ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA
Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 04/04/2025

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«BKV ELITe MGB® Kit»
Ref. RTS175PLD

The BKV ELITe Standard (Ref. STD175PLD) and BKV - ELITe Positive Control (Ref. CTR175PLD) product batches still placed on the market as per IVDD (identified by the LOT numbers reported in the Standard and Positive Control IFU) are technically compatible with the new IVDR version of the amplification kit BKV ELITe MGB® Kit (Ref. RTS175PLD) and can be used, until exhausted, in association with the new IVDR version of the amplification kit and in accordance with its intended use.

Instructions for use

BKV ELITe MGB® Kit

Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS175PLD

UDI 08033891483654

CE 0123

IVD

ÄNDERUNGSVERLAUF

<table>
<tr><th>Rev.</th><th>Änderungsvermerk</th><th>Datum (TT.MM. JJJJ)</th></tr>
<tr><td>19–R</td><td>
Aktualisierung zur Einhaltung der Anforderungen der IVD-Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
Aktualisierung der verbesserten analytischen und diagnostischen Leistungen im Abschnitt „LEISTUNGSMERKMALE“.
Aktualisierung des Verwendungszwecks:
• Validierung der Produkte in Verbindung mit den Geräten ELITe InGenius (REF INT030) und ELITe BeGenius (REF INT040) mit den Matrizes in EDTA entnommenes Plasma und ohne Konservierungsmittel entnommener Urin.
• Validierung der Produkte in Verbindung mit in EDTA entnommenem Plasma als Matrix und den folgenden Geräten: ELITe GALAXY und ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.
HINWEIS!
Die Produktzusammensetzung bleibt unverändert.
HINWEIS!
Die folgenden Produktchargen werden gemäß Artikel 110 der IVD-Verordnung bis zu ihrem Verfallsdatum weiterhin gemäß IVDD auf dem Markt angeboten. Wenn Sie diese Produktchargen haben, kontaktieren Sie bitte die Mitarbeiter der ELITechGroup, um die entsprechende Vorgängerversion der Gebrauchsanweisungen anzufordern.
<table>
<tr><th>PRODUKTREF.</th><th>Chargennummer</th><th>Verfallsdatum</th></tr>
<tr><td>RTS175PLD</td><td>U0224-013</td><td>31/08/2025</td></tr>
<tr><td>RTS175PLD</td><td>U0324-124</td><td>30/11/2025</td></tr>
</table>
Neue grafische und inhaltliche Gestaltung der Gebrauchsanweisung.
</td><td>26/09/2024</td></tr>
<tr><td>18</td><td>
Verwendung des Produkts in Verbindung mit dem Gerät ELITe BeGenius® erweitert
LEISTUNGSMERKMALE aktualisiert:
• Nachweisgrenze (LoD) geändert
• Linearen Messbereich geändert
• Wiederholpräzision hinzugefügt
• Vergleichspräzision hinzugefügt
</td><td>22/10/2021</td></tr>
<tr><td>17</td><td>Referenznummer zum neuen Produkt „BKV – ELITe Positive Control RF“ (Art.-Nr. CTR175PLD-R) hinzugefügt
Verwendung des Produkts zusammen mit der Plattform Roche cobas z 480 analyzer erweitert</td><td>25/01/2021</td></tr>
<tr><td>16</td><td>In der Tabelle „Präzision bei Plasmaproben mit ELITe InGenius (Probenvolumen 1000 µl)“ angegebenen KV%-Wert korrigiert</td><td>01/08/2019</td></tr>
<tr><td>15</td><td>LoD- und LoQ-Werte für Plasma und Urin in Verbindung mit dem Gerät ELITe InGenius® geändert</td><td>11/06/2019</td></tr>
<tr><td>14</td><td>Verwendung mit dem Extraktionskit ELITe InGenius® SP 1000 erweitert</td><td>05/07/2018</td></tr>
<tr><td>13</td><td>Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aktualisiert (ULoQ).</td><td>27/04/2018</td></tr>
</table>

12	Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aktualisiert (LoD und Linearität).	22/12/ 2017
00 — 11	Neuproduktentwicklung und nachfolgende Änderungen	-

INHALTSVERZEICHNIS

1 VERWENDUNGSZWECK 5
2 TESTPRINZIP 5
3 BESCHREIBUNG DES PRODUKTS 5
4 MIT DEM PRODUKT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN 6
5 ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN 6
6 ANDERE ERFORDERLICHE PRODUKTE 6
7 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 7
8 PROBEN UND KONTROLLEN bei ELITe InGenius und ELITe BeGenius 9
9 VERFAHREN BEI ELITe InGenius 12
10 VERFAHREN BEI ELITe BeGenius 18
11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius 24
12 PROBEN UND KONTROLLEN BEI ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 32
13 VERFAHREN BEIM ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 32
14 LEISTUNGSMERKMALE BEI ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 39
15 REFERENZEN 43
16 GRENZEN DES VERFAHRENS 43
17 FEHLERBEHEBUNG 45
18 SYMBOLE 50
19 ANWENDERHINWEISE 51
20 HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ 51
Appendix A QUICK START GUIDE 52
Appendix B QUICK START GUIDE 56

1 VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt **BKV ELITe MGB® Kit** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal als quantitativer Nukleinsäure- und Real-Time-PCR-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der **DNA von humanem Polyomavirus BK (BKV)**, die aus klinischen Proben extrahiert wurde, bestimmt ist.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITe InGenius®** und**ELITe BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma und ohne Konservierungsmittel entnommenem Urin validiert.

Außerdem ist der Assay in Verbindung mit **ELITe GALAXY**, einem System für die automatische Extraktion und PCR-Einstellung, und dem **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, einer Real-Time PCR-Plattform, für die Verwendung von humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma validiert.

Das Produkt ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose und Überwachung von BKV-Infektionen bei Patienten bestimmt, bei denen Verdacht auf eine BKV-Infektionen besteht oder die auf BKV-Infektionen überwacht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

2 TESTPRINZIP

Der Assay ist eine quantitative Real-Time-PCR für den Nachweis von BKV-DNA, die aus Proben isoliert und mit dem Testreagenz BKV Q - PCR Mix, das Primer und ELITe MGB®-Technologie-Sonden enthält, amplifiziert wurde.

Die ELITe MGB-Sonden werden aktiviert, wenn sie mit den jeweiligen PCR-Produkten hybridisieren. **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** überwachen den Fluoreszenzanstieg und berechnen die Schwellenwertzyklen (Ct) sowie die Schmelztemperaturen (Tm). Die Berechnung der BKV-Menge erfolgt auf der Grundlage einer gespeicherten Kalibrationskurve.

7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument misst den Anstieg der Fluoreszenzemission und zeichnet ihn auf. Die anschließende Datenverarbeitung ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von BKV in der Primärprobe.

Bei den ELITe MGB-Sonden werden die Fluorophore im spiralförmig gefalteten, einzelsträngigen Zustand der Sonde gequencht. Die Fluorophore sind in der Sonden/Amplicon-Duplex aktiv, da der Quencher räumlich von dem Fluorophor getrennt ist. Es ist zu beachten, dass das Fluorophor während der PCR nicht abgespalten wird und für die Dissoziationsanalyse und die Berechnung der Schmelztemperatur verwendet werden kann.

3 BESCHREIBUNG DES PRODUKTS

Das **BKV ELITe MGB Kit** enthält das Assay-Reagenz **BKV Q-PCR Mix**, ein optimiertes und stabilisiertes PCR-Gemisch, das die spezifischen Primer und Sonden enthält für:

- eine Region des Gens, welche das **große T-Antigen** von BKV kodiert, nachgewiesen in Kanal **BKV**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher® gequencht und mit einem FAM-Farbstoff markiert.
- Die Internal Control, die für die **Promoter- und 5'-UTR-Region** des **humanen beta-Globin-Gens** spezifisch ist, nachgewiesen in Kanal **IC**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher gequencht und mit dem Farbstoff AquaPhluor® 525 (AP525) markiert.

Der **BKV Q-PCR Mix** enthält außerdem Puffer, Magnesiumchlorid, Triphosphatnukelotide, AP593-Fluorophor (anstelle von ROX oder Cy5) als Passivreferenz zur Normalisierung der Fluoreszenz, das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie das „Warmstart"-DNA-Polymerase-Enzym. Das Produkt **BKV ELITe MGB Kit** enthält ausreichend Reagenzien für **96 Tests** auf **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius**, wobei **20** µl pro Reaktion verwendet werden.

Das Produkt **BKV ELITe MGB Kit** enthält ausreichend Material für **100 Tests auf anderen Systemen**, wobei **20** µl pro Reaktion verwendet werden.

HINWEIS!

Ein Umrechnungsfaktor ist erforderlich, um die Ergebnisse der quantitativen Analyse in internationalen Einheiten BKV gemäß dem „1st WHO International Standard for BK virus DNA“ (NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) auszudrücken.

4 MIT DEM PRODUKT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Tabelle 1

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
BKV Q-PCR Mix Art.-Nr. RTS175PLD	Gemisch aus Reagenzien für die Real-Time-PCR in Röhrchen mit NATURFARBENEM Verschluss	**4 x 540 µl**	**-**

5 ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Laminar-Flow-Haube.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tischzentrifuge (~5.000 U/min).
- Tisch-Mikrozentrifuge (~13.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (0,5–10 µl, 2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- Sterile 2,0-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Deutschland, Art.-Nr. 72.694.005).
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.

6 ANDERE ERFORDERLICHE PRODUKTE

Die Reagenzien für die Extraktion der Proben-DNA, die interne Extraktions- und Inhibitionskontrolle, die Amplifikations-Positiv- und Negativkontrolle, die DNA-Standards und die Verbrauchsmaterialien **sind nicht** in diesem Produkt enthalten.

Für die Nukleinsäureextraktion, Echtzeit-PCR und Ergebnisinterpretation von Proben werden die folgenden Produkte benötigt:

Tabelle 2

Geräte und Software	Produkte und Reagenzien
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA Art.-Nr. INT030) **ELITe InGenius Software**, Version 1.3.0.19 (oder später) **BKV ELITe_STD**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse **BKV ELITe _PC**, Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Positive Control-Analyse **BKV ELITe _NC**, Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Negative Control-Analyse **BKV ELITe_PL_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Plasmaproben-Analyse **BKV ELITe_U_200_100**, Assay Protocols (Assay-Protokolle) mit Parametern für die Urinproben-Analyse	**ELITe InGenius SP200** (EG SpA., Art.-Nr. INT032SP200) **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (EG SpA, Art.-Nr. INT032CS) **ELITe InGenius PCR Cassette** (EG SpA, Art.-Nr. INT035PCR), **ELITe InGenius Waste Box** (EG SpA, Art.-Nr. F2102-000) **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Sciences Inc., Art.-Nr. TF-350-L-R-S), nur mit ELITe InGenius **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Schweiz, Art.-Nr. 30180118) nur mit ELITe BeGenius **CPE - Internal Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTRCPE) **BKV - ELITe Standard** (EG SpA, Art.-Nr. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTR175PLD)
ELITe BeGenius (EG SpA, Art.-Nr. INT040) **ELITe BeGenius Software**, Version 2.2.1 (oder später) **BKV ELITe_Be_STD**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse **BKV ELITe_Be_PC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Positive Control-Analyse **BKV ELITe_Be_NC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Negative Control-Analyse **BKV ELITe_Be_PL_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Plasmaproben-Analyse **BKV ELITe_Be_U_200_100**, Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Urinproben-Analyse	
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, Art.-Nr. 4406985) **ELITe GALAXY** (EG SpA, Art.-Nr. INT020) mit **Software, Version 1.3.1** (oder später). Extraktionsprotokoll für ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universal)	**ELITe GALAXY 300 Extraction Kit** (EG SpA, Art.-Nr. INT021EX). **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, Art.-Nr. 4346906), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation **CPE – Internal Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTRCPE) **BKV - ELITe Standard** (EG SpA, Art.-Nr. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTR175PLD)

7 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist nur für den In-vitro-Gebrauch bestimmt.

7.1 Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

- Geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe sowie Augen-/Gesichtsschutz tragen.
- Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

- Das Essen, Trinken, Rauchen oder die Verwendung von Kosmetika ist in den Arbeitsbereichen untersagt.
- Nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.
- Restliche Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Vor der Durchführung des Assays alle bereitgestellten Anweisungen aufmerksam lesen.
- Bei der Durchführung des Tests die bereitgestellten Produktanweisungen befolgen.
- Das Produkt nicht nach dem angegebenen Ablaufdatum verwenden.
- Es dürfen nur mit dem Produkt bereitgestellte und vom Hersteller empfohlene Reagenzien verwendet werden.
- Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen verwenden.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

7.2 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

Molekularbiologische Verfahren dürfen nur von qualifizierten und geschulten Fachkräften durchgeführt werden, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, insbesondere im Hinblick auf den Nukleinsäureabbau in den Proben oder die Probenkontamination durch PCR-Produkte.

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

Wenn der Amplifikationslauf mit dem 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument durchgeführt werden muss, ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten sicherzustellen. Niemals ein Amplifikationsprodukt in den für die Extraktion/ Vorbereitung von Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich einführen.

Es werden Laborkittel, Handschuhe und Werkzeuge benötigt, die speziell für den jeweiligen Arbeitslauf vorgesehen sind.

Die Proben müssen geeignet und möglichst für diese Art der Analyse bestimmt sein. Proben müssen unter einer Laminar-Flow-Haube gehandhabt werden. Die zur Verarbeitung der Proben verwendeten Pipetten dürfen ausschließlich für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril und sowohl DNase- und RNase-frei als auch DNA- und RNA-frei sein.

Die Reagenzien müssen unter einer Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Die Pipetten, die für die Handhabung der Reagenzien verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril und sowohl DNase- und RNase-frei als auch DNA- und RNA-frei sein.

Die Extraktionsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung minimiert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden.

Die PCR Cassette muss vorsichtig behandelt werden und darf niemals geöffnet werden, um die Diffusion von PCR-Produkten in die Umgebung und die Kontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.

7.3 Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Tabelle 3

Komponente	Umgebungstemperatur bei Lagerung	Haltbarkeit nach Anbruch	Gefrier- und Auftauzyklen	On-Board-Stabilität (ELITe InGenius und ELITe BeGenius)
BKV Q-PCR Mix	-20°C oder darunter (lichtgeschützt)	einen Monat	bis zu fünf	bis zu fünf separate* Läufe von je drei Stunden oder bis zu 7 aufeinanderfolgende Stunden (2 Läufe von je 3 Stunden und die Zeit, die für den Beginn eines dritten Laufs benötigt wird)

* mit zwischenzeitlichem Gefrierzyklus

8 PROBEN UND KONTROLLEN bei ELITe InGenius und ELITe BeGenius

8.1 Proben

Dieses Produkt ist für die Verwendung auf dem **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** mit den folgenden klinischen Proben, die gemäß den Laborrichtlinien identifiziert und gehandhabt und unter den folgenden Bedingungen entnommen, transportiert und aufbewahrt wurden, bestimmt:

Tabelle 4

Probe	Anforderungen an die Entnahme	Transport-/Lagerbedingungen			
		+16 / +26 °C (Raumtemperatur)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma	EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
Urin	ohne Konservierungs-mittel	≤ 4 Stunden	≤ 1 d	≤ 30 d	≤ 30 d

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; d: Tag.

Auch wenn eine länger Aufbewahrung bei -70 °C möglich ist, wie in der wissenschaftlichen Literatur ausführlich berichtet, sollte eine derartige Anwendung intern von den Endbenutzern des Produkts beurteilt werden.

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

Zum Testen von Proben mit dem **ELITe InGenius** und dem **ELITe BeGenius** müssen die folgenden Assay-Protokolle (Assay Protocol) verwendet werden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits und **ELITe InGenius** bzw. **ELITe BeGenius** mit den angegebenen Matrizes validiert.

Tabelle 5

Probe	Instrument	Name des Assay-Protokolls	Melden Sie	Eigenschaften
Plasma in EDTA	ELITe InGenius	BKV ELITe_PL_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_PL_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
Urin	ELITe InGenius	BKV ELITe_U_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_UL_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

IU: internationale Einheiten

HINWEIS!

Überprüfen Sie, ob das Primärröhrchen und das Probenvolumen mit ELITe InGenius oder ELITe BeGenius kompatibel sind, und befolgen Sie dabei die Gebrauchsanweisung des Extraktionskits **ELITeInGeniusSP200** (EG SpA, Art.-Nr. INT032SP200).

Das Volumen der Probe in einem Primärröhrchen variiert je nach Art des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Falls erforderlich, müssen 200 µl Probe in ein Extraction Tube (Extraktionsröhrchen) (bei ELITe InGenius) bzw. ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (bei ELITe BeGenius) überführt werden.

HINWEIS!

Das Pipettieren in das **Extraction Tube (Extraktionsröhrchen)** oder das **2-ml-Sarstedt-Röhrchen** kann **Kontamination verursachen**. Die geeigneten Pipetten verwenden und alle im Abschnitt „7 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN page 7“ aufgeführten Empfehlungen befolgen.

Aufgereinigte Nukleinsäuren können bei Raumtemperatur 16 Stunden und bei -20 °C oder darunter höchstens einen Monat aufbewahrt werden.

Daten zu störenden Substanzen sind im Abschnitt „11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24“ sind „Potenziell interferierende Substanzen“ aufgeführt.

8.2 PCR-Kalibratoren und -Kontrollen

Für jede Charge des PCR-Reagenzes muss die Kalibrationskurve erstellt und genehmigt werden.

- Für die Kalibrationskurve die vier Konzentrationen des Produkts **BKV ELITe Standard** (nicht im Lieferumfang dieses Kits enthalten) mit dem Assay-Protokoll **BKV ELITe_STD** oder **BKV ELITe_Be_STD** verwenden.

HINWEIS!

Die Konzentrationen der Q – PCR Standards sind in Kopien/Reaktion (105 Kopien/Reaktion, 104 Kopien/Reaktion, 103 Kopien/Reaktion, 102 Kopien/Reaktion) ausgedrückt. Siehe „Unsicherheit der Standardkurve“ im Abschnitt 11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24

Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen müssen für jede Charge des PCR-Reagenzes erstellt und genehmigt werden.

- Für die Positive Control das Produkt **BKV - ELITe Positive Control** (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **BKV ELITe_PC** oder **BKV ELITe_Be_PC** verwenden
- Für die Negative Control hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **BKV ELITe_NC** oder **BKV ELITe_Be_NC** verwenden

HINWEIS!

ELITe InGenius und **ELITe BeGenius** ermöglichen die Erstellung und Speicherung der Kalibrationskurve und die Validierung der PCR-Kontrollen für jede PCR-Reagenziencharge.

Kalibrierungskurven verfallen nach **60 Tagen**, danach muss die Kalibration erneut durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen verfallen nach **15 Tagen**, danach müssen die Positive Control und die Negative Control erneut durchgeführt werden.

Die Kalibratoren und PCR-Kontrollen müssen erneut generiert werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- eine neue Reagenziencharge wird verwendet,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- eine größere Wartungs- oder Instandhaltungsmaßnahme am Gerät **ELITe InGenius** oder **ELITe BeGenius** durchgeführt wird.

8.3 Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das Extraktions- und PCR-Verfahren zu überprüfen. Es können archivierte Proben oder zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden.

9 VERFAHREN BEI ELITe InGenius

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

Tabelle 6

SCHRITT 1	Prüfung der Systembereitschaft	
SCHRITT 2	Einrichtung des Laufs	A) Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])
		B) Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
		C) Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])
		D) Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
SCHRITT 3	Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse	1) Validierung der Kalibrationskurve
		2) Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control
		3) Validierung der Probenergebnisse
		4) Ausgabe des Probenergebnisberichts

9.1 SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- **ELITe InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) bestätigen, dass die Kalibratoren (**Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**Positive Control**, **Negative Control**) für die zu verwendende Charge des PCR Mix genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay Protocols (Assay-Protokolle) verwenden (siehe 8 „Proben und Kontrollen“ page 9).

Falls das betreffende Assay Protokoll nicht im System geladen ist, wenden Sie sich an Ihren ELITechGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

9.2 SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **BKV ELITe MGB Kit** kann auf **ELITe InGenius** für die folgenden Läufe verwendet werden:

A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR]),

B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),

C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR]),

D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]).

Alle benötigten Parameter sind in den auf dem Gerät verfügbaren Assay Protokollen enthalten und werden bei Auswahl des Assay Protokolls automatisch geladen.

HINWEIS!

ELITe InGenius kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

HINWEIS!

Den **PCR Mix** lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

Zum Einrichten eines der vier Lauftypen die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	**B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])**
1	**Proben identifizieren** und, falls erforderlich, auf Raumtemperatur auftauen, vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Falls erforderlich, 200 µl Probe in ein zuvor etikettiertes Extraction Tube (Extraktionsröhrchen) überführen. Die benötigten **CPE-Röhrchen** 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen.	**Elution Tube** (Elutionsröhr) mit den extrahierten Nukleinsäuren auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.
2	Auf der Startseite „**Perform Run**“ (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite „**Perform Run**“ (Lauf durchführen) auswählen.
3	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.
4	Für jede Probe eine Spur zuweisen und unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.	Für jede Probe eine Spur zuweisen und unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
5	Das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) **auswählen** (siehe „Proben und Kontrollen“).	Das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).
6	Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).	In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
7	Als Proben-Ladeposition „Primary Tube“ (Primärröhrchen) oder „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen. Sicherstellen, dass der Verdünnungsfaktor (**Dilution factor**) „**1**“ beträgt.	Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr [untere Reihe]) lautet. Sicherstellen, dass der Verdünnungsfaktor (**Dilution factor**) „**1**“ beträgt.
8	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
9	**CPE** und den **PCR Mix** gemäß der „Load List“ (Liste Laden) auf den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) **laden** und die Chargennummer und das Ablaufdatum des CPE und PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben.	Den **PCR Mix** gemäß der „Load List“ (Liste Laden) auf den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) **laden** und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben.
10	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
11	Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
12	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
13	PCR-Kassette, ELITe InGenius SP 200 Extraktionskartuschen und alle benötigten Verbrauchsmaterialien und zu extrahierenden Proben **laden**.	PCR-Kassette und Elution Tube (Elutionsröhr) mit extrahierten Proben **laden**.
14	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
15	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
16	„Start“ (Starten) drücken.	„Start“ (Starten) drücken.

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
1	Die benötigten **Q-PCR Standard -Röhrchen** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.	**Positive Control-Röhrchen** 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Die **Negative Control vorbereiten**: dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen überführen, das im Lieferumfang des ELITe InGenius SP 200 Consumable Set enthalten ist.
2	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.	Sicherstellen, dass „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.
4	Für den Q-PCR Standard die Spur („Track“) zuweisen, das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) (siehe „Proben und Kontrollen“) in der Spalte „Assay“ **auswählen** und die Reagenzien-Chargennummer und das Verfallsdatum eingeben.	Das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) **auswählen** (siehe „Proben und Kontrollen“). Die Chargennummer und das Ablaufdatum der Positive Control und des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie eingeben.
5	Sicherstellen, dass in der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) ausgewählt ist.	Sicherstellen, dass in der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) ausgewählt ist.
6	Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr [untere Reihe]) lautet.	Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr [untere Reihe]) lautet.
7	Den **PCR Mix** gemäß der „Load List“ (Liste Laden) auf den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) **laden** und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben.	Den **PCR Mix** gemäß der „Load List“ (Liste Laden) auf den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) **laden** und die Chargennummer und das Ablaufdatum des PCR Mix sowie die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben.
8	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
9	Die Spitzen in dem/den Spitzenständer/n („Tip Rack (s)“) im Inventory Area (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in dem/den Spitzenständer/n („Tip Rack(s)“) im Inventory Area (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
10	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11	Die PCR-Kassette und die Q-PCR-Standard-Röhrchen **laden**.	PCR-Kassette, Positive Control und Negative Control **laden**.

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
12	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
13	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
14	„Start“ (Starten) drücken.	„Start“ (Starten) drücken.

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

HINWEIS!

Am Ende des Laufs muss die übrige extrahierte Probe im **Elution Tube** (Elutionsröhr.) aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und maximal einen Monat bei -20 ±10 °C aufbewahrt werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der **PCR Mix** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt oder bis zu 7 Stunden (2 Läufe von jeweils 3 Stunden sowie die zum Starten eines dritten Laufs nötige Zeit) im gekühlten Block aufbewahrt werden; vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der übrige **Q - PCR Standard** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter gelagert werden. Verschütten des Q - PCR Standard vermeiden.

HINWEIS!

Der **Q - PCR Standard** kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann die übrige **Positive Control** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt werden. Ein Verschütten der Positive Control vermeiden. Die übrige **Negative Control** muss entsorgt werden.

HINWEIS!

Die **Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs müssen die **PCR Cassette** und die anderen Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

9.3 SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

ELITe InGenius überwacht die Fluoreszenzsignale der Zielsequenz und der Internal Control für jede Reaktion und wendet die Assay-Protokoll-Parameter automatisch an, um PCR-Kurven zu erstellen, anhand derer anschließend die Ergebnisse interpretiert werden.

At the end of the run, the “Results Display” screen is automatically shown. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können die Ergebnisse genehmigt und die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

HINWEIS!

ELITe InGenius kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

ELITe InGenius generiert Ergebnisse mithilfe des **BKV ELITe MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

1. Validierung der Kalibrationskurve,
2. Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control,
3. Validierung der Probenergebnisse,
4. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

9.3.1 Validierung der Kalibrationskurve

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Kalibratorreaktionen mit den **BKV ELITe STD** Assay-Protokoll-Parametern. Die Kalibrationskurve ergibt sich aus dem resultierenden Ct-Wert bei der jeweiligen Konzentration.

Die für die PCR-Reagenziencharge spezifischen Kalibrationskurven werden in der Datenbank („Calibration“) gespeichert. Sie können von Mitarbeitern mit der Qualifikation „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

Die Kalibrationskurve läuft **nach 60 Tagen** ab.

HINWEIS!

Erfüllt die Kalibrationskurve nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „Failed“ (nicht bestanden) auf dem Bildschirm „Calibration“ angezeigt. In diesem Fall können die Ergebnisse nicht genehmigt werden und die Kalibrator-Amplifikationsreaktionen müssen wiederholt werden. Außerdem werden Proben, die nicht in den Lauf einbezogen wurden, nicht quantifiziert und müssen ebenfalls wiederholt werden, um quantitative Ergebnisse zu generieren.

9.3.2 Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positivkontrolle und Negativkontrolle

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Reaktionen der Positive Control und der Negative Control mit den Parametern der Assay-Protokolle (Assay Protocols) **BKV ELITe_PC** und **BKV ELITe_NC**. Die resultierenden Ct-Werte werden in Konzentrationswerte umgerechnet und zur Überprüfung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) herangezogen.

Die Ergebnisse der Positive Control und Negative Control, die für die PCR-Reagenziencharge spezifisch sind, werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert. Sie können vom „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisung auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

Die Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control laufen **nach 15 Tagen** ab.

Die **ELITe InGenius Software** verarbeitet die Ergebnisse der Positive Control und Negative Control und generiert Kontrollendiagramme („Control Charts“). Zum Einrichten der initialen Regelkarte werden vier genehmigte Ergebnisse der Positive Control und Negative Control verwendet. Für darauf folgende Kontrollen werden die Ergebnisse von der Software analysiert, um sicherzustellen, dass die Systemleistungen innerhalb der Akzeptanzkriterien liegen, die in den Kontrollendiagrammen angezeigt sind. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

HINWEIS!

Erfüllt das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „Failed“ (nicht bestanden) im Bildschirm „Controls“ angezeigt. In diesem Fall können die Ergebnisse nicht genehmigt werden und die Läufe der Positive Control oder Negative Control müssen wiederholt werden.

HINWEIS!
Ist das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control ungültig und wurden die Proben in denselben Lauf einbezogen, können die Proben genehmigt werden; ihre Ergebnisse werden jedoch nicht validiert. In diesem Fall müssen alle fehlgeschlagenen Kontrollen und Proben wiederholt werden.

9.3.3 Validierung der Probenergebnisse

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenz (Kanal **BKV**) und die Internal Control (Kanal **IC**) mit den Assay-Protokoll-Parametern **BKV ELITe_PL_200_100** oder **BKV ELITe_U_200_100**. Die resultierenden Ct-Zielwerte werden in Konzentrationswerte umgerechnet.

Die Ergebnisse werden auf dem Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) angezeigt.

Die Probenergebnisse können genehmigt werden, wenn die drei Bedingungen in der nachfolgenden Tabelle erfüllt sind.

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

Die Probenergebnisse werden von der **ELITe InGenius Software** anhand der Assay-Protokoll-Parameter automatisch interpretiert.

Die möglichen Ergebnismeldungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Für jede Probe meldet das System eine Kombination aus den folgenden Meldungen, die angeben, ob die Pathogen-DNA nachgewiesen wurden oder nicht.

Ergebnis des Probenlaufs	**Interpretation**
BKV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU/mL (BKV: DNA erkannt, Menge gleich „XXX“ Kopien/ml oder IU/ml)	In der Probe wurde **BKV-DNA** innerhalb des Messbereichs des Assays **nachgewiesen**, ihre Konzentration wird angezeigt.
BKV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU/mL (BKV: DNA erkannt, Menge unter „LLoQ“ Kopien/ml oder IU/ml)	In der Probe wurde **BKV-DNA nachgewiesen**, ihre Konzentration liegt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Assays.
BKV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL (BKV: DNA erkannt, Menge über „ULoQ“ Kopien/ml oder IU/ml)	In der Probe wurde **BKV-DNA nachgewiesen**, ihre Konzentration liegt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Assays.
BKV: DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU/mL (BKV: DNA nicht erkannt oder unter „LoD“ Kopien/ml oder IU/ml)	In der Probe wurde **keine BKV-DNA nachgewiesen.** Die Probe wurde negativ auf BKV-DNA getestet oder die Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.
Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	**Ungültiges Testergebnis** durch fehlerhafte Internal Control (z. B. aufgrund von falscher Extraktion oder Verschleppung von Inhibitoren). Der Test sollte wiederholt werden.

Als „Invalid-Retest Sample“ (Ungültig – Probe erneut testen) ausgegebene Proben: In diesem Fall wurde die Internal-Control-DNA möglicherweise aufgrund von Problemen beim Probenentnahme-, Extraktions- oder PCR-Schritt nicht effizient erkannt (z. B. falsche Probenahme, Abbau oder Verlust von DNA während der Extraktion oder Inhibitoren im Eluat), was zu falschen Ergebnissen führen kann.

Wenn ausreichend Eluatvolumen übrig bleibt, kann das Eluat (verdünnt oder unverdünnt) mithilfe eines Amplifikationslaufs im Modus „PCR Only“ (nur PCR) erneut getestet werden. Ist das zweite Ergebnis ungültig, muss die Probe beginnend mit der Extraktion einer neuen Probe im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) erneut getestet werden (siehe 17 FEHLERBEHEBUNG page 45).

Als „BKV: DNA Not Detected or below “LoD” copies/mL or IU/mL“ (BKV: DNA nicht erkannt oder unter „LoD“ Kopien/ml oder IU/ml) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, BKV wurde jedoch nicht nachgewiesen. In diesem Fall kann entweder die Probe für BKV-DNA negativ sein oder die BKV-DNA ist bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden (siehe 11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24).

BKV-DNA-positive Proben mit einer Konzentration unter der Nachweisgrenze (und der unteren Bestimmungsgrenze) des Assays werden, falls nachgewiesen, als „BKV: DNA Detected, quantity below “LLoQ” copies/mL or IU/mL“ (BKV: DNA erkannt, Menge unter „LLoQ“ Kopien/ml oder IU/ml) ausgegeben (siehe 11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24).

BKV-DNA-positive Proben innerhalb des linearen Messbereichs werden erkannt und als „BKV: DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies/mL or IU/mL“ (BKV: DNA erkannt, Menge gleich „XXX“ Kopien/ml oder IU/ml) ausgegeben (siehe 11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24).

BKV-DNA-positive Proben, die oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze liegen, werden als „BKV:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL or IU/mL“ (BKV: DNA erkannt, Menge über „ULoQ“ Kopien/ml oder IU/ml) ausgegeben (siehe11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24) und sind nicht zur Quantifizierung geeignet. Falls erforderlich muss die Probe vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt und erneut getestet werden, um Ergebnisse innerhalb des linearen Messbereichs des Assays zu erzielen.

HINWEIS!

Bei der Interpretation der mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

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

9.3.4 Ausgabe des Probenergebnisberichts

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

Der „Sample Report“ zeigt die Ergebnisdetails sortiert nach ausgewählter Probe (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Ergebnisdetails nach ausgewählter Spur an.

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

10 VERFAHREN BEI ELITe BeGenius

Das beim Gebrauch des **BKV ELITe MGB Kit** mit dem **ELITe BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

Tabelle 7

SCHRITT 1	Prüfung der Systembereitschaft	
SCHRITT 2	Einrichtung des Laufs	A) Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])
		B) Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
		C) Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])
		D) Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
SCHRITT 3	Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse	1) Validierung der Kalibrationskurve
		2) Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control
		3) Validierung der Probenergebnisse
		4) Ausgabe des Probenergebnisberichts

10.1 SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- **ELITe BeGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- auf der Startseite im Menü „Calibrations“ (Kalibrationen) bestätigen, dass die Kalibratoren (**Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**Positive Control, Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden (siehe „Proben und Kontrollen“).

Falls das betreffende Assay Protokoll nicht im System geladen ist, wenden Sie sich an Ihren ELITechGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

10.2 SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **BKV ELITe MGB Kit** kann auf **ELITe BeGenius** für die folgenden Läufe verwendet werden:

A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR]),

B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),

C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR]),

D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]).

Alle benötigten Parameter sind in den auf dem Gerät verfügbaren Assay-Protokollen enthalten und werden bei Auswahl des Assay-Protokolls automatisch geladen.

HINWEIS!

ELITe BeGenius kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

HINWEIS!
Den **PCR Mix** lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

Zum Einrichten eines der vier Lauftypen die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	**B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])**
1	**Proben identifizieren** und, falls erforderlich, auf Raumtemperatur auftauen, vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Falls erforderlich, 200 µl Probe in ein zuvor etikettiertes Extraction Tube (Extraktionsröhrchen) überführen. Die benötigten **CPE-Röhrchen** 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen.	**Elution Tube** (Elutionsröhr) mit den extrahierten Nukleinsäuren auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.
2	Auf der Startseite „**Perform Run**“ (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite „**Perform Run**“ (Lauf durchführen) auswählen.
3	Alle Racks aus der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.	Die „Racks“ aus „Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3)“ der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4	Den Laufmodus („Run mode“) wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).	Den Laufmodus („Run mode“) wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
5	Die Proben in das „Sample Rack“ (Probenständer) laden. (Hinweis: Wenn als Sekundärröhrchen „2 mL Tubes“ (2-ml-Röhrchen) geladen werden, verwenden Sie die blauen Adapter für das „Sample Rack“ [Probenständer]).	Die Proben in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) laden.
6	**Das „Sample Rack“** in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 5“ (L5). Falls erforderlich unter „Sample ID“ (SID) die Proben-ID für jede verwendete „Position“ eingeben. (Beim Laden von Sekundärröhrchen „2-ml-Röhrchen“ angeben. Bei Sekundärröhrchen ohne Barcode die Proben-ID manuell eingeben.	**Das „Elution Rack“** in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 3“ (L3). Falls erforderlich, für jede „Position“ die Proben-ID („Sample ID“), die Probenmatrix („Sample Matrix“), das Extraktionskit („Extraction Kit“) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted eluate vol.“) eingeben.
7	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.
9	Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).	Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).
10	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11	Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren ab Punkt 6 wiederholen.	Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren ab Punkt 6 wiederholen.
12	Die „Elution tubes“ (Elutionsröhr) in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) laden (Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit mit einem Barcode etikettiert werden).	Nicht anwendbar

	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
13	Das „Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3). Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren wiederholen und dabei „Lane 2“ (L2) verwenden.	Nicht anwendbar
14	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Nicht anwendbar
15	CPE und PCR Mix in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) laden.	Den PCR Mix in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) laden.
16	Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2), falls verfügbar, oder in „Lane 1“ (L1) einsetzen. Falls erforderlich, für jeden PCR Mix und/oder CPE unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2), falls verfügbar, oder in „Lane 1“ (L1) einsetzen. Falls erforderlich, für jeden PCR Mix unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
17	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
18	Die Spitzen in dem/den „Tip Rack(s)“ (Spitzenständer/n) im „Inventory Area“ (Invetarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in dem/den „Tip Rack (s)“ (Spitzenständer/n) im „Inventory Area“ (Invetarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
19	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
20	Das „PCR Rack“ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) laden.	Das „PCR Rack“ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) laden.
21	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
22	Den „Extraction Rack“ (Extraktionsrack) mit den „ELITe InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden.	Nicht anwendbar
23	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
24	„Start“ (Starten) drücken.	„Start“ (Starten) drücken.

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
1	Die benötigten **Q-PCR Standard -Röhrchen** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.	**Positive Control-Röhrchen** 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Die **Negative Control vorbereiten**: dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen überführen, das im Lieferumfang des ELITe InGenius SP 200 Consumable Set enthalten ist.
2	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3	Die „Racks“ aus „Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3)“ der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.	Die „Racks“ aus „Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3)“ der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4	Den Rund Mode („run mode“) wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).	Den Laufmodus („Run mode“) wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
5	Die **Q-PCR** Standard-Röhrchen in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) **laden**.	Die **Röhrchen für die Positive Control und Negative Control** in das „Elution Rack“ (Elutionsablage) **laden**.
6	Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 3“ (L3). Falls erforderlich, für jede „Position" unter „Reagent name" den Reagenznamen, unter „S/N" die Seriennummer, unter „Lot No." die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 3“ (L3). Falls erforderlich, für jede „Position" unter „Reagent name" den Reagenznamen, unter „S/N" die Seriennummer, unter „Lot No." die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
7	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.
9	Das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).	Das **Assay Protocol** (Assay-Protokoll) in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).
10	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11	Den **PCR Mix** in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) **laden**.	Den **PCR Mix** in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/ Elutionsablage) **laden**.
12	Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2) **einsetzen**. Falls erforderlich, für jeden PCR Mix unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2) einsetzen. Falls erforderlich, für jeden PCR Mix unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
13	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
14	Die Spitzen in den Spitzenständern („Tip Racks“) im „Inventory Area“ (Invetarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in den Spitzenständern („Tip Racks“) im „Inventory Area“ (Invetarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
15	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
16	Das „**PCR Rack**“ mit „**PCR Cassette**“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) **laden**.	Das „**PCR Rack**“ mit „**PCR Cassette**“ (PCR-Kassette) in den Inventory Area (Inventarbereich) **laden**.
17	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
18	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
19	„Start“ (Starten) drücken.	„Start“ (Starten) drücken.

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

HINWEIS!

Am Ende des Laufs muss die übrige extrahierte Probe im **Elution Tube** (Elutionsröhr.) aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und maximal einen Monat bei -20 ±10 aufbewahrt werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der **PCR Mix** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt oder bis zu 7 Stunden (2 Läufe von jeweils 3 Stunden sowie die zum Starten eines dritten Laufs nötige Zeit) im gekühlten Block aufbewahrt werden; vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann der übrige **Q - PCR Standard** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt werden. Verschütten des Q - PCR Standard vermeiden.

HINWEIS!

Der **Q - PCR Standard** kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs kann die übrige **Positive Control** aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt werden. Ein Verschütten der **Positive Control** vermeiden. Die übrige **Negative Control** muss entsorgt werden.

HINWEIS!

Die **Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

HINWEIS!

Am Ende des Laufs müssen die **PCR Cassette** und die anderen Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

10.3 SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

ELITe BeGenius überwacht die Fluoreszenzsignale der Zielsequenz und der Internal Control für jede Reaktion und wendet die Assay-Protokoll-Parameter automatisch an, um PCR-Kurven zu erstellen, anhand derer anschließend die Ergebnisse interpretiert werden.

At the end of the run, the “Results Display” screen is automatically shown. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können die Ergebnisse genehmigt und die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

HINWEIS!
ELITe BeGenius kann mit dem „Laboratory Information System“ (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

ELITe BeGenius generiert die Ergebnisse mithilfe des **BKV ELITe MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

1. Validierung der Kalibrationskurve,
2. Validierung der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control,
3. Validierung der Probenergebnisse,
4. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

HINWEIS!
Einzelheiten sind dem entsprechenden Abschnitt unter **Verfahren bei ELITe InGenius** zu entnehmen.

11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius

11.1 Nachweisgrenze (LoD)

Die Nachweisgrenze (LoD) des Assays in Verbindung mit den Matrizes EDTA-Plasma und Urin wurde auf den ELITe InGenius Geräten durch Testen einer Reihe BKV-negativer Matrizes, die mit Referenzmaterial von BKV dotiert waren („1st WHO International Standard for BK Virus DNA“, NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich), bestimmt. Es wurde eine Probit-Regressionsanalyse der Ergebnisse durchgeführt und die Nachweisgrenze als die Konzentration geschätzt, bei der eine 95 %-ige Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses vorliegt.

Die Ergebnisse für beide Matrizes sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 8 Nachweisgrenze mit ELITe InGenius (IU/ml)

Matrix	LoD	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Urin	142 IU/ml	110 IU/ml	222 IU/ml
Plasma	215 IU/ml	168 IU/ml	319 IU/ml

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im entsprechenden Abschnitt angegeben ist. 11.9 Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten page 29

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Tabelle 9 Nachweisgrenze mit ELITe InGenius (Kopien/ml)

Matrix	LoD	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Urin	89 Kopien/ml	69 Kopien/ml	139 Kopien/ml
Plasma	165 Kopien/ml	129 Kopien/ml	245 Kopien/ml

Zur Verifizierung des berechneten LoD-Werts für die einzelnen Matrizes wurde jeweils ein Pool, der in der angegebenen Konzentration mit zertifiziertem BKV-Referenzmaterial dotiert war, auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius getestet.

Die erhaltenen Ergebnisse für jede Matrix bestätigten die angegebene Konzentration für die Zielsequenz von BKV ELITe MGB Kit auf den Geräten ELITe InGenius und ELITe BeGenius.

11.2 Inklusivität: Nachweiseffizienz bei verschiedenen Stämmen oder Isolaten

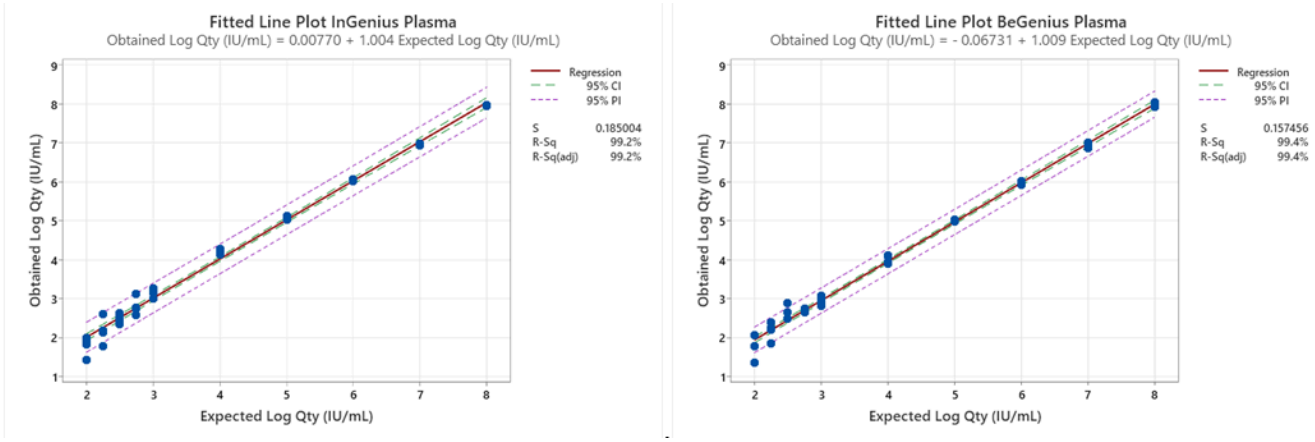
Die Inklusivität des Assays, d. h. die Nachweiseffizienz bei verschiedenen Stämmen oder Isolaten von BK Polyomavirus wurde mittels In-silico-Analyse bewertet. Die Analyse zeigte eine Sequenzerhaltung und ein Nichtvorhandensein signifikanter Mutationen. Daher wird ein effizienter Nachweis für die meisten Stämme oder Isolate erwartet.

11.3 Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen

Der lineare Messbereich des Assays wurde in Verbindung mit den Matrizes EDTA-Plasma und Urin auf **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** anhand einer Reihe von Verdünnungen von BKV-Referenzmaterial (BKV Virus Culture Fluid, hitzeinaktiviert, ZeptoMetrix) in BKV-DNA-negativer Matrix ermittelt.

Die Ergebnisse für jede Matrix sind in den folgenden Abschnitten angegeben.

Plasma:



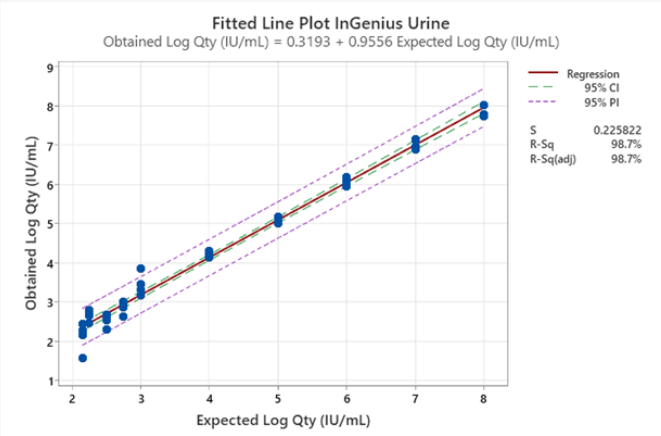
Der lineare Messbereich in Kopien/ml für EDTA-Plasma wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der in Abschnitt angegeben ist. 11.9 Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten page 29

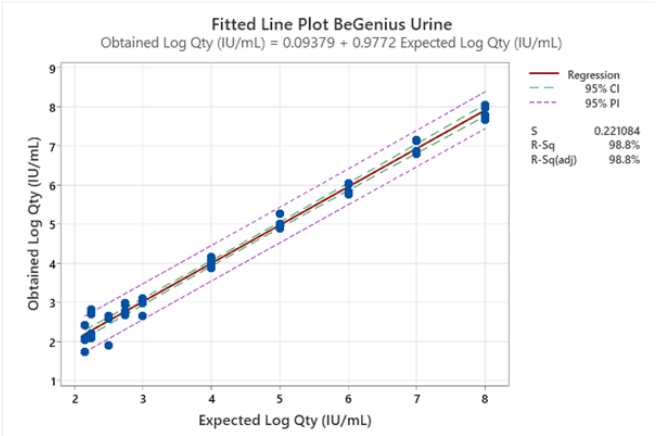
Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10 Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Einheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	215	130.000.000
Kopien/ml	165	100.000.000

Urin:





Der lineare Messbereich in Kopien/ml für Urin wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der in Abschnitt angegeben ist. 11.9 Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten page 29

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 11 Linearer Messbereich für Urinproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Einheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	142	160.000.000
Kopien/ml	89	100.000.000

11.4 Unsicherheit der Standardkurve

Der Unsicherheitswert der Standardkurve wurde durch Kombination der zufälligen Fehler (SD) aller Levelquantifizierungen und Multiplikation mit dem Abdeckungsfaktor k = 2 (erweiterte kombinierte Unsicherheit) berechnet und beträgt 0,2146 log Kopien/Reaktion.

Tabelle 12

Standardkurven-Levels	Theoretisch	Gemessen	Messabweichung	SD	Erweiterte kombinierte Unsicherheit
	Log Kopien/ Reaktion	Log Kopien/ Reaktion			
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	

11.5 Potenziell interferierende Marker: Kreuzreaktivität

Die potenzielle Kreuzreaktivität mit anderen ungewollten Organismen des Produkts BKV ELITe MGB Kit wurde mittels In-silico-Analyse der in der EBI ENA Nukleotid-Datenbank verfügbaren Sequenzen bewertet. Die Analyse ergab keine signifikante Sequenzhomologie mit anderen unbeabsichtigten Organismen (Viren, Bakterien und Pilze). Es wird daher keine Kreuzreaktivität oder Interferenz erwartet.

11.6 Potenziell interferierende Substanzen: Inhibition

Die potenzielle Inhibition interferierender Substanzen (endogen und exogen), die in klinischen Proben vorkommen können, wurde für den Assay durch die Analyse einer Reihe von Substanzen in relevanten Konzentrationen in BKV-positiven Proben bewertet.

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

Tabelle 13 Plasma

Substanz	Pos. / Wiederh.	Ergebnis
Azithromycin	5/5	Keine Interferenz
Ganciclovir	5/5	Keine Interferenz
Ribavirin	5/5	Keine Interferenz
Abacavir	5/5	Keine Interferenz
Cidofovir	5/5	Keine Interferenz
Cyclosporin A	5/5	Keine Interferenz
Bilirubin	5/5	Keine Interferenz
EDTA	5/5	Keine Interferenz
Heparin	5/5	Keine Interferenz

Die getesteten Substanzen interferieren nicht mit der Amplifikation von BKV oder der Internal Control.

Tabelle 14 Urin

Substanz	Pos. / Wiederh.	Ergebnis
Azithromycin	5/5	Keine Interferenz
Bilirubin	5/5	Keine Interferenz
HBW	5/5	Keine Interferenz
Phenazopyridin Hydrochlorid	5/5	Keine Interferenz

Die getesteten Substanzen interferieren nicht mit der Amplifikation von BKV oder der Internal Control.

11.7 Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs und der laufübergreifenden Wiederholpräzision des Assays wurde mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius eine Reihe von in EDTA entnommenen Plasmaproben analysiert, einschließlich einer negativen Probe und zweier Proben, die mit zertifiziertem BKV-Referenzmaterial („1st WHO International Standard for BKV virus DNA“, NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) dotiert waren.

Ein Beispiel für die Ergebnisse der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs (an einem Tag) ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 15 Wiederholpräzision innerhalb des Laufs auf ELITe InGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,66	0,45	0,82
10 x LoD	8	34,88	0,56	1,33

Tabelle 16 Wiederholpräzision innerhalb des Laufs auf ELITe BeGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	37,09	0,52	1,40
10 x LoD	8	35,45	0,31	0,88

Ein Beispiel für die Ergebnisse der laufübergreifenden Wiederholpräzision ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 17 Laufübergreifende Wiederholpräzision auf ELITe InGenius

Probe	BKV- –Tage 1-2			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD Ct	KV % Ct
Negativ	16	-	-	-
3 x LoD	16	36,36	0,52	1,43
10 x LoD	16	34,40	0,68	1,96

Tabelle 18 Laufübergreifende Wiederholpräzision auf ELITe BeGenius

Probe	BKV – Tage 1-2			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD Ct	KV % Ct
Negativ	16	-	-	-
3 x LoD	16	36,68	0,71	1,43
10 x LoD	16	34,98	0,55	1,96

Beim Test der Wiederholpräzision erkannte der BKV ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% unter 5 % aus.

11.8 Vergleichspräzision

Zur Bewertung der Vergleichspräzision des Assays wurde mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius eine Reihe von in EDTA entnommenen Plasmaproben analysiert, die negativ oder mit BKV („1st WHO International Standard for BKV virus DNA“, NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) dotiert waren.

Eine Übersicht der geräteübergreifenden Vergleichspräzision (bei zwei Geräten) ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 19 Geräteübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe InGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,72	0,30	0,82
10 x LoD	8	30,89	0,41	1,33

Tabelle 20 Geräteübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe BeGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,87	0,58	1,56
10 x LoD	8	34,86	0,25	0,72

Eine Übersicht der chargenübergreifenden Vergleichspräzision (bei zwei Chargen) ist in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 21 Chargenübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe InGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,94	0,36	0,82
10 x LoD	8	35,07	0,28	1,33

Tabelle 22 Chargenübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe BeGenius

Probe	BKV			
	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,81	0,66	1,56
10 x LoD	8	35,01	0,41	0,72

Beim Test der Vergleichspräzision erkannte der BKV ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% unter 5 % aus.

11.9 Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der Umrechnungsfaktor zur Angabe der quantitativen Ergebnisse von Kopien/ml in internationale Einheiten (International Units, IU) wurde für jede Matrix berechnet. Hierfür wurde das zertifizierte kalibrierte Referenzmaterial („1st WHO International Standard for BKV virus DNA“ (NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich) verwendet.

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

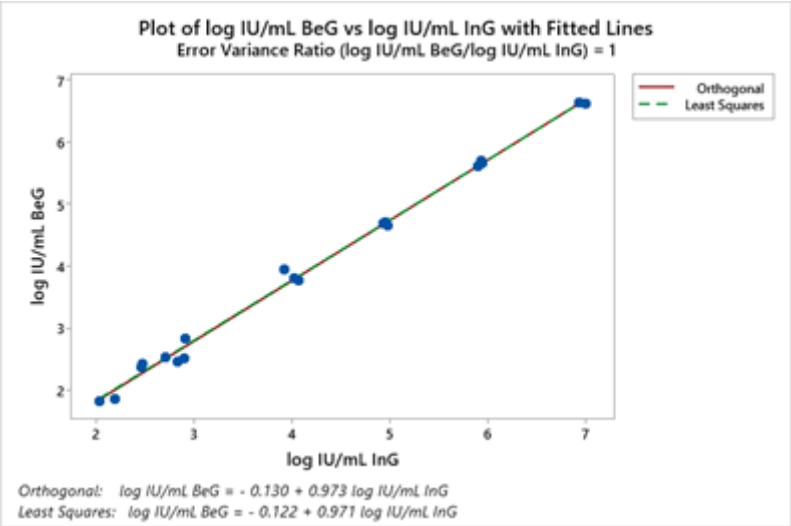
Tabelle 23 Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten (IU) mit ELITe InGenius

Probenvolumen	Matrix	Umrechnungsfaktor Fc (IU/Kopien)
200 µl	Plasma	1,3
200 µl	Urin	1,6

Zur Berechnung der Korrelation wurden die erhaltenen Ergebnisse mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert.

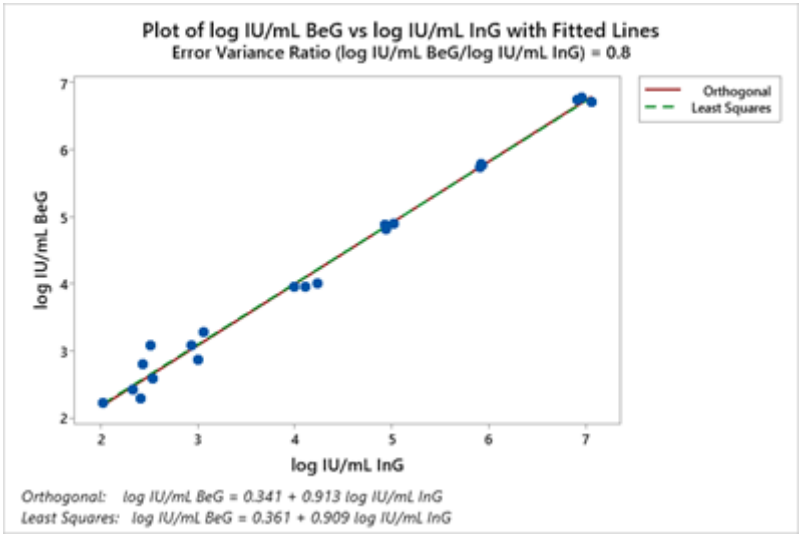
Die Ergebnisse für jede Matrix sind in den folgenden Abschnitten angegeben.

Plasma



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von -0,130 (95%-KI: -0,263 – 0,002) und eine Steigung von 0,973 (95%-KI: 0,944 - 1,001).

Urin:



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von 0,341 (95%-KI: 0,152 - 0,529) und eine Steigung von 0,913 (95%-KI: 0,872 - 0,954).

11.10 Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Spezifität des Assays als Bestätigung negativer Proben wurden in Verbindung mit **ELITe InGenius** klinische Proben, die für BKV-DNA als negativ oder vermutlich negativ bestätigt worden waren, analysiert. Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufwies, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit ELITe InGenius erhaltene diagnostische Spezifität des Assays auch für ELITe BeGenius.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 24 Diagnostische Spezifität

Proben	Anzahl	Positiv	Negativ	Diagnostische Spezifität in %
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-negatives Plasma	79	3	76	**96,2 %**
BKV-DNA-negativer Urin ohne Konservierungsmittel	68	0	68	**100 %**

Der Ct-Grenzwert für die IC wurde beim Test mit ELITe InGenius bzw. ELITe BeGenius für in EDTA entnommene Plasmaproben und ohne Konservierungsmittel entnommene Urinproben auf 35 festgelegt.

11.11 Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität des Assays als Bestätigung positiver klinischer Proben wurden in Verbindung mit **ELITe InGenius** klinische Proben analysiert, die für BKV-DNA als positiv bestätigt oder mit Referenzmaterial dotiert waren. Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufwies, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit ELITe InGenius erhaltene diagnostische Sensitivität des Assays auch für ELITe BeGenius.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 25 Diagnostische Sensitivität

Proben	Anzahl	Positiv	Negativ	Diagnostische Sensitivität in %
In EDTA entnommenes, BKV-DNA-positives Plasma	34	34	0	100 %
In EDTA entnommenes, BKV-dotiertes Plasma	24	24	0	
Gesamt	58	58	0	
BKV-DNA-positiver Urin ohne Konservierungsmittel	67	67	0	100 %

HINWEIS!

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

12 PROBEN UND KONTROLLEN BEI ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

12.1 Proben

Die folgenden Proben und Nukleinsäureextraktionsmethoden sind für die Verwendung mit dem **BKV ELITe MGB Kit** unter Verwendung des ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument validiert.

Tabelle 26

Probentyp	Kit/Methode	Protokoll	Eingangsvolumen (µl)	Elutionsvolumen (µl)	Mindestvolumen Primärröhrchen (µl)	Besondere Anweisung
Plasma	ELITe GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	10 µl/CPE-Probe zur IC + Trägerlösung geben

12.2 Störende Substanzen

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

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

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

Keine Proben verwenden, die in Heparin entnommen wurden, da dieses bekanntlich die reverse Transkription und PCR hemmt.

12.3 Amplifikationskontrollen

Jeder Amplifikationslauf muss mit einer Negative Control-Reaktion und einer Positive Control-Reaktion validiert werden.

Für die Negative Control muss statt der aus der Probe extrahierten DNA hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang dieses Kits enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positive Control das Produkt **BKV - ELITePositive Control** oder das Produkt **BKV - ELITe Standard** verwenden.

12.4 Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das Extraktions- und PCR-Verfahren zu überprüfen. Es können archivierte Proben oder zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden.

13 VERFAHREN BEIM ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

13.1 Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

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

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

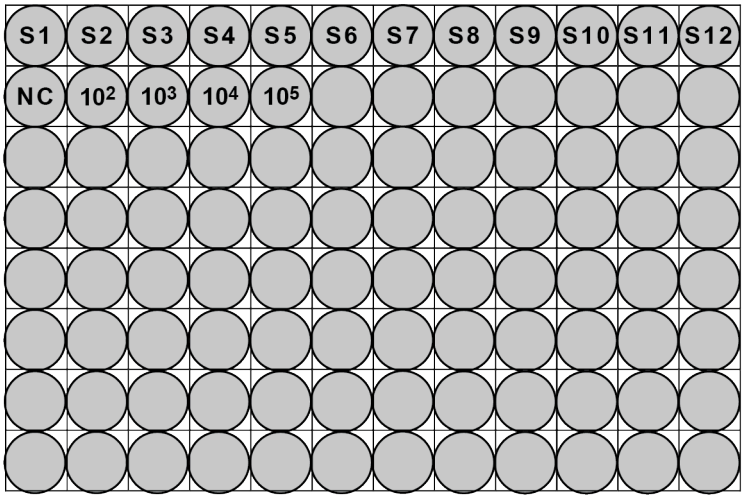
- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen und einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;

- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die JCV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „JCV“ nennen,
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die Internal Control so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „ROX“ (AP593 wird statt ROX verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

HINWEIS!

Zum Bestimmen des DNA-Titers in der Ausgangsprobe eine Reaktionsreihe mit den **Q - PCR Standards** (105 Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

Nachfolgend ist beispielhaft aufgeführt, wie die quantitative Analyse von 12 Proben eingerichtet wird.



Legende: S1 -**S12**: Zu analysierende Proben; **NC**: Negative Control der Amplifikation;

10 ²: 10^2-Standardkopien; **10³**: 10^3-Standardkopien; **10⁴**: 10^4-Standardkopien; **10⁵**: 10^5-Standardkopien.

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

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

HINWEIS!

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

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

Tabelle 27 Temperaturzyklus 7300

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

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

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

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

HINWEIS!

Zum Bestimmen des DNA-Titers in der Ausgangsprobe eine Reaktionsreihe mit den Q - PCR Standards (105 Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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

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

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

HINWEIS!

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

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

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

.

Tabelle 28 Temperaturzyklus 7500

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

13.2 Einrichtung des Echtzeit-PCR-Laufs

(Durchgeführt vom Gerät **ELITe GALAXY**)

Zum Einrichten des PCR-Laufs:

- die für den Lauf benötigten **Q-PCR Mix** Röhrchen auftauen (jedes Röhrchen reicht für **25 Reaktionen** aus).
- die **Positive Control**- (qualitative Analyse: Nachweis von extrahierter DNA) oder die **Q - PCR Standard**- (quantitative Analyse: Quantifizierung von extrahierter DNA) Röhrchen auftauen
- Die Reagenzien vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren
- die **Negative Control** (nicht im Lieferumfang enthalten) gemäß der Gebrauchsanweisung des Geräts vorbereiten
- eine **Q-PCR Microplate** vorbereiten. Mit puderfreien Handschuhen anfassen und die Vertiefungen nicht beschädigen.

HINWEIS!

Zum Vorbereiten der PCR auf dem **ELITe GALAXY** die Elutions-Mikrotiterplatte, welche die extrahierten DNA-Proben, die Reagenzien und die **Q - PCR Microplate** wie in der Gebrauchsanweisung des Geräts angegeben laden und die Schritte auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.

Das Gerät bereitet automatisch die PCR vor, indem es in jede Vertiefung der **Q-PCR Microplate** Folgendes dispensiert:

- **20 µl Q-PCR Mix**
- **20 µl extrahierte DNA** / **Q-PCR Standard** / **Kontrollen**

HINWEIS!

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

Nachdem das Gerät die PCR vorbereitet hat:

- die **Q-PCR Microplate** mit einer optisch klaren Dichtungsfolie verschließen

- die **Q-PCR Microplate** auf das **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** überführen und die PCR starten. Die Laufdatei mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Namen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-TARGET-EGSpA“) speichern.

HINWEIS!

Am Ende der PCR muss die **Q-PCR Microplate** unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Um ein Verschütten der PCR-Produkte zu vermeiden, **darf die optisch klare Dichtungsfolie nicht von der Q-PCR Microplate entfernt werden**.

13.3 Allgemeine Einstellungen zur Analyse der Ergebnisse

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation Folgendes durchführen:

- den Berechnungsbereich für die **Grundlinie** (Fluoreszenz-Hintergrundniveau) von Zyklus 6 auf Zyklus 15 anpassen („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus);

HINWEIS!

Die FAM-Fluoreszenz der BKV-Sonde kann in einer Probe mit einer hohen Konzentration an BKV-DNA bereits vor Zyklus 15 ansteigen. Senken Sie in diesem Fall den Bereich für die **Grundlinienberechnung** auf den Zyklus, bei dem die FAM-Fluoreszenz der Probe anzusteigen beginnt („Results > Component“ (Ergebnisse > Komponente)).

- die Schwellenwerte für die Detektoren manuell einstellen:

den **Schwellenwert** für den FAM-Detektor „BKV“ auf **0,2** einstellen;

den **Schwellenwert** für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,1** einstellen.

Der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzniveau einer Probe den **Schwellenwert** erreicht, bestimmt den **Schwellenwertzyklus (Ct)** für diese Probe.

Die Gerätesoftware analysiert automatisch die Fluoreszenzwerte in den Kontrollen, Standards und Probenreaktionen und berechnet die Ct-Werte.

13.4 Qualitative Analyse der Ergebnisse

Der BKV-**Ct**-Wert der **Positive Control** dient zur Validierung der PCR. Der PCR-Lauf ist gültig, wenn die Ergebnisse den Angaben in der folgenden Tabelle entsprechen.

Tabelle 29

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

Wenn das Ergebnis der **Positive Control Ct > 25** oder **Ct Undetermined** für den FAM-Detektor „BKV“ lautet, ist der Lauf ungültig und muss ab dem PCR-Schritt wiederholt werden. Dies kann auf ein Problem während der PCR-Vorbereitung, der PCR oder des Detektionsschritts hinweisen (z. B. falsche Dispensierung oder Abbau des Q-PCR-Mix oder der Positive Control, falsche Platzierung der Positive Control, falsche Temperaturzyklus-Einstellungen), was zu falschen Ergebnissen führen kann.

HINWEIS!

Wenn das Produkt zur Quantifizierung von BKV-DNA verwendet wird, wurden statt der **Positive Control**-Reaktionen die **Q - PCR Standard**-Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**) beachten.

Der BKV-Ct-Wert der **Negative Control** dient zur Validierung der PCR. Der PCR-Lauf ist gültig, wenn die Ergebnisse den Angaben in der folgenden Tabelle entsprechen.

Tabelle 30

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

Weicht das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** von **Ct Undetermined** für den FAM-Detektor „BKV“ ab, ist der Lauf ungültig und muss ab dem PCR-Schritt wiederholt werden. Dies kann auf Probleme während des Amplifikationsschritts (Kontamination) hinweisen, die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Der **Ct**-Wert von BKV in der jeweiligen Probe wird zum Nachweis der Ziel-DNA und der **Ct**-Wert der Internal Control zur Validierung der Extraktion, der PCR und des Nachweises verwendet.

HINWEIS!

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

Mögliche Probenergebnisse („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) sind in der folgenden Tabelle beschrieben:

Tabelle 31

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

Ein Probenergebnis von **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) für BKV und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** für die Internal Control ist ungültig und weist auf ein Problem bei der Nukleinsäureextraktion oder PCR hin (z. B. Abbau der Proben-DNA, Verlust von DNA während der Extraktion, Vorhandensein von Inhibitoren in der DNA, ineffiziente oder fehlende Amplifikation), was zu falschen Ergebnissen führen kann. Die Probe ist nicht für die Analyse geeignet und der Assay muss ab der Nukleinsäureextraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ein Probenergebnis von **Ct Undetermined** für BKV und **Ct ≤ 35** für die Internal Control ist ein gültiges Ergebnis und zeigt an, dass in der Probe keine BK-DNA nachgewiesen wurde. Die Probe enthält möglicherweise keine BKV-DNA oder sie enthält BKV-DNA in einer Konzentration, die unter der Nachweisgrenze des Produkts liegt (siehe 14 Leistungsmerkmale page 39). Ein Probenergebnis von **Ct Determined (Ct ≤ 45)** für BKV und **Ct > 35**, **Ct Undetermined** oder **Ct ≤ 35** für die IC ist ein gültiges Ergebnis und zeigt an, dass in der Probe BKV-DNA nachgewiesen wurde.

HINWEIS!

Bei einem Probenergebnis von „Ct Determined“ für BKV und Ct > 35 bzw. „Undetermined“ für die IC kann die PCR-Effizienz der IC durch Konkurrenz mit der hohen PCR-Effizienz der BKV-DNA beeinträchtigt worden sein. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Ergebnis gültig.

HINWEIS!

Bei der Interpretation der mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

13.5 Quantitative Analyse der Ergebnisse

Nach der qualitativen Analyse der Ergebnisse kann eine quantitative Analyse der positiven Proben durchgeführt werden.

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

Tabelle 32

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

Wenn der Wert des **Korrelationskoeffizienten (R2)** nicht innerhalb der Grenzen liegt, ist der Lauf ungültig und muss ab dem PCR-Schritt wiederholt werden. Dies kann auf ein Problem während der PCR oder des Detektionsschritts hindeuten (z. B. falsche Dispensierung oder Abbau des Q-PCR Mix oder der Standards, falsche Platzierung der Standards, falsche Temperaturzyklus-Einstellungen oder Kreuzkontamination), was zu falschen Ergebnissen führen kann.

Tabelle 33

Probenergebnis für FAM-Detektor „BKV“	BKV-Kopien pro Reaktion
Menge > 1×10^6	MEHR ALS 1×10^6
$1 \times 10^1 \leq$ Menge $\leq 1 \times 10^6$	= Menge
Menge < 1×10^1	WENIGER ALS 10

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

Tabelle 34

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

dabei ist:

Ve das Gesamtvolumen **in µl** der extrahierten DNA-Probe (Elutionsvolumen)

Menge die von der Gerätesoftware berechnete **Kopien/Reaktion** der Probe (PCR-Ergebnis)

Vc das Volumen der bei für die Nukleinsäureextraktion verwendeten Probe (Eingangsvolumen), ausgedrückt in der gewünschten Maßeinheit

Va das Volumen der in der PCR verwendeten extrahierten DNA-Probe (Eluat) in **µl**

Ep die Effizienz des Verfahrens (Extraktion und PCR), **ausgedrückt als Dezimalzahl**

Zur Umrechnung der Probenmenge von Kopien/ml in IU/ml wird der Kopien/ml-Wert mit dem **Umrechnungsfaktor (Fc)** multipliziert. Der Fc wurde unter Verwendung von kalibriertem zertifiziertem Referenzmaterial („1st WHO International Standard for BK Virus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC) berechnet (siehe 14 Leistungsmerkmale page 39).

Der Einfachheit halber werden im Folgenden vereinfachte Formeln aufgeführt, in denen Ve/(Vc x Va x Ep) und die Umrechnung in IU/ml berechnet wurden.

Tabelle 35

Matrix	Methode der Nukleinsäureextraktion	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Formel zur Quantifizierung Nc (Kopien/ml)	Fc (IU/Kopien)	Formel zur Quantifizierung Nc (IU/ml)
Plasma	ELITe GALAXY	35	35 x Menge	4,1	143,5 x Menge

14 LEISTUNGSMERKMALE BEI ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

14.1 Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze (LoD)

Die Nachweisgrenze (LoD) des Assays in Verbindung mit EDTA-Plasma wurde auf den Geräten ELITe GALAXY und ABI 7500 durch Testen einer Reihe BKV-negativer Matrizes, die mit Referenzmaterial von BKV dotiert waren („1st WHO International Standard for BKV virus DNA“, NIBSC code 14/212, Vereinigtes Königreich), verifiziert. Es wurde eine Probit-Regressionsanalyse der Ergebnisse durchgeführt und die Nachweisgrenze als die Konzentration geschätzt, bei der eine 95 %-ige Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses vorliegt.

Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 36 Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe GALAXY

		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	**190 Kopien/ml**	122 Kopien/ml	452 Kopien/ml
95 %-Positivität	**779 IU/ml**	500 IU/ml	1.853 IU/ml

Die LoD als Kopien/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im entsprechenden Abschnitt angegeben ist. 14.7 Umrechnung in internationale Einheiten page 42

14.2 Linearer Messbereich

Zur Bestimmung des linearen Messbereichs des Assays wurde auf **ABI 7500 Fast Dx** eine Verdünnungsreihe einer Plasmid-DNA, die das Amplifikationsprodukt enthielt, verwendet.

Der lineare Messbereich in Kopien/ml wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im Abschnitt 14.7 Umrechnung in internationale Einheiten page 42 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 37 Linearer Messbereich für EDTA-Plasmaproben und ABI 7500

Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	41	41.000.000
Kopien/Reaktion	10	1.000.000

14.3 Potenziell interferierende Marker: Kreuzreaktivität

Die potenzielle Kreuzreaktivität mit unbeabsichtigten Organismen, die in klinischen Proben vorkommen können, wurde durch eine *In-silico*-Analyse bewertet. Die Analyse ergab keine signifikante Homologie mit anderen unbeabsichtigten Organismen (Viren, Bakterien, Protozoen und Pilze). Es dürfte daher keine Kreuzreaktivität zu erwarten sein.

Das Fehlen einer Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Organismen wurde auch durch die Analyse des Panels unbeabsichtigter Organismen (ATCC, NIBSC) mit hohem Titer überprüft.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 38

Organismus	Pos. / Wiederh.	Ergebnis
HSV1	0/3	Keine Kreuzreaktivität
HSV2	0/3	Keine Kreuzreaktivität
CMV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
EV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
VZV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
ADV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
EBV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
JCV	0/3	Keine Kreuzreaktivität
HHV6	0/3	Keine Kreuzreaktivität

Alle getesteten potenziell interferierenden Marker wiesen für die BKV-Zielamplifikation mit dem BKV ELITe MGB Kit keine Kreuzreaktivität auf.

14.4 Potenziell interferierende Marker: Inhibition

Die potenzielle Inhibition unbeabsichtigter Organismen, die in klinischen Proben vorkommen können, wurde für den Assay durch die Analyse eines Panels unbeabsichtigter Organismen in BKV-positiven Proben verschiedener Anbieter (ATCC, NIBSC) bewertet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 39

Organismus	Pos. / Wiederh.	Ergebnis
HSV1	3/3	Keine Interferenz
HSV2	3/3	Keine Interferenz
CMV	3/3	Keine Interferenz
EV	3/3	Keine Interferenz
VZV	3/3	Keine Interferenz
ADV	3/3	Keine Interferenz
EBV	3/3	Keine Interferenz
JCV	3/3	Keine Interferenz
HHV6	3/3	Keine Interferenz

Bei allen getesteten potenziell interferierenden Organismen zeigte der Test mit dem BKV ELITe MGB Kit keine Interferenz des Nachweises und der Quantifizierung der BKV-Zielsequenz.

14.5 Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs, zwischen verschiedenen Läufen und zwischen verschiedenen Tagen wurden mit ABI 7500 ein Panel von Proben, die mit Plasmid-DNA dotiert waren, welche das BKV-Amplifikationsprodukt enthielt, sowie eine negative Probe analysiert.

Ein Beispiel für die Ergebnisse der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 40 Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs auf ABI 7500

Probe Kopien/Reaktion	BKV			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
50.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	12/12	23,89	0,15	0,64
5.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	12/12	27,07	0,10	0,37
500 Zielsequenzen + 150.000 IC	12/12	30,41	0,17	0,56
10 Zielsequenzen + 150.000 IC	12/12	37,97	0,92	2,43
150.000 IC	0/12	-	-	-

Ein Beispiel für die Ergebnisse der laufübergreifenden Wiederholpräzision (bei zwei Läufen) ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 41 Laufübergreifende Wiederholpräzision auf ABI 7500

Probe Kopien/Reaktion	BKV			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
50.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	24/24	23,91	0,13	0,53
5.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	24/24	27,05	0,11	0,41
500 Zielsequenzen + 150.000 IC	24/24	30,40	0,20	0,66
10 Zielsequenzen + 150.000 IC	24/24	36,62	0,70	1,91
150.000 IC	0/24	-	-	-

Beim Test der Wiederholpräzision erkannte der BKV ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% unter 5 % aus.

14.6 Vergleichspräzision

Zur Bewertung der Vergleichspräzision des Assays auf ABI 7500 wurden die Ergebnisse von 10 QC-Tests des Produkts „BKV ELITe MGB Kit“ analysiert.

In den nachfolgenden Tabellen sind die Analyseergebnisse bezüglich der Ct-Werte der BKV-Zielsequenz und der Internal Control, die mit dem BKV ELITe MGB Kit amplifiziert wurden, zusammengefasst:

Tabelle 42 Vergleichspräzision auf ABI 7500

Probe Kopien/Reaktion	Anzahl	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Ergebnis
100.000 Zielsequenzen	30	22,70	0,34	1,51	Bestanden

Tabelle 42 Vergleichspräzision auf ABI 7500 (continued)

50.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	30	23,54	0,33	1,39	Bestanden
5.000 Zielsequenzen + 150.000 IC	30	26,81	0,40	1,49	Bestanden
500 Zielsequenzen + 150.000 IC	30	30,18	0,47	1,54	Bestanden
10 Zielsequenzen + 150.000 IC	90	36,16	0,67	1,86	Bestanden
150.000 IC	30	22,76	0,25	1,09	Bestanden
6.000 IC	90	28,11	0,32	1,15	Bestanden

14.7 Umrechnung in internationale Einheiten

Zur Berechnung des Umrechnungsfaktors in internationale Einheiten des BKV ELITe MGB Kit und der Produktkomponente „BKV ELITe Standard“ in Kombination mit dem ELITe GALAXY und dem ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument wurde eine Reihe serieller Verdünnungen (0,5-log-Schritte) des „1st WHO International Standard for BK Virus DNA“ (NIBSC, Vereinigtes Königreich, code 14/212) in BKV-DNA-negativem, in EDTA entnommenem Plasma analysiert.

Der Umrechnungsfaktor wurde als Antilogarithmus des Mittelwerts der Differenzen (10^{Md}) zwischen dem zugewiesenen log IU/ml-Wert und dem gemessenen log Kopien/ml-Wert berechnet und ergab 4,12 IU/Kopie für das in EDTA entnommene Plasma.

14.8 Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer klinischer Proben wurden mit ELITe GALAXY und dem ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument als vermutlich BKV-DNA-negative Proben analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 43 Diagnostische Spezifität

Probe	Anzahl	positiv	negativ	Diagnostische Spezifität in %
In EDTA entnommenes Plasma BKV-DNA-negativ	52	0	52	100 %

14.9 Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurden mit ELITe GALAXY und dem ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument als positiv für BKV-DNA bestätigte Proben und dotierte Proben analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 44 Diagnostische Sensitivität

Proben	Anzahl	positiv	negativ	Diagnostische Sensitivität in %
In EDTA entnommenes Plasma BKV-DNA-positiv	9	9	0	100 %
In EDTA entnommenes Plasma BKV-dotiert	42	42	0	
Gesamt	51	51	0	

HINWEIS!

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

15 REFERENZEN

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

C. N. Kotton et al. (2018) *Transplantation* 02: 900 - 931

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 – 740

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

16 GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf ausschließlich mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden: in EDTA entnommenes Plasma (alle Geräte), und Urin (nur ELITe InGenius und ELITe BeGenius).

In EDTA entnommenes Plasma muss aus Vollblut gewonnen werden, das bei Raumtemperatur oder bei +2 bis +8 °C nicht länger als 24 Stunden gelagert wurde.

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

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

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

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

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von der ordnungsgemäßen Durchführung von Identifizierung, Entnahme, Transport, Lagerung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es daher notwendig, bei diesen Schritten sorgfältig vorzugehen und die dem Produkt beiliegende Gebrauchsanweisung sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Real-Time-PCR-Methode empfindlich für Kontaminationen durch positive klinische Proben, Positivkontrollen und PCR-Produkte. Kreuzkontamination führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Das Produktformat ist so gestaltet, dass Kreuzkontamination begrenzt wird. Trotzdem kann Kreuzkontamination nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

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

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

Dieses Produkt macht das Tragen von persönlicher Schutzausrüstung und das Verwenden von für die Einrichtung des Arbeitslaufs vorgesehenen Instrumente erforderlich, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Zur Vermeidung falscher Ergebnisse darf dieses Produkt nur von professionellem, qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, PCR und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden.

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

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis zeigt, dass die Ziel-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter der Nachweisgrenze des Produkts liegt (siehe „11 LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius page 24“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Mit diesem Produkt erhaltene Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein. In diesem Fall ist die Probe beginnend mit der Extraktion erneut zu testen, was zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen kann.

Etwaige Polymorphismen, Insertionen oder Deletionen in der Primer- oder Sondenbindungsregion der DNA können den Nachweis und die Quantifizierung der Ziel-DNA beeinträchtigen.

Wie bei allen anderen diagnostischen Produkten müssen die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse in Kombination mit allen relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunden interpretiert werden.

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen Auswirkungen auf den Patienten beitragen. Dieses Restrisiko im Zusammenhang mit dem Verwendungszweck des Produkts wurde jedoch gegen den potenziellen Nutzen für den Patienten abgewogen und als akzeptabel eingestuft.

17 FEHLERBEHEBUNG

ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Tabelle 45

Ungültige Reaktion von Q-PCR Standard, Standardkurve oder Positive Control	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Einstellfehler des Geräts.	Position von Q-PCR Mix, Q-PCR Standards und Positive Control kontrollieren. Volumina von Q-PCR Mix, Q-PCR Standards und Positive Control kontrollieren.
Abbau des PCR Mix.	Den Q-PCR Mix nicht für mehr als 5 unabhängige Arbeitsläufe verwenden (jeweils 3 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit). Den Q-PCR Mix nicht für mehr als 3 aufeinander folgende Läufe verwenden (7 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit). Den Q-PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren. Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Abbau von Q-PCR Standards oder Positive Control.	Den Q-PCR Standard nicht für mehr als 4 unabhängige Läufe verwenden (jeweils 2 Stunden im Extraktionsbereich oder in der Cooler Unit). Die Positive Control nicht für mehr als 4 unabhängige Arbeitsläufe verwenden (jeweils 3 Stunden im Extraktionsbereich oder in der Cooler Unit). Neue Aliquote von Q-PCR Standards oder Positive Control verwenden.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Tabelle 46

Ungültige Reaktion der Negativkontrolle	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Einstellfehler des Geräts.	Position des Q-PCR Mix und der Negative Control kontrollieren. Volumina des Q-PCR Mix und der Negative Control kontrollieren.
Kontamination der Negativkontrolle.	Die Negativkontrolle nicht für mehr als 1 Lauf verwenden. Ein neues Aliquot hochreines Wasser für die Molekularbiologie verwenden.
Kontamination des PCR Mix.	Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Kontamination des Extraktionsbereichs, der Racks, des Bestandsmanager oder der Cooler Unit.	Oberflächen mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Röhrchen und Spitzen austauschen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Tabelle 47

Ungültige Probenreaktion	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Einstellfehler des Geräts.	Position von Q-PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren. Volumina von Q-PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren.
Abbau des PCR Mix.	Den Q-PCR Mix nicht für mehr als 5 unabhängige Arbeitsläufe verwenden (jeweils 3 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit). Den Q-PCR Mix nicht für mehr als 3 aufeinander folgende Läufe verwenden (7 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit). Den Q-PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren. Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Abbau der Vorlage für die Internal Control.	Ein neues Aliquot der Internal Control verwenden.
Inhibition durch Störsubstanzen in der Probe.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only"-Lauf (nur PCR) wiederholen. Extraktion der Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR"-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Tabelle 48

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

Tabelle 49

Fehler bei der Berechnung des Ct-Werts	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe oder Probe mit anomalem Fluoreszenzsignal.	Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist, entsprechende Spur für die Probe auswählen und Ergebnis manuell als positiv bestätigen. Wenn im PCR-Diagramm keine Amplifikation zu beobachten ist, entsprechende Spur für die Probe auswählen und Ergebnis manuell als negativ bestätigen oder als ungültig belassen. Wenn ein Ct-Wert benötigt wird: - Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only"-Lauf (nur PCR) wiederholen. - Extraktion der Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR"-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.

Tabelle 50

Ungewöhnlich hoher Anteil positiver Ergebnisse innerhalb ein und desselben Laufs (Reaktionen mit ähnlich späten Ct-Werten)	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Kontamination von Probe zu Probe bei Präanalyseschritten.	Mikropipette nach dem Pipettieren jeder Probe mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Keine Pasteur-Pipetten verwenden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Proben in die letzten Positionen der Geräte einsetzen, wie auf der Benutzeroberfläche angegeben. Die von der Software angegebene Ladefolge beachten.
Kontamination der Laborumgebung.	Alle Oberflächen, die mit dem Bediener und den Proben (einschließlich Pipetten) in Kontakt kommen, mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Einen UV-Dekontaminationszyklus durchführen. Ein neues Röhrchen mit Q-PCR Mix und/oder Internal Control verwenden.

Offene Plattform

Tabelle 51

Ungültige Reaktion von Q-PCR Standard, Standardkurve oder Positive Control	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Volumina von PCR Mix, Q-PCR Standards und Positive Control, die in die Q-PCR Microplate dispensiert wurden, kontrollieren.
Abbau des Q-PCR Mix.	PCR Mix nicht mehr als 5 Mal einfrieren und wieder auftauen. Den Q-PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren. Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Abbau von Q-PCR Standards oder Positive Control.	Q-PCR Standard nicht mehr als 4 Mal einfrieren und wieder auftauen. Neue Aliquote von Q-PCR Standards oder Positive Control verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Position von PCR Mix, Q-PCR Standards und Positive Control auf dem Gerät kontrollieren. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.

Tabelle 52

Ungültige Reaktion der Negativkontrolle	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Einstellfehler des Geräts.	Position des Q-PCR Mix und der Negative Control kontrollieren. Volumina des Q-PCR Mix und der Negative Control kontrollieren.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Verschließen der Q-PCR Microplate mit der optisch klaren Dichtungsfolie vorsichtig vorgehen.

Tabelle 52 (continued)

Ungültige Reaktion der Negativkontrolle	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Kontamination der Negativkontrolle.	Die Negativkontrolle nicht für mehr als 1 Lauf verwenden. Ein neues Aliquot hochreines Wasser für die Molekularbiologie verwenden.
Kontamination des PCR Mix.	Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Kontamination von Vorbereitungsbereich, Racks und Mikropipette.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.

Tabelle 53

Ungültige Probenreaktion	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Einstellfehler des Geräts.	Position von Q-PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren. Volumina von Q-PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren.
Abbau des PCR Mix.	PCR Mix nicht mehr als fünfmal einfrieren und wieder auftauen. Den Q-PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren. Ein neues Aliquot mit Q-PCR Mix verwenden.
Abbau der Vorlage für die Internal Control.	Ein neues Aliquot der Internal Control verwenden.
Inhibition durch Störsubstanzen in der Probe.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie wiederholen. Extraktion der Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie wiederholen.

Tabelle 54

Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Falsche Dispensierung der Probe.	Volumina der in die Q-PCR Microplate dispensierten Reagenzien und Proben kontrollieren.
Einstellfehler der Grundlinie.	Wenn der Berechnungsbereich für die von Zyklus 6 bis Zyklus 15 eingestellten Grundlinie nicht geeignet ist, um den Hintergrund zu normalisieren, den Berechnungsbereich innerhalb der Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat („Results“ [Ergebnisse], „Component“ [Komponente] überprüfen) und die Zielfluoreszenz noch nicht zuzunehmen begonnen hat.

Tabelle 55

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

18 SYMBOLE

REF	Katalognummer.
	Temperaturobergrenze.
LOT	Chargenbezeichnung.
	Verfallsdatum (letzter Tag des Monats).
IVD	*In-vitro*-Diagnostikum.
CE 0123	Erfüllt die Anforderungen der Verordnung (EU) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika (IVDR). Zertifizierung ausgestellt von der TÜV SÜD Product Service GmbH, Deutschland.
UDI	Unique Device Identification, eindeutige Gerätekennung
	Ausreichend für „N“ Tests
	Gebrauchsanweisung beachten.
CONT	Inhalt.
	Vor Sonneneinstrahlung schützen.
	Hersteller.

19 ANWENDERHINWEISE

Jeder schwerwiegende Zwischenfall, der im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten ist, muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden. Zum Zeitpunkt der aktuellen Überarbeitung der Gebrauchsanweisung lag kein schwerwiegender Zwischenfall oder Rückruf mit Auswirkungen auf die Produktleistung und Gerätesicherheit vor.

Eine „Zusammenfassung der Unbedenklichkeit und der Leistung“ wird der Öffentlichkeit über die Europäische Datenbank für Medizinprodukte (Eudamed) zur Verfügung gestellt, sobald dieses Informatiksystem funktionsfähig ist. Vor der Veröffentlichung des Hinweises über die vollständige Funktionsfähigkeit von Eudamed wird die „Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung“ der Öffentlichkeit auf Anfrage per E-Mail an emd.support@elitechgroup.com ohne unnötige Verzögerung zur Verfügung gestellt.

20 HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

Dieses Produkt enthält Reagenzien, die von Thermo Fisher Scientific hergestellt wurden und im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S. p. A. und deren Tochtergesellschaften und Thermo Fisher Scientific vertrieben werden. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-Mail: outlicensing@thermofisher.com.

ELITe MGB ® detection reagents are covered by one or more of U. S. Patent numbers 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, and EP patent numbers 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 as well as applications that are currently pending.

Die ELITe InGenius®- und die ELITe BeGenius®-Technologie sind durch Patente und Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz erlaubt der Person oder Einrichtung, der das Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt und die bei Verwendung des Produkts erzeugten Daten ausschließlich für die Humandiagnostik zu verwenden. Weder die ELITechGroup S. p. A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, das ELITe MGB®-Gerätelogo, ELITe InGenius® und ELITe BeGenius® sind eingetragene Marken der ELITechGroup in der Europäischen Union.

Appendix A BKV ELITe MGB Kit zur Verwendung mit Plattformen der Genius-Reihe®

VORSICHT

Dieses Dokument ist eine vereinfachte Version der offiziellen Gebrauchsanweisung. Bitte lesen Sie vor dem Gebrauch das vollständige Dokument: www.elitechgroup.com

Verwendungszweck

Das Produkt **BKV ELITe MGB® Kit** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal als quantitativer Nukleinsäure- und Real-Time-PCR-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der **DNA von humanem Polyomavirus BK (BKV)**, die aus klinischen Proben extrahiert wurde, bestimmt ist.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITe InGenius®** und**ELITe BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma und ohne Konservierungsmittel entnommenem Urin validiert.

Außerdem ist der Assay in Verbindung mit **ELITe GALAXY**, einem System für die automatische Extraktion und PCR-Einstellung, und dem **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, einer Real-Time PCR-Plattform, für die Verwendung von humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma validiert.

Das Produkt ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose und Überwachung von BKV-Infektionen bei Patienten bestimmt, bei denen Verdacht auf eine BKV-Infektionen besteht oder die auf BKV-Infektionen überwacht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

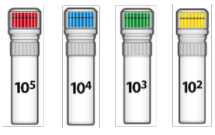
Amplifizierte Sequenz

Sequenz	Gen	Fluorophor	Kanal
Zielorganismus	Gen des großen T-Antigens	FAM	BKV
Internal Control	beta-Globin	AP525	IC

Validierte Matrix

- In EDTA entnommenes **Plasma**
- Ohne Konservierungsmittel entnommener **Urin**

Kit-Inhalt und zugehörige Produkte

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
X 4	 X 2	X 2
Gebrauchsfertiger PCR Mix 4 Röhrchen mit 540 µl 96 Reaktionen pro Kit 5 Gefrier- und Auftauzyklen	4 Konzentrationen (gebrauchsfertig): 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 Sets à 4 Röhrchen mit 200 µl 4 Gefrier- und Auftauzyklen	Gebrauchsfertige PC 2 Röhrchen mit 160 µl 8 Reaktionen pro Kit 4 Gefrier- und Auftauzyklen

Maximale Haltbarkeitsdauer: **24 Monate**

Lagerungstemperatur: **-20 °C**

Weitere benötigte, nicht im Kit enthaltene Produkte

- ELITe InGenius-Gerät: INT030.
- ELITe BeGenius-Gerät: INT040.
- ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.
- ELITe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS.
- ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR.
- ELITe InGenius Waste Box: F2102-000.
- CPE – Internal Control: CTRCPE
- 300 µl Filterspitzen, Axigen: TF-350-L-R-S.
- 1000 µl Filterspitzen, Tecan: 30180118.

ELITe InGenius- und ELITe BeGenius-Protokoll

› Probenvolumen › CPE-Volumen › Gesamtes Elutionsvolumen	200 µl 10 µl 100 µl	› PCR-Eingangsvolumen für die Elution › Volumen Q-PCR-Mix › Häufigkeit der Kontrollen	20 µl 20 µl 15 Tage

Leistungsdaten für ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Matrix	Nachweisgrenze	Diagnostische Spezifität	Diagnostische Sensitivität
Plasma	215 IU/ml	96,2 %	100 %
Urin	142 IU/ml	100 %	100 %

Probenvorbereitung

Dieses Produkt ist für die Verwendung auf dem **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** mit den folgenden klinischen Proben, die gemäß den Laborrichtlinien identifiziert und unter den folgenden Bedingungen entnommen, transportiert und aufbewahrt wurden, bestimmt:

Probentyp	Transport-/Lagerbedingungen			
	+16 / +26 °C (Raumtemperatur)	**+2 / +8 °C**	**-20 ± 10 °C**	**-70 ± 15 °C**
Plasma in EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
Urin	≤ 4 Stunden	≤ 1 d	≤ 30 d	≤ 30 d

C EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; d: Tag.

ELITe InGenius-Verfahren

Der Benutzer wird von der ELITe InGenius-Software zur Vorbereitung des Laufs Schritt für Schritt durch die grafische Benutzeroberfläche geführt. Alle Schritte: Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation werden automatisch durchgeführt. Es stehen zwei Betriebsmodi zur Verfügung: vollständiger Lauf „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) und „PCR Only“ (Nur PCR).

Vor der Analyse

1. ELITe InGenius einschalten. Mit dem Benutzernamen und Passwort anmelden. Den Modus „**CLOSED**“ (Geschlossen) wählen.	**2.** Kontrollen überprüfen: **Positive Control** sowie **Negative Control** im Menü „Controls“ (Kontrollen). Hinweis: Beide müssen ausgeführt und genehmigt worden sein und dürfen nicht abgelaufen sein.	**3. PCR Mix** und **CTRCPE**-Röhrchen auftauen. Vorsichtig vortexen. 5 Sek. herunterzentrifugieren.

Verfahren 1 – Vollständiger Lauf: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) (z. B. Proben)

1. Auf dem Touchscreen „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen und anschließend auf den Laufmodus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) klicken.	**2.** Das Sample Rack (Probenständer) mit den barcodierten Proben in die Cooler Unit einsetzen. Der Barcode-Scan ist bereits aktiv	**3.** Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“
4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: BKV ELITe_PL_200_100 oder BKV ELITe_U_200_100 **Hinweis:** Bei Durchführung einer zweiten Extraktion die Schritte 2 bis 4 wiederholen	**5.** Die Etiketten ausdrucken, um die leeren Elution Tubes (Elutionsröhrchen) mit einem Barcode zu versehen. Die Röhrchen in das Elution Rack (Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen	**6.** Den PCR Mix und die Internal Control in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen
7. Das „PCR Rack“ mit der „PCR Cassette“ und den „Extraction Rack“ (Extraktionsrack) mit den „ELITe InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden	**8.** Tür schließen. Analyselauf starten	**9.** Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern

HINWEIS!

Wird der Modus „Extract Only“ (nur Extraktion) benötigt, zum Verfahren das Benutzerhandbuch des Geräts beachten.

Verfahren 2: „PCR Only“ (Nur PCR) (z. B. Eluate, Standards, Kontrollen)

1. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen	**2.** Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“	**3.** Die Proben-Barcodes mit dem tragbaren Barcodeleser scannen oder die Proben-ID eingeben
4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: BKV ELITe_PC und BKV ELITe_NC, oder BKV ELITe_STD, oder BKV ELITe_PL_200_100 oder BKV ELITe_U_200_100	**5.** Die Methode „PCR Only“ (Nur PCR) und die „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube“ (Elutionsröhrchen) auswählen	**6.** Den PCR Mix in den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) laden
7. Folgendes laden: PCR Cassette-Rack und Elution tube (Elutionsröhrchen)-Rack mit der extrahierten Nukleinsäure	**8.** Tür schließen. Analyselauf starten	**9.** Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern

ELITe BeGenius-Verfahren

Der Benutzer wird von der ELITe BeGenius-Software zur Vorbereitung des Laufs Schritt für Schritt durch die grafische Benutzeroberfläche geführt. Alle Schritte: Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation werden automatisch durchgeführt. Es stehen zwei Betriebsmodi zur Verfügung: vollständiger Lauf „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) und „PCR Only“ (Nur PCR).

Vor der Analyse

1. ELITe InGenius einschalten. Mit dem Benutzernamen und Passwort anmelden. Den Modus „**CLOSED**“ (Geschlossen) wählen.	**2.** Kontrollen überprüfen: **Positive Control** sowie **Negative Control** im Menü „Controls“ (Kontrollen). Hinweis: Beide müssen ausgeführt und genehmigt worden sein und dürfen nicht abgelaufen sein.	**3. PCR Mix** und **CTRCPE**-Röhrchen auftauen. Vorsichtig vortexen. 5 Sek. herunterzentrifugieren.

Verfahren 1 – Vollständiger Lauf: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) (z. B. Proben)

1. Auf dem Touchscreen „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen und anschließend auf den Laufmodus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) klicken.	**2.** Das Sample Rack (Probenständer) mit den barcodierten Proben in die Cooler Unit einsetzen. Der Barcode-Scan ist bereits aktiv	**3.** Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“
4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: BKV ELITe_Be_PL_200_100 oder BKV ELITe_Be_U_200_100 oder **Hinweis:** Bei Durchführung einer zweiten Extraktion die Schritte 2 bis 4 wiederholen	**5.** Die Etiketten ausdrucken, um die leeren Elution Tubes (Elutionsröhrchen) mit einem Barcode zu versehen. Die Röhrchen in das Elution Rack (Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen	**6.** Den PCR Mix und die Internal Control in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsablage) laden und in die Cooler Unit einsetzen
7. Das „PCR Rack“ mit der „PCR Cassette“ und den „Extraction Rack“ (Extraktionsrack) mit den „ELITe InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden	**8.** Tür schließen. Analyselauf starten	**9.** Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern

HINWEIS!

Wird der Modus „Extract Only“ (nur Extraktion) benötigt, zum Verfahren das Benutzerhandbuch des Geräts beachten.

Verfahren 2: „PCR Only“ (Nur PCR) (z. B. Eluate, Standards, Kontrollen)

1. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen	**2.** Die Extraktionsvolumina überprüfen: Eingang: „200 µL“, Elutionsvolumen: „100 µL“	**3.** Die Proben-Barcodes mit dem tragbaren Barcodeleser scannen oder die Proben-ID eingeben
4. Das gewünschte Assay-Protokoll auswählen: BKV ELITe_PC und BKV ELITe_NC, oder BKV ELITe_STD, oder BKV ELITe_PL_200_100 oder BKV ELITe_U_200_100.	**5.** Die Methode „PCR Only“ (Nur PCR) und die „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube“ (Elutionsröhrchen) auswählen	**6.** Den PCR Mix in den „Inventory Block“ (Bestandsmanager) laden
7. Folgendes laden: PCR Cassette-Rack und Elution tube (Elutionsröhrchen)-Rack mit der extrahierten Nukleinsäure	**8.** Tür schließen. Analyselauf starten	**9.** Ergebnisse anzeigen, genehmigen und speichern

Appendix B BKV ELITe MGB Kit verwendet zusammen mit ABI 7500 Instrument

VORSICHT

Dieses Dokument ist eine vereinfachte Version der offiziellen Gebrauchsanweisung. Bitte lesen Sie vor dem Gebrauch das vollständige Dokument: www.elitechgroup.com

Verwendungszweck

Das Produkt **BKV ELITe MGB® Kit** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal als quantitativer Nukleinsäure- und Real-Time-PCR-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der **DNA von humanem Polyomavirus BK (BKV)**, die aus klinischen Proben extrahiert wurde, bestimmt ist.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITe InGenius®** und**ELITe BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma und ohne Konservierungsmittel entnommenem Urin validiert.

Außerdem ist der Assay in Verbindung mit **ELITe GALAXY**, einem System für die automatische Extraktion und PCR-Einstellung, und dem **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, einer Real-Time PCR-Plattform, für die Verwendung von humanen Proben von in EDTA entnommenem Plasma validiert.

Das Produkt ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose und Überwachung von BKV-Infektionen bei Patienten bestimmt, bei denen Verdacht auf eine BKV-Infektionen besteht oder die auf BKV-Infektionen überwacht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

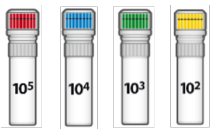
Amplifizierte Sequenz

Sequenz	Gen	Fluorophor	Kanal
Zielorganismus	Gen des großen T-Antigens	FAM	BKV
Internal Control	beta-Globin	AP525	IC

Validierte Matrix

- In EDTA entnommenes **Plasma**

Kit-Inhalt und zugehörige Produkte

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
X 4	 X 2	X 2
Gebrauchsfertiger PCR Mix 4 Röhrchen mit 540 µl 100 Reaktionen pro Kit 5 Gefrier- und Auftauzyklen	4 Konzentrationen (gebrauchsfertig): 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 Sets à 4 Röhrchen mit 200 µl 8 Gefrier- und Auftauzyklen	Gebrauchsfertige PC 2 Röhrchen mit 160 µl 12 Reaktionen pro Kit 8 Gefrier- und Auftauzyklen

Maximale Haltbarkeitsdauer: **24 Monate**

Lagerungstemperatur: **-20 °C**

Weitere benötigte, nicht im Kit enthaltene Produkte

• **ELITe GALAXY:** INT020 • **ELITe GALAXY 300 Extraction Kit:** INT021EX • **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**	• CPE – Internal Control: CTRCPE • Hochreines Wasser für die Molekularbiologie

Leistung von 7500 Real-Time PCR Instrument

Matrix	Nachweis-grenze	Diagnosti-sche Spezifität	Diagnosti-sche Sensitivität	Linearität (IU/ml),	Umrechnungs-faktor IU/ml in Kopien/ml	Umrechnungs-faktor Kopien/ml in IU/ml
Plasma	779 IU/ml	100 %	100 %	41→ 4,1*10^7	4,1	143,5 x Menge

7500 Real-Time PCR Instrument-Verfahren

Das nachfolgende Verfahren fasst die Hauptschritte der Probenanalyse mit dem herkömmlichen PCR-Arbeitsablauf zusammen: validierte Extraktionssysteme, PCR-Geräteeinstellungen, PCR-Einrichtung und Ergebnisinterpretation.

Extraktion – Validierte Systeme

Extraktion	Validierte Matrix	Verarbeitetes Probenvolumen	Mindestproben-volumen	Gesamtes Elutionsvolumen	CPE Internal-Control-Volumen
ELITe Galaxy	Plasma	300 µl	400 µl	200 µl	10 µl

Amplifikation – Einstellungen von 7500 Fast Dx

1. Thermocycler einschalten
2. „BKV“-Detektor auf „FAM“ und Quencher auf „keinen“ einstellen
3. „Internal Control“-Detektor auf „VIC“ und Quencher auf „keinen“ einstellen
4. Passive Fluoreszenz auf „Cy5“ einstellen
5. Das Temperaturprofil wie angegeben einstellen. Die Fluoreszenzerfassung muss während des Hybridisierungsschritts auf 60 °C eingestellt werden

Phase	Temperatur	Zeitsteuerung
Dekontamination	50 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	2 min
Amplifikation	94 °C	10 s
Detektion	60 °C	30 s
45 Zyklen	72 °C	20 s

Die Schmelzkurvenanalyse ist optional, vollständige Gebrauchsanweisung beachten

Amplifikation – PCR-Einstellung

Zum Einrichten des PCR-Laufs:

1. Die Q-PCR Mix und Positive Control / Q-PCR Standard-Röhrchen auftauen
2. Vorsichtig mischen und herunterzentrifugieren

3. die **Negative Control** (nicht im Lieferumfang enthalten) vorbereiten
4. eine **Q-PCR Microplate** vorbereiten
5. Das Gerät bereitet automatisch die PCR vor, indem es in jede Vertiefung der **Q-PCR Microplate 20 µl PCR Mix** und **20 µl extrahierte DNA** / **Q-PCR Standard** / **Kontrollen** dispensiert.

Nachdem das Gerät die PCR vorbereitet hat:

1. die **Q-PCR Microplate** mit einer optisch klaren Dichtungsfolie verschließen.
2. die **Q-PCR Microplate** auf das **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** überführen und die PCR starten. Die Laufdatei mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Namen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-TARGET-EGSpA“) speichern.

Amplifikation – Schwellenwert für die qualitative Analyse

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

Interpretation

Qualitative Ergebnisse

BKV-Ct-Wert	Internal Control Ct-Wert	Interpretation
Determined (bestimmt)	–	Positiv
Undetermined (unbestimmt)	Ct ≤ 35	Negativ
	Ct > 35 oder Undetermined (unbestimmt)	Ungültig

Quantitative Ergebnisse

Der für jede Probe erhaltene BKV-Ct-Wert und die generierte Standardkurve werden zur Berechnung der Menge der Ziel-DNA in der Reaktion herangezogen.
Die Probenquantifizierung reicht zirka von 10 bis 10^{6} Kopien/Reaktion bzw. zirka von 41 bis 4,1 x 10^{7} IU/ml.

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITALIEN
Tel. +39-011 976 191
Fax +39-011 936 76 11
E-Mail: emd.support@elitechgroup.com
Website: www.elitechgroup.com