

# **cobas**<sup>®</sup> **BKV**

---

## **Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sui cobas<sup>®</sup> 5800/6800/8800 Systems**

Per uso diagnostico *in vitro*

<b>cobas<sup>®</sup> BKV</b>	P/N: 09040960190
<b>cobas<sup>®</sup> EBV/BKV Control Kit</b>	P/N: 09040951190
<b>cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit</b>	P/N: 09051953190

# Indice generale

<b>Uso previsto .....</b>	<b>5</b>
<b>Riassunto e spiegazione del test.....</b>	<b>5</b>
<b>Reagenti e materiali .....</b>	<b>8</b>
Reagenti e controlli <b>cobas®</b> BKV .....	8
Reagenti <b>cobas omni</b> per la preparazione dei campioni.....	11
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	12
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il <b>cobas®</b> 5800 System .....	13
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i <b>cobas®</b> 6800/8800 Systems.....	14
Altri materiali necessari per il <b>cobas®</b> 5800 System .....	15
Altri materiali necessari per i <b>cobas®</b> 6800/8800 Systems .....	16
Strumentazione e software necessari.....	17
<b>Precauzioni e requisiti per l'uso.....</b>	<b>18</b>
Avvertimenti e precauzioni.....	18
Manipolazione dei reagenti.....	19
Buone pratiche di laboratorio.....	19
<b>Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni .....</b>	<b>20</b>
Campioni di plasma EDTA.....	20
Campioni di urina .....	21
<b>Istruzioni per l'uso.....</b>	<b>23</b>
Note sulla procedura.....	23
Esecuzione del test <b>cobas®</b> BKV sul <b>cobas®</b> 5800 System .....	23
Esecuzione del test <b>cobas®</b> BKV sui <b>cobas®</b> 6800/8800 Systems.....	25

<b>Risultati .....</b>	<b>26</b>
Controllo di qualità e validità dei risultati sul <b>cobas</b> ® 5800 System .....	26
Risultati dei controlli sul <b>cobas</b> ® 5800 System.....	26
Controllo di qualità e validità dei risultati sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems .....	26
Interpretazione dei risultati .....	27
Interpretazione dei risultati sul <b>cobas</b> ® 5800 System .....	28
Interpretazione dei risultati sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems.....	28
Limiti della procedura .....	29
 <b>Valutazione delle prestazioni non cliniche .....</b>	 <b>30</b>
Caratteristiche chiave delle prestazioni con il tipo di campione plasma EDTA sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems.....	30
Limite di sensibilità (LoD) Standard Internazionale OMS .....	30
Intervallo lineare .....	31
Precisione intra-laboratorio .....	32
Verifica del sottotipo .....	33
Specificità .....	33
Specificità analitica .....	33
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	35
Correlazione tra i metodi.....	35
Tasso globale d'errore del sistema .....	36
Contaminazione crociata.....	36
Caratteristiche delle prestazioni chiave per il tipo di campione urina sui <b>cobas</b> ® 6800/8800 Systems.....	37
Limite di sensibilità (LoD) Standard Internazionale OMS .....	37
Intervallo lineare .....	39
Precisione intra-laboratorio .....	39
Verifica del sottotipo .....	40

Specificità.....	40
Specificità analitica .....	41
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	42
Correlazione tra i metodi.....	43
Contaminazione crociata.....	43

**Valutazione delle prestazioni cliniche eseguita sui  
cobas® 6800/8800 Systems ..... 44**

Riproducibilità del test cobas® BKV per il tipo di campione plasma EDTA .....	44
Prestazioni del test cobas® BKV per il tipo di campione plasma EDTA .....	45
Riproducibilità del test cobas® BKV per il tipo di campione urina stabilizzata .....	47
Prestazioni del test cobas® BKV per il tipo di campione urina stabilizzata .....	48
Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi.....	51

**Informazioni supplementari..... 52**

Caratteristiche del test .....	52
Simboli.....	53
Assistenza tecnica.....	54
Produttore e importatore .....	54
Marchi e brevetti.....	54
Copyright.....	54
Bibliografia .....	55
Revisione del documento .....	56

## Uso previsto

**cobas® BKV** è un test di amplificazione *in vitro* degli acidi nucleici per la quantificazione del DNA del virus BK (BKV) nel plasma EDTA umano e nell'urina stabilizzata in **cobas® PCR Media**.

L'uso previsto per il test **cobas® BKV** sul plasma EDTA è di sostegno alla diagnosi e alla gestione del virus BKV nei pazienti trapiantati. Nei pazienti in cui viene monitorata la presenza di BKV nel plasma EDTA, le misurazioni del DNA in serie possono indicare la necessità di potenziali variazioni della terapia e consentono di valutare la risposta virale alla terapia in atto.

L'uso previsto per il test **cobas® BKV** sull'urina stabilizzata in **cobas® PCR Media** è di sostegno alla diagnosi e alla gestione del virus BKV nei pazienti trapiantati.

I risultati generati dal test **cobas® BKV** devono essere interpretati contestualmente a tutti i dati clinici rilevanti e ai riscontri di laboratorio.

Il test **cobas® BKV** non è destinato all'uso per lo screening del sangue o degli emoderivati.

## Riassunto e spiegazione del test

### Premessa

I pazienti trapiantati sono esposti a un maggiore rischio di contrarre molte infezioni virali e batteriche che possono avere effetti negativi sulla salute più gravi per la popolazione di pazienti trapiantati rispetto alla popolazione sana. Il maggiore rischio è parzialmente imputabile al ridotto funzionamento del sistema immunitario, causato dai farmaci immunosoppressori che i pazienti trapiantati devono assumere per ridurre le probabilità di rigetto del trapianto.<sup>1,2</sup>

Il virus BK (BKV) è un piccolo virus (circa 5 kilobasi) a DNA (acido desossiribonucleico), sprovvisto di pericapside e appartenente alla famiglia dei polyomaviridae. Esistono quattro sottotipi principali di BKV: tra questi, viene rilevato con maggiore frequenza il sottotipo I (80%), seguito dal sottotipo IV (15%).<sup>3</sup> La sieroprevalenza del BKV è > 80% nella popolazione adulta sana generale.<sup>4</sup> Nei soggetti immunocompetenti, il BKV non è associato a patologie significative. Tuttavia un'infezione da BKV potrebbe causare una patologia clinica grave nei soggetti immunocompromessi, inclusi i riceventi di trapianto.<sup>5</sup>

Le infezioni da BKV interessano prevalentemente i reni e le vie urinarie. Dopo l'infezione primaria, il virus resta latente nell'epitelio tubulare renale e nell'epitelio uretrale e può essere riattivato nei soggetti immunocompromessi. Rispetto ad altri tipi di trapianti, il trapianto del rene espone il ricevente a un rischio maggiore di sviluppare le complicazioni associate al BKV, tra cui la nefropatia da polyomavirus (Polyoma Virus Nephropathy, PVN) e la stenosi uretrale. La PVN viene riscontrata nel 10% dei riceventi di trapianto di rene, mentre circa il 50% dei pazienti affetti da PVN andrà incontro a un fallimento dell'innesto. Inoltre circa il 3% dei riceventi di trapianto di rene sviluppano la stenosi uretrale associata al BKV.<sup>5</sup> Anche i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cell Transplants, HSCT) sviluppano complicazioni associate al BKV con una frequenza maggiore, normalmente sotto forma di cistite emorragica (HC). Una percentuale di pazienti HSCT compresa tra il 5 e il 15% soffre di HC.<sup>1</sup>

Le linee guida suggeriscono di monitorare il BKV con regolarità nei trapiantati di rene nei 5 anni successivi al trapianto.<sup>6</sup> Con il monitoraggio costante è possibile identificare l'80-90% dei pazienti a rischio di PVN. La determinazione della viremia BKV nel plasma è raccomandata nell'ambito della strategia di individuazione dei pazienti con maggiore rischio di PVN. I test possono servire da conferma, nel caso di pazienti con viruria BKV rilevata, oppure possono essere utilizzati come test primari per lo screening di routine.<sup>6</sup> Attualmente non vi sono raccomandazioni specifiche per il monitoraggio di routine del BKV nei pazienti HSCT e l'esecuzione dei test è raccomandata principalmente per la valutazione dei pazienti con ematuria e sintomi clinici di cistite. Tuttavia un livello di DNA di BKV maggiore di 10.000 copie/ml è associato a un rischio più alto di HC nei pazienti trapiantati.<sup>7</sup>

Per i riceventi di trapianto di rene nei quali si osserva un aumento persistente dei livelli di DNA di BKV nel plasma (con misurazione superiore a 10.000 copie/ml), si raccomanda di eseguire il test BKV nel plasma ogni 1-2 settimane finché il livello del DNA non avrà raggiunto una concentrazione non rilevabile in due misurazioni consecutive.

Poiché molti test di laboratorio per la quantificazione del BKV non sono standardizzati, la variabilità tra laboratori e tra saggi è elevata.<sup>6,7</sup> Inoltre la composizione dell'urina potrebbe causare l'aggregazione del BKV, con ripercussioni sulla variabilità dal punto di vista quantitativo.<sup>8,9</sup> Una valutazione formale della riproducibilità e della validità dei livelli di DNA di BKV è essenziale per poter garantire risultati coerenti (indipendentemente da quale laboratorio esegue il test) per la gestione clinica dei pazienti affetti da patologie correlate a BKV.

A causa della variabilità tra i saggi, l'esatta soglia virale rilevante dal punto di vista medico è ancora oggetto di discussione, tuttavia il concetto di soglia critica si conferma valido ed è dichiarato negli studi di storia naturale per dimostrare che a livelli più alti di DNA di BKV corrisponde un maggiore rischio di sviluppare PVN e HC.<sup>6,7</sup>

### **Perché utilizzare i test degli acidi nucleici**

La sierologia del polyomavirus non rientra tra gli esami clinici di routine: ha valore soltanto per determinare se un paziente ha contratto un'infezione pregressa da BKV ed è a rischio di riattivazione. I metodi basati sulle colture virali hanno tempi di esecuzione lunghi e, in quanto semiquantitativi, sono poco utili per i pazienti immunocompromessi nei quali sono comuni livelli bassi del virus. La rilevazione diretta del DNA di BKV mediante PCR real-time è potenzialmente il metodo che garantisce un ampio intervallo dinamico, precisione e una sensibilità e una specificità ottimali per i pazienti trapiantati.

### **Spiegazione del test**

Il test **cobas**® BKV è un metodo quantitativo eseguito sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems. Il test **cobas**® BKV consente di rilevare e quantificare il DNA di BKV nei campioni di plasma EDTA e di urina stabilizzata in **cobas**® PCR Media ottenuti da pazienti infetti. Il livello di DNA di BKV viene quantificato rispetto ad uno standard di quantificazione, costituito da DNA non BKV (DNA-QS), che viene introdotto in ogni campione nella fase di preparazione. Il DNA-QS svolge inoltre un ruolo di controllo dell'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test utilizza inoltre tre controlli esterni: un titolo positivo alto, un titolo positivo basso e un controllo negativo. I controlli esterni positivo alto e positivo basso vengono prodotti mediante diluizione da materiale stock con un titolo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per il BKV. Ogni lotto del kit di amplificazione/rilevazione è calibrato in modo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per il BKV.

## Principi della procedura

Il test **cobas**® BKV si basa su una procedura completamente automatizzata per la preparazione dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici) e sulla successiva amplificazione e rilevazione mediante PCR. Il **cobas**® 5800 System è progettato come strumento unico integrato. I **cobas**® 6800/8800 Systems sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatizzata dei dati viene eseguita dal Software **cobas**® 5800 o **cobas**® 6800/8800, che assegna i risultati dei test come “Target not detected” (target non rilevato), “BKV DNA detected < LLoQ” (rilevato DNA di BKV al di sotto del limite inferiore di quantificazione), “BKV DNA detected > ULoQ” (rilevato DNA di BKV al di sopra del limite superiore di quantificazione) o un valore compreso nell'intervallo lineare “LLoQ <  $x$  < ULoQ”. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

Gli acidi nucleici ottenuti dai campioni dei pazienti e le molecole aggiunte di DNA-QS del lambda vengono estratti simultaneamente. In sintesi, l'acido nucleico virale viene liberato aggiungendo nel campione la proteinasi e il reagente di lisi. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro con il tampone di eluizione a temperature elevate.

È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione utilizzando un approccio virus-specifico a doppio target dalle regioni altamente conservate del BKV, localizzate nella regione dell'antigene t piccolo del BKV e nella regione VP2 del BKV. È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dello standard di quantificazione DNA-QS utilizzando dei primer forward e reverse sequenza-specifici, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con il genoma dell'BKV. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato per l'amplificazione. Le sequenze del target virale e dello standard DNA-QS vengono amplificate simultaneamente, utilizzando un profilo di amplificazione PCR universale con valori predefiniti per temperatura e numero di cicli. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).<sup>10-12</sup> L'eventuale amplicone contaminante prodotto da sessioni di PCR precedenti viene distrutto dall'enzima AmpErase, contenuto nella miscela per PCR, quando viene riscaldato nel primo passaggio del ciclo termico. Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas**® BKV contiene due sonde di rilevazione specifiche per le sequenze target di BKV e una sonda per il DNA-QS. Le sonde sono marcate con fluorocromi reporter specifici per i target, in modo da consentire la rilevazione simultanea del target BKV e del DNA-QS in due diversi canali.<sup>13,14</sup> Il segnale fluorescente delle sonde intatte è soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, la sonda ibridizza con gli stampi specifici di DNA a filamento unico e viene scissa dall'attività nucleasica in direzione 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Con ogni ciclo di PCR viene generata una quantità crescente di sonde scisse e, parallelamente, si assiste all'aumento del segnale cumulativo del fluorocromo reporter. È possibile ottenere la rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR misurando la fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati, che rappresentano rispettivamente i target virali e il DNA-QS.

## Reagenti e materiali

### Reagenti e controlli cobas® BKV

I materiali forniti per il test cobas® BKV sono elencati nella Tabella 1. I materiali necessari ma non forniti sono elencati dalla Tabella 2 alla Tabella 4 e dalla Tabella 8 alla Tabella 10.

Per informazioni sui pericoli relativi al prodotto, consultare i paragrafi **Reagenti e materiali** e **Precauzioni e requisiti per l'uso**.

**Tabella 1** cobas® BKV

cobas® BKV Conservare a 2-8°C Cassetta per 192 test (P/N 09040960190)		
Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit 192 test
<b>Soluzione proteinasi (PASE)</b>	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi, glicerolo  EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina da <i>Bacillus subtilis</i> . Può provocare una reazione allergica.	22,3 ml
<b>Standard di quantificazione DNA (DNA QS)</b>	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% Costrutto di DNA non BKV contenente una regione di legame per il primer non BKV e una regione di legame univoca per la sonda (DNA non infettivo), < 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	21,2 ml
<b>Tampone di eluizione (EB)</b>	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	21,2 ml
<b>Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)</b>	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	7,5 ml
<b>BKV Master Mix Reagente 2 (BKV MMX-R2)</b>	Tampone tricina, acetato di potassio, < 18% dimetilsolfossido, glicerolo, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream BKV, < 0,01% primer forward e reverse QS, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per BKV e per QS di BKV, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,10% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	9,7 ml

Tabella 2 cobas® EBV/BKV Control Kit

<b>cobas® EBV/BKV Control Kit</b> Conservare a 2-8°C (P/N 09040951190)			
<b>Componenti del kit</b>	<b>Ingredienti dei reagenti</b>	<b>Quantità per kit</b>	<b>Simbolo di sicurezza e avvertimento*</b>
<b>Controllo positivo basso EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C)</b>	< 0,001% DNA sintetico (plasmide) di BKV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, DNA di BKV non rilevabile con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 <p><b>AVVERTIMENTO</b></p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.</p> <p>P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato.</p> <p>55965-84-9 Massa di reazione di: metilcloroisotiazolinone 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one e metilisotiazolinone 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1).</p>
<b>Controllo positivo alto EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C)</b>	< 0,001% DNA sintetico (plasmide) di BKV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, DNA di BKV non rilevabile con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 <p><b>AVVERTIMENTO</b></p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.</p> <p>P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato.</p> <p>55965-84-9 Massa di reazione di: metilcloroisotiazolinone 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one e metilisotiazolinone 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1).</p>

\* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

\*\* Sostanza pericolosa.

09478124001-01IT

Doc Rev. 1.0

**Tabella 3** cobas® Buffer Negative Control Kit

<b>cobas® Buffer Negative Control Kit</b> Conservare a 2-8°C (P/N 09051953190)		
<b>Componenti del kit</b>	<b>Ingredienti dei reagenti</b>	<b>Quantità per kit</b>
<b>cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)</b>	Tampone Tris, < 0,1% sodio azide, EDTA, 0,002% Poly rA RNA (sintetico)	16 ml (16 × 1 ml)

## Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

**Tabella 4** Reagenti **cobas omni** per la preparazione dei campioni

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
<b>cobas omni MGP Reagent (MGP)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
<b>cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
<b>cobas omni Lysis Reagent (LYS)</b> Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) guanidina tiocianato**, 5% (p/v) polidocanolo**, 2% (p/v) ditiotreitolo**, citrato di sodio diidrato EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.	4 × 875 ml	 <p><b>PERICOLO</b></p> <p>H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. H314: Provoca gravi ustioni e lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>
<b>cobas omni Wash Reagent (WASH)</b> Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

\* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

\*\* Sostanza o miscela pericolosa.

## Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5, Tabella 6 alla Tabella 7.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sul **cobas**® 5800 System o sui **cobas**® 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 5.

**Tabella 5** Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
<b>cobas</b> ® BKV	2-8°C
<b>cobas</b> ® EBV/BKV Control Kit	2-8°C
<b>cobas</b> ® Buffer Negative Control Kit	2-8°C
<b>cobas</b> <b>omni</b> Lysis Reagent	2-8°C
<b>cobas</b> <b>omni</b> MGP Reagent	2-8°C
<b>cobas</b> <b>omni</b> Specimen Diluent	2-8°C
<b>cobas</b> <b>omni</b> Wash Reagent	15-30°C

## Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System

Dopo il caricamento sul cobas® 5800 System, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 6. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. Nella Tabella 6 vengono fornite all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per il cobas® 5800 System.

**Tabella 6** Scadenza dei reagenti sul cobas® 5800 System

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo
cobas® BKV	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni**
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 36 giorni**
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 36 giorni**
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile

\* Reagenti monouso.

\*\* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sul cobas® 5800 System.

## Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems

Dopo il caricamento sui cobas® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. I cobas® 6800/8800 Systems consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 7 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i cobas® 6800/8800 Systems.

**Tabella 7** Scadenza dei reagenti sui cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
cobas® BKV	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile <sup>a</sup>	Non applicabile	Max 10 ore
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile

<sup>a</sup> Reagenti monouso.

\* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sui cobas® 6800/8800 Systems.

## Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System

**Tabella 8** Materiali e consumabili per l'utilizzo sul **cobas® 5800 System**

<b>Materiale</b>	<b>P/N</b>
<b>cobas omni</b> Processing Plate 24	08413975001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate 24	08499853001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto	07435967001 oppure 08030073001
Provette secondarie <b>cobas omni</b> 13 × 75 (opzionali)	06438776001
<b>cobas®</b> PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
<b>cobas®</b> PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
<b>cobas®</b> PCR Media Disposable Tube Stand (opzionale)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 7001-7050*.**	03143449001
RD5 RACK - RD Standard rack 0001-0050 LR*.**	11902997001
Carrier per provette a 16 posizioni*	09224319001
Carrier per rack a 5 posizioni*	09224475001

\* Contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni.

\*\* Con i campioni raccolti nei tubi **cobas®** PCR Media, utilizzare preferibilmente i rack MPA 16 mm o i carrier per provette a 16 posizioni.

## Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems

**Tabella 9** Materiali e consumabili per l'uso sui **cobas®** 6800/8800 Systems

Materiale	P/N
<b>cobas omni</b> Processing Plate	05534917001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate	05534941001
<b>cobas omni</b> Pipette Tips	05534925001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi e Contenitore per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto e Kit cassetto	07435967001 e 07094361001 oppure 08030073001 e 08387281001
Provette secondarie <b>cobas omni</b> 13 × 75 (opzionali)	06438776001
<b>cobas®</b> PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
<b>cobas®</b> PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
<b>cobas®</b> PCR Media Disposable Tube Stand (opzionale)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 7001-7050*,**	03143449001

\* Contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni, dei rack per puntali otturati e dei vassoi portarack accettati dagli strumenti.

\*\* Per i campioni raccolti nei tubi **cobas®** PCR Media, è preferibile utilizzare il rack MPA 16 mm.

**Tabella 10** Kit per la raccolta dei campioni di urina destinati al test **cobas®** BKV

Kit di raccolta	P/N
<b>cobas®</b> PCR Urine Sample Kit	05170486190
<b>cobas®</b> PCR Media Kit	06466281190

Nota: **cobas®** PCR Urine Sample Kit è un prodotto destinato alla raccolta e al trasporto di campioni di urina. Ogni confezione di **cobas®** PCR Urine Sample Kit contiene 100 bustine **cobas®** PCR Urine Sample Packets. Ogni confezione include 1 pipetta monouso e 1 tubo **cobas®** PCR Media, contenente 4,3 ml di **cobas®** PCR Media. Il terreno di trasporto **cobas®** PCR Media consente di stabilizzare l'acido nucleico e conservare i campioni di urina.

Nel caso dei campioni di urina che devono essere inviati direttamente al laboratorio senza utilizzare il **cobas®** PCR Urine Sample Kit per la raccolta, è possibile ricorrere in alternativa al **cobas®** PCR Media Kit, contenente 100 tubi **cobas®** PCR Media (senza pipette monouso), in quanto l'urina deve essere obbligatoriamente trasferita entro 24 ore dalla raccolta.

## Strumentazione e software necessari

Il software del **cobas**® 5800 System e il pacchetto di analisi **cobas**® BKV per il **cobas**® 5800 System devono essere installati sugli strumenti **cobas**® 5800. Il software Data Manager e il PC per il **cobas**® 5800 System verranno forniti con il sistema.

Il software **cobas**® 6800/8800 e il pacchetto di analisi **cobas**® BKV devono essere installati sugli strumenti. Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

**Tabella 11** Strumentazione

<b>Apparecchiatura</b>	<b>P/N</b>
<b>cobas</b> ® 5800 System	08707464001
<b>cobas</b> ® 6800 System (opzione mobile)	05524245001 e 06379672001
<b>cobas</b> ® 6800 System (fisso)	05524245001 e 06379664001
<b>cobas</b> ® 8800 System	05412722001
Modulo di inserimento dei campioni	06301037001

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Utente o le Guide per l'utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Nota: contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato delle provette campione primarie e secondarie, dei rack per campioni, dei rack per puntali otturati e dei vassoi portarack accettati sugli strumenti.

Il test **cobas**® BKV accetta il tubo primario utilizzato per i tipi di campioni di urina raccolti in **cobas**® PCR Media.

# Precauzioni e requisiti per l'uso

## Avvertimenti e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas®** BKV non è approvato per l'uso come test di screening per la presenza di BKV in sangue ed emoderivati.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone procedure di laboratorio descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>15, 16</sup> Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas®** BKV e dei **cobas®** 5800/6800/8800 Systems.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfettare immediatamente l'area con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6% in acqua distillata o deionizzata (diluire la candeggina per uso domestico 1:10) oppure seguire le procedure previste dal proprio laboratorio.
- Il prodotto **cobas®** EBV/BKV Control Kit contiene plasma derivato da sangue umano. Il materiale di origine è stato analizzato con metodiche PCR e non conteneva tracce apprezzabili di bassi livelli di DNA di BKV. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- **Non congelare il sangue intero o i campioni di urina conservati nei tubi primari.**
- Per garantire prestazioni ottimali del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.
- Il terreno di trasporto **cobas®** PCR Media (nel tubo primario) contiene cloridrato di guanidina. **Impedire il contatto diretto tra il cloridrato di guanidina e l'ipoclorito di sodio (candeggina) o altri reagenti fortemente reattivi, ad esempio acidi o basici. Queste miscele possono rilasciare un gas nocivo.** In caso di fuoriuscita di liquido contenente cloridrato di guanidina, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene potenziali agenti infettivi, **PRIMA** pulire la superficie interessata con l'acqua e un detergente da laboratorio, quindi usare ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6%.
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale.

## Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover dei campioni e dei controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il **cobas omni** Lysis Reagent contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- I kit **cobas**® BKV Test, **cobas omni** MGP Reagent e **cobas omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Evitare che il **cobas omni** Lysis Reagent, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione tiocianato di guanidinio di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

## Buone pratiche di laboratorio

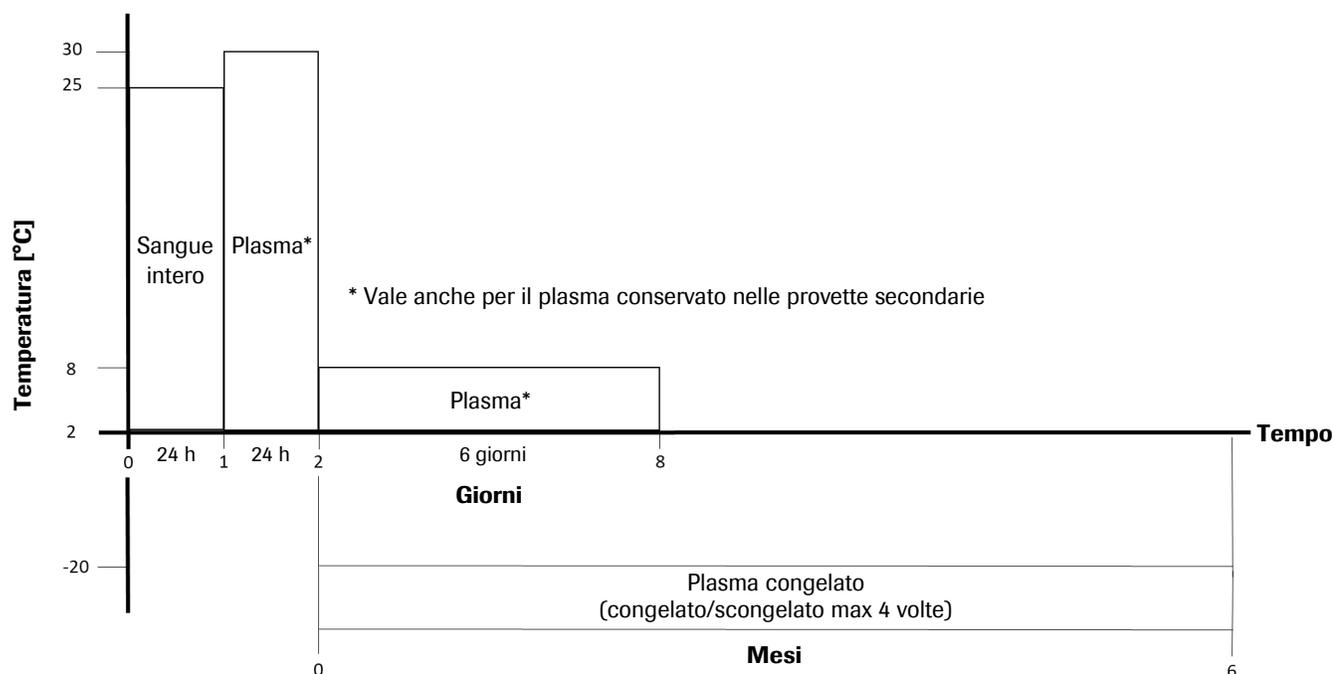
- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit. Per prevenire eventuali contaminazioni, è necessario sostituire i guanti quando si manipolano i campioni, i kit del test **cobas**® BKV, i controlli EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+))C ed EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C, il controllo negativo **cobas**® Buffer Negative Control Kit e i reagenti **cobas omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di versamenti di liquidi sullo strumento **cobas**® 5800 o **cobas**® 6800/8800, attenersi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei **cobas**® 5800 o **cobas**® 6800/8800 Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento (o degli strumenti).

## Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

**Nota: manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.**

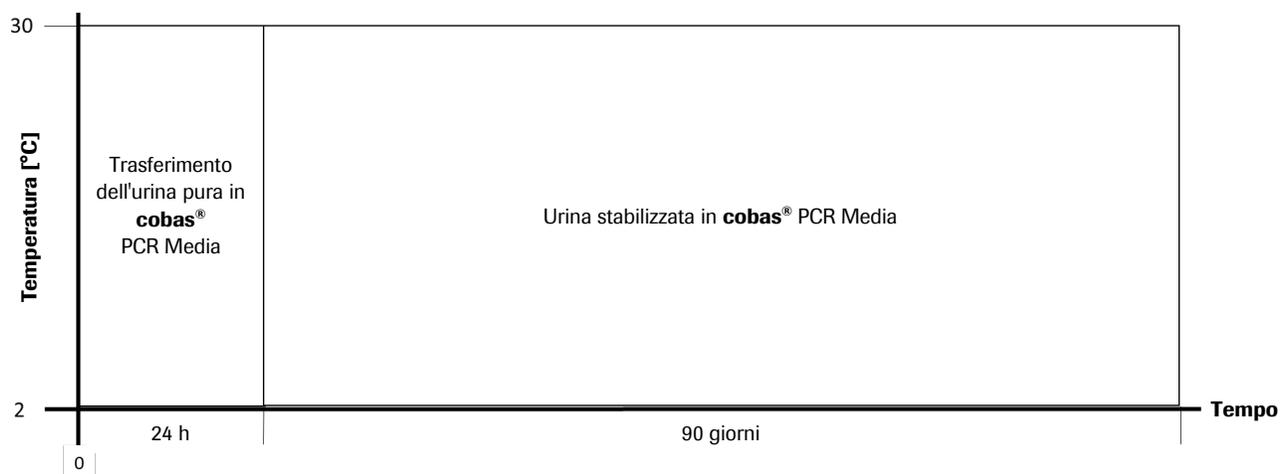
### Campioni di plasma EDTA

- Conservare tutti i campioni alle temperature indicate. La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.
- Se si utilizzano campioni congelati nelle provette secondarie, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi miscelare brevemente (ad esempio, in vortex per 3-5 secondi) e centrifugare in modo da raccogliere tutto il volume del campione sul fondo della provetta.
- Raccogliere il sangue intero nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare, oppure in provette sterili con l'anticoagulante EDTA. Attenersi alle istruzioni fornite dal produttore delle provette. Vedere la Figura 1.
- Il sangue intero raccolto nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare oppure nelle provette sterili con l'anticoagulante EDTA può essere conservato e/o trasportato fino a 24 ore a 2-25°C prima della preparazione del plasma. Per la centrifugazione, seguire le istruzioni fornite dal produttore.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma possono essere conservati nei contenitori per campioni primari o secondari a 2-30°C per 24 ore e successivamente:
  - Conservazione nei contenitori per campioni primari o secondari a 2-8°C per un massimo di 6 giorni.
  - Conservazione nelle provette secondarie a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  per un massimo di 6 mesi.
- I campioni di plasma sono stabili per un massimo di quattro cicli di congelamento/scongelamento quando sono congelati a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .
- Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

**Figura 1** Condizioni di conservazione dei campioni di plasma EDTA

## Campioni di urina

- Per raccogliere e stabilizzare i campioni di urina destinati al test **cobas®** BKV, utilizzare esclusivamente il **cobas®** PCR Urine Sample Kit. Il test **cobas®** BKV non è stato validato per l'uso con altri tipi di dispositivi o terreni di raccolta dell'urina. L'uso del test **cobas®** BKV con altri dispositivi o terreni di raccolta dell'urina potrebbe causare risultati falsi negativi, falsi positivi e/o non validi.
- I campioni di urina devono essere trasferiti (stabilizzati) immediatamente nel tubo **cobas®** PCR Media. Qualora non fosse possibile trasferire i campioni immediatamente, conservarli a una temperatura compresa tra 2°C e 30°C per non più di 24 ore.  
Dopo la stabilizzazione in **cobas®** PCR Media, i campioni di urina possono essere conservati per un massimo di 90 giorni a 2-30°C. Vedere la Figura 2.
- Il livello di liquido dei campioni di urina non analizzati deve essere compreso tra le due linee nere visibili sulla finestrella del tubo **cobas®** PCR Media. Se il livello di liquido è al di sopra o al di sotto di queste linee, significa che il campione non è stato raccolto correttamente e non può essere utilizzato per il test.
- Se il volume di urina disponibile non è sufficiente (4,3 ml) per eseguire la diluizione nella provetta campione **cobas®** PCR Urine, è possibile diluire l'urina manualmente con **cobas®** PCR Media. Prima di eseguire il test **cobas®** BKV, è necessario diluire manualmente almeno 0,5 ml di urina pura in **cobas®** PCR Media (rapporto 1:1).
- Per evitare la contaminazione crociata dei campioni, dopo aver eseguito il test richiudere i tubi **cobas®** PCR Media con tappi di un colore alternativo (neutro; vedere **Materiali aggiuntivi necessari**).
- Se occorre eseguire ulteriori test, verificare che il tubo **cobas®** PCR Media contenga ancora almeno 1,2 ml di campione.
- Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

**Figura 2** Condizioni di conservazione dei campioni di urina

# Istruzioni per l'uso

## Note sulla procedura

- Non utilizzare i reagenti **cobas**® BKV, il **cobas**® EBV/BKV Control Kit, il **cobas**® Buffer Negative Control Kit o i reagenti **cobas** **omni** dopo la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Assicurarsi che le etichette barcode delle provette campione siano ben visibili attraverso le aperture laterali sui rack per campioni RD5 o MPA. Per le esatte specifiche dei barcode e per maggiori informazioni sul caricamento delle provette campione, consultare la Guida Utente **cobas**® 5800 System o **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare l'Assistenza Utente e/o la Guida Utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

## Esecuzione del test **cobas**® BKV sul **cobas**® 5800 System

È possibile eseguire il test **cobas**® BKV con un volume di campione minimo di 375 µl per il plasma EDTA (flusso di lavoro con 200 µl di campione) e di 575 µl per l'urina stabilizzata (flusso di lavoro con 400 µl di campione). La procedura del test è descritta dettagliatamente nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei **cobas**® 5800 Systems. Nella

Figura 3 sottostante è riassunta la procedura.

- Per il trattamento sul **cobas**® 5800 System, i campioni devono essere stappati e caricati direttamente sui rack.
- Una seduta singola può includere una combinazione di campioni (plasma, urina stabilizzata).

Per trattare i campioni di plasma EDTA e di urina stabilizzata, selezionare il tipo di campione appropriato nell'interfaccia utente del test **cobas**® BKV (vedere la descrizione nella Figura 3, passaggio 2).

**Figura 3** Procedura del test **cobas®** BKV sul **cobas®** 5800 System

<b>1</b>	Eseguire la procedura di accesso al sistema Premere Avvio per preparare il sistema
<b>2</b>	Caricare i campioni sul sistema: <ul style="list-style-type: none"><li>• Caricare i rack per campioni sul sistema</li><li>• Il sistema si prepara automaticamente</li><li>• Ordinare i test<ul style="list-style-type: none"><li>○ Selezionare “Plasma” per creare un ordine per i campioni di plasma EDTA</li><li>○ Selezionare “Urine” per creare un ordine per i campioni di urina raccolti in <b>cobas®</b> PCR Media<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Stappare la provetta</li><li>▪ Trasferire la provetta direttamente nel rack</li></ul></li></ul></li></ul>
<b>3</b>	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: <ul style="list-style-type: none"><li>• Caricare le cassette dei reagenti specifici per il test</li><li>• Caricare i minirack per i controlli</li><li>• Caricare i puntali di estrazione</li><li>• Caricare i puntali di eluizione</li><li>• Caricare le piastre di estrazione</li><li>• Caricare le piastre per rifiuti liquidi</li><li>• Caricare le piastre di amplificazione</li><li>• Caricare la cassetta MGP</li><li>• Ricaricare il diluente per campioni</li><li>• Ricaricare il reagente di lisi</li><li>• Ricaricare il reagente di lavaggio</li></ul>
<b>4</b>	Avviare la seduta selezionando il pulsante Start processing nell'interfaccia utente; tutte le sedute successive si avvieranno automaticamente, a meno che non vengano posticipate manualmente
<b>5</b>	Rivedere ed esportare i risultati
<b>6</b>	Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento: <ul style="list-style-type: none"><li>• Scaricare i minirack per i controlli vuoti</li><li>• Scaricare le cassette dei reagenti specifici per il test</li><li>• Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione</li><li>• Svuotare i rifiuti liquidi</li><li>• Svuotare i rifiuti solidi</li></ul>

## Esecuzione del test cobas® BKV sui cobas® 6800/8800 Systems

È possibile eseguire il test **cobas®** BKV con un volume di campione minimo di 375 µl per il plasma EDTA (flusso di lavoro con 200 µl di campione) e di 575 µl per l'urina stabilizzata (flusso di lavoro con 400 µl di campione). La procedura del test sullo strumento è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei **cobas®** 6800/8800 Systems. La procedura è riassunta nella Figura 4.

- Per il trattamento sui **cobas®** 6800/8800 Systems, i campioni devono essere stappati e caricati direttamente sui rack.
- Una seduta singola può includere una combinazione di campioni (plasma, urina stabilizzata).
- Per trattare i campioni di plasma EDTA e di urina stabilizzata, selezionare il tipo di campione appropriato nell'interfaccia utente del test **cobas®** BKV (vedere la descrizione nella Figura 4, passaggio 1).

**Figura 4** Procedura del test **cobas®** BKV sui **cobas®** 6800/8800 Systems

<b>1</b>	<p>Eeguire la procedura di accesso al sistema Premere Avvio per preparare il sistema Ordinare i test:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Selezionare "Plasma" per creare un ordine per i campioni di plasma EDTA</li> <li>• Selezionare "Urine" per creare un ordine per i campioni di urina raccolti in <b>cobas®</b> PCR Media</li> </ul>
<b>2</b>	<p>Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caricare la cassetta dei reagenti specifici per il test</li> <li>• Caricare le cassette dei controlli</li> <li>• Caricare i puntali di pipettamento</li> <li>• Caricare le piastre di estrazione</li> <li>• Caricare il reagente MGP</li> <li>• Caricare le piastre di amplificazione</li> <li>• Ricaricare il diluente per campioni</li> <li>• Ricaricare il reagente di lisi</li> <li>• Ricaricare il reagente di lavaggio</li> </ul>
<b>3</b>	<p>Caricare i campioni sul sistema:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per i campioni primari di urina raccolti in <b>cobas®</b> PCR Media <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Stappare la provetta</li> <li>◦ Trasferire la provetta direttamente nel rack</li> </ul> </li> <li>• Caricare il rack per campioni e i rack per puntali otturati sullo stesso modulo di inserimento dei campioni</li> <li>• Confermare che i campioni sono stati accettati dal modulo di trasferimento</li> </ul>
<b>4</b>	<p>Per avviare la seduta, scegliere il pulsante Avvio manuale nell'interfaccia utente o attendere l'avvio automatico dopo 120 minuti o se il batch è al completo</p>
<b>5</b>	<p>Rivedere ed esportare i risultati</p>
<b>6</b>	<p>Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Scaricare le cassette dei controlli vuote</li> <li>• Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione</li> <li>• Svuotare i rifiuti liquidi</li> <li>• Svuotare i rifiuti solidi</li> </ul>

## Risultati

I **cobas**® 5800/6800/8800 Systems rilevano automaticamente la concentrazione del DNA di BKV per i campioni e i controlli. La concentrazione del DNA di BKV si esprime in unità internazionali per millilitro (UI/ml).

### Controllo di qualità e validità dei risultati sul **cobas**® 5800 System

- In ogni batch vengono eseguiti un controllo negativo [(-) Ctrl] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [EBV/BKV L(+)C] e un controllo positivo alto [EBV/BKV H(+)C]. Ciò avviene almeno ogni 72 ore e per ogni nuovo lotto del kit. È possibile aumentare la frequenza con cui sono programmati i controlli positivi e/o negativi in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali.
- Per verificare la validità dei risultati, controllare se nel **cobas**® 5800 software e/o nel report sono presenti flag con risultati associati.

Il **cobas**® 5800 software considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento del controllo negativo o dei controlli positivi.

**NOTA:** il **cobas**® 5800 System è preimpostato in modo che venga eseguita una serie di controlli (positivi e negativi) con ogni seduta; tuttavia è possibile configurare una frequenza inferiore, fino a 72 ore, in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali. Per maggiori informazioni, rivolgersi ad un tecnico Roche e/o all'assistenza clienti Roche.

### Risultati dei controlli sul **cobas**® 5800 System

I risultati dei controlli sono visualizzati nell'app “Controls” del software **cobas**® 5800.

- I controlli sono contrassegnati come “validi” nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono validi. I controlli sono contrassegnati come “non validi” nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono non validi.
- Ai controlli “non validi” viene associato un avviso nella colonna degli avvisi. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui il controllo è contrassegnato come non valido e vengono mostrati gli eventuali avvisi.
- Se uno dei controlli non è valido, è necessario analizzare di nuovo tutti i controlli e tutti i campioni associati.

### Controllo di qualità e validità dei risultati sui **cobas**® 6800/8800 Systems

- In ogni batch vengono inclusi un controllo negativo [(-) Ctrl] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [EBV/BKV L(+)C] e un controllo positivo alto [EBV/BKV H(+)C].
- Nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report verificare se sono presenti flag e risultati ad essi associati per confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non viene generato nessun flag per i tre controlli, che includono un controllo negativo e due controlli positivi: EBV/BKV L(+)C, EBV/BKV H(+)C. Il risultato del controllo negativo è visualizzato come (-) Ctrl e i controlli positivi alto e basso sono visualizzati come EBV/BKV L(+)C e EBV/BKV H(+)C.

Il software **cobas**® 6800/8800 considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento dei controlli negativo e positivo.

## Flag dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems

**Tabella 12** Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Flag	Risultato	Interpretazione
(-) Ctrl	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo negativo non è negativo.
Controllo positivo	Flag	Risultato	Interpretazione
EBV/BKV L(+ )C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo basso non rientra nell'intervallo assegnato.
EBV/BKV H(+ )C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo alto non rientra nell'intervallo assegnato.

Se il batch di controllo non è valido, ripetere il test su tutti i campioni del batch interessato.

## Interpretazione dei risultati

Nel caso di un batch valido, verificare nel software **cobas® 5800 System** e **cobas® 6800/8800 Systems** e/o nei report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- Un batch valido può includere risultati dei campioni validi e non validi.

**Tabella 13** Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati	Interpretazione
Target Not Detected	DNA di BKV non rilevato. Segnalare i risultati nel report come "BKV non rilevato".
< Titer Min <sup>a</sup>	Il titolo calcolato è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "BKV rilevato, minore di (Titer Min)". Valore "Titer Min" del plasma EDTA = 21,5 UI/ml Valore "Titer Min" dell'urina = 200 UI/ml
Titer	Il titolo calcolato rientra nell'intervallo lineare del saggio: maggiore o uguale al valore "Titer Min" e minore o uguale al valore "Titer Max". Segnalare i risultati nel report come "(Titolo) di BKV rilevato".
> Titer Max <sup>b</sup>	Il titolo calcolato è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "BKV rilevato, maggiore di (Titer Max)". Valore "Titer Max" di plasma EDTA e urina = 1,0E+08 UI/ml

<sup>a</sup> I risultati dei campioni "< Titer Min" (Target rilevato < LLoQ) devono essere interpretati nel contesto di altri dati clinici e non dovrebbero essere l'unico elemento su cui basare decisioni terapeutiche.

<sup>b</sup> Se il risultato del campione è "> Titer Max", si riferisce ai campioni BKV-positivi con titoli al di sopra del limite di quantificazione superiore (ULoQ). Se si desidera ottenere un risultato quantitativo per i campioni di plasma EDTA, è necessario diluire il campione originale con plasma EDTA umano BKV-negativo e ripetere il test. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

## Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System

I risultati dei campioni sono visualizzati nell'app "Risultati" del software **cobas**® 5800.

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas**® 5800 e/o nel report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni associati a un batch di controllo valido sono mostrati come "Validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come validi nel report. I campioni associati a un batch di controllo non valido sono mostrati come "Non validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come non validi nel report.
- Se i controlli associati di un risultato campione sono non validi, verrà aggiunto un flag specifico al risultato campione nel modo seguente:
  - Q05D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo positivo non valido
  - Q06D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo negativo non valido
- I valori nella colonna "Risultati" relativi ai singoli risultati dei target dei campioni devono essere interpretati nel modo indicato nella Tabella 13.

Se uno o più target dei campioni sono contrassegnati con "Non valido", il software **cobas**® 5800 mostra un flag nella colonna "Flag". Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui i target dei campioni sono contrassegnati come non validi e vengono mostrati gli eventuali avvisi.

## Interpretazione dei risultati sui cobas® 6800/8800 Systems

Se un batch è valido, verificare nel software dei **cobas**® 6800/8800 Systems e/o nel report se sono presenti flag per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni sono contrassegnati con "Yes" nella colonna "Valido" se tutti i target richiesti hanno generato risultati validi. I campioni contrassegnati con "No" nella colonna "Valido" potrebbero necessitare di ulteriore interpretazione e altri interventi.
- I valori per ogni risultato target del campione dovrebbero essere interpretati secondo le informazioni riportate nella precedente Tabella 13.

## Limiti della procedura

- Il test **cobas**® BKV è stato valutato soltanto in associazione con i prodotti **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, **cobas** **omni** MGP Reagent, **cobas** **omni** Lysis Reagent, **cobas** **omni** Specimen Diluent e **cobas** **omni** Wash Reagent per l'uso sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- Questo test è stato validato esclusivamente per l'uso con campioni di plasma EDTA e di urina stabilizzata. L'uso di altri tipi di campioni con il test **cobas**® BKV può generare imprecisioni nei risultati. Non è possibile fare un confronto diretto dei livelli di misurazione del DNA nel plasma e nell'urina, né rispetto ad altri tipi di campioni.
- La quantificazione del DNA di BKV può essere influenzata dai metodi di raccolta dei campioni, da fattori legati al paziente (ad esempio età, presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
- La degradazione del DNA di BKV nell'urina pura può influenzare la quantificazione.<sup>17</sup> Il trasferimento dell'urina in **cobas**® PCR Media è indispensabile per stabilizzare il campione.
- La variabilità quantitativa del DNA di BKV nell'urina è stata osservata in diversi esperimenti sulla stabilità dei campioni, che sono stati svolti in momenti diversi (urina pura) o con diverse aliquote dello stesso campione (urina pura e urina stabilizzata in **cobas**® PCR Media).
- Alla luce di questi limiti, i risultati del DNA di BKV ottenuti dall'urina devono essere interpretati con cautela, nel contesto di riscontri clinici e altri risultati di laboratorio, ma non possono essere utilizzati da soli per decisioni terapeutiche.
- L'urina potrebbe contenere livelli elevati di DNA di BKV, con il rischio di contaminazioni dovute a carry-over.<sup>18</sup>
- Come accade con tutti i test molecolari, le mutazioni comprese nelle regioni target del test **cobas**® BKV potrebbero alterare il legame del primer e/o della sonda, causando una quantificazione per difetto del virus o la mancata rilevazione della presenza del virus.
- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, si consiglia agli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, di svolgere uno studio sulla correlazione tra i metodi nel proprio laboratorio, così da qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test **cobas**® BKV non è destinato all'uso per lo screening per la presenza di BKV nel sangue e negli emoderivati.

## Valutazione delle prestazioni non cliniche

### Caratteristiche chiave delle prestazioni con il tipo di campione plasma EDTA sui cobas® 6800/8800 Systems

#### Limite di sensibilità (LoD) Standard Internazionale OMS

Il limite di sensibilità del test cobas® BKV per lo Standard Internazionale OMS è stato determinato analizzando le diluizioni seriali del 1° Standard Internazionale OMS per il virus BKV (codice NIBSC: 14/212) in plasma EDTA umano BKV-negativo. I pannelli, costituiti da sei livelli di concentrazione più un bianco, sono stati analizzati utilizzando tre lotti di reagenti cobas® BKV in più sedute, su più giorni, da più operatori e su più strumenti.

I risultati ottenuti con il plasma EDTA sono illustrati dalla Tabella 14 fino alla Tabella 16. Lo studio dimostra che, con il lotto meno sensibile, la concentrazione alla quale è atteso un tasso di successo del 95% in base all'analisi PROBIT è di 21,5 UI/ml, con un intervallo di confidenza al 95% tra 16,3 e 32,4 UI/ml, in plasma EDTA. La concentrazione più bassa con un tasso di successo  $\geq 95\%$  è di 19,0 UI/ml in plasma EDTA.

**Tabella 14** Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 1

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	21,5 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 16,3-32,4 UI/ml		

**Tabella 15** Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 2

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	19,7 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 15,0-29,2 UI/ml		

**Tabella 16** Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 3

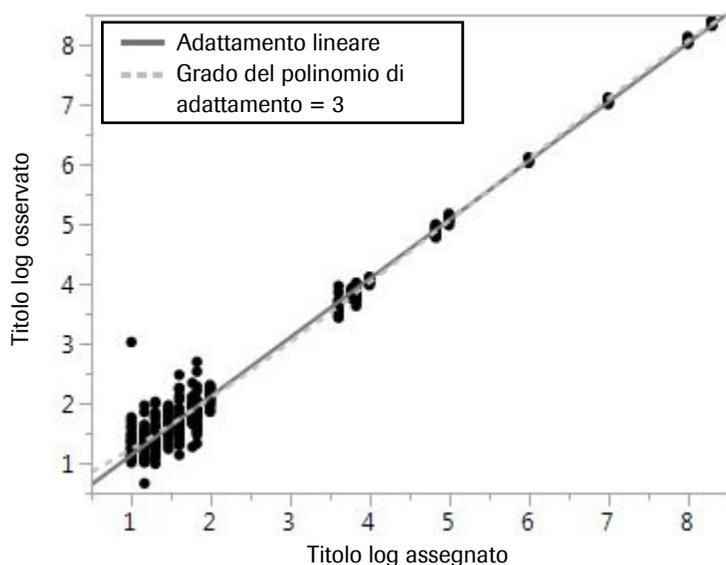
Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	19,3 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 14,8-28,5 UI/ml		

## Intervallo lineare

La linearità del test **cobas**® BKV è stata valutata utilizzando una serie di diluizioni costituita da un pannello di 18 componenti, con DNA di BKV del sottogruppo Ib, distribuiti lungo l'intero intervallo lineare del test. Per preparare 11 componenti del pannello distribuiti lungo l'intero intervallo lineare è stato utilizzato uno stock di DNA lambda con titolo alto. Per preparare 7 componenti del pannello distribuiti nei livelli intermedi e bassi dell'intervallo lineare è stato utilizzato un campione clinico.

Ogni campione del pannello è stato analizzato in 36 ripetizioni con tre lotti di reagenti del **cobas**® BKV; i risultati dello studio sono illustrati nella Figura 5.

I dati dimostrano che il test **cobas**® BKV è lineare nell'intervallo tra 1,01E+01 e 1,97E+08 UI/ml, con una deviazione assoluta dalla regressione non lineare di migliore adattamento minore o uguale a  $\pm 0,1 \log_{10}$  in plasma EDTA umano (vedere la Figura 5). Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro  $\pm 0,2 \log_{10}$ .

**Figura 5** Determinazione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA

## Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas**® BKV è stata determinata analizzando le diluizioni seriali del DNA di BKV (sottogruppo Ib) con titolo alto in plasma EDTA BKV-negativo. Sono stati analizzati 5 livelli di diluizione in 72 ripetizioni per ogni livello, utilizzando tre lotti di reagenti **cobas**® BKV, quattro strumenti e due operatori nell'arco di 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® BKV, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati nella Tabella 17.

Il test **cobas**® BKV ha dimostrato un'elevata precisione per i tre lotti di reagenti utilizzati su un intervallo di concentrazioni compreso tra  $9,83E+01$  UI/ml e  $9,83E+05$  UI/ml.

**Tabella 17** Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® BKV\*

Concentrazione nominale [UI/ml]	Concentrazione assegnata [UI/ml]	Plasma EDTA			
		Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
		DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

\* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione  $\log_{10}$ . Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

## Verifica del sottotipo

Le prestazioni del test **cobas**® BKV con il virus BKV, sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV sono state valutate con i seguenti metodi:

- Verifica del limite di sensibilità
- Verifica dell'intervallo lineare

### Verifica del limite di sensibilità per i sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV

Il DNA di BKV per i 5 diversi sottotipi/sottogruppi (Ia, Ic, II, III e IV) è stato diluito fino a tre livelli di concentrazione diversi in plasma EDTA umano BKV-negativo. Il calcolo del tasso di successo è stato effettuato con 63 ripetizioni per ogni livello. I test sono stati eseguiti con tre lotti di reagenti **cobas**® BKV in più sedute e giorni, da più operatori e strumenti. Questi risultati confermano che il test **cobas**® BKV ha rilevato il DNA di BKV per 5 diversi sottotipi/sottogruppi a concentrazioni di 21,5 UI/ml con un tasso di successo  $\geq 95\%$ .

### Verifica dell'intervallo lineare per i sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV

La serie di diluizioni utilizzata per verificare lo studio di linearità sui sottotipi/sottogruppi per il test **cobas**® BKV è costituita da un pannello di 8 componenti, distribuiti lungo l'intervallo lineare del saggio. Per i test sono stati utilizzati tre lotti di reagenti **cobas**® BKV. Sono state eseguite 12 ripetizioni per livello nel plasma EDTA.

L'intervallo lineare del test **cobas**® BKV è stato verificato per tutti i 5 sottotipi/sottogruppi (Ia, Ic, II, III e IV).

## Specificità

La specificità del test **cobas**® BKV è stata determinata analizzando campioni di plasma EDTA BKV-negativo appartenenti a singoli donatori. Sono stati analizzati 104 campioni individuali di plasma EDTA con tre lotti di reagenti **cobas**® BKV. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per il DNA di BKV. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas**® BKV è stata del 100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale inferiore: 97,16%).

## Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® BKV è stata valutata analizzando un pannello di microorganismi a una concentrazione di 1,00E+06 unità/ml (CFU/ml, cellule/ml, CCU/ml, IFU/ml) per i batteri e i lieviti e a concentrazioni comprese tra 1,00E+05 unità/ml e 1,00E+06 unità/ml (copie/ml, TCID<sub>50</sub>/ml, UI/ml, cellule/ml) per i virus. I microorganismi sono stati diluiti in plasma EDTA umano negativo per il DNA di BKV e in plasma EDTA umano contenente DNA di BKV (100 UI/ml). Gli organismi analizzati sono elencati in modo dettagliato nella Tabella 18. Il test è stato ripetuto tre volte per ogni campione. Nessuno dei patogeni non BKV ha interferito con le prestazioni del test alle concentrazioni analizzate. Il test **cobas**® BKV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni contenenti i microrganismi ma non il target BKV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni contenenti sia i microrganismi che il target BKV. Inoltre, per ognuno dei campioni BKV-positivi contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo log<sub>10</sub> si è attestata entro  $\pm 0,5$  log<sub>10</sub> della media del titolo log<sub>10</sub> del rispettivo controllo spike positivo.

**Tabella 18** Microrganismi analizzati ai fini della reattività crociata

<b>Virus</b>	<b>Batteri</b>	<b>Lieviti</b>
Adenovirus tipo 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Citomegalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Virus di Epstein Barr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus dell'epatite B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Virus dell'epatite C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Virus dell'herpes simplex tipo 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Virus dell'herpes simplex tipo 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Virus dell'immunodeficienza umana 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Virus dell'immunodeficienza umana 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Papillomavirus umano	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Virus di JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Simian virus 40	-	-
Virus Varicella-Zoster	-	-

## Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni con livelli elevati di trigliceridi (fino a 33 g/l), bilirubina coniugata (0,2 g/l), bilirubina non coniugata (0,2 g/l), albumina (60 g/l), emoglobina (2 g/l) e DNA umano (2 mg/l), sia con DNA di BKV (100 UI/ml) che senza. Le sostanze interferenti endogene che sono state analizzate non hanno interferito con le prestazioni del test **cobas® BKV**.

Inoltre sono stati analizzati i composti farmacologici elencati nella Tabella 19, ad una concentrazione pari a tre volte il valore  $C_{max}$  sia con DNA di BKV che senza.

Nessuna delle potenziali sostanze interferenti ha alterato in alcun modo le prestazioni del test. Il test **cobas® BKV** ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni in cui era assente il target BKV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni in cui era presente il target BKV. Inoltre, per ognuno dei campioni BKV-positivi contenenti potenziali sostanze interferenti, la media del titolo  $\log_{10}$  si è attestata entro  $\pm 0,5 \log_{10}$  rispetto alla media del titolo  $\log_{10}$  del rispettivo controllo spike positivo.

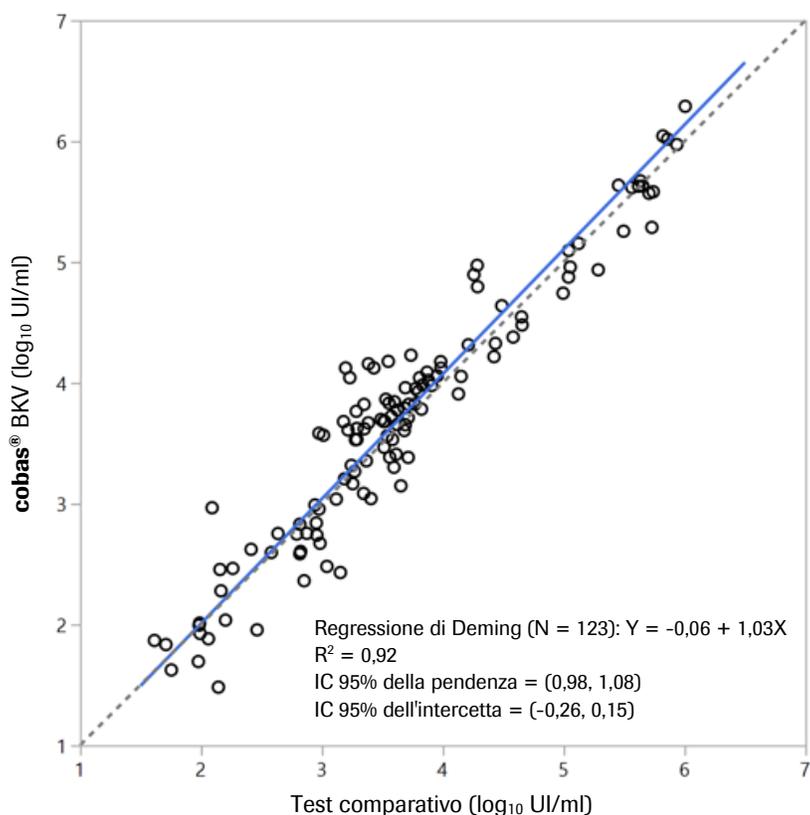
**Tabella 19** Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con il test **cobas® BKV** ai fini della quantificazione del DNA di BKV

Categoria farmacologica	Nome generico del farmaco	
Antibatterico	Cefotetan	Sulfametossazolo
	Clavulanato di potassio	Ticarcillina disodica
	Fluconazolo	Trimetoprima
	Piperacillina	Vancomicina
	Tazobactam sodico	Micafungin
Composti per il trattamento dei virus dell'herpes	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Immunosoppressori	Azatioprina	Prednisone
	Ciclosporina	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Micofenolato mofetile	Acido micofenolico

## Correlazione tra i metodi

Le prestazioni del test **cobas® BKV** sono state valutate rispetto a un test comparativo, analizzando alcuni campioni di plasma EDTA ottenuti da pazienti infetti da BKV. I campioni di plasma EDTA i cui valori rientravano nell'intervallo di quantificazione di entrambi i test sono stati analizzati con un'unica ripetizione. È stata applicata l'analisi di regressione di Deming.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 6.

**Figura 6** Analisi di regressione del test **cobas®** BKV rispetto al test comparativo

## Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas®** BKV è stato calcolato eseguendo 100 ripetizioni del test su campioni di plasma EDTA arricchiti con un campione clinico BKV-positivo. Questi campioni sono stati analizzati a una concentrazione tripla rispetto al limite di sensibilità ( $3 \times \text{LoD}$ ).

Questo studio dimostra che tutte le ripetizioni sono risultate valide e positive per il target BKV e hanno prodotto un tasso globale d'errore del sistema dello 0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale superiore: 2,95%).

## Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test **cobas®** BKV è stato determinato analizzando 240 ripetizioni di una matrice BKV-negativa e 225 ripetizioni di un campione con titolo alto di DNA di BKV, a una concentrazione di circa  $2,00E+07$  UI/ml. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni del campione negativo hanno generato risultati negativi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è dello 0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale superiore: 1,24%).

## Caratteristiche delle prestazioni chiave per il tipo di campione urina sui cobas® 6800/8800 Systems

### Limite di sensibilità (LoD) Standard Internazionale OMS

Il limite di sensibilità del test cobas® BKV per lo Standard Internazionale dell'OMS è stato determinato analizzando le diluizioni seriali del 1° Standard Internazionale dell'OMS per il virus BKV (codice NIBSC 14/212), urina in pool BKV-negativa, stabilizzata in cobas® PCR Media. I pannelli, costituiti da sei livelli di concentrazione più un bianco, sono stati analizzati utilizzando tre lotti di reagenti cobas® BKV in più sedute, su più giorni, da più operatori e su più strumenti.

I risultati per l'urina in pool, stabilizzata in cobas® PCR Media, sono riportati dalla Tabella 20 alla Tabella 22. Lo studio dimostra che, con il lotto meno sensibile, la concentrazione alla quale è atteso un tasso di successo del 95% in base all'analisi PROBIT è di 12,2 UI/ml, con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 9,2 e 18,3 UI/ml, in urina pura. La concentrazione più bassa con un tasso di successo  $\geq 95\%$  è di 10,0 UI/ml in urina pura.

**Tabella 20** Limite di sensibilità per l'urina, lotto 1

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	12,2 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 9,2-18,3 UI/ml		

**Tabella 21** Limite di sensibilità per l'urina, lotto 2

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	11,9 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 9,2-17,3 UI/ml		

\* Campioni di urina stabilizzata in cobas® PCR Media che sono stati analizzati. Concentrazione iniziale del titolo che è stata utilizzata per il calcolo basato sull'urina pura.

**Tabella 22** Limite di sensibilità per l'urina, lotto 3

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di BKV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	10,1 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 7,8-14,7 UI/ml		

\* Campioni di urina stabilizzata in cobas® PCR Media che sono stati analizzati. Concentrazione iniziale del titolo che è stata utilizzata per il calcolo basato sull'urina pura.

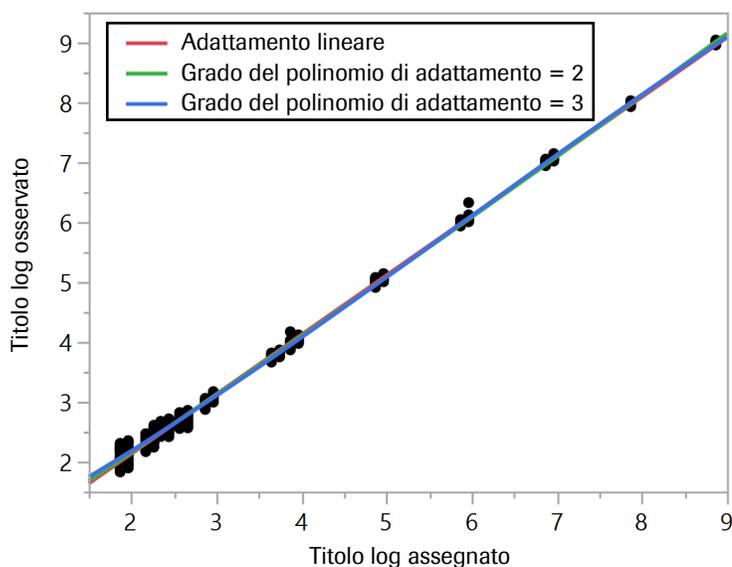
## Intervallo lineare

La linearità del test **cobas**® BKV è stata valutata con un pannello di 10 componenti ottenuti dalla diluizione seriale di un campione clinico (BKV sottogruppo Ib), distribuiti sull'intero intervallo lineare del test. Per preparare 12 componenti del pannello distribuiti lungo l'intero intervallo lineare è stato utilizzato uno stock di DNA lambda con titolo alto.

Ogni campione del pannello è stato analizzato in 36 ripetizioni con tre lotti di reagenti del **cobas**® BKV; i risultati dello studio sono illustrati nella Figura 7.

I dati dimostrano che il test **cobas**® BKV è lineare nell'intervallo compreso tra  $7,41E+01$  UI/ml e  $7,41E+08$  UI/ml e presenta una deviazione assoluta dalla regressione non lineare di migliore adattamento minore o uguale a  $\pm 0,1 \log_{10}$  nell'urina in pool stabilizzata in **cobas**® PCR Media (vedere la Figura 7). Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro  $\pm 0,2 \log_{10}$ .

**Figura 7** Determinazione dell'intervallo lineare per l'urina



## Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas**® BKV è stata determinata analizzando le diluizioni seriali del DNA di BKV (sottogruppo Ib) con titolo alto in un pool di urina BKV-negativa, stabilizzata in **cobas**® PCR Media. Sono stati analizzati 5 livelli di diluizione in 72 ripetizioni per ogni livello, utilizzando tre lotti di reagenti **cobas**® BKV, due strumenti e due operatori nell'arco di 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® BKV, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati nella Tabella 23.

Il test **cobas**® BKV ha dimostrato un'elevata precisione per i tre lotti di reagenti utilizzati su un intervallo di concentrazioni compreso tra  $7,41E+02$  UI/ml e  $7,41E+05$  UI/ml.

**Tabella 23** Precisione intra-laboratorio del test **cobas® BKV\***

Concentrazione nominale [UI/ml]	Concentrazione assegnata [UI/ml]	Urina stabilizzata in <b>cobas® PCR Media</b>			
		Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
		DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

\* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione  $\log_{10}$ . Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

## Verifica del sottotipo

Le prestazioni del test **cobas® BKV** con il virus BKV, sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV sono state valutate con i seguenti metodi:

- Verifica del limite di sensibilità
- Verifica dell'intervallo lineare

### Verifica del limite di sensibilità per i sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV

Il DNA di BKV per i 5 diversi sottotipi/sottogruppi (Ia, Ic, II, III e IV) è stato diluito fino a tre diversi livelli di concentrazione nel pool di urina BKV-negativa, stabilizzata in **cobas® PCR Media**. Il calcolo del tasso di successo è stato effettuato con 63 ripetizioni per ogni livello. I test sono stati eseguiti con tre lotti di reagenti **cobas® BKV** in più sedute e giorni, da più operatori e strumenti. Questi risultati confermano che il test **cobas® BKV** ha rilevato il DNA di BKV per 5 diversi sottotipi/sottogruppi a concentrazioni di 12,2 UI/ml con un tasso di successo  $\geq 95\%$ .

### Verifica dell'intervallo lineare per i sottotipi I (con i sottogruppi Ia e Ic), II, III e IV

La serie di diluizioni utilizzata per verificare lo studio di linearità sui sottotipi/sottogruppi per il test **cobas® BKV** è costituita da un pannello di 8 componenti, distribuiti lungo l'intervallo lineare del saggio. Per i test sono stati utilizzati tre lotti di reagenti **cobas® BKV**. Sono state eseguite 12 ripetizioni per livello nell'urina stabilizzata in **cobas® PCR Media**.

L'intervallo lineare del test **cobas® BKV** è stato verificato per tutti i 5 sottotipi/sottogruppi (Ia, Ic, II, III e IV).

## Specificità

La specificità del test **cobas® BKV** è stata determinata analizzando campioni di urina BKV-negativa, stabilizzata in **cobas® PCR Media**, ottenuti da singoli donatori. Sono stati analizzati 100 campioni individuali di urina con tre lotti di reagenti **cobas® BKV**. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per il DNA di BKV. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas® BKV** è stata del 100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale inferiore: 97,05%).

## Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® BKV è stata valutata analizzando un pannello di microorganismi a concentrazioni comprese tra 1,00E+06 unità/ml e 2,00E+06 unità/ml (CFU/ml, cellule/ml, CCU/ml, IFU/ml) per i batteri e i lieviti e a una concentrazione di 1,00E+05 unità/ml (copie/ml, TCID<sub>50</sub>/ml, UI/ml, cellule/ml) per i virus. I microorganismi sono stati diluiti in urina negativa (priva di DNA di BKV) e in urina arricchita con DNA di BKV (600 UI/ml). Gli organismi analizzati sono elencati in modo dettagliato nella Tabella 24. Il test è stato ripetuto tre volte per ogni campione. Nessuno dei patogeni non BKV ha interferito con le prestazioni del test alle concentrazioni analizzate. Il test **cobas**® BKV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni contenenti i microrganismi ma non il target BKV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni contenenti sia i microrganismi che il target BKV. Inoltre, per ognuno dei campioni BKV-positivi contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo log<sub>10</sub> si è attestata entro ±0,5 log<sub>10</sub> della media del titolo log<sub>10</sub> del rispettivo controllo spike positivo.

**Tabella 24** Microrganismi analizzati ai fini della reattività crociata

Virus	Batteri	Batteri	Lieviti
Virus dell'herpes simplex 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Papillomavirus umano 16	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida glabrata</i>
-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	-
-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
-	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus oralis/viridans</i>	-
-	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
-	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
-	<i>Lactobacillus crispus</i>	-	-
-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-
-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-
-	<i>Morganella morganii</i>	-	-

## Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni con livelli elevati di albumina (0,5% p/v), bilirubina coniugata (1% p/v), glucosio (1% p/v), cellule mononucleate di sangue periferico (1,00E+06 cellule/ml), muco (in presenza di 1 tampone di muco pari a 4,3 ml di campione), pH acido (pH 4), pH alcalino (pH 9), liquido seminale (1 tampone immerso in liquido seminale pari a 4,3 ml di campione), sodio (300 mEq/L) e sangue intero (10% v/v) sia con il DNA di BKV (600 UI/ml) che senza. Le sostanze interferenti endogene che sono state analizzate non hanno interferito con le prestazioni del test **cobas®** BKV.

Inoltre sono stati analizzati i composti farmacologici elencati nella Tabella 25, sia con il DNA di BKV che senza.

Nessuna delle potenziali sostanze interferenti, ad eccezione del talco in polvere, ha influenzato le prestazioni del test. Il talco in polvere, a una concentrazione  $\leq 0,05\%$ , non ha interferito con il test **cobas®** BKV. Il test **cobas®** BKV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni in cui era assente il target BKV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni in cui era presente il target BKV. Inoltre, per ognuno dei campioni BKV-positivi contenenti potenziali sostanze interferenti, la media del titolo  $\log_{10}$  si è attestata entro  $\pm 0,5 \log_{10}$  rispetto alla media del titolo  $\log_{10}$  del rispettivo controllo spike positivo.

**Tabella 25** Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con il test **cobas®** BKV ai fini della quantificazione del DNA di BKV

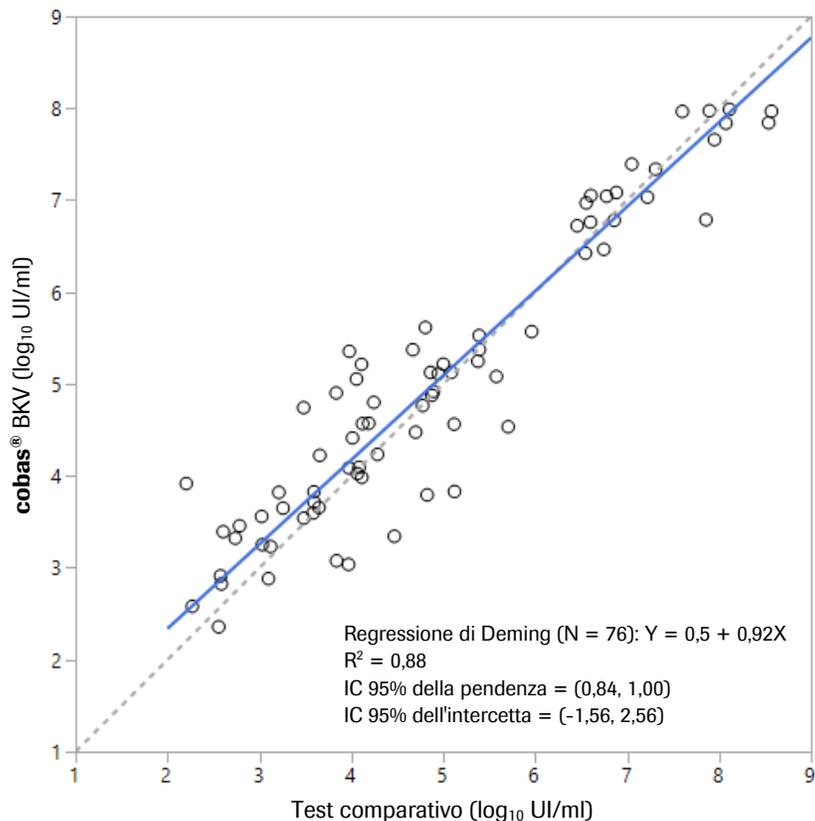
Categoria farmacologica	Principio attivo	Concentrazione	Nome generico del farmaco
Antibatterico	Clotrimazolo	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazolo	701 µmol/l	Arilin rapid Supposte vaginali Vagi Metro (crema) Nidazea Gel
Ormone steroideo estrogeno	Estradiolo	4,41 nmol/l	Estrace
Analgesico	Fenazopiridina cloridrato	200 µg/ml	Azo Standard
	Acetaminofene (paracetamolo)	1324 µmol/l	Acetaminofene (paracetamolo)
Lubrificante	Glicole propilenico	1000 µg/ml	K-Y UltraGel
Farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS)	Acido acetilsalicilico (aspirina)	3,62 mmol/l	Acido acetilsalicilico (aspirina)
	Naprossene	2170 µmol/l	Naprossene
	Ibuprofene	2425 µmol/l	Ibuprofene
Non applicabile	Talco	0,05% (p/v)	Talco in polvere

## Correlazione tra i metodi

Le prestazioni del test **cobas**® BKV sono state valutate rispetto a un test comparativo, analizzando i campioni di urina ottenuti da pazienti infetti da BKV. I campioni di urina i cui valori rientravano nell'intervallo di quantificazione di entrambi i test sono stati analizzati in singolo. È stata applicata l'analisi di regressione di Deming.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 8.

**Figura 8** Analisi di regressione del test **cobas**® BKV rispetto al test comparativo



## Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test **cobas**® BKV è stato determinato analizzando 240 ripetizioni di una matrice BKV-negativa e 225 ripetizioni di un campione con titolo alto di DNA di BKV, a una concentrazione di circa  $1,00E+09$  UI/ml. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni del campione negativo hanno generato risultati negativi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è dello 0,0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale superiore: 1,24%).

# Valutazione delle prestazioni cliniche eseguita sui cobas® 6800/8800 Systems

## Riproducibilità del test cobas® BKV per il tipo di campione plasma EDTA

La riproducibilità del test cobas® BKV è stata valutata rispetto a più fattori (lotto di reagenti, laboratorio, batch e giorni in cui vengono eseguiti i test) che potrebbero influenzare i risultati ottenuti nei test clinici di routine. La valutazione è avvenuta presso 3 laboratori, utilizzando 3 lotti di reagenti con un pannello costituito da campioni positivi e un altro pannello costituito da campioni negativi, per un totale di 270 test per livello di concentrazione (esclusi i controlli). I pannelli erano costituiti da campioni di plasma EDTA negativi per gli anticorpi VCA IgG anti-BKV, testati per la presenza del virus BKV secondo un protocollo di rilascio NAT per il plasma e arricchiti con uno standard internazionale dell'OMS per BKV, o DNA di virus BKV coltivato di genotipo Ib (il genotipo più comune). Due operatori in ogni laboratorio hanno testato ogni lotto di reagente per 5 giorni. Ogni giorno sono state eseguite due sedute (1 seduta = 1 batch; 1 batch = 1 pannello + 3 controlli), con 3 replicati di ciascun componente del pannello per ogni seduta. Per un riepilogo dei risultati della valutazione, vedere nella Tabella 26.

**Tabella 26** Percentuali attribuibili della varianza totale (%TV), deviazione standard (DS) della precisione totale e CV (%) log-normale della concentrazione di DNA di BKV ( $\log_{10}$  UI/ml) per componente del pannello positivo

Concentrazione del DNA di BKV attesa ( $\log_{10}$ UI/ml)	Concentrazione media <sup>a</sup> del DNA di BKV osservata ( $\log_{10}$ UI/ml)	Numero di test <sup>b</sup>	Lotto %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Laboratorio %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Giorno/Operatore %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Batch %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Stesso-batch %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Precisione totale DS <sup>e</sup>	CV (%) log-normale della precisione totale <sup>d</sup>
1,81	1,74	270	9% (20,63)	6% (17,69)	0% (0,00)	7% (19,15)	78% (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10% (9,79)	10% (9,57)	14% (11,44)	25% (15,16)	40% (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3% (4,42)	24% (13,46)	0% (0,00)	56% (20,58)	17% (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7% (5,66)	28% (11,50)	0% (0,00)	40% (13,85)	25% (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4% (3,27)	49% (11,00)	0% (0,00)	13% (5,60)	34% (9,10)	0,068	15,74

<sup>a</sup> Calcolata mediante la procedura SAS MIXED.

<sup>b</sup> Numero di test validi con livello di DNA rilevabile.

<sup>c</sup> %TV = Contributo alla varianza totale (%).

<sup>d</sup> CV% = coefficiente di variazione percentuale log-normale =  $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$ .

<sup>e</sup> Calcolata a partire dalla variabilità totale ottenuta con la procedura SAS MIXED.

Nota: la tabella include soltanto i risultati con DNA rilevabile. DS = deviazione standard. CV = coefficiente di variazione; BKV = virus BK.

Il test cobas® BKV presenta una riproducibilità clinica accettabile alle concentrazioni comprese nell'intero intervallo lineare. Inoltre il sistema ha rilevato il 100% dei campioni  $3 \times$  LLoQ. I cobas® 6800 e cobas® 8800 Systems hanno lo stesso design modulare e offrono prestazioni equivalenti durante l'esecuzione del test cobas® BKV. Tutti i limiti di confidenza al 95% stimati per la differenza tra 2 misurazioni dallo stesso soggetto erano compresi entro  $\pm 0,84 \log_{10}$  UI/ml. Ciò indica che il test può rilevare i cambiamenti nei livelli di DNA di BKV che sono considerati significativi dal punto di vista clinico.

Su 270 test validi per i componenti del pannello negativo, eseguiti sui **cobas**® 6800/8800 Systems, tutti i campioni hanno generato un risultato “Target Not Detected”, pertanto la concordanza percentuale negativa (CPN) è stata del 100% con IC esatto al 95% compreso fra il 98,6% e il 100%.

## Prestazioni del test **cobas**® BKV per il tipo di campione plasma EDTA

Le prestazioni cliniche del test **cobas**® BKV sono state ulteriormente valutate presso tre laboratori, attraverso la misurazione dei livelli di DNA di BKV nei campioni clinici (diluiti e non diluiti) di pazienti con e senza infezione da BKV e nei campioni di plasma EDTA preparati artificialmente e arricchiti con virus BKV coltivato. Questi risultati sono stati confrontati con quelli di un consolidato test comparativo per BKV sviluppato in laboratorio (*Laboratory Developed Test*, LDT). Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas**® BKV e con il test BKV comparativo, in totale 550 campioni (217 campioni clinici non diluiti e 303 diluiti, appartenenti a 129 soggetti trapiantati, più 30 campioni preparati artificialmente) sono risultati validi con entrambi i test e sono stati ritenuti idonei all'analisi della concordanza clinica (Tabella 27).

**Tabella 27** Analisi della concordanza tra i risultati del livello di DNA di BKV ottenuti con il test **cobas**® BKV e con il test comparativo LDT per tutti i campioni

<b>cobas</b> ® BKV (log <sub>10</sub> UI/ml)	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) Target Not Detected	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) < LLoQ (< 2,3)	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) Da 2,3 a < 3,0	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) Da 3,0 a < 3,7	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) Da 3,7 a 4,4	Test comparativo BKV LDT (log <sub>10</sub> UI/ml) > 4,4	Totale
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
Da 2,3 a < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
Da 3,0 a < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
Da 3,7 a 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Totale	130	61	85	133	70	71	550
Concordanza colonna (%)	(130/130) 100,0%	(61/61) 100,0%	(80/85) 94,1%	(133/133) 100,0%	(69/70) 98,6%	(71/71) 100,0%	-
(Punteggio IC 95%) <sup>a</sup>	(97,1%, 100%)	(94,1%, 100,0%)	(87,0%, 97,5%)	(97,2%, 100,0%)	(92,3%, 99,7%)	(94,9%, 100,0%)	-

Nota: IC = intervallo di confidenza; LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo BKV LDT (200 UI/ml = 2,3 log<sub>10</sub> UI/ml). Deviazione standard del test comparativo BKV LDT stimata a 0,37 log<sub>10</sub> UI/ml (studio sulla precisione analitica del test BKV LDT dell'Università dell'Indiana). La concentrazione dell'analita di 3,0 log<sub>10</sub> UI/ml rappresentava LLoQ + 2σ; 3,7 log<sub>10</sub> UI/ml rappresentava LLoQ + 4σ; e 4,4 log<sub>10</sub> UI/ml rappresentava LLoQ + 6σ con un intervallo di 2σ. Nella tabella sono stati inclusi i campioni appaiati idonei all'analisi della concordanza clinica.

<sup>a</sup> Indipendenza presunta tra tutti i campioni.

Sono stati considerati discordanti i risultati che si collocavano a una distanza di più di una casella dalla diagonale (indicata dall'ombreggiatura). Nella cella Colonna concordanza, sotto la colonna Target Not Detected relativa al test LDT, le celle Target Not Detected e < LLoQ (< 2,3) relative al test **cobas**® BKV sono state unite. La logica dell'unione tra le celle adiacenti < LLoQ e TND per la colonna TND è la seguente: la differenza tra un risultato TND e un risultato < LLoQ non è clinicamente rilevante, inoltre dal punto di vista analitico questi risultati sono al limite inferiore dell'intervallo di misurazione e potrebbero risentire di un errore random.

Dei 43 campioni negativi al DNA di BKV che sono stati raccolti per la stima della concordanza percentuale negativa (CPN) con il test **cobas**® BKV, tutti e 43 i campioni sono risultati negativi al test **cobas**® BKV, pertanto la CPN è stata del 100% con un IC esatto al 95% compreso fra il 91,8% e il 100%.

La concordanza tra il test **cobas**® BKV e il test comparativo BKV LDT è stata valutata anche utilizzando soglie cliniche diverse (Tabella 28).

**Tabella 28** Riepilogo della concordanza tra il test **cobas**® BKV e il test comparativo BKV LDT utilizzando soglie diverse per tutti i campioni

Soglie*	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza
	< soglia IC 95% (n/N)	≥ soglia IC 95% (n/N)
Target Not Detected	82,3% (107/130) (74,8%, 87,9%)	97,1% (408/420) (95,1%, 98,4%)
LLoQ (2,3 log <sub>10</sub> UI/ml)	98,4% (188/191) (95,5%, 99,5%)	87,7% (315/359) (83,9%, 90,7%)
3,0 log <sub>10</sub> UI/ml	99,6% (275/276) (98,0%, 99,9%)	77,0% (211/274) (71,7%, 81,6%)
4,0 log <sub>10</sub> UI/ml	100,0% (447/447) (99,1%, 100,0%)	67,0% (69/103) (57,4%, 75,3%)

Nota: i campioni con un risultato “Target Not Detected” sono stati classificati come “< valore soglia in UI/ml”.

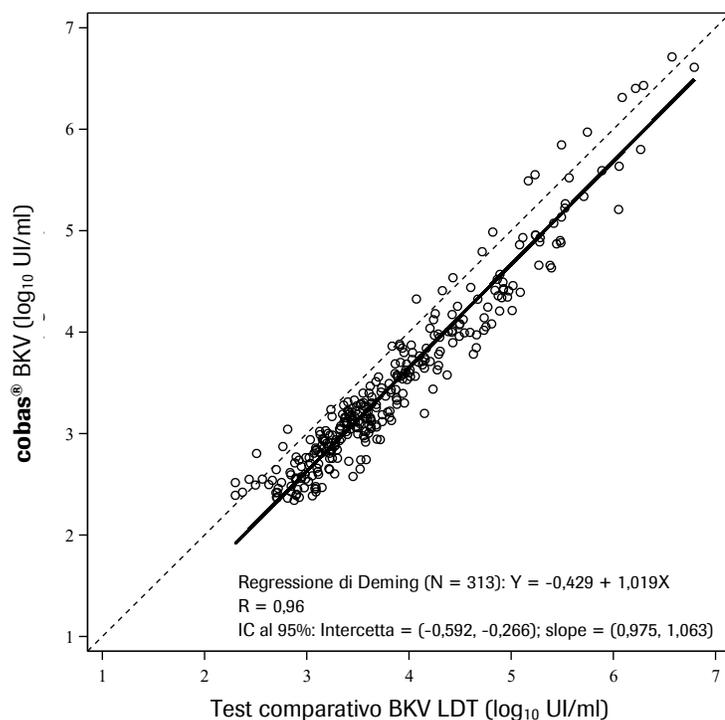
LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo BKV LDT (200 UI/ml = 2,3 log<sub>10</sub> UI/ml).

Intervallo di confidenza (IC) al 95% calcolato con l'intervallo di punteggio, presumendo l'indipendenza tra tutti i campioni.

\* Soglie di 1000 UI/ml = 3,0 log<sub>10</sub> UI/ml e 10.000 UI/ml = 4,0 log<sub>10</sub> UI/ml.

Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas**® BKV che avevano generato risultati positivi per BKV con il test comparativo BKV, in totale 313 campioni (133 campioni clinici non diluiti e 159 diluiti, appartenenti a 68 soggetti trapiantati, più 21 campioni preparati artificialmente) sono stati ritenuti idonei all'analisi della correlazione presso tre laboratori (Figura 9).

**Figura 9** Correlazione tra il test **cobas®** BKV e il test comparativo BKV LDT per tutti i campioni: diagramma di regressione lineare di Deming dei livelli di DNA ( $\log_{10}$  UI/ml)



Dall'ulteriore analisi del grafico della distorsione riguardante le differenze nel livello di DNA è emersa una differenza sistematica fra i due test che è costante lungo tutto l'intervallo lineare sovrapponibile. L'IC al 95% dell'intercetta della linea adattata nei grafici della distorsione era compreso fra (-0,404 e -0,168), cioè valori entro  $\pm 0,74 \log_{10}$  UI/ml ( $\pm 2$  volte la deviazione standard dalla precisione analitica del test comparativo BKV LDT). Inoltre, l'errore statistico era stimato a  $-0,357 \log_{10}$  UI/ml e, utilizzando l'equazione della linea adattata nei grafici di distorsione, la differenza sistematica tra i due test era di  $-0,343 \log_{10}$  UI/ml e di  $-0,362 \log_{10}$  UI/ml per i campioni con livelli di DNA rispettivamente di 3 e 4  $\log_{10}$  UI/ml.

### Riproducibilità del test **cobas®** BKV per il tipo di campione urina stabilizzata

La riproducibilità del test **cobas®** BKV è stata valutata rispetto a più fattori (lotto di reagenti, laboratorio, batch e giorni in cui vengono eseguiti i test) che potrebbero influenzare i risultati ottenuti nei test clinici di routine. La valutazione è avvenuta presso 3 laboratori, utilizzando 3 lotti di reagenti con un pannello costituito da campioni positivi e un altro pannello costituito da campioni negativi, per un totale di 270 test per livello di concentrazione (esclusi i controlli). I pannelli sono stati preparati con urina stabilizzata con **cobas®** PCR Media (confermato negativo per il DNA di BKV tramite un protocollo rilasciato per i test degli acidi nucleici (NAT) dell'urina) e arricchita con uno standard internazionale dell'OMS per BKV, o DNA di virus BKV coltivato di genotipo Ia. Due operatori in ogni laboratorio hanno testato ogni lotto di reagente per 5 giorni. Ogni giorno sono state eseguite due sedute (1 seduta = 1 batch; 1 batch = 1 pannello + 3 controlli), con 3 replicati di ciascun componente del pannello per ogni seduta. Per un riepilogo dei risultati della valutazione, vedere nella Tabella 29.

**Tabella 29** Percentuali attribuibili della varianza totale (%TV), deviazione standard (DS) della precisione totale e CV (%) log-normale della concentrazione di DNA di BKV ( $\log_{10}$  UI/ml) per componente del pannello positivo (urina stabilizzata)

Concentrazione del DNA di BKV attesa	Concentrazione media <sup>a</sup> del DNA di BKV osservata	Numero di test <sup>b</sup>	Lotto %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Laboratorio %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Giorno/Operatore %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Batch %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Stesso-batch %TV <sup>c</sup> (CV%) <sup>d</sup>	Precisione totale DS <sup>e</sup>	Precisione totale CV (%) <sup>d</sup>
2,78	2,92	270	59% (12,64)	0% (1,15)	0% (0,00)	0% (0,00)	40% (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47% (8,14)	2% (1,62)	8% (3,31)	0% (0,00)	43% (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38% (5,02)	2% (1,28)	6% (2,07)	0% (0,00)	53% (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21% (3,12)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	79% (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2% (1,51)	19% (4,84)	6% (2,79)	0% (0,00)	73% (9,53)	0,048	11,17

Nota: la tabella include soltanto i risultati con DNA rilevabile. DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione percentuale; BKV = virus BK.

<sup>a</sup> Calcolata mediante la procedura SAS MIXED.

<sup>b</sup> Numero di test validi con livello di DNA rilevabile.

<sup>c</sup> %TV = Contributo alla varianza totale (%).

<sup>d</sup> CV% = coefficiente di variazione percentuale log-normale =  $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$ .

<sup>e</sup> Calcolata a partire dalla variabilità totale ottenuta con la procedura SAS MIXED.

Il test **cobas**® BKV presenta una riproducibilità clinica accettabile alle concentrazioni comprese nell'intero intervallo lineare. Inoltre il sistema ha rilevato il 100% dei campioni  $3 \times$  LLoQ. I **cobas**® 6800 e **cobas**® 8800 Systems hanno lo stesso design modulare e offrono prestazioni equivalenti durante l'esecuzione del test **cobas**® BKV. Tutti i limiti di confidenza al 95% stimati per la differenza tra 2 misurazioni dallo stesso soggetto erano compresi entro  $\pm 0,20 \log_{10}$  UI/ml. Ciò indica che il test può rilevare i cambiamenti nei livelli di DNA di BKV che sono considerati significativi dal punto di vista clinico. La concordanza percentuale negativa del sistema è del 99,26%, con un IC compreso tra il 97,3% e il 99,9%. Su 270 test validi per i componenti del pannello negativo, 2 campioni (0,74%) presentavano una positività con un livello di DNA < LLoQ. Ulteriori indagini su questi risultati hanno dimostrato che non erano associati a nessun particolare strumento/laboratorio o lotto di reagente. L'ulteriore sequenziamento del DNA ha confermato la presenza di BKV. Le sequenze di BKV identificate erano diverse da quelle del controllo positivo e del ceppo di BKV utilizzato per la preparazione del pannello: ciò esclude la contaminazione durante la preparazione del pannello e suggerisce la presenza di tracce di viruria in uno dei 25 campioni di urina utilizzati per il pool con cui è stato preparato il pannello negativo.

## Prestazioni del test **cobas**® BKV per il tipo di campione urina stabilizzata

Le prestazioni cliniche del test **cobas**® BKV sono state ulteriormente valutate presso tre laboratori, attraverso la misurazione dei livelli di DNA di BKV nei campioni clinici di urina ottenuti da pazienti con e senza infezione da BKV, stabilizzati in **cobas**® PCR Media e confrontati con quelli di un consolidato test comparativo per BKV sviluppato in laboratorio (*Laboratory Developed Test, LDT*).

Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas**® BKV e con il test BKV comparativo, in totale 308 campioni di urina non diluiti, stabilizzati in **cobas**® PCR Media e appartenenti a 84 soggetti trapiantati, sono risultati validi con entrambi i test e sono stati ritenuti idonei all'analisi della concordanza clinica (Tabella 30).

**Tabella 30** Analisi della concordanza tra i risultati del livello di DNA di BKV ( $\log_{10}$  UI/ml) ottenuti con il test **cobas®** BKV e con il test comparativo LDT per tutti i campioni (urina stabilizzata)

<b>cobas® BKV</b> <b>(<math>\log_{10}</math> UI/ml)</b>	<b>Test comparativo BKV LDT Target Not Detected</b>	<b>Test comparativo BKV LDT &lt; LLoQ (&lt; 3,0)</b>	<b>Test comparativo BKV LDT Da 3,0 a &lt; 3,3</b>	<b>Test comparativo BKV LDT Da 3,3 a &lt; 3,6</b>	<b>Test comparativo BKV LDT Da 3,6 a 3,9</b>	<b>Test comparativo BKV LDT &gt; 3,9</b>	<b>Totale</b>
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
Da 3,0 a < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
Da 3,3 a < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
Da 3,6 a 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Totale	66	30	8	16	18	170	308
Concordanza colonna (%)	(66/66) 100,0%	(30/30) 100,0%	(6/8) 75,0%	(14/16) 87,5%	(18/18) 100,0%	(169/170) 99,4%	-
(Punteggio IC 95%) <sup>a</sup>	(94,5%, 100,0%)	(88,6%, 100,0%)	(40,9%, 92,9%)	(64,0%, 96,5%)	(82,4%, 100,0%)	(96,7%, 99,9%)	-

Nota: IC = intervallo di confidenza; LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo BKV LDT ( $1000 \text{ UI/ml} = 3,0 \log_{10} \text{ UI/ml}$ ); LDT = test sviluppato in laboratorio; BKV = virus BK.

Deviazione standard del test comparativo BKV LDT stimata a  $0,15 \log_{10} \text{ UI/ml}$  (studio di validazione del test comparativo BKV LDT).

La concentrazione dell'analita di  $3,3 \log_{10} \text{ UI/ml}$  rappresentava  $\text{LLoQ} + 2\sigma$ ;  $3,6 \log_{10} \text{ UI/ml}$  rappresentava  $\text{LLoQ} + 4\sigma$ ; e  $3,9 \log_{10} \text{ UI/ml}$  rappresentava  $\text{LLoQ} + 6\sigma$  con un intervallo di  $2\sigma$ .

Nella tabella sono stati inclusi i campioni appaiati idonei all'analisi della concordanza clinica.

<sup>a</sup> Indipendenza presunta tra tutti i campioni.

Il sequenziamento del DNA su campioni rappresentativi, ottenuti da soggetti con risultati in cui il livello di DNA si discostava costantemente di più di  $1 \log_{10} \text{ UI/ml}$ , non ha evidenziato nessun disallineamento delle sequenze per nessuno dei target primer o sonda per il test **cobas®** BKV. Sono stati considerati discordanti i risultati che si collocavano a una distanza di più di una casella dalla diagonale (indicata dall'ombreggiatura). Nella cella Colonna concordanza, sotto la colonna Target Not Detected relativa al test LDT, le celle Target Not Detected e < LLoQ (< 3,0) relative al test **cobas®** BKV sono state unite. La logica dell'unione tra le celle adiacenti < LLoQ e TND per la colonna TND è la seguente: la differenza tra un risultato TND e un risultato < LLoQ non è clinicamente rilevante, inoltre dal punto di vista analitico questi risultati sono al limite inferiore dell'intervallo di misurazione e potrebbero risentire di un errore random. Dei 66 campioni negativi al DNA di BKV che sono stati raccolti per la stima della concordanza percentuale negativa (CPN) con il test **cobas®** BKV, 61 campioni hanno prodotto risultati validi, tutti e 61 negativi al test **cobas®** BKV, e pertanto la CPN è stata del 100% con un IC esatto al 95% compreso fra il 94,1% e il 100%.

La concordanza tra il test **cobas®** BKV e il test comparativo BKV LDT è stata valutata anche utilizzando soglie cliniche diverse (Tabella 31).

**Tabella 31** Riepilogo della concordanza tra il test **cobas®** BKV e il test comparativo BKV LDT utilizzando soglie diverse per tutti i campioni (urina stabilizzata)

Soglia*	Concordanza percentuale < soglia IC al 95% (n/N)	Concordanza percentuale ≥ soglia IC al 95% (n/N)
Target Not Detected	93,9% (62/66) (85,4%, 97,6%)	97,5% (236/242) (94,7%, 98,9%)
LLoQ (3,0 log <sub>10</sub> UI/ml)	97,9% (94/96) (92,7%, 99,4%)	99,5% (211/212) (97,4%, 99,9%)
4,0 log <sub>10</sub> UI/ml	90,9% (130/143) (85,1%, 94,6%)	99,4% (164/165) (96,6%, 99,9%)
7,0 log <sub>10</sub> UI/ml	97,2% (242/249) (94,3%, 98,6%)	94,9% (56/59) (86,1%, 98,3%)

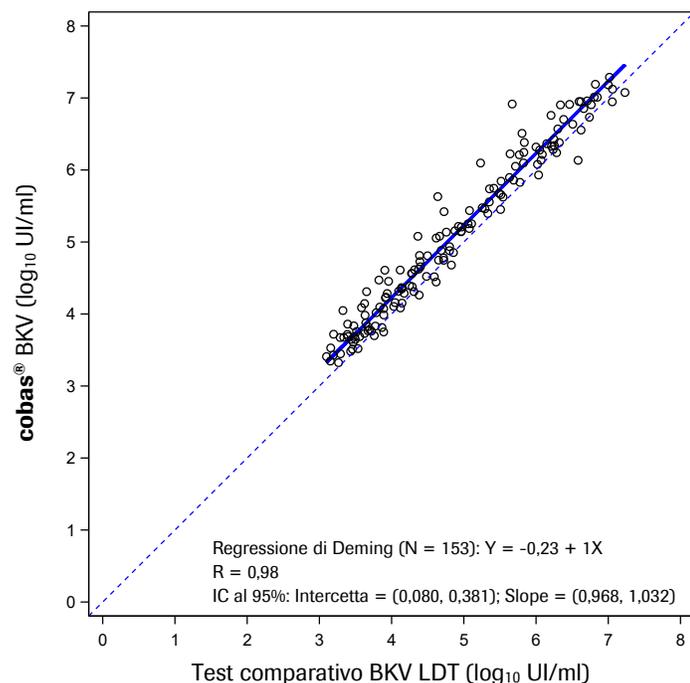
Nota: i campioni con un risultato “Target Not Detected” sono stati classificati come “< valore soglia in UI/ml”.

LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo BKV LDT (1000 UI/ml = 3,0 log<sub>10</sub> UI/ml).

Intervallo di confidenza (IC) al 95% calcolato con l'intervallo di punteggio, presumendo l'indipendenza tra tutti i campioni.

\* Soglie di 10.000 UI/ml = 4,0 log<sub>10</sub> UI/ml e 10.000.000 UI/ml = 7,0 log<sub>10</sub> UI/ml.

Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas®** BKV che avevano generato risultati positivi per BKV con il test comparativo BKV, in totale 153 campioni non diluiti di urina stabilizzata in **cobas®** PCR Media, appartenenti a 55 soggetti trapiantati, sono stati ritenuti idonei all'analisi della correlazione presso tre laboratori (Figura 10).

**Figura 10** Correlazione tra il test **cobas®** BKV e il test comparativo BKV LDT per tutti i campioni: diagramma di regressione lineare di Deming dei livelli di DNA (log<sub>10</sub> UI/ml) (urina stabilizzata)

Dall'ulteriore analisi del grafico della distorsione riguardante le differenze nel livello di DNA è emersa una differenza sistematica fra i due test che è costante lungo tutto l'intervallo lineare sovrapponibile. L'IC al 95% dell'intercetta della linea adattata nei grafici della distorsione era compreso fra (0,168 e 0,488), cioè valori entro  $\pm 0,5 \log_{10}$  UI/ml. Inoltre, l'errore statistico era stimato a  $0,231 \log_{10}$  UI/ml e, utilizzando l'equazione della linea adattata nei grafici di distorsione, la differenza sistematica tra i due test era di  $0,248 \log_{10}$  UI/ml e di  $0,188 \log_{10}$  UI/ml per i campioni con livelli di DNA rispettivamente di  $4 \log_{10}$  e  $7 \log_{10}$  UI/ml.

## **Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi**

L'equivalenza tra i cobas® 5800, cobas® 6800 e cobas® 8800 Systems è stata dimostrata attraverso alcuni studi sulle prestazioni. I risultati presentati nelle Istruzioni per l'uso dimostrano l'equivalenza delle prestazioni tra tutti i sistemi.

## Informazioni supplementari

### Caratteristiche del test

<b>Tipo di campione</b>	Plasma EDTA	Urina stabilizzata in <b>cobas</b> ® PCR Media
<b>Quantità minima di campione richiesta</b>	375 µl*	575 µl*
<b>Volume di analisi del campione</b>	200 µl	400 µl
<b>Sensibilità analitica</b>	21,5 UI/ml (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 16,3-32,4 UI/ml)	12,2 UI/ml (intervallo di confidenza bilaterale al 95%: 9,2-18,3 UI/ml)
<b>Intervallo lineare</b>	21,5 UI/ml - 1E+08 UI/ml	200 UI/ml - 1E+08 UI/ml
<b>Specificità</b>	100%	100%
<b>Sottotipi rilevati</b>	Virus BKV, sottotipi I (con i sottogruppi Ia, Ib e Ic), II, III e IV	

\* Volume morto di 175 µl identificato per le provette secondarie **cobas** **omni**. Eventuali altre provette utilizzate per il test potrebbero avere un volume morto diverso o richiedere un volume minimo più basso o più alto. Per ulteriori informazioni, contattare un rappresentante dell'assistenza tecnica Roche.

## Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 32 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

 <b>Age/DOB</b> Età o data di nascita	 Dispositivo non idoneo ai test POC	 <b>QS IU/PCR</b> UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
 <b>SW</b> Software ausiliario	 Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	 <b>SN</b> Numero di serie
 <b>Assigned Range [copies/mL]</b> Intervallo assegnato (copie/ml)	 Distributore <i>(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)</i>	 <b>Site</b> Laboratorio
 <b>Assigned Range [IU/mL]</b> Intervallo assegnato (UI/ml)	 Non riutilizzare	 <b>Procedure Standard</b> Procedura standard
 <b>EC REP</b> Mandatario nella Comunità Europea	 Femmina	 <b>STERILE EO</b> Sterilizzazione con ossido di etilene
 <b>BARCODE</b> Foglio di dati del barcode	 Solo per valutazione delle prestazioni IVD	 Conservare al buio
 <b>LOT</b> Codice del batch	 <b>GTIN</b> Global Trade Item Number	 Limiti di temperatura
 Rischio biologico	 Importatore	 <b>TDF</b> File di definizione del test
 <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>IVD</b> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	 Alto
 <b>CE</b> Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	 <b>LLR</b> Limite inferiore dell'intervallo assegnato	 <b>Procedure UltraSensitive</b> Procedura ultrasensibile
 <b>Collect Date</b> Data di raccolta	 Maschio	 <b>UDI</b> Identificazione univoca del dispositivo
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Fabbricante	 <b>ULR</b> Limite superiore dell'intervallo assegnato
 $\Sigma$ Contenuto sufficiente per <n> test	 <b>CONTROL -</b> Controllo negativo	 <b>Urine Fill Line</b> Riga di riempimento urina
 <b>CONTENT</b> Contenuto del kit	 <b>NON STERILE</b> Non sterile	 <b>Rx Only</b> Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
 <b>CONTROL</b> Controllo	 ? Nome del paziente	 Utilizzare entro la data
 Data di produzione	 # Numero del paziente	
 Dispositivo idoneo ai test POC	 Staccare qui	
 Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	 <b>CONTROL +</b> Controllo positivo	
	 <b>QS copies / PCR</b> Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.	

## Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:

[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Produttore e importatore

**Tabella 33** Produttore e importatore



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Prodotto in USA



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany

## Marchi e brevetti

Vedere <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

## Copyright

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim  
Germany



## Bibliografia

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nিকেleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Preventions, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

## Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 1.0 03/2022	Prima pubblicazione.

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:  
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.