

Istruzioni per l'uso

# BKV ELITe MGB® Kit

---

reagenti per la Real-Time PCR del DNA



**REF** RTS175PLD

**UDI** 08033891483654

**CE** **IVD**  
0123

## CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev.	Notifiche dei cambiamenti	Data (gg/mm/aa)									
19-R	<p>Marchatura CE secondo il nuovo Regolamento Europeo 2017/746 (IVDR).            Aggiornamento delle prestazioni analitiche e diagnostiche nel paragrafo CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI            Aggiornamento dell' Intended Use:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Validazione del prodotto in associazione con gli strumenti ELiTe InGenius® (REF INT030) ed ELiTe BeGenius® (REF INT040) con le matrici WB and Plasma.</li> <li>Validazione del prodotto in associazione con la matrice WB e gli strumenti: ELiTe GALAXY and ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>NOTA</b></p> <p>La composizione del prodotto rimane invariata</p> <p style="text-align: center;"><b>NOTA</b></p> <p>i lotti di prodotto sotto elencati, con marcatura CE secondo la Direttiva IVDD, rimarranno presenti sul mercato fino alla data di scadenza, in accordo all' Articolo 110 dell'IVDR. Se in possesso di questi lotti, si prega di contattare il personale di ELiTechGroup per richiedere la relativa precedente versione delle IFUs.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Numero di catalogo</th> <th style="text-align: center;">Numero di lotto</th> <th style="text-align: center;">Data di scadenza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">RTS175PLD</td> <td style="text-align: center;">U0224-013</td> <td style="text-align: center;">31/08/2025</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">RTS175PLD</td> <td style="text-align: center;">U0324-124</td> <td style="text-align: center;">30/11/2025</td> </tr> </tbody> </table> <p>Nuovo formato grafico e nuova impostazione dei contenuti dell'IFU.</p>	Numero di catalogo	Numero di lotto	Data di scadenza	RTS175PLD	U0224-013	31/08/2025	RTS175PLD	U0324-124	30/11/2025	26/09/24
Numero di catalogo	Numero di lotto	Data di scadenza									
RTS175PLD	U0224-013	31/08/2025									
RTS175PLD	U0324-124	30/11/2025									
18	<p>Espansione d'uso del prodotto in associazione con lo strumento "ELiTe BeGenius®".            Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE:            Cambiamento del Limite di rivelazione (LoD)            Cambiamento dell' Intervallo di linearità            Aggiunta ripetibilità            Aggiunta riproducibilità</p>	22/10/21									
17	<p>Aggiunta del riferimento al nuovo prodotto "BKV - ELiTe Positive Control RF" (rif. CTR175PLD-R).            espansione dell'uso del prodotto in associazione con la piattaforma Roche cobas z 480.</p>	25/01/21									
16	<p>Correzione del valore CV% riportato nella tabella Precisione con campioni di plasma e ELiTe InGenius (volume del campione 1000 µl).</p>	01/08/19									
15	<p>Modifica dei valori LoD e LoQ per il plasma e l'urina in associazione con lo strumento ELiTe InGenius®.</p>	11/06/19									
14	<p>Espansione dell'uso con il kit di estrazione ELiTe InGenius® SP 1000</p>	05/07/18									
13	<p>Aggiornamento delle caratteristiche delle prestazioni (ULoQ)</p>	27/04/18									
12	<p>Aggiornamento delle caratteristiche delle prestazioni (LoD e Linearità)</p>	22/12/17									
00—11	<p>Nuovo sviluppo di prodotto e cambiamenti successivi</p>	-									

# INDICE

<b>1 USO PREVISTO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 PRINCIPIO DEL SAGGIO.....</b>	<b>4</b>
<b>3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO .....</b>	<b>5</b>
<b>4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO .....</b>	<b>5</b>
<b>5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO .....</b>	<b>5</b>
<b>6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI .....</b>	<b>5</b>
<b>7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....</b>	<b>6</b>
<b>8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius .....</b>	<b>8</b>
<b>9 PROCEDURA ELITe InGenius.....</b>	<b>10</b>
<b>10 PROCEDURA ELITe BeGenius.....</b>	<b>17</b>
<b>11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITe InGenius and ELITe BeGenius.....</b>	<b>22</b>
<b>12 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>13 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.....</b>	<b>30</b>
<b>14 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.....</b>	<b>36</b>
<b>15 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>40</b>
<b>16 LIMITI DELLA PROCEDURA .....</b>	<b>40</b>
<b>17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....</b>	<b>41</b>
<b>18 LEGENDA DEI SIMBOLI .....</b>	<b>45</b>
<b>19 AVVISO PER L'UTILIZZATORE .....</b>	<b>45</b>
<b>20 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA.....</b>	<b>46</b>
<b>Appendix A QUICK START GUIDE.....</b>	<b>47</b>
<b>Appendix B QUICK START GUIDE.....</b>	<b>51</b>

## 1 USO PREVISTO

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

Il saggio è validato in associazione agli strumenti **ELITE InGenius®** ed **ELITE BeGenius®**, sistemi integrati e automatizzati per l'estrazione, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati, a partire da campioni di plasma raccolto in EDTA e urine.

Il saggio è anche validato in associazione con **ELITE GALAXY**, sistema automatico per l'estrazione e il setup della PCR, e lo strumento per la PCR **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, a partire da campioni di plasma raccolto in EDTA.

Il prodotto è destinato all'uso come ausilio nello screening, nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da BKV, in soggetti asintomatici e pazienti con sospetta infezione o sotto monitoraggio per infezione da BKV.

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

## 2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

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

Le sonde ELITE MGB sono attivate quando ibridano con il prodotto specifico della PCR. **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** monitorano l'incremento di fluorescenza emessa e calcolano i "cicli soglia" (Ct) e le temperature di melting (Tm). La concentrazione del DNA di BKV è calcolata rispetto ad una curva di calibrazione.

Il **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** misura e registra l'incremento di fluorescenza emessa. L'analisi dei dati successiva permette la rilevazione e la quantificazione del BKV nel campione primario.

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

### 3 DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **BKV ELITE MGB Kit** fornisce il reagente **BKV Q - PCR Mix**, una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per PCR che contiene i primers e le sonde specifici per:

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

**BKV Q - PCR Mix** contiene inoltre il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del Cy5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il prodotto **BKV ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test** in associazione con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, utilizzando 20 µL per reazione.

Il prodotto **BKV ELITE MGB Kit** consente di effettuare **100 test** in associazione ad **altri sistemi**, utilizzando 20 µL per reazione.

#### NOTA

E' richiesto un Fattore di Conversione per esprimere i risultati quantitativi nelle Unità Internazionali di BKV, in accordo con il "1<sup>st</sup> WHO International Standard for BK virus DNA" (NIBSC code 14/212, United Kingdom).

### 4 MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Tabella 1

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
<b>BKV Q-PCR Mix</b> cod. RTS175PLD	Miscela di reagenti per la Real-Time PCR, in provetta con <b>tappo trasparente</b>	<b>4 x 540 µL</b>	-

### 5 MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga da banco (~5,000 giri/minuto).
- Microcentrifuga da banco (~13,000 giri/minuto).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a spostamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Provette sterili da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

### 6 ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo interno di estrazione e di inibizione, i controlli positivo e negativo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i materiali di consumo **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la Real-Time PCR e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, sono richiesti i seguenti prodotti.

**Tabella 2**

Strumenti e Software	Prodotti e Reagenti
<p><b>ELITE InGenius</b> (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030)  <b>ELITE InGenius Software</b> versione 1.3. 0.19 (o successiva)  <b>BKV ELITE_STD</b> Assay Protocol (Protocollo di Saggio) con i parametri per l'analisi dei Calibratori  <b>BKV ELITE_PC</b> Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo  <b>BKV ELITE_NC</b> Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo  <b>BKV ELITE_PL_200_100</b> Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma.  <b>BKV ELITE_U_200_100</b> Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di urine</p>	<p><b>ELITE InGenius SP 200</b> (EG SpA, cod. INT032SP200)  <b>ELITE InGenius SP 200 Consumable Set</b> (EG SpA, cod. INT032CS),  <b>ELITE InGenius PCR Cassette</b> (EG SpA, cod. INT035PCR),  <b>ELITE InGenius Waste Box</b> (EG SpA, cod. F2102-000)  <b>300 µL Filter Tips Axygen</b> (Corning Life Sciences Inc., cod. TF-350-L-R-S) solo per ELITE InGenius  <b>1000 µL Filter Tips Tecan</b> (Tecan, Switzerland, cod. 30180118) solo per ELITE BeGenius  <b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRPE)  <b>BKV ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD175PLD)  <b>BKV - ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR175ING)</p>
<p><b>ELITE BeGenius</b> (EG SpA cod. INT040)  <b>ELITE BeGenius Software</b> versione 2.2.1. (o successiva)  <b>BKV ELITE_Be_STD</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei Calibratori  <b>BKV ELITE_Be_PC</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Positivo  <b>BKV ELITE_Be_NC</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi del Controllo Negativo  <b>BKV ELITE_Be_PL_200_100</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di plasma  <b>BKV ELITE_Be_U_200_100</b>, Assay Protocol con i parametri per l'analisi dei campioni di urine</p>	<p><b>ELITE GALAXY 300 Extraction Kit</b> (ELITechGroup S.p.A., cCod. INT021EX)  <b>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, cod. 4346906), microplates with 0.1 mL wells and adhesive sealing sheets for real time amplification  <b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRPE)  <b>BKV ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD175PLD)  <b>BKV - ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR175ING)</p>
<p><b>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument</b> (ThermoFisher Scientific, cod. 4406985)  <b>ELITE GALAXY</b> (EG SpA., Cod. INT020) con <b>software version 1.3.1</b> (o successiva)            Extraction Protocol for ELITE GALAXY, xNA Extraction (Universal)</p>	<p><b>ELITE GALAXY 300 Extraction Kit</b> (ELITechGroup S.p.A., cCod. INT021EX)  <b>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL</b> (Life Technologies, cod. 4346906), microplates with 0.1 mL wells and adhesive sealing sheets for real time amplification  <b>CPE - Internal Control</b> (EG SpA, cod. CTCRPE)  <b>BKV ELITE Standard</b> (EG SpA, cod. STD175PLD)  <b>BKV - ELITE Positive Control</b> (EG SpA, cod. CTR175ING)</p>

## 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.

### 7.1 Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare provette, puntali, e gli altri materiali che vengono a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.

Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.

Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

## 7.2 Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

Non trasferire mai camici, guanti o strumenti da laboratorio dall'area designata per l'amplificazione / rilevamento dei prodotti di amplificazione all'area designata per l'estrazione / preparazione delle reazioni di amplificazione

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

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

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

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

Manipolare i campioni estratti in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Gestire le cassette di PCR (PCR Cassette) in modo tale da ridurre quanto più possibile la diffusione dei prodotti di amplificazione nell'ambiente come pure la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

## 7.3 Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

**Tabella 3**

Componente	Temperatura di conservazione	Utilizzo dalla prima apertura	Cicli di congelamento / scongelamento	Stabilità On board (ELITE InGenius ed ELITE BeGenius)
BKV Q-PCR Mix	-20 °C o inferiore (protetta dalla luce)	entro un mese	fino a cinque	fino a cinque sessioni indipendenti* da tre ore ciascuna oppure fino a 7 ore consecutive (2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna più il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro)

\*con congelamento intermedio

## 8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius

### 8.1 Campioni

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

**Tabella 4**

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

\* *EDTA, acido etilendiamminotetraacetico*; g, giorno.

Anche se sono possibili periodi di conservazione più lunghi a 70° C, come ampiamente riportato dalla letteratura scientifica, la loro applicazione deve essere valutata internamente dagli utilizzatori finali di questo prodotto.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Per eseguire l'analisi dei campioni su **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius**, è necessario utilizzare gli Assay Protocols di seguito indicati. Questi protocolli di saggio IVD sono stati validati per l'uso specifico con i kit ELITE MGB e **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con le matrici indicate.



Tabella 5 Assay protocols per BKV ELITE MGB Kit

Campione	Strumento	Nome Assay Protocol	Report	Caratteristiche
Plasma in EDTA	ELITE InGenius	BKV ELITE_PL_200_100	copie/ mL o IU/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	BKV ELITE_Be_PL_200_100	copie/ mL o IU/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
Urine	ELITE InGenius	BKV ELITE_U_200_100	copie/ mL o IU/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL
	ELITE BeGenius	BKV ELITE_Be_UL_200_100	copie/ mL o IU/mL	Volume estrazione in ingresso: 200 µL Volume eluizione: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

IU, unità internazionali

### NOTA

Verificare se il tubo primario e il volume del campione sono compatibili con ELITE InGenius o ELITE BeGenius, seguendo le Istruzioni per l'uso del kit di estrazione ELITE InGenius SP200 (EG SpA, rif. INT032SP200).

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube (per ELITE InGenius) o in una provetta Sarstedt da 2 mL (per ELITE BeGenius).

### NOTA

Il trasferimento con le pipette dei campioni nell' **Extraction Tube** o nella **provetta Sarstedt da 2 mL** potrebbe **generare contaminazione**. Utilizzare le pipette appropriate e seguire tutte le raccomandazioni riportate nella sezione 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI pagina 6.

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

I dati disponibili relativi all'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#).

## 8.2 Calibratori e Controlli di PCR

Prima di analizzare ogni campione, è obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per ogni lotto di reagente di PCR:

- come Curva di Calibrazione, utilizzare il prodotto **BKV ELITE Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **BKV ELITE\_STD** o **BKV ELITE\_Be\_STD**.

### NOTA

La concentrazione dei Q-PCR Standards sono espresse in copie / reazione ( $10^5$  copie / rxn,  $10^4$  copie / rxn,  $10^3$  copie / rxn,  $10^2$  copie / rxn). Fare riferimento al paragrafo "Incertezza della Curva Standard" in 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22.

Prima di analizzare ogni campione, è obbligatorio generare e approvare i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Controllo Positivo di PCR, utilizzare il prodotto **BKV – ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con gli Assay Protocols **BKV ELITE\_PC** o **BKV ELITE\_Be\_PC**.
- come Controllo Negativo di PCR, utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita in questo kit) in associazione con gli Assay Protocols **BKV ELITE\_NC** o **BKV ELITE\_Be\_NC**.
- 

### NOTA

**ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** richiedono la generazione e l'approvazione della curva di calibrazione e risultati approvati e validi dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di PCR.

Le curve di calibrazione scadono dopo **60 giorni** e la validazione dei risultati dei controlli di PCR, approvati e memorizzati nel database scade dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente la curva di calibrazione e l'analisi dei controlli positivi e negativi.

Inoltre, i calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati nei seguenti casi:

- quando si utilizza un nuovo lotto di reagenti di PCR,
- quando i risultati delle analisi di controllo qualità (vedi [8.3 Controlli di qualità pagina 10](#)) non rientrano nelle specifiche,
- quando **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** deve essere sottoposto ad un intervento di manutenzione principale.

## 8.3 Controlli di qualità

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

## 9 PROCEDURA ELITE InGenius

La procedura per l'uso del prodotto **BKV ELITE MGB Kit** con **ELITE InGenius** si articola in tre fasi:

**Tabella 6**

<b>FASE 1</b>	Verifica che il sistema sia pronto	
<b>FASE 2</b>	Impostazione della sessione	A) Corsa dei campioni (Extract + PCR)
		B) Corsa dei campioni estratti (PCR Only)
		C) Corsa di Calibrazione (PCR Only)
		D) Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)

Tabella 6 (segue)

<b>FASE 3</b>	Esame ed approvazione dei risultati	1) Validazione della curva di calibrazione
		2) Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
		3) Validazione dei risultati dei campioni
		4) Refertazione dei risultati dei campioni

### 9.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITe InGenius** e selezionare la modalità **“CLOSED”**,
- nella sezione “Calibration” della schermata Home, verificare che i calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito
- nella sezione “Controls” della schermata Home, verificare che i controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo **8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITe InGenius ed ELITe BeGenius pagina 8**).

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

### 9.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

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

- Corsa dei campioni (Extract + PCR),
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

#### NOTA

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

Prima di impostare una sessione:

Scongelare le provette necessarie di **Q - PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

#### NOTA

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>
<b>1</b>	<p><b>Identificare i campioni</b> e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Extraction tube precedentemente etichettato. <b>Scongelare</b> le provette necessarie di controllo interno <b>CPE</b> a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.</p>	<p><b>Scongelare</b> a temperatura ambiente gli <b>Elution tube</b> con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.</p>
<b>2</b>	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".
<b>3</b>	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
<b>4</b>	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.	Per ogni campione, assegnare un "Track" d'interesse e compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
<b>5</b>	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli").
<b>6</b>	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".	Nella colonna "Protocol" selezionare "PCR Only".
<b>7</b>	Selezionare "Primary tube" o "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Verificare che il " <b>Dilution factor</b> " sia "1".	Nella colonna "Sample Position" selezionare "Elution Tube" (bottom row) come posizione in cui caricare il campione. Verificare che il " <b>Dilution factor</b> " sia "1".
<b>8</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>9</b>	<b>Caricare il CPE e la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
<b>10</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>11</b>	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> .
<b>12</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>13</b>	Caricare le <b>PCR cassette</b> , le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre.	Caricare le <b>PCR cassette</b> e gli Elution tube con i campioni da analizzare.
<b>14</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>15</b>	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
<b>16</b>	Premere "Start".	Premere "Start".

	<b>C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)</b>	<b>D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
1	<b>Scongelare</b> le provette di <b>Q-PCR Standard</b> (Cal1: Q-PCR Standard 10 <sup>2</sup> , Cal2: Q-PCR Standard 10 <sup>3</sup> , Cal3: Q-PCR Standard 10 <sup>4</sup> , Cal4: Q-PCR Standard 10 <sup>5</sup> ) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	<b>Scongelare</b> le provette di <b>Controllo Positivo</b> a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 4 reazioni). <b>Preparare il Controllo Negativo</b> trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".
3	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.	Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia 100 µL.
4	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Q-PCR Standard.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare (si veda paragrafo "Campioni e Controlli") e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del Positive Control e dell'acqua per biologia molecolare.
5	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".	Verificare che nella colonna "Protocol" il protocollo visualizzato sia: "PCR Only".
6	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".	Verificare nella colonna "Sample Position" che la posizione sia "Elution Tube".
7	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.	<b>Caricare la PCR Mix</b> nell' "Inventory Block" selezionato e digitare il numero di lotto della PCR Mix, la data di scadenza e il numero di reazioni dei tubi.
8	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
9	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> .	Nell'"Inventory Area" controllare/caricare i <b>Tip Rack</b> .
10	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	Caricare le <b>PCR cassette</b> e le provette per il Q-PCR Standard.	Caricare le <b>PCR cassette</b> e le provette per il Controllo Positivo ed il Controllo Negativo.
12	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
13	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
14	Premere "Start".	Premere "Start".

Dopo il completamento della procedura, **ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

### NOTA

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a  $-20 \pm 10$  °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

### NOTA

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a  $-20$  °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

**NOTA**

Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

**NOTA**

I **Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

**NOTA**

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a -20 °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

**NOTA**

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

**NOTA**

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

### 9.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

**ELITe InGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display" nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

**NOTA**

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

**ELITe InGenius** genera i risultati del prodotto **BKV ELITe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione della Curva di Calibrazione,
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
3. Validazione dei risultati dei campioni,
4. Refertazione dei risultati dei campioni.

#### 9.3.1 Validazione della Curva di Calibrazione

L' **ELITe InGenius software** interpreta i risultati di PCR per il target dei calibratori con i parametri inclusi nell' Assay Protocol **ELITe\_STD**. Il Ct risultante rispetto alla concentrazione genera la curva di calibrazione.

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

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

**NOTA**

Se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" si visualizza il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute. Se la curva di calibrazione viene processata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

**9.3.2 Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo**

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di PCR dei target del Controllo Positivo e del Controllo Negativo con i parametri inclusi negli Assay Protocol **EBV ELITE\_PC** e **EBV ELITE\_NC**. I valori di Ct ottenuti sono convertiti in concentrazione e utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati del **Controllo Positivo** e **Controllo Negativo**, specifici per il lotto del reagente di PCR, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal **software ELITE InGenius** per impostare le Carte di Controllo. Quattro risultati approvati di controllo positivo e controllo negativo vengono utilizzati per impostare la carta di controllo iniziale. Per i controlli successivi, i risultati vengono analizzati dal software per garantire che le prestazioni del sistema rientrino nei criteri di accettazione, mostrati nei grafici della Carta di controllo. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento

**NOTA**

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" appare il messaggio "Failed" che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo.

**NOTA**

Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo sono amplificati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

**9.3.3 Validazione dei risultati dei campioni**

Il **software ELITE InGenius** interpreta i risultati di amplificazione del target (Canale **BKV**) e del controllo Interno (Canale **IC**) con i parametri inclusi negli Assay Protocol **BKV ELITE\_PL\_200\_100** e **BKV ELITE\_U\_200\_100**. I valori dei Ct ottenuti sono convertiti in valori di concentrazione.

I risultati vengono mostrati nella schermata "Results Display".

La corsa del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le condizioni riportate nella tabella sottostante.

<b>1) Curva di Calibrazione</b>	<b>Stato</b>
BKV Q-PCR Standard	APPROVATO
<b>2) Controllo Positivo</b>	<b>Stato</b>
BKV Positive Control	APPROVATO
<b>3) Controllo Negativo</b>	<b>Stato</b>
BKV Negative Control	APPROVATO

I risultati del campione vengono interpretati automaticamente dal **software ELITE InGenius** utilizzando i parametri dell'Assay Protocol. La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Per ogni campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se il DNA dei patogeni è stato rilevato o non rilevato.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
BKV: DNA rilevato, quantità pari a "XXX copie/mL or IU/mL"	Il <b>DNA di BKV è stato rilevato</b> nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità mostrata.
BKV: DNA rilevato, quantità inferiore a "LLoQ" copie/mL or IU/mL	Il <b>DNA di BKV è stato rilevato</b> nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio
BKV: DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie/mL or IU/mL	Il <b>DNA di BKV è stato rilevato</b> nel campione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio.
BKV: DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL or IU/mL	Il <b>DNA di BKV non è stato rilevato</b> nel campione. Il campione è negativo per il DNA di BKV oppure la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rilevazione (LoD) del saggio.
Non valido - Ripeti test sul campione	<b>Risultato del saggio non valido</b> per un errore del controllo interno (es: estrazione errata, presenza di un inibitore). Il test deve essere ripetuto.

Campioni che riportano il risultato "Non Valido-Ripeti test su campione": in questo caso, il DNA del Controllo Interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di campionamento, estrazione o amplificazione (e.g. errato campionamento, degradazione o perdita di DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono generare risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale oppure diluito, mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (vedi [17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI pagina 41](#)).

I campioni segnalati come "BKV:DNA non rilevato o inferiore a "LoD" copie/mL o IU/mL", sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il DNA di BKV. In tal caso non si può escludere che il DNA di BKV sia presente ad una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA di BKV ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione (e al limite inferiore di quantificazione), quando sono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "BKV:DNA Rilevato, quantità inferiore a LLoQ copie/mL o IU/mL" (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA di BKV ad una concentrazione all'interno del Range di misurazione lineare sono identificati nel report come "BKV: DNA rilevato, quantità pari a "XXX" copie/mL o IU/mL" (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#)).

I campioni positivi per il DNA di BKV ad una concentrazione oltre il limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio sono identificati nel report come "BKV:DNA rilevato, quantità oltre "ULoQ" copie/mL or IU/mL" e non sono validi ai fini della quantificazione (vedi [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#)). Se necessario, il campione può essere diluito prima dell'estrazione o la PCR e ritestato al fine di ottenere risultati all'interno del range di misurazione lineare del saggio.

## NOTA

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e degli altri esiti di laboratorio riguardanti il paziente.

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

### 9.3.4 Refertazione dei risultati dei campioni

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".



Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per campione selezionato (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per track selezionato.

Il "Sample Report" e il "Track Report" possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

## 10 PROCEDURA ELITE BeGenius

La procedura per l'utilizzo del prodotto **BKV ELITE MGB Kit** con **ELITE BeGenius** si articola in tre fasi:

**Tabella 7**

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

### 10.1 FASE 1 - Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione:

- accendere lo strumento **ELITE BeGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**",
- nella sezione "Calibration" della schermata Home, verificare che i Calibratori (**Q - PCR Standard**) siano processati, approvati e validi (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Calibratori validi, eseguire la sessione dei calibratori come descritto di seguito
- nella sezione "Controls" della schermata Home, verificare che i Controlli di PCR (**Positive Control, Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di **PCR Mix** da utilizzare. Se non sono disponibili Controlli validi, eseguire la sessione dei controlli come descritto di seguito, selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay Protocols forniti da EG SpA (si veda paragrafo **8 CAMPIONI E CONTROLLI per ELITE InGenius ed ELITE BeGenius pagina 8**).

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

### 10.2 FASE 2 - Impostazione della sessione

Il prodotto **BKV ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con **ELITE BeGenius** per eseguire:

- Corsa dei campioni (Extract + PCR)
- Corsa dei campioni estratti (PCR Only),
- Corsa di Calibrazione (PCR Only),
- Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

**NOTA**

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

**Prima di impostare una sessione:**

Scongelare le provette necessarie di **Q - PCR Mix** a temperatura ambiente per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.

**NOTA**

La miscela **PCR Mix** è fotosensibile per cui non va esposta alla luce diretta.

Per l'impostazione dei quattro tipi di sessione procedere con i seguenti passaggi seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI).

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>
<b>1</b>	<b>Identificare i campioni</b> e, se necessario, scongelarli a temperatura ambiente. Quando richiesto, trasferire 200 µL di campione in un Tubo Sarstedt da 2 mL precedentemente etichettato <b>Scongelare</b> le provette necessarie di controllo interno <b>CPE</b> a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per 12 reazioni.	<b>Scongelare</b> a temperatura ambiente gli " <b>Elution tube</b> " con i campioni di DNA estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi, conservare in ghiaccio o in blocco freddo.
<b>2</b>	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".	Nella schermata Home, selezionare " <b>Perform Run</b> ".
<b>3</b>	Rimuovere tutti i <b>Racks</b> dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i <b>Racks</b> dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
<b>4</b>	Selezionare il "Run mode": " <b>Extract + PCR</b> ".	Selezionare il "Run mode": " <b>PCR Only</b> ".
<b>5</b>	<b>Caricare i campioni</b> nel " <b>Sample Rack</b> ". (Nota: quando si utilizzano tubi secondari "2 mL Tube" utilizzare gli adattatori blu per il "Sample Rack").	<b>Caricare gli eluati</b> dei campioni estratti nell'" <b>Elution Rack</b> ".
<b>6</b>	Inserire il " <b>Sample Rack</b> " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 5" (L5). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse inserire il "SampleID" (SID). (Se si utilizzano tubi secondari, selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha etichetta o barcode, digitare manualmente il SID).	Inserire l'" <b>Elution Rack</b> " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
<b>7</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>8</b>	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
<b>9</b>	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
<b>10</b>	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
<b>11</b>	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.	Quando devono essere analizzati più di 12 campioni, ripetere la procedura dal punto 6.
<b>12</b>	Caricare gli " <b>Elution tube</b> " nell'" <b>Elution Rack</b> ".	Non applicabile

	<b>A. Corsa dei campioni (Extract + PCR)</b>	<b>B. Corsa dei campioni estratti (PCR Only)</b>
13	Inserire l'“ <b>Elution Rack</b> ” nella “Cooler Unit” partendo dalla “Lane 3” (L3). In caso di un numero di campioni maggiore di 12, ripetere usando “Lane 2” (L2).	Non applicabile
14	Fare clic su "Next" per proseguire.	Non applicabile
15	<b>Caricare il CPE e la PCR Mix</b> nel “Reagent/Elution Rack”.	<b>Caricare la PCR Mix</b> nel “Reagent/Elution Rack”.
16	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix e / o CPE inserire “S/N”, “Lot No.”, “Exp. Date”, “T/R” (numero reazioni del tubo).	Inserire il “Reagent/Elution Rack” nella “Cooler Unit” nella “Lane 2” (L2) se disponibile o nella “Lane 1” (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire “S/N”, “Lot No.”, “Exp. Date”, “T/R” (numero reazioni del tubo).
17	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
18	Nell'“Inventory Area” controllare / caricare i “ <b>Tip Rack</b> ”.	Nell'“Inventory Area” controllare / caricare i “ <b>Tip Rack</b> ”.
19	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
20	Caricare il “ <b>PCR Rack</b> ” con le “ <b>PCR Cassette</b> ” nell' Inventory Area.	Caricare il “ <b>PCR Rack</b> ” con le “ <b>PCR Cassette</b> ” nell' Inventory Area.
21	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
22	Caricare l'“ <b>Extraction Rack</b> ” con le cartucce di estrazione “ELITe InGenius SP 200” e i consumabili richiesti.	Non applicabile
23	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
24	Premere “Start”.	Premere “Start”.

	<b>C. Corsa di Calibrazione (PCR Only)</b>	<b>D. Corsa del Controllo Positivo e del Controllo Negativo (PCR Only)</b>
1	<b>Scongelare</b> le provette di <b>Q-PCR Standard</b> (Cal1: Q-PCR Standard 10 <sup>2</sup> , Cal2: Q-PCR Standard 10 <sup>3</sup> , Cal3: Q-PCR Standard 10 <sup>4</sup> , Cal4: Q-PCR Standard 10 <sup>5</sup> ) a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo.	Scongelare le provette di Controllo Positivo a temperatura ambiente per 30 minuti. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e conservare in ghiaccio o in blocco freddo. (Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni). <b>Preparare il Controllo Negativo</b> trasferendo almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un <b>"Elution tube"</b> , fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Nella schermata Home, selezionare <b>"Perform Run"</b> .	Nella schermata Home, selezionare <b>"Perform Run"</b> .
3	Rimuovere i <b>Racks</b> dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.	Rimuovere i <b>Racks</b> dalla "Lane 1, 2 e 3" (L1, L2, L3) della "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.
4	Selezionare il "Run mode": <b>"PCR Only"</b> .	Selezionare il "Run mode": <b>"PCR Only"</b> .
5	<b>Caricare</b> le provette di <b>Q-PCR Standard</b> nell' "Elution Rack".	<b>Caricare</b> le provette di <b>Controllo Positivo</b> e di <b>Controllo Negativo</b> nell' "Elution Rack".
6	Inserire l'" <b>Elution Rack</b> " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".	Inserire l'" <b>Elution Rack</b> " nella "Cooler Unit" partendo dalla "Lane 3" (L3). Se necessario, per ogni "Position" d'interesse compilare il "SampleID" (SID), "Sample Matrix", "Extraction Kit", "Extracted Eluate Vol.".
7	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
8	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.	Verificare che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
9	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.	Nella colonna "Assay" selezionare gli Assay Protocol da utilizzare.
10	Click "Next" to continue.	Fare clic su "Next" per proseguire.
11	<b>Caricare la PCR Mix</b> nel "Reagent/Elution Rack".	Caricare la PCR Mix nel "Reagent/Elution Rack".
12	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2) se disponibile o nella "Lane 1" (L1). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).	Inserire il "Reagent/Elution Rack" nella "Cooler Unit" nella "Lane 2" (L2). Se necessario, per ogni PCR Mix inserire "S/N" (numero seriale), "Lot No.", "Exp. Date", "T/R" (numero reazioni del tubo).
13	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
14	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i <b>"Tip Rack"</b> .	Nell'"Inventory Area" controllare / caricare i "Tip Rack".
15	Fare clic su "Next" per proseguire.	Fare clic su "Next" per proseguire.
16	Caricare il <b>"PCR Rack"</b> con le <b>"PCR Cassette"</b> nell' Inventory Area.	Caricare il "PCR Rack" con le "PCR Cassette" nell' Inventory Area.
17	Fare clic su "Next" per proseguire	Fare clic su "Next" per proseguire
18	Chiudere lo sportello dello strumento.	Chiudere lo sportello dello strumento.
19	Premere "Start".	Premere "Start".

Dopo il completamento della procedura, **ELITE BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

**NOTA**

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento gli **Elution tube** con il campione estratto residuo, chiuderlo, identificarlo e conservarlo a  $-20 \pm 10$  °C al massimo per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

**NOTA**

Alla fine della corsa la **PCR Mix** può essere rimossa dallo strumento, tappata e conservata a  $-20$  °C o temperatura inferiore, o può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 7 ore (2 sessioni di lavoro consecutive da 3 ore ciascuna e il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro), mescolare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

**NOTA**

Alla fine della corsa prelevare dallo strumento le provette di **Q - PCR Standard**, chiuderle e conservarle a  $-20$  °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Q - PCR Standards.

**NOTA**

I **Q-PCR Standard** possono essere utilizzati per 4 sessioni di lavoro indipendenti da 2 ore ciascuna.

**NOTA**

Alla fine della corsa, prelevare dallo strumento le provette di **Controllo Positivo**, chiuderle e conservarle a  $-20$  °C o temperatura inferiore. Evitare la fuoriuscita accidentale del Controllo Positivo. Smaltire le provette di **Controllo Negativo**.

**NOTA**

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

**NOTA**

Alla fine della corsa, rimuovere dallo strumento le **PCR Cassette** e gli altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

### 10.3 FASE 3 - Esame ed approvazione dei risultati

**ELiTe BeGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri dell'Assay Protocol per generare curve di PCR e di dissociazione che sono poi interpretate nei risultati.

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display", nella quale sono riportati i risultati e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

**NOTA**

**ELiTe BeGenius** può essere collegato al "Laboratory Information System" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

**ELiTe BeGenius** genera i risultati del prodotto **BKV ELiTe MGB Kit** attraverso la seguente procedura:

1. Validazione della Curva di Calibrazione
2. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
3. Validazione dei risultati dei campioni
4. Refertazione dei risultati dei campioni

**NOTA**

Per i dettagli fare riferimento agli stessi paragrafi della “Procedura” dello strumento **ELITE InGenius**.

## 11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius

### 11.1 Limite di Rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio in associazione con plasma EDTA e urine è stato determinato in associazione a **ELITE InGenius**, testando un pannello di matrici negative per BKV, positivizzate con il materiale di riferimento per BKV (1st WHO International Standard for BK Virus DNA, NIBSC ref. 14/212, United Kingdom).

L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è uguale al 95%.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nella tabella seguente.

**Tabella 8 Limite di Rilevazione con ELITE InGenius (IU / mL)**

Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%	
		limite inferiore	limite superiore
plasma	142 IU / mL	110 IU / mL	222 IU / mL
urine	215 IU / mL	168 IU / mL	319 IU / mL

La sensibilità analitica espressa in copie / mL è stata calcolata applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [11.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 27](#)

La sensibilità analitica per ogni matrice come copie / mL è riportata nella tabella seguente

**Tabella 9 Limite di Rilevazione con ELITE InGenius (copie / mL)**

Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%	
		limite inferiore	limite superiore
urine	89 copie / mL	69 copie / mL	139 copie / mL
plasma	165 copie / mL	129 copie / mL	245 copie / mL

Il valore del limite di rilevazione (LoD) calcolato è stato verificato per ciascuna matrice testando su ELITE InGenius e ELITE BeGenius un pool di matrici positivizzate con il materiale di riferimento di BKV alla concentrazione dichiarata.

I risultati ottenuti confermano la concentrazione dichiarata per il target BKV su entrambi gli strumenti ELITE InGenius ed ELITE BeGenius per ciascuna matrice.

### 11.2 Inclusività: Efficienza di rilevazione e efficienza di quantificazione su genotipi differenti

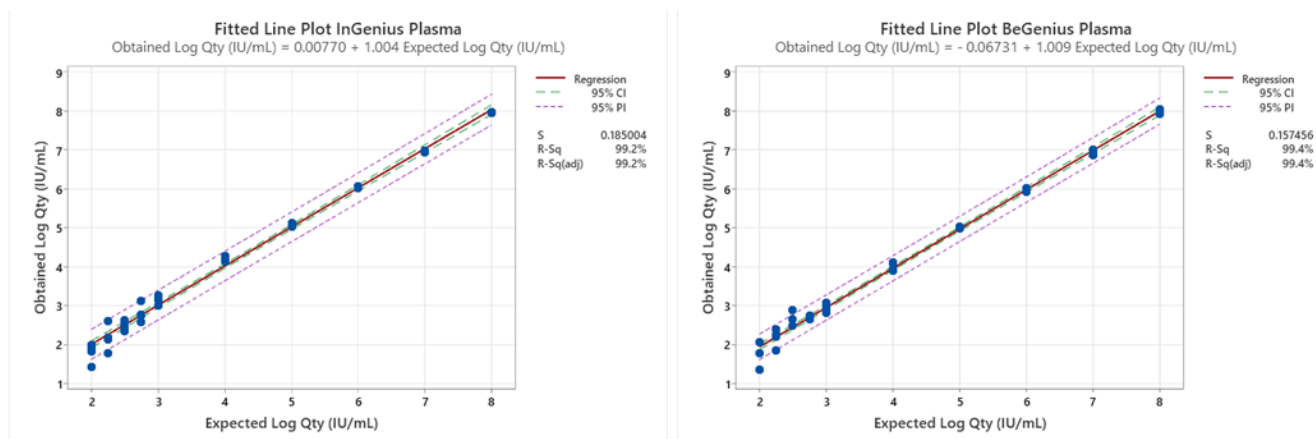
L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione su genotipi differenti di BKV è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi. L'analisi ha mostrato conservazione di sequenza e assenza di mutazioni significative. Pertanto, è prevedibile l'efficienza di rilevazione per i diversi ceppi o isolati.

### 11.3 Intervallo di misurazione lineare e limite di quantificazione

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

I risultati, per ciascuna matrice, sono riportati nei paragrafi seguenti.

#### Plasma:

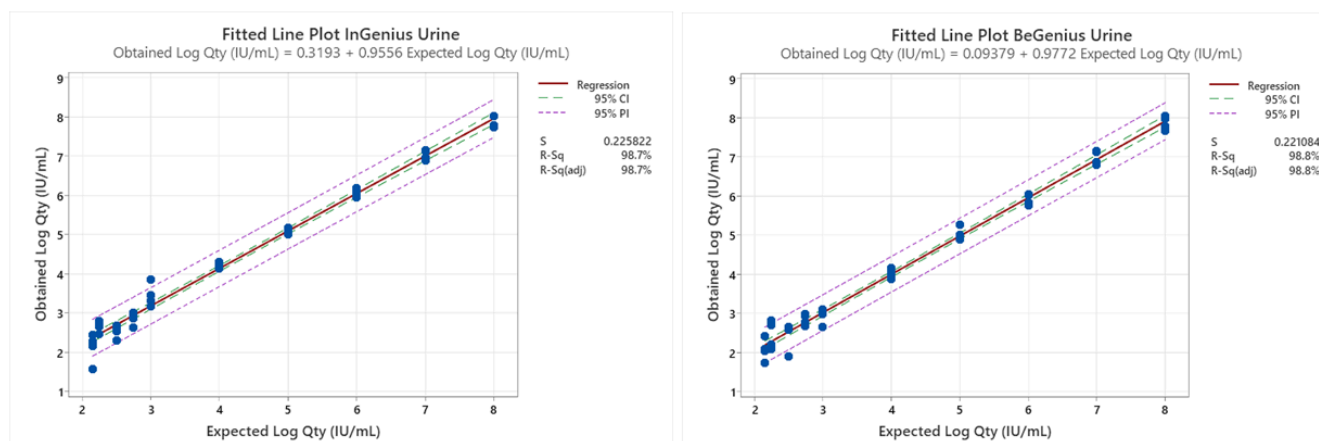


L'intervallo di misurazione lineare in copie / mL per plasma EDTA è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [11.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 27](#)

I risultati sono riportati nella tabella seguente

**Tabella 10 Intervallo di misurazione lineare per plasma e ELITe InGenius ed ELITe BeGenius**

Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
IU / mL	215	130.000.000
copie / mL	165	100.000.000

**Urine:**

L'intervallo di misurazione lineare in copie / mL per Urine è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [11.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali pagina 27](#)

I risultati sono riportati nella tabella seguente

**Tabella 11 Intervallo di misurazione lineare per urine e ELITE InGenius ed ELITE BeGenius**

Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
IU / mL	142	160.000.000
copie / mL	89	100.000.000

#### 11.4 Incertezza della Curva Standard

Il valore di incertezza della Curva Standard è stato calcolato combinando gli errori casuali (SD) di tutte le quantificazioni dei livelli e moltiplicandoli per il fattore di copertura  $k = 2$  (Incertezza Combinata Estesa) ed è pari a 0,2146 Log copie / reazione.

**Tabella 12**

Livelli di curva standard	Teorico	Misurato	Bias	SD	Incertezza Combinata Estesa
	Log c/rxn	Log c/rxn			
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 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con organismi diversi che possono essere trovati in campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri organismi indesiderati (virus, batteri, protozoi e funghi) e pertanto non sono attese cross-reattività.



## 11.6 Sostanze potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione di sostanze interferenti (endogene e esogene) che potrebbero trovarsi nei campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante analisi di un pannello di sostanze a concentrazione rilevante in campioni positivi per BKV.

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

**Tabella 13 Plasma**

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

Tutte le sostanze testate non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del BKV o del Controllo Interno.

**Tabella 14 Urine**

Campioni	Pos. / Rep.	Esito
Azitromicina	5 / 5	Nessuna interferenza
Bilirubina	5 / 5	Nessuna interferenza
HBW	5 / 5	Nessuna interferenza
Phenazopyridine Hydrochloride	5 / 5	Nessuna interferenza

Tutte le sostanze testate non hanno mostrato alcuna inibizione dell'amplificazione del BKV o del Controllo Interno.

## 11.7 Ripetibilità

La ripetibilità Intra-Sessione ed Inter-Sessione del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius ed ELITE InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di Plasma raccolto in EDTA, contenente un campione negativo e due campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato per BKV (1<sup>st</sup> WHO International Standard for BKV virus DNA<sup>™</sup> NIBSC code 14/212, United Kingdom).

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su un giorno) è riportato nelle tabelle seguenti.

**Tabella 15 Ripetibilità Intra – Sessione su ELITE InGenius**

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

**Tabella 16 Ripetibilità Intra – Sessione su ELITE BeGenius**

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

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

**Tabella 17 Ripetibilità Inter – Sessione su ELITE InGenius**

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

**Tabella 18 Ripetibilità Inter – Sessione su ELITE BeGenius**

Campione	BKV -giorni 1-2			
	N	Media Ct	SD	% CV
Negativo	16	-	-	-
3 x LoD	16	36,68	0,71	1,43
10 x LoD	16	34,98	0,55	1,96

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

## 11.8 Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata valutata su ELITE BeGenius e ELITE InGenius mediante l'analisi di un pannello di campioni di plasma raccolti in EDTA negativi o positivizzati con BKV (1<sup>st</sup> WHO International Standard for BKV virus DNA” NIBSC code 14/212, United Kingdom).

Un riassunto dei risultati di Riproducibilità Inter-Strumento (su due strumenti) è riportato nelle tabelle seguenti:

**Tabella 19 Riproducibilità Inter-Strumento su ELITE InGenius**

Campione	EBV			
	N	Media Ct	SD	% CV
Negativo	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,72	0,30	0,82
10 x LoD	8	30,89	0,41	1,33

**Tabella 20 Riproducibilità Inter-Strumento su ELITE BeGenius**

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

Un riassunto dei risultati di Riproducibilità Inter-Lotto (su due lotti) è riportato nelle tabelle seguenti:

**Tabella 21 Riproducibilità Inter-Lotto su ELITE InGenius**

Campione	EBV			
	N	Media Ct	SD	% CV
Negativo	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,94	0,36	0,82
10 x LoD	8	35,07	0,28	1,33

**Tabella 22 Riproducibilità Inter-Lotto su ELITE BeGenius**

Campione	EBV			
	N	Media Ct	SD	% CV
Negativo	8	-	-	-
3 x LoD	8	36,81	0,66	1,56
10 x LoD	8	35,01	0,41	0,72

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

### 11.9 Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione per riportare i risultati quantitativi da copie / mL in Unità Internazionali / mL, è stato calcolato, per ciascuna matrice, utilizzando il pannello di materiale di riferimento calibrato certificato "1st WHO International Standard for BKV virus DNA" (NIBSC code 14/212, United Kingdom).

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nella tabella seguente.

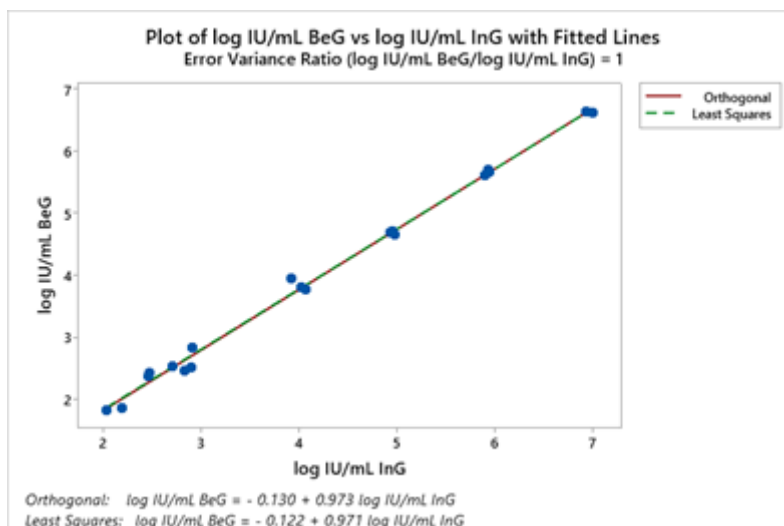
**Tabella 23 Fattore di conversione alle Unità Internazionali con ELITE InGenius**

Volume di campione	Matrice	Fc (IU / gEq)
200 µL	Plasma	1,3
200 µL	Urine	1,6

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

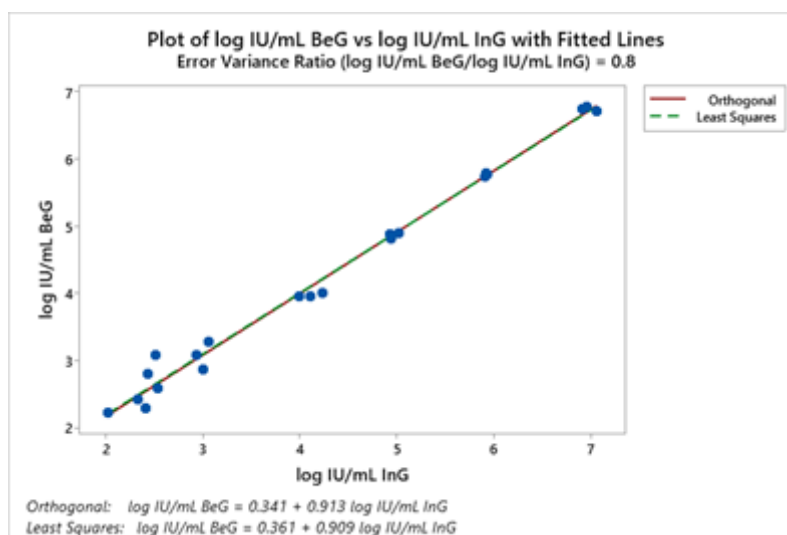
I risultati, per ogni matrice, sono riportati nei paragrafi seguenti.

#### Plasma



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

#### Urine:



L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a 0.341 (95% CI: 0.152 – 0.529) e una pendenza pari a 0.913 (95%IC: 0.872 - 0.954).

#### 11.10 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici, certificati negativi o presunti negativi per BKV DNA. Poiché **ELITE BeGenius** possiede performance analitiche equivalenti ad **ELITE InGenius**, le performance diagnostiche del saggio eseguito sui due strumenti sono anch'esse considerate equivalenti. Quindi la Specificità Diagnostica del saggio ottenuta in associazione con ELITE InGenius è anche riferibile ad ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 24 Specificità Diagnostica**

Campioni	N	Positivi	Negativi	% Specificità Diagnostica
Plasma raccolto in EDTA e negativo per BKV DNA	79	3	76	<b>96.2%</b>
Urine raccolte senza conservanti negative per BKV DNA	68	0	68	<b>100%</b>

Il cut-off del Ct del Controllo Interno è impostato a 35 per plasma raccolto in EDTA e Urine quando testati su ELITE InGenius ed ELITE BeGenius.

### 11.11 Sensibilità Diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata in associazione con **ELITE InGenius** analizzando campioni clinici certificati positivi per BKV DNA o positivizzati con materiale di riferimento. Poiché **ELITE BeGenius** ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, le prestazioni diagnostiche del saggio su entrambi gli strumenti sono considerate analogamente equivalenti. Per questo motivo, la sensibilità diagnostica dell' Assay ottenuta in associazione con lo strumento ELITE InGenius può essere applicata anche allo strumento ELITE BeGenius.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 25 Sensibilità Diagnostica**

Campione	N	Positivi	Negativi	% Sensibilità Diagnostica
Plasma raccolto in EDTA e positivo per BKV DNA	34	34	0	100%
Plasma raccolto in EDTA e positivizzato per BKV	24	24	0	
Totale	58	58	0	
Urine senza conservanti e positive per BKV DNA	67	67	0	100%

#### NOTA

I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nell Fascicolo Tecnico di Prodotto "BKV ELITE MGB Kit", FTP 175PLD.

## 12 CAMPIONI E CONTROLLI per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR

### 12.1 Campioni

I seguenti campioni e metodi di estrazione degli acidi nucleici sono validati per l'uso con il **BKV ELITE MGB Kit** utilizzando l' ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tabella 26

Campione	Kit / Metodo di estrazione	Protocollo	Volume Input (µL)	Volume di eluizione (µL)	Volume minimo nel tubo primario (µL)	Istruzioni specifiche
Sangue intero	ELITe GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	aggiungere 10 µL/campione di CPE alla soluzione IC + Carrier

## 12.2 Sostanze interferenti

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

Un'elevata quantità di DNA genomico umano nel DNA estratto dal campione può inibire la reazione di amplificazione.

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

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

## 12.3 Controlli di Amplificazione

E' obbligatorio validare ogni sessione di amplificazione con una reazione del Controllo Negativo e del Controllo Positivo.

Come Controllo Negativo, usare acqua per biologia molecolare (non fornita con questo kit) aggiunta alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Come Controllo Positivo, usare il prodotto **BKV - ELITe Positive Control** oppure il prodotto **BKV - ELITe Standard**.

## 12.4 Controlli di Qualità

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

# 13 PROCEDURA per ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

## 13.1 Impostazione della sessione di amplificazione real time

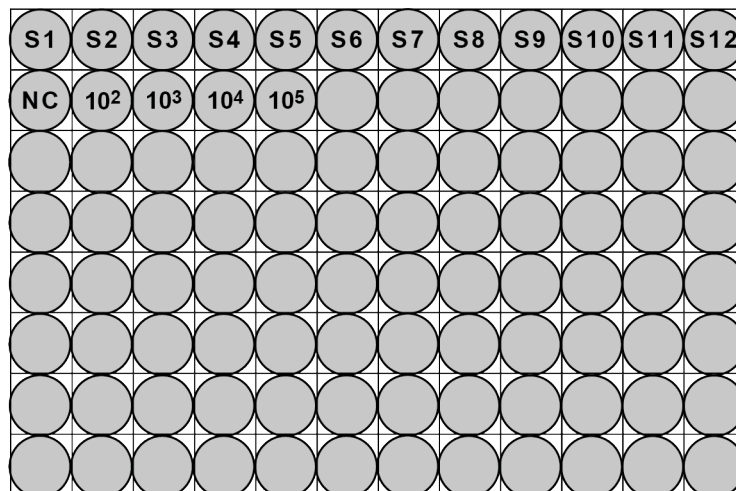
Prima di iniziare la sessione, riferirsi alla documentazione dello strumento per:

- accendere il computer di controllo, accendere il thermal cycler per real time, avviare il software dedicato, aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode:Fast 7500",
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per BKV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "BKV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente a VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastre, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "Cy5" (AP593 è usato invece del Cy5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota).

**NOTA**

Per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** ( $10^5$  copie,  $10^4$  copie,  $10^3$  copie,  $10^2$  copie) per ottenere la Curva standard

Si illustra di seguito, a titolo di esempio, come può essere organizzata l'analisi quantitativa di 12 campioni.



**Legenda:** **S1 - S12:** Campioni da analizzare; **CN:** Controllo negativo di amplificazione;

**102:** Standard  $10^2$  copie; **103:** Standard  $10^3$  copie; **104:** Standard  $10^4$  copie; **105:** Standard  $10^5$  copie.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del ciclo termico:

- aggiungere **20 secondi di estensione a 72 °C** (Add Step);

**NOTA**

L'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di ibridazione a 60 °C

- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare il volume del campione a **30 µL**
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C** a **80 °C**.

**Tabella 27 Ciclo termico**

Stage	Temperature	Tempi
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.

**Tabella 27 Ciclo termico (segue)**

Stage	Temperature	Tempi
Dissociazione (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

### 13.2 Allestimento dell'amplificazione

(Da eseguire con lo strumento **ELITE GALAXY**)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

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

#### NOTA

Se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento «**ELITE GALAXY**», caricare la **Q-PCR microplate**, la miscela completa di reazione e la micropiastra di amplificazione come previsto dal manuale di istruzioni d'uso dello strumento e seguendo quanto richiesto dalla GUI.

Lo strumento esegue automaticamente l'allestimento della PCR dispensando in ciascun pozzetto della **Q-PCR microplate**:

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

#### NOTA

Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a -20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

Dopo l' allestimento della PCR da parte dello strumento:

- sigillare la **Q-PCR microplate** con un foglietto (Amplification Sealing Sheet)
- trasferire la **Q-PCR microplate** nello strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR** e iniziare la PCR. Salvare il file della corsa con un nome univoco e riconoscibile (es. "anno-mese-giorno-TARGET-EGSpa")

#### NOTA

Al termine del ciclo termico **Q-PCR microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento e smaltita in modo da non generare contaminazioni ambientali. Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dalla **Q-PCR microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

### 13.3 Considerazioni generali per l' analisi dei risultati

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

- impostare manualmente il livello di fluorescenza di fondo (**Baseline**) dal ciclo 6 al ciclo 15 (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle);



**NOTA**

La fluorescenza FAM della sonda in un campione positivo ad alto titolo di BKV può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso, abbassare il calcolo del Livello di fluorescenza di fondo al ciclo in cui la fluorescenza FAM del campione comincia a crescere (Results > Component).

Impostare manualmente la Soglia per i detectors:

- impostare il detector FAM "BKV" a **0.2**
- impostare il detector VIC "IC" a **0.1**.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore **Soglia** di fluorescenza sono utilizzati per determinare il Ciclo Soglia (Ct, Threshold cycle) per quel campione.

Il software dello strumento automaticamente analizza i livelli di fluorescenza nei controlli, standards e nelle reazioni dei campioni e calcola il valore di Ct.

**13.4 Analisi qualitativa dei risultati**

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

**Tabella 28**

Reazione Positive Control detector FAM "CMV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è Ct > 25 o Ct Non determinato (Undetermined) per BKV, la sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione. Questo potrebbe indicare un problema nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti.

**NOTA**

Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di BKV, al posto della reazione con il Positive Control viene allestita la serie di reazioni con i Q - PCR Standard. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del Q - PCR Standard 10<sup>5</sup> (Ct ≤ 25).

Nella reazione di amplificazione del Controllo negativo, il valore di Ct per BKV (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 29**

Reazione Controllo negativo detector FAM "BKV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del Controllo negativo è diverso da Ct Non determinato (Undetermined) per BKV, la sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione. Questo potrebbe indicare un problema nella fase di amplificazione (contaminazione) che può causare risultati non corretti e falsi positivi.

Il valore di Ct di BKV in ciascun campione è usato per la rilevazione del target a DNA mentre il valore di Ct del controllo interno è usato per validare l'estrazione, la PCR e la rilevazione.

**NOTA**

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

Possibili risultati di campioni (Results > Report) sono descritti nella seguente tabella:

**Tabella 30**

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di BKV
Detector FAM "BKV"	Detector VIC "IC"			
Ct Undetermined	Ct > 35 or Ct Non determinato	non idoneo	non valido	-
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, negativo	NON RILEVATO
Ct Determined	Ct > 35 or Ct Non determinato	idoneo	valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, positivo	RILEVATO

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

Un risultato di **Ct Non determinato** per BKV e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno è un risultato valido e indica che il DNA di BKV non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione. Il campione può non contenere il DNA di BKV o contiene un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). Un campione che risulta con Ct determinato **Ct ≤ 45** per BKV e **Ct 35**, **Ct Non determinato** o **Ct ≤ 35** per il controllo interno è un risultato valido e indica che il DNA di BKV è stato rilevato nel campione.

**NOTA**

Nel caso di Ct determinato per BKV e Ct > 35 o Ct Non determinato per il controllo interno, la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di BKV. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

**NOTA**

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

**13.5 Analisi Quantitativa dei risultati**

I valori di **Ct** per BKV nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

**Tabella 31**

Curva Standard detector FAM "BKV"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	$0.990 \leq R2 \leq 1.000$	CORRETTA

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

**Tabella 32**

Risultato del campione detector FAM "BKV"	copie di BKV per reazione
Quantità > 1 x 10 <sup>6</sup>	SUPERIORI A 1 x 10 <sup>6</sup>
1 x 10 <sup>1</sup> ≤ Quantità ≤ 1 x 10 <sup>6</sup>	= Quantità
Quantità < 1 x 10 <sup>1</sup>	INFERIORI A 10

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

**Tabella 33**

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

dove:

**Ve** è il volume totale ottenuto dall'estrazione espresso in µL

**Quantity** è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione espresso in **copie per reazione**.

**Vc** è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta

**Va** è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di amplificazione espresso in µL

**Ep** è l'efficienza della procedura, estrazione ed amplificazione, espressa in decimali

Per convertire la quantità di campione da copie/mL a IU/mL, moltiplicare il valore in copie/mL al **fattore di conversione (Fc)**. Il Fc è stato calcolato utilizzando il materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for BK Virus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC) (vedi [14 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument pagina 36](#)).

Per comodità, le seguenti sono formule semplificate in cui Ve/(Vc x Va x Ep) e la sua conversione a IU/mL è stata calcolata.

**Tabella 34**

Matrice	Metodo di estrazione dell'acido nucleico	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Formula per quantificare Nc (copie/mL)	Fc (IU/copia)	Formula per quantificare Nc (IU/mL)
plasma	ELiTe GALAXY	35	35 x Quantità	4,1	143,5 x Quantità

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

### 14.1 Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del saggio in associazione al plasma raccolto in EDTA è stato verificato con gli strumenti ELITe GALAXY e ABI 7500, testando un pannello di matrici negative per BKV positivizzate con materiale di riferimento per BKV (1st WHO international standard for BKV virus DNA, NIBSC code 14/212, United Kingdom). L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è uguale al 95%

Il risultato è riportato nella tabella seguente

**Tabella 35 Limite di Rilevazione con campioni di Plasma ed ELITe GALAXY**

		Intervallo di confidenza del 95%	
		limite inferiore	limite superiore
95% positivity	<b>190 copies / mL</b>	122 copies / mL	452 copies / mL
95% positivity	<b>779 IU / mL</b>	500 IU / mL	1,853 IU / mL

La sensibilità analitica espressa in copie / mL è stata calcolata applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [14.7 Conversione alle Unità Internazionali pagina 39](#).

### 14.2 Intervallo di misurazione lineare

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

L'intervallo di misurazione lineare come copie / mL è stato calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato al paragrafo [14.7 Conversione alle Unità Internazionali pagina 39](#).

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 36 Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma EDTA e ABI 7500**

Unità di Misura	Limite inferiore	Limite superiore
IU / mL	41	41.000.000
copies / reaction	10	1.000.000

### 14.3 Organismi potenzialmente interferenti: Cross-reattività

La potenziale cross-reattività con organismi diversi che possono essere trovati in campioni clinici è stata valutata per il saggio mediante analisi *in silico*. L'analisi non ha mostrato alcuna omologia significativa con altri organismi (virus, batteri, protozoi e funghi) e pertanto non sono attese cross-reattività,

L'assenza di cross-reattività con organismi diversi è stata anche valutata tramite l'analisi di un pannello di organismi potenzialmente interferenti ad alto titolo (ATCC, NIBSC).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

**Tabella 37**

Organismo	Pos. / Rep.	Esito
HSV1	0 / 3	nessuna cross reattività
HSV2	0 / 3	nessuna cross reattività

**Tabella 37 (segue)**

Organismo	Pos. / Rep.	Esito
CMV	0 / 3	nessuna cross reattività
EV	0 / 3	nessuna cross reattività
VZV	0 / 3	nessuna cross reattività
ADV	0 / 3	nessuna cross reattività
EBV	0 / 3	nessuna cross reattività
JCV	0 / 3	nessuna cross reattività
HHV6	0 / 3	nessuna cross reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno cross-reagito con l'amplificazione del BKV utilizzando il prodotto BKV ELITe MGB Kit.

#### 14.4 Organismi potenzialmente interferenti: Inibizione

La potenziale inibizione con organismi diversi che possono essere trovati in campioni clinici è stata valutata per il saggio attraverso l'analisi di un pannello di organismi potenzialmente interferenti ad alto titolo (ATCC, NIBSC), in campioni positivi per BKV.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

**Tabella 38**

Organismo	Pos. / Rep.	Esito
HSV1	3 / 3	nessuna interferenza
HSV2	3 / 3	nessuna interferenza
CMV	3 / 3	nessuna interferenza
EV	3 / 3	nessuna interferenza
VZV	3 / 3	nessuna interferenza
ADV	3 / 3	nessuna interferenza
EBV	3 / 3	nessuna interferenza
JCV	3 / 3	nessuna interferenza
HHV6	3 / 3	nessuna interferenza

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno inibito l'amplificazione del BKV utilizzando il prodotto BKV ELITe MGB Kit.

#### 14.5 Ripetibilità

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

Un esempio dei risultati di ripetibilità Intra-Sessione (su una sessione) è riportato nella tabella seguente.

**Tabella 39 Ripetibilità Intra – Sessione su ABI 7500**

Campione	BKV			
	N	Media Ct	SD	% CV
50,000 target + 150,000 IC	12 / 12	23.89	0.15	0.64
5,000 target + 150,000 IC	12 / 12	27.07	0.10	0.37
500 target + 150,000 IC	12 / 12	30.41	0.17	0.56
10 target + 150,000 IC	12 / 12	37.97	0.92	2.43
150,000 IC	0 / 12	-	-	-

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

**Tabella 40 Ripetibilità Inter — Sessione su ABI 7500**

Campione	BKV			
	N.	Media Ct	SD	% CV
50,000 target + 150,000 IC	24/ 24	23.91	0.13	0.53
5,000 target + 150,000 IC	24/ 24	27.05	0.11	0.41
500 target + 150,000 IC	24/ 24	30.40	0.20	0.66
10 target + 150,000 IC	24/ 24	36.62	0.70	1.91
150,000 IC	0 / 24	-	-	-

Nel test di ripetibilità, il BKV ELITe MGB Kit ha rilevato tutti i campioni come atteso e ha mostrato una variabilità massima di valori di Ct come %CV minore del 5%.

## 14.6 Riproducibilità

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

Un riassunto dei risultati ottenuti dall'analisi dei Ct di BKV e del Controllo Interno amplificati utilizzando il prodotto BKV ELITe MGB è riportato nella tabella seguente.

**Tabella 41 Riproducibilità Inter-Lotto su ABI 7500**

Campione	N	Media Ct	SD	% CV	Esito
100,000 target	30	22.70	0.34	1.51	Passed
50,000 target + 150,000 IC	30	23.54	0.33	1.39	Passed
5,000 target + 150,000 IC	30	26.81	0.40	1.49	Passed
500 target + 150,000 IC	30	30.18	0.47	1.54	Passed
10 target + 150,000 IC	90	36.16	0.67	1.86	Passed

**Tabella 41 Riproducibilità Inter-Lotto su ABI 7500 (segue)**

Campione	N	Media Ct	SD	% CV	Esito
150,000 IC	30	22.76	0.25	1.09	Passed
6,000 IC	90	28.11	0.32	1.15	Passed

**14.7 Conversione alle Unità Internazionali**

Il fattore di conversione da utilizzare con BKV ELITe MGB Kit per trasformare il risultato quantitativo da copie / mL ad Unità Internazionali / mL, in associazione con ELITe GALAXY e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, è stato calcolato, utilizzando un pannello di diluizioni seriali di campioni di plasma EDTA positivamente con materiale di riferimento di BKV "1st WHO International Standard for BK Virus DNA" (NIBSC, UK, code 14/212)

Il fattore di conversione è stato calcolato come l'anti-log della media della differenza (10Md) tra i valori di Log IU / mL assegnati e i valori di Log copie / mL calcolati e corrisponde a 4.12 IU / copie per il plasma EDTA.

**14.8 Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi**

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata analizzando in associazione a **ELITe GALAXY** e **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** campioni certificati negativi per BKV DNA.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 42**

Campioni	N	positivi	negativi	% Specificità Diagnostica
Plasma collected in EDTA and negative for BKV DNA	52	0	52	100 %

**14.9 Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi**

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

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

**Tabella 43**

Campioni	N	positivi	negativi	% Sensibilità diagnostica
Plasma collected in EDTA and positive for BKV DNA	9	9	0	100%
Plasma collected in EDTA and spiked for BKV	42	42	0	
Total	51	51	0	

**NOTA**

I dati ed i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

## 15 BIBLIOGRAFIA

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 LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici:

- plasma raccolto in EDTA (con tutti gli strumenti), le urine (solo con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius)

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

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

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

Con questo prodotto non utilizzare DNA contenente alte quantità di DNA genomico umano che può inibire la reazione di amplificazione degli acidi nucleici.

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

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

La metodica di amplificazione Real-Time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross-contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

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

Questo prodotto richiede l'uso di abbigliamento da lavoro e la disponibilità di aree idonee alla lavorazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA target non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (si veda [11 CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI CON ELITE InGenius and ELITE BeGenius pagina 22](#)); in questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

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



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

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati insieme a tutte le osservazioni cliniche rilevanti e agli esiti degli esami di laboratorio.

Come per qualunque altro dispositivo medico-diagnostico, vi è un rischio residuo di ottenere con questo prodotto risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi. Tale rischio residuo non può essere eliminato né ulteriormente ridotto. In taluni casi, potrebbe indurre decisioni sbagliate con effetti potenzialmente pericolosi per il paziente. Comunque, questo rischio residuo associato all'uso previsto del prodotto è stato valutato in rapporto ai benefici potenziali per il paziente ed è stato considerato accettabile.

## 17 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

### ELiTe InGenius ed ELiTe BeGenius

**Tabella 44**

<b>Reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standard o della Curva standard non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della PCR Mix, Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
Degradazione della PCR Mix	Non utilizzare la PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Positivo o dei Q-PCR Standards.	Non utilizzare i Q-PCR Standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato) Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione o nel blocco refrigerato). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR Standard o Controllo Positivo
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELiTechGroup.

**Tabella 45**

<b>Reazione del Controllo Negativo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix, del Controllo Interno e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della PCR Mix, del Controllo Interno e del Controllo Negativo.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELiTechGroup.

Tabella 46

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della PCR Mix e del campione. Controllare i volumi della PCR Mix e del campione.
Degradazione della PCR Mix.	Non utilizzare il PCR Mix per più di 5 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non utilizzare la PCR Mix per più di tre sessioni consecutive (7 ore nel blocco refrigerato dell'area reagenti o nell'unità refrigerata). Non lasciare la PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Preparare una nuova aliquota della PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup.

Tabella 47

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Tabella 48

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare il rack relativo al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione del campione eluito con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 49

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

**Piattaforme aperte**

Tabella 50

<b>Reazione del Controllo Positivo o dei Q - PCR Standards o della Curva standard non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errore nella dispensazione nella micropiastra.	Controllare i volumi della Q-PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Controllo Positivo dispensati.
Degradazione della Q-PCR Mix	Non congelare e scongelare la Q-PCR Mix più di 5 volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Degradazione dei Q-PCR Standards oppure del Controllo Positivo	Non congelare e scongelare i Q-PCR Standards più di 4 volte. Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR Standards oppure di Controllo Positivo.
Errata impostazione dello strumento	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, dei Q-PCR Standards e del Controllo Positivo nello strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.

Tabella 51

<b>Reazione del Controllo Negativo non valida</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della Q-PCR Mix e del Controllo Negativo.
Micropiastra sigillata male	Sigillare con attenzione la micropiastra.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il Controllo Negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione della Q-PCR Mix.	Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e dell'area reagenti o dell'unità refrigerata.	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.

Tabella 52

Reazione del campione non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errata impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della Q-PCR Mix, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della Q-PCR Mix, del Controllo Interno e del campione.
Degradazione della Q-PCR Mix.	Non congelare e scongelare la Q-PCR mix per più di 5 volte. Non lasciare la Q-PCR Mix a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Utilizzare una nuova aliquota di Q-PCR Mix.
Degradazione del Controllo Interno.	Utilizzare una nuova aliquota di Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only" (solo PCR). Ripetere l'estrazione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

Tabella 53

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errata dispensazione del campione.	Controllare i volumi dei reagenti e dei campioni dispensati nelle micropiastre di Q-PCR.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Tabella 54

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differente da quella degli altri campioni, degli Standard o del Controllo Positivo.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

## 18 LEGENDA DEI SIMBOLI



Numero di catalogo



Limite superiore di temperatura



Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).



Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti del Regolamento Europeo 2017/746/EC relativo ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*. Certificazione rilasciata da TÜV SÜD Product Service GmbH, Germany.



Numero Unico Identificativo del dispositivo



Contenuto sufficiente per "N" test.



Consultare le istruzioni per l'uso



Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

## 19 AVVISO PER L'UTILIZZATORE

Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utilizzatore e/o il paziente.

Al momento dell'attuale revisione dell'IFU, non si sono verificati incidenti gravi o richiami del dispositivo, aventi un impatto sulle prestazioni e sulla sicurezza del dispositivo.

Una "Sintesi della Sicurezza e delle Prestazioni" (Summary of Safety and Performance) sarà resa disponibile al pubblico attraverso la Banca Dati Europea sui Dispositivi Medici (Eudamed) quando questo sistema informatico sarà operativo. Prima della pubblicazione dell'avviso di piena funzionalità di Eudamed, il "Summary of Safety and Performance" sarà reso disponibile al pubblico su richiesta via e-mail all'indirizzo [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com), senza indebito ritardo.

## 20 AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e brevetti EP numero 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Le tecnologie ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® sono coperte da brevetti e oggetto di domande di brevetto.

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

## Appendix A BKV ELITE MGB Kit used in association with Genius series® platforms



### CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

### Intended use

The product **BKV ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the **DNA of human Polyomavirus BK (BKV)** extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of plasma collected in EDTA and urine collected without preservatives.

The assay is also validated in association with the **ELITE GALAXY**, automatic extraction and PCR set-up system and **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, Real-Time PCR platform, using human specimens of plasma collected in EDTA.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of BKV infections in patients suspected of having or undergoing monitoring of BKV infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.


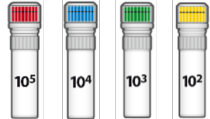

### Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	Large T antigen gene	FAM	BKV
Internal Control	Beta-globin	AP525	IC

### Validated matrix

- **Plasma** collected in EDTA
- **Urine** without preservatives

### Kit content and related products

BKV ELITE MGB Kit	BKV ELITE Standard	BKV- ELITE Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: $10^5$ , $10^4$ , $10^3$ , $10^2$ 2 set of 4 tubes of 200 µL 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

## Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELITe InGenius instrument: INT030.</li> <li>• ELITe BeGenius instrument: INT040.</li> <li>• ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.</li> <li>• ELITe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR.</li> <li>• ELITe InGenius Waste Box: F2102-000.</li> <li>• CPE - Internal Control: CTCRPE</li> <li>• 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S.</li> <li>• 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.</li> </ul>
--	---

## ELITe InGenius and ELITe BeGenius protocol

› Sample volume	200 µL	› Eluate PCR input volume	20 µL
› CPE volume	10 µL	› Q—PCR Mix volume	20 µL
› Total elution volume	100 µL	› Frequency of controls	15 days

## ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Specificity	Diagnostic Sensitivity
Plasma	215 IU / mL	96.2 %	100 %
Urine	142 IU / mL	100 %	100 %

## Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius** and **ELITe BeGenius** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Sample type	Transport/Storage conditions			
	+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Plasma in EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
Urine	≤ 4 hours	≤ 1 d	≤ 30 d	≤ 30 d

C EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; d, day.

## ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

### Before analysis

<p><b>1.</b> Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "<b>CLOSED</b>".</p>	<p><b>2.</b> Verify controls: <b>Positive Control</b> and <b>Negative Control</b> in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.</p>	<p><b>3.</b> Thaw the <b>PCR Mix</b> and the <b>CTRCPE</b> tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.</p>
--	--	---



**Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)**

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest BKV ELITE_PL_200_100 or BKV ELITE_U_200_100 <b>Note:</b> If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" with the "ELITE InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

**NOTE**

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

**Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, standards, controls)**

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: BKV ELITE_PC and BKV ELITE_NC, or BKV ELITE_STD, or BKV ELITE_PL_200_100 or BKV ELITE_U_200_100	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

**ELITE BeGenius Procedures**

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface (GUI) of ELITE BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational modes are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

**Before analysis**

1. Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password. Select the mode " <b>CLOSED</b> ".	2. Verify controls: <b>Positive Control</b> and <b>Negative Control</b> in the "Controls" menu. Note: Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the <b>PCR Mix</b> and the <b>CTRCPE</b> tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.
--	---	---

**Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)**

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest BKV ELITE_Be_PL_200_100 or BKV ELITE_Be_U_200_100 or <b>Note:</b> If a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	6. Load the PCR Mix and the Internal Control in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7. Load "PCR Rack" with "PCR Cassette" and the "Extraction Rack" with the "ELITE InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

**NOTE**

If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

**Procedure 2: PCR Only (e.g., eluates, standards, controls)**

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: BKV ELITE_PC and BKV ELITE_NC, or BKV ELITE_STD or BKV ELITE_PL_200_100 or BKV ELITE_U_200_100.	5. Select the method "PCR Only" and the sample position "Elution Tube"	6. Load the PCR Mix in the Inventory Block
7. Load: PCR Cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door. Start the run	9. View, approve and store the results

## Appendix B BKV ELITE MGB Kit used in association with ABI 7500 Instrument



### CAUTION

This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

### Intended use

The product **BKV ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the **DNA of human Polyomavirus BK (BKV)** extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with the **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of plasma collected in EDTA and urine collected without preservatives.

The assay is also validated in association with the **ELITE GALAXY**, automatic extraction and PCR set-up system and **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, Real-Time PCR platform, using human specimens of plasma collected in EDTA.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis and monitoring of BKV infections in patients suspected of having or undergoing monitoring of BKV infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.


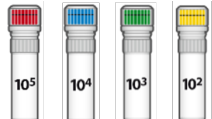

### Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	Large T antigen gene	FAM	BKV
Internal Control	Beta-globin	AP525	IC

### Validated matrices

- **Plasma** collected in EDTA

### Kit content and related products

BKV ELITE MGB Kit	BKV ELITE Standard	BKV- ELITE Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 100 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: $10^5$ , $10^4$ , $10^3$ , $10^2$ 2 set of 4 tubes of 200 µL 8 freeze-thaw cycles	Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 12 reactions per kit 8 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **24 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

## Other products required not provided in the kit

<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELITe GALAXY: INT020</li> <li>• ELITe GALAXY 300 extraction kit: INT021EX</li> <li>• 7500 Fast Dx Real—Time PCR Instrument</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CPE - Internal Control: CTRCPE</li> <li>• Molecular biology grade water</li> </ul>
--	---

## 7500 Real-Time PCR Instrument Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Specificity	Diagnostic Sensitivity	Linearity(IU/mL),	Conversion factor IU/mL to copies/mL	Conversion factor copies/mL to IU/ mL
Plasma	779 IU /mL	100%	100%	41→ 4.1*10 <sup>7</sup>	4.1	143.5 x Quantity

## 7500 Real-Time PCR Instrument Procedures

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

### Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Galaxy	Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

### Amplification - Settings of 7500 Fast Dx

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set “BKV” detector with “FAM” and quencher “none”
3. Set “Internal Control” detector with “VIC” and quencher “none”
4. Set passive fluorescence as “Cy5”
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60° C

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

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

### Amplification - PCR Set-up

To perform the PCR session set up:

1. Thaw the Q PCR-Mix and Positive Control / Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. prepare the **Negative Control** (not provided)

4. prepare a **Q-PCR microplate**
5. The instrument automatically performs the PCR set-up dispensing in each well of the **Q-PCR microplate 20 µL of PCR Mix and 20 µL of extracted DNA / Q-PCR Standard / Controls**

After the PCR set-up performed by the instrument:

1. seal the **Q-PCR microplate** with an optical seal
2. transfer the **Q-PCR microplate** onto the **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** and start the PCR. Save the run file with a unique and recognizable name (e.g. "year-month-day-TARGET-EGSpA")

#### Amplification - Threshold for qualitative analysis

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

#### Interpretation

##### Qualitative results

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

##### Quantitative results

The BKV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction
The sample quantification ranges from approximately 10 to 10 <sup>6</sup> copies / reaction or approximately from 41 to 4.1 x 10 <sup>7</sup> IU/mL

ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITALY  
Tel. +39-011 976 191  
Fax +39-011 936 76 11  
E. mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
WEB site: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

