modificare il timing come indicato nella tabella**"Thermalcycle"**;
- impostare il numero di cicli su**45**;
- impostare il volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione (“Sample volume”) su**30µL**;

Tabella 31 Ciclo termico 7300

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

Quando si utilizza una piattaforma**7500Fast DxReal-Time PCRInstrument.**

Prima di iniziare la sessione, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- Accendere il termociclatore della Real-Time, accendere il computer, avviare il software dedicato e aprire una sessione di “quantificazione assoluta” e impostare la modalità “Run mode: Fast 7500”.
- Impostare (in Detector Manager) il “detector” per la sonda per BKV con il “reporter” = “FAM” e il “quencher” = “none” (non fluorescente) e chiamarlo “BKV”.
- Impostare (in Detector Manager) il “detector” per la sonda dell’Internal Control con il “reporter” = “VIC” (AP525 è simile a VIC) e il “quencher” = ‘none’ (non fluorescente) e chiamarlo “IC”.
- Per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (in Well Inspector) il “detector” (tipo di fluorescenza da misurare), il “passive reference” = "Cy5" (viene utilizzato AP593 invece di "Cy5", normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo di amplificazione negativo, controllo di amplificazione positivo o standard con la relativa quantità nota). Riportare questi dati sul**Work Sheet**(Scheda di lavoro) accluso in fondo al presente manuale oppure stampare le impostazioni della micropiastra. Attenersi rigorosamente al**Work Sheet**durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

NOTA

Per determinare il titolo del DNA nel campione iniziale, impostare una serie di reazioni con il componente Q-PCRStandards(10^5copie, 10^4copie, 10^3copie, 10^2copie) per ottenere la**curva Standard.**

Nel paragrafo precedente, che descrive la procedura per lo strumento**7300 Real Time PCR System**, è illustrata, a titolo esemplificativo, la configurazione dell'analisi quantitativa di 12 campioni.

Con l'ausilio della documentazione fornita con lo strumento, impostare sul software specifico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del**ciclo termico**:

- Aggiungere alla fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di**estensionea72°C**.

NOTA

L'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 60 °C.

- Modificare il timing come indicato nella tabella**"Thermal cycle"cycle"**.
- Impostare il numero di cicli su**45**.
- Impostare il volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") su**30µL**.
- Opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare la temperatura da**40 °C**a**80 °C**

.

Tabella 32 Ciclo termico 7500

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

14.2 Impostazioni della sessione per la Real-Time PCR

(Eseguita dallo strumento **ELITe GALAXY**)

Per eseguire la configurazione della sessione PCR:

- scongelare le provette di **Q-PCR Mix** necessarie per la sessione (ciascuna provetta è sufficiente per **25 reazioni**)
- scongelare le provette di **Positive Control** (analisi qualitativa: rilevazione di DNA estratto) o le provette di **Q – PCR Standard** (analisi quantitativa: quantificazione di DNA estratto)
- agitare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo
- preparare il **Negative Control** (non fornito) come da istruzioni d'uso dello strumento
- preparare una **Q-PCR microplate**. Maneggiarla con guanti senza polvere e non danneggiare i pozzetti.

NOTA

Per preparare la PCR sullo strumento **ELITe GALAXY**, caricare la micropiastra di eluizione contenente i campioni di DNA estratti, i reagenti e la **Q-PCR microplate** come indicato nel manuale d'uso dello strumento e seguire i passaggi indicati sull'interfaccia grafica utente.

Lo strumento esegue automaticamente la configurazione della PCR dispensando in ciascun pozzetto della **Q-PCR microplate**:

- **20 µL** di **Q-PCR Mix**
- **20 µL** di **DNA estratto** / **Q-PCR Standard** / **Controlli**

NOTA

Se non viene utilizzata tutta la Q—PCR Mix, conservare il volume rimanente al buio a -20 °C per non più di un mese. Congelare e scongelare la Q—PCR Mix per un massimo di **5 VOLTE**.

Una volta completata la configurazione della PCR da parte dello strumento:

- sigillare la **Q-PCR microplate** con un sigillo ottico
- trasferire la **Q-PCR microplate** nella piattaforma **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e avviare la PCR. Salvare il file di esecuzione con un nome unico e riconoscibile (ad esempio “anno-mese-giorno-TARGET-EGSpA”).

NOTA

Al termine della PCR, la **Q-PCR microplate**deve essere smaltita nel rispetto di tutte le normative legali e ambientali. Per evitare la fuoriuscita dei prodotti della PCR, **non si deve rimuovere il sigillo ottico dalla Q-PCR microplate**.

14.3 Impostazioni generali per l'analisi dei risultati

Prima di eseguire l'analisi, fare riferimento alla documentazione dello strumento per:

- impostare manualmente l’intervallo di calcolo per la **Baseline** (livello di fluorescenza di fondo) dal ciclo 6 al ciclo 15 (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle);

NOTA

La fluorescenza FAM della sonda BKV in un campione positivo ad alta concentrazione di BKV potrebbe cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso, abbassare l’intervallo di calcolo della**Baseline**al ciclo in cui la fluorescenza FAM del campione comincia a crescere (Results > Component).

- impostare manualmente le soglie per i rilevatori di fluorescenza (“detector”):

impostare il rilevatore FAM della**soglia**“BKV” a**0,2**;

impostare il rilevatore VIC della**soglia**“IC” a**0,1**;

Il ciclo PCR in cui il livello di fluorescenza di un campione raggiunge il valore**soglia**determina il**ciclo soglia (Ct)** per quel campione.

Il software dello strumento automaticamente analizza i livelli di fluorescenza nei controlli, negli standard e nelle reazioni dei campioni e calcola i valori Ct.

14.4 Analisi qualitativa dei risultati

Il valore **Ct** di BKV del **Positive Control** viene utilizzato per validare la PCR. La sessione di PCR è valida quando i risultati ottenuti sono come quelli descritti nella seguente tabella:

Tabella 33

Reazione del Positive Control positiva, Rivelatore FAM di “BKV”	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct ≤25	POSITIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o**Ct Undetermined** (Ct Non determinato) per il Rilevatore FAM di “BKV”, la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di PCR. Ciò potrebbe indicare una contaminazione che potrebbe portare a risultati errati e falsi positivi.

NOTA

Quando il prodotto viene utilizzato per la quantificazione del DNA di BKV, vengono impostate le reazioni del**Q - PCR Standard**al posto della reazione del**Positive Control**. In questo caso, convalidare l’amplificazione e il rilevamento facendo riferimento alla reazione di amplificazione del**Q - PCR Standard 10^5**(**Ct ≤ 25**).

Per convalidare la PCR viene utilizzato il valore Ct di BKV del**Negative Control**. La sessione di PCR è valida quando i risultati ottenuti sono come quelli descritti nella seguente tabella:

Tabella 34

Reazione del Negative Control negativa, Rilevatore FAM di "BKV"	Risultato del saggio	Amplificazione/rilevazione
Ct indeterminato	NEGATIVO	CORRETTO

Se il risultato della reazione di amplificazione del**Negative control**è diverso da**CtUndetermined** (Ct Non determinato) per il Rilevatore FAM di “BKV”, la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di PCR. Questo potrebbe indicare che si è verificato un problema nella fase di amplificazione (contaminazione) che potrebbe portare a risultati non corretti e falsi positivi.

Il valore**Ct**di BKV in ciascun campione viene utilizzato per la rilevazione del DNA target mentre il valore**Ct**dell’Internal Control viene utilizzato per validare l’estrazione, la PCR e la rilevazione.

NOTA

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

I possibili risultati dei campioni (Results > Report) sono descritti nella seguente tabella:

Tabella 35

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di BKV
Rilevatore FAM "BKV"	Rilevatore VIC "IC"			
Ct indeterminato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Non idoneo	Non valido	-
	Ct ≤35	Idoneo	Valido, negativo	NON RILEVATO
Ct determinato	Ct > 35 o Ct indeterminato	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤35	Idoneo	Valido, positivo	RILEVATO

Un risultato della reazione di amplificazione di un campione che ha**CtUndetermined** (Ct Non determinato) per BKV e**Ct > 35**o**CtUndetermined** (Ct Non determinato) per l’Internal Control non è valido e indica un problema durante l’estrazione degli acidi nucleici o la PCR (per es. degradazione del DNA del campione, perdita del DNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nel DNA estratto, amplificazione non efficiente o nulla), che potrebbe portare a risultati non corretti. Il campione non è idoneo all'analisi e il saggio deve essere ripetuto ripartendo dall'estrazione degli acidi nucleici di un nuovo campione.

Un risultato di**Ct Undetermined**(Ct Non determinato) per BKV e**Ct ≤ 35**per l’Internal Control è un risultato valido e indica che il DNA di BKV non è stato rilevato nel campione. Il campione potrebbe non contenere DNA del BKV oppure contenerne in concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità del prodotto (vedere15 Caratteristiche delle prestazioni pagina 49). Un risultato di**Ct Determined (Ct ≤ 45)** (Ct Determinato, Ct ≤ 45) per BKV e**Ct>35**, **Ct Undetermined**(Ct Non determinato) o**Ct ≤ 35**per l’Internal Control (IC) è un risultato valido e indica che il DNA di BKV è stato rilevato nel campione.

NOTA

Nel caso di Ct Determinato per BKV e Ct > 35 o Non determinato per L’Internal Control (IC), la reazione di amplificazione a bassa efficienza dell’IC potrebbe essere stata annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza del DNA di BKV. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

NOTA
I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche ed esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

14.5 Analisi quantitativa dei risultati

Dopo l'analisi qualitativa dei risultati, è possibile eseguire l'analisi quantitativa dei campioni positivi.

Nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR Standard**, i valori **Ct** del BKV vengono utilizzati per calcolare la **curva Standard** (Results > Standard Curve) per la sessione di amplificazione, al fine di convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Tabella 36

Curva Standard, Rilevatore FAM "BKV"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione/rilevazione
Coefficiente di correlazione (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETTO

Se il valore del**Correlationcoefficient(R2)**(Coefficiente di correlazione R2) non rientra nei limiti, la sessione non è valida e deve essere ripetuta partendo dalla fase di amplificazione. Questo potrebbe indicare un problema durante la fase di amplificazione o di rilevazione (per esempio: dispensazione errata o degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico o cross-contaminazione) che possono causare risultati non corretti.

Tabella 37

Risultato campione delrivelatore FAM "BKV"	copie di BKV per reazione
Quantità > 1×10^6	MAGGIORE DI 1×10^6
$1 \times 10^1 \leq$ Quantità $\leq 1 \times 10^6$	= Quantità
Quantità < 1×10^1	MINORE DI 10

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun campione (Results > Report) vengono utilizzati per calcolare le copie di BKV presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

Tabella 38

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

dove:

Veè il volume totale**in µL**del campione di DNA estratto (volume di eluizione)

Quantità è il numero di**copie/reazioni**del campione calcolato dal software dello strumento (risultato PCR)

Vcè il volume del campione utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici (volume di input) espresso nell'unità di misura richiesta.

Vaè il volume in**µL**del campione di DNA estratto (eluato) utilizzato nella PCR.

Epè l'efficienza della procedura ,(estrazione e PCR)**expressa in decimali**

Per convertire la quantità di campione da copie/mL a IU/mL, moltiplicare il valore di copie/mL per il**fattore di conversione (Fc)**. Il valore Fc è stato calcolato utilizzando materiale di riferimento certificato e calibrato ("1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus BK per tecniche di amplificazione degli acidi nucleici", NIBSC) (vedere15 Caratteristiche delle prestazioni pagina 49).

Per comodità, di seguito sono riportate formule semplificate in cui sono stati calcolati Ve/(Vc x Va x Ep) e la rispettiva conversione in IU/mL.

Tabella 39

Matrice	Metodo di estrazione degli acidi nucleici	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Formula per quantificare Nc (copie/mL)	Fc (IU/copie)	Formula per quantificare Nc (IU/mL)
Plasma	ELITe GALAXY	35	35 x Quantità	4,1	143,5 x Quantità

15 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

15.1 Sensibilità analitica: Limite di rilevabilità (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) del saggio in associazione al plasma EDTA è stato verificato sugli strumenti ELITe GALAXY e ABI 7500, analizzando un pannello di matrici negative al BKV inoculate con materiale di riferimento del BKV (1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus BKV, codice NIBSC 14/212, Regno Unito). È stata eseguita l'analisi di regressione con modello Probit sui risultati ed è stato stimato il LoD come la concentrazione del campione che ha una probabilità del 95% di risultare positivo.

Il risultato è riportato nella tabella seguente Tabella.

Tabella 40 Limite di rilevabilità per campioni di plasma ed ELITe GALAXY

% Positività	LoD	Intervallo di confidenza al 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
95%	**189 copie/mL**	119 copie/mL	462 copie/mL
95%	**779 IU/mL**	490 IU/mL	1.903 IU/mL

Il livello di rilevabilità (LoD) espresso in copie/mL per ciascuna matrice è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo 15.7 Conversione in Unità Internazionali (IU) pagina 52

15.2 Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del saggio è stato determinato in associazione ad **ABI 7500 Fast Dx** utilizzando un pannello di diluizioni di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione.

L'intervallo di misurazione lineare in copie/mL è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo 15.7 Conversione in Unità Internazionali (IU) pagina 52.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 41 Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma in EDTA e ABI 7500

Unità di Misura	Limite inferiore	Limite superiore
IU/mL	41	41.000.000
copie / reazione	10	1.000.000

15.3 Marcatori potenzialmente interferenti: Crossreattività

La potenziale cross-reattività con altri microrganismi che si possono rilevare nei campioni clinici è stata valutata mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha evidenziato omologie significative con altri organismi diversi da quello di interesse (virus, batteri, protozoi e funghi). Pertanto, non si prevede nessuna inibizione.

La mancata cross-reattività con organismi potenzialmente interferenti è stata verificata anche mediante l'analisi di un pannello di organismi diversi da quello di interesse (ATCC, NIBSC) ad alto titolo.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 42

Microrganismo	Pos./Rep.	Esito
HSV1	0/3	Nessuna cross-reattività
HSV2	0/3	Nessuna cross-reattività
CMV	0/3	Nessuna cross-reattività
DV3	0/3	Nessuna cross-reattività
VZV	0/3	Nessuna cross-reattività
Flu B	0/3	Nessuna cross-reattività
EBV	0/3	Nessuna cross-reattività
JCV	0/3	Nessuna cross-reattività
HHV6	0/3	Nessuna cross-reattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna cross-reattività per l'amplificazione del target BKV quando analizzati con BKV ELITe MGB Kit.

15.4 Marcatori potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di organismi indesiderati che possono essere presenti nei campioni clinici è stata valutata per il test attraverso l'analisi di un panel di organismi indesiderati in campioni positivi al BKV, provenienti da diversi fornitori (ATCC, NIBSC).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Tabella 43

Microrganismo	Pos./Rep.	Esito
HSV1	3/3	Nessuna interferenza
HSV2	3/3	Nessuna interferenza
CMV	3 / 3	Nessuna interferenza
DV3	3 / 3	Nessuna interferenza
VZV	3 / 3	Nessuna interferenza
ADV	3 / 3	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	Nessuna interferenza
JCV	3 / 3	Nessuna interferenza
HHV6	3/3	Nessuna interferenza

Tutti i potenziali organismi interferenti analizzati non hanno mostrato alcuna interferenza con il rilevamento e la quantificazione del BKV utilizzando il prodotto BKV ELITe MGB Kit.

15.5 Ripetibilità

La Ripetibilità intra-sessione, inter-sessione ed inter-giorno del saggio è stata valutata su ABI 7500 mediante l'analisi di un pannello di campioni positivizzato con DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione BKV e un campione negativo.

Un esempio dei risultati della ripetibilità intra-sessione è riportato nelle tabelle sottostanti.

Tabella 44 Ripetibilità intra-sessione su ABI 7500

Campione copie / reazione	BKV			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
50.000 target + 150.000 IC	12 / 12	23,89	0,15	0,64
5.000 target + 150.000 IC	12 / 12	27,07	0,10	0,37
500 target + 150.000 IC	12 / 12	30,41	0,17	0,56
10 target + 150.000 IC	12 / 12	37,97	0,92	2,43
150000 IC	0/12	-	-	-

Un esempio dei risultati di Ripetibilità inter-sessione (su due sessioni) è riportato nella tabella seguente.

Tabella 45 Ripetibilità inter-sessione su ABI 7500

Campione copie / reazione	BKV			
	Pos./Rep.	Media Ct	SD	% CV
50.000 target + 150.000 IC	24/24	23,91	0,13	0,53
5.000 target + 150.000 IC	24/24	27,05	0,11	0,41
500 target + 150.000 IC	24/24	30,40	0,20	0,66
10 target + 150.000 IC	24/24	36,62	0,70	1,91
150000 IC	0/24	-	-	-

Nel test di ripetibilità, BKV ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come previsto e ha mostrato una variabilità massima dei valori di Ct del target espressa come %CV inferiore a 5%.

15.6 Riproducibilità

La Riproducibilità del saggio è stata valutata su ABI 7500 mediante l'analisi dei risultati di 10 test di Controllo Qualità eseguiti sul prodotto BKV ELITe MGB Kit.

Una sintesi dei risultati dell'analisi del valore Ct del target BKV e dell'Internal Control amplificati utilizzando il prodotto BKV ELITe MGB Kit è riportata nelle tabelle seguenti:

Tabella 46 Riproducibilità su ABI 7500

Campione copie / reazione	N	Media Ct	SD	% CV	Esito
100.000 target	30	22,70	0,34	1,51	Passed (Passa)
50.000 target + 150.000 IC	30	23,54	0,33	1,39	Passed (Passa)

Tabella 46 Riproducibilità su ABI 7500 (segue)

5.000 target + 150.000 IC	30	26,81	0,40	1,49	Passed (Passa)
500 target + 150.000 IC	30	30,18	0,47	1,54	Passed (Passa)
10 target + 150.000 IC	90	36,16	0,67	1,86	Passed (Passa)
150000 IC	30	22,76	0,25	1,09	Passed (Passa)
6000 IC	90	28,11	0,32	1,15	Passed (Passa)

15.7 Conversione in Unità Internazionali (IU)

Il fattore di conversione in Unità Internazionali del prodotto BKV ELITe MGB Kit e del componente “BKV ELITe Standard” in associazione con gli strumenti ELITe GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR è stato calcolato analizzando un pannello di diluizioni seriali (a incrementi di 0,5 Log) del “1° Standard Internazionale dell’OMS per il DNA del Virus BK” (NIBSC, Regno Unito, codice 14/212) in plasma negativo al DNA del BKV raccolto in EDTA.

Il fattore di conversione è stato calcolato come l’anti-log della media della differenza (10^{Md}) tra i valori di Log IU/mL assegnati e i valori di Log copie/mL calcolati e corrisponde a 4,12 IU/copie per il plasma raccolto in EDTA.

15.8 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando, in associazione con ELITe GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, campioni ritenuti negativi al DNA di BKV.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 47 Specificità diagnostica:

Campione	N	Positivi	Negativi	Specificità diagnostica in %
Plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di BKV	52	0	52	100%

15.9 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando, in associazione con ELITe GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, campioni certificati positivi al DNA del BKV e campioni positivizzati.

I risultati sono riepilogati nella tabella seguente.

Tabella 48 Sensibilità diagnostica

Campioni	N	Positivi	Negativi	Sensibilità diagnostica in %
Plasma raccolto in EDTA e positivo per il DNA di BKV	9	9	0	100%
Plasma raccolto in EDTA e positivizzato per il BKV	42	42	0	
Totale	51	51	0	

NOTA

I dati completi e i risultati delle prove effettuate per valutare le caratteristiche delle prestazioni del prodotto con matrici e strumenti sono riportati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto “BKV ELITe MGB® Kit”, FTP 175PLD.

16 BIBLIOGRAFIA

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85

C. N. Kotton et al. (2025) Transplantation 109: 1066-1110

E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

17 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici:

- Plasma raccolto in EDTA (solo su ELITe InGenius, ELITe BeGenius, MyGenius PRO e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument).
- Urina (solo su ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO).
- Sangue intero raccolto in EDTA (solo su ELITe InGenius ed ELITe BeGenius).

Attualmente non sono disponibili dati relativi alle prestazioni del prodotto con altri campioni clinici quali: sospensioni di leucociti, sospensioni di granulociti.

Il plasma raccolto in EDTA deve essere ottenuto da sangue intero conservato a temperatura ambiente o a +2/+8 °C per non più di 24 ore.

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

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

Non utilizzare questo prodotto con DNA estratto contenente un'elevata quantità di DNA genomico umano che potrebbe inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

Non sono disponibili dati relativi all'inibizione causata da farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

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

A causa della sua elevata sensibilità analitica, il metodo della Real Time PCR è soggetto a contaminazioni da campioni positivi, controlli positivi e prodotti della PCR. Tali cross-contaminazioni potrebbero causare risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è stato progettato in modo da ridurre questo rischio, ma solo le buone pratiche di laboratorio e il rispetto delle presenti istruzioni per l'uso possono prevenirlo.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato, addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l’utilizzatore e altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di dispositivi di protezione individuale e di aree adeguate alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente infettivi e preparati chimici classificati come pericolosi, al fine di prevenire incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utente e altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di dispositivi di protezione individuale e di strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Per evitare risultati errati, questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, PCR e rilevazione di acidi nucleici.

A causa di differenze intrinseche tra tecnologie, si raccomanda agli utilizzatori di eseguire studi di correlazione al fine di valutare le differenze a livello tecnologico prima di cambiare prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA del target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione, ma non si può escludere che il DNA del target abbia un titolo più basso del limite di rilevazione del prodotto (12 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 30). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi per via di un difetto del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi, inserimenti o delezioni nella regione dell'DNA del coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA del target.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati in combinazione con tutte le osservazioni cliniche e i risultati di laboratorio pertinenti.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi o errati. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Tuttavia, tale rischio residuo associato all’uso previsto del prodotto è stato ponderato a fronte dei potenziali benefici per il paziente ed è stato ritenuto accettabile.

18 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ELITe InGenius ed ELITE BeGenius

Tabella 49

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione dei componenti Q-PCR Mix, Q-PCR Standard e Positive Control. Controllare i volumi dei componenti Q-PCR Mix, Q-PCR Standards e Positive Control.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nell'unità refrigerata). Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nella Cooler Unit). Utilizzare nuove provette di Q-PCR Standards o Positive Control.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 50

Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix e di Negative Control. Controllare i volumi di Q-PCR Mix e Negative Control.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei Rack, dell'Inventory Block o della Cooler Unit.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 51

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, dell'Internal Control e del campione. Controllare i volumi di Q-PCR Mix, Internal Control e campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'Inventory Area o nella Cooler Unit). Non utilizzare la Q-PCR Mix per più di 3 sessioni consecutive (7 ore nell'Inventory Area, nel Cool Block o nella Cooler Unit). Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Degradazione del template di Internal Control.	Utilizzare una nuova provetta di Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito tal quale con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only". Ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR). Per i campioni BAL/BA, eseguire o ripetere la liquefazione del campione primario come descritto: 8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO pagina 9
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 52

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	**Soluzioni**
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma Tm differente rispetto a quello di altri campioni e degli standard o del Positive Control.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere la reazione di amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 53

Errore nel calcolo di Ct	
Possibili cause	**Soluzioni**
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con segnale di fluorescenza anomalo.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa, selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione, selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo come non valido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only"; - ripetere l'estrazione del campione primario con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR".

Tabella 54

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	**Soluzioni**
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche.	Pulire la micropipetta, con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o un detergente per DNA/RNA, dopo aver pipettato ciascun campione. Non utilizzare le pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzate con puntali con filtro per aerosol. Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale del laboratorio.	Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o detergente per DNA/RNA. Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix e/o di Internal Control.

MyGenius PRO

Tabella 55

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare i volumi dei componenti Q-PCR Mix, Q-PCR Standards e Positive Control. È importante che le provette utilizzate su MyGenius PRO non siano state precedentemente utilizzate da altre piattaforme o per impostare sessioni su piattaforme aperte, poiché lo strumento legge l'etichetta e assegna automaticamente il numero massimo di repliche che possono essere eseguite se quella provetta non è mai stata caricata su MyGenius PRO. Pertanto, se si utilizza una provetta non nuova, il volume potrebbe non essere sufficiente.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare il composto Q-PCR Mix per più di 7 ore nel carosello, né per più di 3 ore nel carosello per cinque volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non utilizzare il Q-PCR Standard per più di 2 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nel carosello). Non utilizzare il Positive Control per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel carosello). Utilizzare nuove provette di Q-PCR Standards o Positive Control.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 56

Reazione del controllo negativo non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare i volumi di Q-PCR Mix e Negative Control. È importante che le provette utilizzate su MyGenius PRO non siano state precedentemente utilizzate da altre piattaforme o per impostare sessioni su piattaforme aperte, poiché lo strumento legge l'etichetta e assegna automaticamente il numero massimo di repliche che possono essere eseguite se quella provetta non è mai stata caricata su MyGenius PRO. Pertanto, se si utilizza una provetta non nuova, il volume potrebbe non essere sufficiente.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione e per più di 8 ore. Utilizzare una nuova provetta di Negative Control.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei Rack, dell'Inventory Block o della Cooler Unit.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 57

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare i volumi di Q-PCR Mix, Internal Control e campioni. È importante che le provette utilizzate su MyGenius PRO non siano state precedentemente utilizzate da altre piattaforme o per impostare sessioni su piattaforme aperte, poiché lo strumento legge l'etichetta e assegna automaticamente il numero massimo di repliche che possono essere eseguite se quella provetta non è mai stata caricata su MyGenius PRO. Pertanto, se si utilizza una provetta non nuova, il volume potrebbe non essere sufficiente.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare il composto Q-PCR Mix per più di 7 ore nel carosello, né per più di 3 ore nel carosello per cinque volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Degradazione del template di Internal Control.	Non utilizzare l'Internal Control per più di 8 ore. Utilizzare una nuova provetta di Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione. Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare.
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con segnale di fluorescenza anomalo.	Se è necessario un valore Ct, ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 58

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	**Soluzioni**
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma Tm differente rispetto a quello di altri campioni e degli standard o del Positive Control.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target presente nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 59

Errore nel calcolo di Ct	
Possibili cause	**Soluzioni**
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con segnale di fluorescenza anomalo.	Se nel grafico PCR compare un'amplificazione significativa, il risultato deve essere considerato positivo. Se nel grafico PCR non compare alcuna amplificazione, il risultato deve essere considerato negativo o non valido. Se è necessario un valore Ct, ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare.

Tabella 60

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	**Soluzioni**
Contaminazione tra campioni durante i passaggi pre-analitici.	Pulire la micropipetta con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o con un detergente per DNA/RNA dopo aver pipettato ogni campione. Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a spostamento positivo o utilizzate con puntali con filtro anti-aerosol. Analizzare i campioni come ultima operazione della giornata.
Contaminazione ambientale del laboratorio.	Pulire tutte le superfici che vengono a contatto con l'operatore e i campioni (incluse le pipette) con soluzione fresca di ipoclorito di sodio (candeggina) al 3% o detergente per DNA/RNA. Eseguire un ciclo di decontaminazione con U.V. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix e/o di Internal Control.

Piattaforma aperta

Tabella 61

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata distribuzione nei pozzetti della micropiastra.	Controllare i volumi della PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Positive Control dispensati nella micropiastra (Q-PCR microplate).
Degradazione della Q-PCR Mix.	Non congelare e scongelare la Q-PCR Mix più di 5 volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.

Tabella 61 (segue)

Reazione con Q-PCR Standard, curva standard o Positive Control non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Positive Control.	Non congelare e scongelare il Q-PCR Standard più di 4 volte. Utilizzare nuove provette di Q-PCR Standards o Positive Control.
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Positive Control sullo strumento. Controllare le impostazioni del ciclo termico sullo strumento.

Tabella 62

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix e di Negative Control. Controllare i volumi di Q-PCR Mix e Negative Control.
Micropiastra coperta male.	Prestare attenzione quando si sigilla la Q-PCR microplate con il sigillo ottico.
Contaminazione del Negative Control.	Non utilizzare il Negative Control per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di preparazione, dei rack e della micropipetta.	Pulire le superfici e gli strumenti con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire le provette e i puntali in uso.

Tabella 63

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, dell'Internal Control e del campione. Controllare i volumi di Q-PCR Mix, Internal Control e campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non congelare e scongelare la Q-PCR Mix più di 5 volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova provetta di Q-PCR Mix.
Degradazione del template di Internal Control.	Utilizzare una nuova provetta di Internal Control.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare. Ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare.

Tabella 64

Fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	**Soluzioni**
Errata distribuzione del campione.	Controllare i volumi dei reagenti e dei campioni dispensati nella micropiastra (Q-PCR microplate).
Errata impostazione al basale.	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15.

Tabella 65

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	**Soluzioni**
Assenza di un picco definito. Picco definito, ma differente rispetto a quello di altri campioni e degli Standard o del Positive Control.	Controllare che il valore Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità di prodotti di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di melting. Ripetere la reazione di amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

19 LEGENDA DEI SIMBOLI

REF	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
LOT	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
IVD	Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*.
CE 0123	Conforme ai requisiti del Regolamento IVDR 2017\746\CE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*. Certificato rilasciato da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germania.
UDI	Identificazione unica del dispositivo
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Consultare le istruzioni per l'uso.
CONT	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.

20 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente. Per informare ELITechGroup S.p.A., produttore del presente dispositivo, si prega di utilizzare il seguente indirizzo e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Verrà resa disponibile al pubblico una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" tramite il database europeo dei dispositivi medici (Eudamed) non appena questo sistema informatico sarà funzionante. Prima che sia pubblicato l'avviso della piena funzionalità di Eudamed, verrà tempestivamente resa disponibile al pubblico la "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" richiedendola via email all'indirizzo emd.support@elitechgroup.com.

21 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti realizzati da Promega Corporation e forniti a ELITechGroup S.p.A. per essere utilizzati esclusivamente come componenti dei kit diagnostici a marchio ELITech. I reagenti possono essere utilizzati solo all'interno di questo kit. Non vengono concessi ulteriori diritti o licenze, espressi o impliciti, per qualsiasi uso, modifica o rivendita dei reagenti al di fuori di questo kit.

I reagenti di rilevamento ELITe MGB® e le piattaforme ELITech (ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®, MyGenius PRO®) sono protetti da brevetti concessi in licenza e da richieste di brevetto in attesa di approvazione.

Qualsiasi utilizzo dei reagenti o dei dati correlati al di fuori dell'ambito di applicazione del presente kit richiede la previa autorizzazione scritta da parte di ELITechGroup S.p.A.

I reagenti di rilevazione ELITe MGB ® sono coperti da uno o più brevetti USA con numero di brevetto 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e da brevetti EP numero di brevetto 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 inoltre sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®e MyGenius PRO® sono coperte da brevetti e richieste di brevetto in attesa di approvazione.

Questa licenza limitata permette all'individuo o alla persona giuridica alla quale il prodotto è stato fornito di utilizzarlo unitamente ai dati generati dal suo utilizzo solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite, per altri scopi.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, the ELITe MGB® logo, ELITe InGenius®, ELITe BeGenius® e MyGenius PRO® (nome registrato ELIVERSE®) sono marchi registrati di ELITechGroup nell'Unione Europea.
QIAsymphony® è un marchio registrato di QIAGEN GmbH.
Ficoll® è un marchio registrato di GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Appendix A BKV ELITe MGB Kit utilizzato in associazione alle piattaforme della serie ®



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione sintetica del manuale di istruzioni ufficiale. Fare riferimento al documento completo prima dell'uso: www.elitechgroup.com

Uso previsto

Il prodotto **BKV ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione del **DNA del Polyomavirus BK (BKV) umano**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA, urina raccolta senza conservanti e sangue intero raccolto in EDTA.

Il saggio è stato validato anche in associazione con lo strumento **MyGenius PRO®** (nome registrato ELIVERSE®), sistema automatizzato e integrato per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA e urina raccolta senza conservanti.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real-Time PCR denominata **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da BKV in pazienti con sospetta infezione da BKV o sottoposti a monitoraggio per tale infezione.

I risultati devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche e agli esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

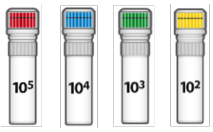
Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Gene dell'antigene Large T	FAM	BKV
Controllo interno	Beta-globina	AP525	IC

Matrice validata

- **Plasma** raccolto in EDTA
- **Urine** senza conservanti
- **Sangue intero** raccolto in EDTA

Contenuto del Kit e prodotti correlati

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta per l'uso 4 provette da 540 µL 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta, utilizzata a bordo	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 set di 4 provette da 200 µL 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/scongelamento per provetta, utilizzata a bordo	Positive Control (PC) pronto per l'uso 2 provette da 160 µL 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta, utilizzata a bordo

Validità massima: **24 mesi**

Temperatura di conservazione: **-20 °C**

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

• Strumento ELITe InGenius: INT030. • Strumento ELITe BeGenius: INT040. • ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.	• CPE - Internal Control: CTRCPE **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** Consumable Set (vedere le Istruzioni per l'uso di ELITe InGenius ed ELITe BeGenius).

Protocollo ELITe InGenius ed ELITe BeGenius

› Volume del campione › Volume di CPE › Volume eluizione totale	200 µL(InGenius e BeGenius) 10 µL 100 µL	› Volume di eluato in PCR › Volume Q—PCR Mix › Frequenza dei controlli › Frequenza di calibrazione	20 µL 20 µL 15 giorni 60 giorni

Prestazioni di ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matrice	Limite di rilevabilità		Specificità diagnostica	Sensibilità diagnostica	Linearità (IU/mL),		Fattore di conversione (IU/copie)
	IU/mL	Copie/mL			IU/mL	Copie/mL	
Plasma	215 IU/mL	165 copie/ml	96,2%	100%	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3
Urine	142 IU/mL	89 copie/ml	100%	100%	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Sangue intero	538 IU/mL	117 copie/ mL	100%	100%	538→ 46,0 x 10^7	117→ 10,0 x 10^7	4,6

Preparazione dei campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato su **ELITe InGenius** ed **ELITe BeGenius** con i seguenti campioni clinici identificati secondo le linee guida di laboratorio e raccolti, trasportati e conservati nelle seguenti condizioni.

Tipo di campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	**+2/+8 °C**	**-20 ± 10 °C**	**-70 ± 15 °C**
Plasma	EDTA	≤1 gg	≤3 gg	≤30 gg	≤30 gg
Urine	Senza conservanti	≤4 ore	≤1 gg	≤30 gg	≤30 gg
Sangue intero	EDTA	≤1 g	≤3 gg	≤30 gg	≤30 gg

EDTA, acido etilendiamminotetraacetico; d, giorno.

Procedure di ELITe InGenius

L'interfaccia grafica utente (GUI) del software ELITe InGenius fornisce istruzioni passo-passo per configurare la sessione. Tutti i passaggi di estrazione, Real-Time PCR e interpretazione dei risultati vengono eseguiti in automatico. Sono disponibili due modalità operative: sessione completa (Extract + PCR) o PCR Only.

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITe InGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità "Closed" (chiuso).	**2.** Verificare i calibratori: **Q-PCR Standard** nel menu "Calibration". Verificare i controlli: **Positive Control** e **Negative Control** nel menu "Controls". Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	**3.** Scongelare la **PCR Mix** e le provette **CTRCPE.** Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.

Procedura 1 - Sessione completa: Extract + PCR (ad es. campioni)

1. Selezionare "Perform Run"sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	**2.** Inserire il "Sample Rack" contenente i campioni con il codice a barre nella "Cooler Unit". La scansione del codice a barre è già attiva	**3.** Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: "200 µL", Eluizione: "100 µL"
4. Selezionare l'Assay Protocol di interesse: BKV ELITe_PL_200_100 oppure BKV ELITe_U_200_100 oppure BKV ELITe_WB_200_100 **Nota:** se si esegue una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 2 a 4.	**5.** Stampare le etichette per identificare con il codice a barre gli Elution Tube vuoti. Caricare le provette nell'Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	**6.** Caricare la PCR Mix e l'Internal Control nel Reagent/Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il '"PCR Rack" con la "PCR Cassette" e l'"Extraction Rack" con le cartucce di estrazione "ELITe InGenius SP 200" e i materiali di consumo per l'estrazione richiesti.	**8.** Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	**9.** Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA

Se è necessaria una modalità "Extract Only", fare riferimento al manuale d'istruzioni dello strumento per la procedura.

Procedura 2: PCR Only (ad es. eluati, standard, controlli)

1. Selezionare “Perform Run” sul touch screen	**2.** Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: “200 µL”, eluizione: “100 µL”	**3.** Scansionare i codici a barre dei campioni con un lettore di codici a barre manuale o digitare l’ID campione
4. Selezionare l’Assay Protocol di interesse: BKV ELITe_PC e BKV ELITe_NC, oppure BKV ELITe_STD, oppure BKV ELITe_PL_200_100, BKV ELITe_U_200_100 oppure BKV ELITe_WB_200_100	**5.** Selezionare il metodo “PCR Only” e impostare la posizione del campione “Elution Tube”.	**6.** Caricare la miscela PCR Mix nell’Inventory Block.
7. Caricare: Il Rack delle PCR Cassette e il Rack delle “Elution tube” con i campioni di DNA estratti da analizzare	**8.** Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	**9.** Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

Procedure di ELITe BeGenius

L’interfaccia grafica utente (GUI) del software ELITe BeGenius fornisce istruzioni passo-passo per configurare la sessione. Tutti i passaggi di estrazione, Real-Time PCR e interpretazione dei risultati vengono eseguiti in automatico. Sono disponibili due modalità operative: sessione completa (Extract + PCR) o PCR Only.

Prima dell'analisi

1. Accendere ELITe BeGenius. Inserire username e password. Selezionare la modalità “Closed” (chiuso).	**2.** Verificare i calibratori: **Q-PCR Standard** nel menu “Calibration”. Verificare i controlli: **Positive Control** e **Negative Control** nel menu “Controls”. Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.	**3.** Scongelare la **PCR Mix** e le provette **CTRCPE.** Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 sec.

Procedura 1 - Sessione completa: Extract + PCR (ad es. campioni)

1. Selezionare “Perform Run”sul touch screen, quindi fare clic sul run mode «Extract + PCR»	**2.** Inserire il "Sample Rack” contenente i campioni con il codice a barre nella “Cooler Unit”. La scansione del codice a barre è già attiva	**3.** Verificare i volumi di estrazione: Ingresso: “200 µL”, Eluizione: “100 µL”
4. Selezionare l’Assay Protocol di interesse: BKV ELITe_Be_PL_200_100 oppure BKV ELITe_Be_U_200_100 oppure BKV ELITe_WB_200_100 **Nota:** se si esegue una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 2 a 4.	**5.** Stampare le etichette per identificare con il codice a barre gli Elution Tubes vuoti. Caricare le provette nell’Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	**6.** Caricare la PCR Mix e l’Internal Control nel Reagent/Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.
7. Caricare il ’“PCR Rack” con la “PCR Cassette” e l’”Extraction Rack” con le cartucce di estrazione “ELITe InGenius SP 200” e i materiali di consumo per l’estrazione richiesti.	**8.** Chiudere lo sportello. Avviare la sessione	**9.** Visualizzare, approvare e archiviare i risultati

NOTA
Se è necessaria una modalità “Extract Only”, fare riferimento al manuale d’istruzioni dello strumento per la procedura.

Procedura 2: PCR Only (ad es. eluati, standard, controlli)

1. Selezionare “Perform Run” sul touch screen.	**2.** Caricare le provette con codice a barre contenenti l'acido nucleico estratto o i controlli/calibratori nell’Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit.	**3.**Per gli Standard e i Controlli: per ogni “Position” inserire i dati relativi a “Reagent name” e “S/N” (numero di serie), “Lot No.” (numero di lotto), “Exp. Date” (data di scadenza) e “T/R” (numero di reazioni). Per gli eluati: per ogni “Position” inserire i dati relativi a “Sample ID”, “Sample matrix”, “Extraction kit” ed “Extracted eluate vol.” (volume eluato).
4. Selezionare l’Assay Protocol di interesse: BKV ELITe_PC e BKV ELITe_NC, oppure BKV ELITe_STD o BKV ELITe_PL_200_100 o BKV ELITe_U_200_100.	**5.** Caricare la PCR Mix nel Reagent/ Elution Rack e inserirlo nella Cooler Unit. Caricare i puntali con filtro e il PCR Rack con la “PCR Cassette”.	**6.** Chiudere lo sportello. Avviare la sessione
7. Visualizzare, approvare e archiviare i risultati		

Appendix B BKV ELITe MGB Kit utilizzato in associazione con MyGenius PRO



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione sintetica del manuale di istruzioni ufficiale. Fare riferimento al documento completo prima dell'uso: www.elitechgroup.com

Uso previsto

Il prodotto **BKV ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione del **DNA del Polyomavirus BK (BKV) umano**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®** , sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA, urina raccolta senza conservanti e sangue intero raccolto in EDTA.

Il saggio è stato validato anche in associazione con lo strumento **MyGenius PRO®** (nome registrato ELIVERSE®), sistema automatizzato e integrato per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA e urina raccolta senza conservanti.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real-Time PCR denominata **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da BKV in pazienti con sospetta infezione da BKV o sottoposti a monitoraggio per tale infezione.

I risultati devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche e agli esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

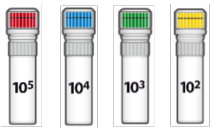
Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Gene dell'antigene Large T	FAM	BKV
Controllo interno	Beta-globina	AP525	IC

Matrice validata

- **Plasma** raccolto in EDTA
- **Urine** senza conservanti

Contenuto del Kit e prodotti correlati

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta per l'uso 4 provette da 540 µL 96 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta, utilizzata a bordo	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 set di 4 provette da 200 µL 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/scongelamento per provetta, utilizzata a bordo	Positive Control (PC) pronto per l'uso 2 provette da 160 µL 8 reazioni per kit 4 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta, utilizzata a bordo

Validità massima: **24 mesi**

Temperatura di conservazione: **-20 °C**

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

- **MyGenius PRO** (EG SpA cod. INT050)
- **MyGenius PRO Software** versione BB-04 (o successiva)
- **MyGenius PRO** (EG SpA cod. INT052SP)
- **Negative Control** (EG SpA, cod. CTRNEG)
- **Internal Control Maxi** (EG SpA, cod. ICMAXI)
- **MyGenius PRO** Consumable Sets (vedere le Istruzioni per l'uso di MyGenius PRO)

Potocollo di MyGenius PRO

› Volume del campione	200 µL	› Volume di eluato in PCR	20 µL
› Volume di IC	10 µL	› Volume Q—PCR Mix	20 µL
› Volume eluizione totale	100 µL	› Frequenza dei controlli	15 giorni
		› Frequenza di calibrazione	60 giorni

Prestazioni di MyGenius^{PRO}

Matrice	Limite di rilevabilità		Sensibilità diagnostica	Specificità diagnostica	Linearità (IU/mL)		Fattore di conversione (IU/copie)
	IU/mL	Copie/mL			IU/mL	Copie/mL	
Urina	142	89	100%	100%	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Plasma	215 IU/mL	165 copie/ mL	96,2%	100%	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3

Preparazione dei campioni

Questo prodotto è destinato all'uso sullo strumento **MyGenius^{PRO}** con i seguenti campioni clinici secondo le linee guida del laboratorio, e raccolti, trasportati e conservati nelle condizioni indicate di seguito:

Tipo di campione	Requisiti per la raccolta	Condizioni di trasporto/conservazione			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	**+2/+8 °C**	**-20 ± 10 ° C**	**-70 ± 15 ° C**
Urina	Senza conservanti	≤4 ore	≤1 g	≤30 gg	≤30 gg
Plasma	EDTA	≤1 gg	≤3 gg	≤30 gg	≤30 gg

g, giorno.

Procedure di MyGenius PRO

L'utente viene guidato passo dopo passo dall'interfaccia grafica utente (GUI) del software MyGenius PRO per impostare l'esecuzione. Tutti i passaggi di estrazione, Real-Time PCR e interpretazione dei risultati vengono eseguiti in automatico. Sono disponibili due modalità operative: sessione completa (Extract + PCR) o PCR Only (solo per calibratori e controlli).

1. Accendere lo strumento **MyGenius PRO**. Accedere in modalità **STAND-BY** con nome utente e password.	**2.** Caricare tutti i materiali di consumo nei cassetti e svuotare il serbatoio dei rifiuti liquidi e i contenitori dei rifiuti solidi, se necessario. Premere il pulsante Start per eseguire la preparazione: al termine della preparazione, lo strumento passerà alla modalità Operativa.	**3.** Verificare i calibratori: **Q-PCR Standard** nel menu “Calibration”. Verificare i controlli: **Positive Control** e **Negative Control** nel menu “Controls”. Nota: Tutti devono essere eseguiti, approvati e non scaduti.

4. Scongelare la **PCR Mix** e le provette **IC MAXI** Mescolare delicatamente con agitatore vortex. Centrifugare per 5 secondi.	**5.** Caricare le provette con le miscele PCR nel carosello dei reagenti seguendo le indicazioni della GUI.	**6.**Caricare le provette IC MAXI nell’apposito rack blu e inserirlo nell’area dell’Auto Sampler.
7a. Se lo strumento è collegato al LIS, inserire i campioni nell’area dell’Auto Sampler utilizzando i rack dedicati in base al diametro delle provette utilizzate. L'estrazione inizierà automaticamente. **7b**. Se lo strumento non è collegato al LIS, nell’elenco dei campioni premere “Assign test” (Assegna test), leggere il codice a barre dei campioni con il lettore di codici a barre esterno, selezionare la matrice delle urine e assegnare l’Assay Protocol “BKV ELITe_My_U_IU_200_100” o “BKV ELITe_My_U_cmL_200_100”, quindi inserire i campioni nell’area dell’Auto Sampler utilizzando i rack dedicati in base al diametro delle provette utilizzate. L'estrazione inizierà automaticamente.		

Appendix C BKV ELITe MGB Kit utilizzato in associazione con ABI 7500 Instrument



ATTENZIONE

Il presente documento è una versione sintetica del manuale di istruzioni ufficiale. Fare riferimento al documento completo prima dell'uso: www.elitechgroup.com

Uso previsto

Il prodotto **BKV ELITe MGB® Kit** è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* destinato all'uso da parte degli operatori sanitari come saggio di Real-Time PCR quantitativa degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione del **DNA del Polyomavirus BK (BKV) umano**, estratto da campioni clinici.

Il saggio è stato validato in associazione con gli strumenti **ELITe InGenius®** ed **ELITe BeGenius®**, sistemi automatizzati e integrati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA, urina raccolta senza conservanti e sangue intero raccolto in EDTA.

Il saggio è stato validato anche in associazione con lo strumento **MyGenius PRO®** (nome registrato ELIVERSE®), sistema automatizzato e integrato per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA e urina raccolta senza conservanti.

Infine il saggio è stato validato in associazione con il sistema automatico di estrazione e configurazione PCR denominato **ELITe GALAXY** e con la piattaforma di Real-Time PCR denominata **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, utilizzando campioni umani di plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle infezioni da BKV in pazienti con sospetta infezione da BKV o sottoposti a monitoraggio per tale infezione.

I risultati devono essere interpretati in associazione a tutte le osservazioni cliniche e agli esiti degli esami di laboratorio rilevanti.

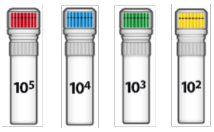
Sequenza amplificata

Sequenza	Gene	Fluoroforo	Canale
Target	Gene dell'antigene Large T	FAM	BKV
Controllo interno	Beta-globina	AP525	IC

Matrici validate

- **Plasma** raccolto in EDTA

Contenuto del Kit e prodotti correlati

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta per l'uso 4 provette da 540 µL 100 reazioni per kit 5 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta	Pronta per l'uso a 4 livelli: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 set di 4 provette da 200 µL 16 reazioni per kit 8 cicli di congelamento/scongelamento per provetta	Positive Control (PC) pronto per l'uso 2 provette da 160 µL 12 reazioni per kit 8 cicli di congelamento/ scongelamento per provetta

Validità massima: **24 mesi**

Temperatura di conservazione: **-20 ° C**

Altri prodotti richiesti ma non forniti nel kit

• **ELITe GALAXY:** INT020 • **ELITe GALAXY 300 extraction kit:** INT021EX • **ABI 7500 Fast Dx Real—Time PCR Instrument**	• CPE - Internal Control: CTRCPE • Acqua per biologia molecolare

Prestazioni di 7500 Real-Time PCR Instrument

Matrice	Limite di rilevabilità	Specificità diagnostica	Sensibilità diagnostica	Linearity(IU/mL),	Fattore di conversione da IU/mL a copie/mL	Fattore di conversione da copie/mL a IU/ mL
Plasma	779 IU/mL	100%	100%	41→ $4.1*10^7$	4,1	143,5 x Quantità

Procedure di 7500 Real-Time PCR Instrument

La procedura riportata di seguito riassume le fasi principali dell'analisi del campione con il flusso di lavoro PCR convenzionale: sistemi di estrazione convalidati, impostazioni dello strumento PCR, configurazione PCR e interpretazione dei risultati.

Estrazione - Sistemi validati

Estrazione	Matrice validata	Volume di campione processato	Volume di campione min.	Volume di eluato totale	Volume CPE dell'Internal Control
ELITe Galaxy	Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

Amplificazione - Impostazioni di 7500 Fast Dx

1. Accendere il termociclatore
2. Impostare il rilevatore (detector) di "BKV" con "FAM" e quencher "none"
3. Impostare il rilevatore di "Internal Control" con "VIC" e quencher "none"
4. Impostare la fluorescenza passiva su "Cy5"

5. Impostare il profilo termico come indicato. L'acquisizione della fluorescenza deve essere impostata durante la fase di ibridazione a 60 °C.

Fase	Temperatura	Durata
Decontaminazione	50 °C	2 min
Denaturazione	94 °C	2 min
Amplificazione	94 °C	10 s
Rilevazione	60 °C	30 s
45 cicli	72 °C	20 s

L'analisi della curva di melting è facoltativa, consultare le istruzioni per l'uso complete.

Amplificazione - Impostazione della PCR

Per eseguire la configurazione della sessione PCR:

1. Scongelare le provette di Q PCR-Mix e di Positive Control/Q-PCR Standard
2. Agitare delicatamente e centrifugare
3. Preparare il **Negative Control** (non fornito)
4. Preparare la **Q-PCR microplate**
5. Lo strumento esegue automaticamente la configurazione della PCR dispensando in ciascun pozzetto della **Q-PCR microplate 20 µL** di **PCR Mix** e **20 µL** di **DNA estratto** / **Q-PCR Standard** / **Controlli**

Una volta completata la configurazione della PCR da parte dello strumento:

1. sigillare la **Q-PCR microplate** con un sigillo ottico
2. trasferire la **Q-PCR microplate** nella piattaforma **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e avviare la PCR. Salvare il file di esecuzione con un nome unico e riconoscibile (ad esempio "anno-mese-giorno-TARGET-EGSpA").

Amplificazione - Soglia per l'analisi qualitativa

Strumento	BKV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interpretazione

Risultati quantitativi

Valore Ct del BKV	Valore Ct dell'Internal Control	Interpretazione
Determinato	–	Positivi
Non determinato	Ct ≤35	Negativi
	Ct >35 o Non determinato	Non valido

Risultati quantitativi

Il valore Ct del BKV ottenuto per ciascun campione e la curva standard generata vengono utilizzati per calcolare la quantità di DNA target nella reazione.
Gli intervallo di quantificazione del campione vanno da circa 10 a 10^6copie/reazione o circa da 41 a 4,1 x 10^7IU/mL

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITALY
Tel. +39-011 976 191
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito web: www.elitechgroup.com