



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 08/06/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«CMV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK015PLD

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Extension of the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040), Plasma and Whole Blood*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Change in Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*
- *Introduction of IC cut-off value*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBILE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



CMV ELITE MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD



INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	Seite 2
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 3
IM KIT ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 3
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)	Seite 3
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 5
ELITE INGENIUS®	Seite 6
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 6
VERFAHREN BEI ELITE INGENIUS®	Seite 9
ELITE BEGENIUS®	Seite 18
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 18
VERFAHREN BEI ELITE BEGENIUS®	Seite 19
LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE INGENIUS® und ELITE BEGENIUS®	Seite 24
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Seite 38
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 38
VERFAHREN	Seite 40
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 49
Roche cobas z 480 analyzer	Seite 63
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 63
VERFAHREN	Seite 64
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 70
QUELLENANGABEN	Seite 75
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 75
FEHLERBEHEBUNG	Seite 76
SYMBOLE	Seite 79
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 80

CMV ELITE MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt „CMV ELITE MGB® Kit“ ist ein qualitativer und quantitativer Nukleinsäure-Amplifikationstest zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Zytomegalievirus (CMV)** in DNA-Proben, die aus in EDTA entnommenem Vollblut, in EDTA entnommenem Plasma, Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrichen, Fruchtwasser oder bronchoalveolären Lavagen (BAL) / Bronchialaspirat (BA) extrahiert wurden.

Das Produkt ist zur Verwendung bei der Diagnose und Überwachung von CMV-Infektionen, sowie für klinische Patientendaten und weitere Laborbefunde bestimmt.

TESTPRINZIPIEN

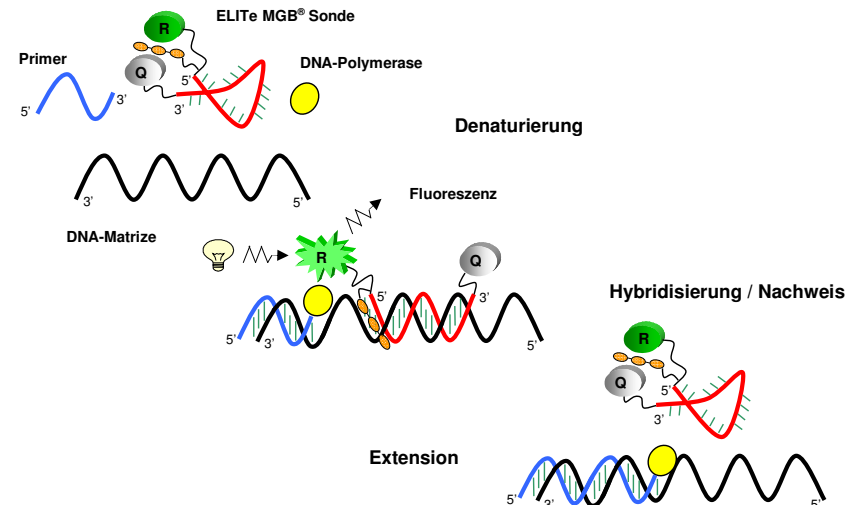
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion für die **Exon-4-Region des CMV-MIEA-Gens** (major immediate early antigen, HCMVUL123) und eine spezifische Reaktion für eine Region des **humanen beta-Globin-Gens** (interne Kontrolle der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, CMV-spezifische Sonde mit ELITE MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der CMV-Amplifikationsreaktion hybridisiert. Die mit einem AP525-Fluorophor (analog zu VIC) markierte, für die interne Kontrolle spezifische Sonde mit ELITE MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion der internen Kontrolle hybridisiert. Die Fluoreszenzemission erhöht sich mit Zunahme des spezifischen Produkts der Amplifikationsreaktion und wird vom Gerät gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verarbeitung der Daten lassen sich das Vorhandensein und der Titer von CMV-DNA in der Ausgangsprobe nachweisen.

Im Anschluss an den Amplifikationslauf kann die Dissoziationskurve (Schmelzkurve) analysiert werden, um die Dissoziationstemperatur (Schmelztemperatur) zu ermitteln und das Vorhandensein der korrekten Targets zu bestätigen oder das Vorhandensein von Mutationen zu identifizieren.

Der Test ist mit den in diesem Benutzerhandbuch beschriebenen Systemen validiert.

In der folgenden Abbildung ist der Mechanismus der Aktivierung und Fluoreszenzemission der ELITE MGB®-Technologie-Sonde nicht zusammenfassend dargestellt. Bitte beachten Sie, dass die Sonde während des Amplifikationszyklus nicht hydrolysiert wird, damit sie für die Analyse der Dissoziationskurve verwendet werden kann.



CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das Produkt „**CMV ELITE MGB® Kit**“ enthält das **gebrauchsfertige Komplettgemisch** „CMV Q - PCR Mix“ zur Echtzeit-Amplifikation in einer stabilisierenden Lösung, die **in vier Einweg-Teströhrchen aliquotiert wird**. Jedes Röhrchen enthält **540 µl** Lösung, die für **24 Tests** (bei Verarbeitung von mindestens 2 Proben pro Lauf) mit dem „**ELITE InGenius®**“ und dem „**ELITE BeGenius®**“ System und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die Primer und die CMV-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für die **Exon-4-Region des CMV-MIEA-Gens** (major immediate early antigen, HCMVUL123).

Die Primer und die Sonde für die interne Kontrolle (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit AP525-Fluorophor, analog zu VIC, und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für die **Promoter- und 5'-UTR-Region des humanen beta-Globin-Gens**.

Das Reaktionsgemisch enthält Puffer, Magnesiumchlorid, Triphosphatnukleotide, AP593-Fluorophor (anstelle von ROX oder Cy5 als Passivreferenz für die Fluoreszenz-Normalisierung verwendet), das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie das „Warmstart“-DNA-Polymerase-Enzym.

Das Produkt reicht aus für **96 Tests mit dem „ELITE InGenius®“** und „**ELITE BeGenius®**“ einschließlich Standards und Kontrollen.

Das Produkt reicht aus für **100 Tests mit anderen Systemen** einschließlich Standards und Kontrollen.

IM KIT ENTHALTENE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
CMV Q – PCR Mix	Komplettes Reaktionsgemisch	4 x 540 µl	-

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Laminar-Flow-Haube.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tisch-Mikrozentrifuge (12.000–14.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (0,5–10 µl, 2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.
- Programmierbarer Thermostat mit optischem Fluoreszenznachweissystem 7300 Real-Time PCR System oder 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, das gemäß den Herstelleranweisungen kalibriert ist.
- Programmierbarer Thermostat mit optischem Fluoreszenznachweissystem cobas z 480 analyzer, das gemäß den Herstelleranweisungen kalibriert ist.

SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE

Die Reagenzien für die Extraktion von DNA aus den Proben, die Positivkontrolle der Extraktion, die Positivkontrolle der Amplifikation, die bekannten DNA-Mengenstandards und die Verbrauchsmaterialien sind **nicht** in diesem Kit enthalten.

Für die manuelle DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben ist die Verwendung des generischen Produkts „**EXTRAblood**“ (ELITechGroup S.p.A., Bestell-Nr. EXTB01), ein Kit zur Extraktion von DNA aus zellulären und nicht-zellulären Proben, validiert.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät „**ELITE InGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) werden die folgenden generischen Produkte benötigt: die Extraktionskartuschen „**ELITE InGenius® SP 200**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200) oder „**ELITE InGenius® SP 1000**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT033SP1000), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nukleinsäuren aus biologischen Proben

„**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), „**ELITE InGenius® Waste Box**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000), „**ELITE InGenius® PCR Cassette**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und „**300 µl Filter Tips Axygen**“ (Axygen BioScience Inc., CA, USA, Art.-Nr. TF-350-L-R-S).

Für die automatische DNA-Extraktion, Amplifikation und Interpretation der Probenanalyse werden das Gerät „**ELITE InGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) und die folgenden spezifischen Assay Protocols (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

für die Kalibratoren «**CMV ELITE STD**» oder «**CMV ELITE STD_1000_100**»,
für die Positivkontrolle der Amplifikation «**CMV ELITE_PC**» oder «**CMV ELITE_PC_1000_100**»,
für die Negativkontrolle der Amplifikation «**CMV ELITE_NC**» oder «**CMV ELITE_NC_1000_100**»,
für die Probenanalyse „**CMV ELITE_WB_200_100**“, „**CMV ELITE_PL_200_100**“, „**CMV ELITE_PL_1000_100**“, „**CMV ELITE_CSF_200_100**“, „**CMV ELITE_U_200_100**“, „**CMV ELITE_BS_200_100**“, „**CMV ELITE_AF_200_100**“ und „**CMV ELITE_BAL_200_100**“.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) sind die folgenden generischen Produkte validiert: die Extraktionskartuschen «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nukleinsäuren aus biologischen Proben «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und «**1000 µl Filter Tips Tecan**» (Tecan, Schweiz, Art.-Nr. 30180118).

Für die automatische DNA-Extraktion, Amplifikation und Interpretation der Probenanalyse werden das Gerät „**ELITE BeGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) und die folgenden spezifischen Assay Protocols (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

für die Kalibratoren «**CMV ELITE_Be_STD**»,
für die Positivkontrolle der Amplifikation «**CMV ELITE_Be_PC**»,
für die Negativkontrolle der Amplifikation «**CMV ELITE_Be_NC**»,
für die Probenanalyse „**CMV ELITE_Be_WB_200_100**“ und „**CMV ELITE_Be_PL_200_100**“.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben ist die Verwendung des generischen Produkts „**ELITE STAR 200 Extraction Kit**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT011EX), ein Kit zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**ELITE STAR**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT010) validiert.

Für die automatische DNA-Extraktion und Vorbereitung von Mikrotiterplatten für die Amplifikation von zu analysierenden Proben ist die Verwendung des generischen Produkts «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT021EX), ein Kit zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT020) validiert.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben sind die generischen Produkte „**NucliSENS® easyMAG® Reagents**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), Kits zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**NucliSENS® easyMAG®**“ (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111) ebenfalls validiert.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben sind die Produkte „**QIASymphony® DNA Mini Kit**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 931236) und „**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 937055), Kits zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 9001297, 9001301) und den dazugehörigen generischen Produkten ebenfalls validiert.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben ist das Produkt «**MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, Art.-Nr. 07658036001), ein Kit zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät «**MagNA Pure 24 System**» (Roche, Art.-Nr. 07290519001) ebenfalls validiert.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Beim Einsatz eines 7300 Real-Time-PCR-Systems muss das generische Produkt „**Q - PCR Microplates**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC01), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument muss das generische Produkt: „**Q - PCR Microplates Fast**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC02), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Beim Einsatz eines cobas z 480 analyzer muss das generische Produkt «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, Art.-Nr. 05232724001), Mikrotiterplatten mit 0,3-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Wird ein Nachweis von CMV DNA benötigt (qualitative Analyse), verwenden Sie das Produkt „**CMV - ELITe Positive Control**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR015PLD) oder das Produkt „**CMV - ELITe Positive Control RF**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR015PLD-R), Positive Control von Plasmid-DNA.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von CMV-DNA benötigt (quantitative Analyse), muss das Produkt „**CMV ELITe Standard**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD015PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve, verwendet werden.

Als Positivkontrolle der Nukleinsäureextraktion aus nicht-zellulären Proben und als Inhibitionskontrolle muss das generische Produkt «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTRCPE), eine stabilisierte Lösung, die zwei Plasmid-DNAs und die genomische RNA des MS2-Phagen enthält, verwendet werden.

Mithilfe eines Umrechnungsfaktors können die Ergebnisse der quantitativen CMV-Analyse in internationalen Einheiten gemäß dem „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) ausgedrückt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist ausschließlich für die *In-vitro*-Anwendung bestimmt.

Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

Geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zum Schutz der Augen und des Gesichts tragen. Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren. Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind in den Arbeitsbereichen verboten. Die Hände nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich waschen. Übrig gebliebene Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen. Vor Durchführung des Tests alle dem Produkt beiliegenden Anweisungen aufmerksam lesen. Bei der Durchführung des Tests die dem Produkt beiliegenden Anweisungen befolgen. Das Produkt darf nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwendet werden. Es dürfen nur die mit dem Produkt bereitgestellten und vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwendet werden. Reagenzien von anderen Chargen dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für molekularbiologische Anwendungen

Molekularbiologische Verfahren, wie die Nukleinsäureextraktion, -amplifikation und -detektion, dürfen nur von qualifiziertem und geschultem Personal durchgeführt werden, um das Risiko von fehlerhaften Ergebnissen zu vermeiden. Dies gilt insbesondere angesichts des Abbaus von in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren sowie der Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten zu beachten. Niemals ein Amplifikationsprodukt in den für die Extraktion/Vorbereitung von Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich einführen.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs müssen Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel vorhanden sein, die ausschließlich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten verwendet werden. Niemals Laborkittel, Schutzhandschuhe oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation / den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

Die Proben dürfen ausschließlich für diese Art von Analyse verwendet werden. Die Proben müssen unter einer Laminar-Flow-Haube verarbeitet werden. Röhrchen, die verschiedene Proben enthalten, dürfen niemals gleichzeitig geöffnet werden. Die zur Verarbeitung der Proben verwendeten Pipetten dürfen ausschließlich für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen nach dem Verdrängungsprinzip arbeiten oder in Verbindung mit Aerosol-Filterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Die Reagenzien müssen unter einer Laminar-Flow-Haube gehandhabt werden. Die für die Amplifikation benötigten Reagenzien müssen so vorbereitet werden, dass sie in einem einzelnen Lauf verwendet werden können. Die Pipetten, die für die Handhabung der Reagenzien verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen nach dem Verdrängungsprinzip arbeiten oder in Verbindung mit Aerosol-Filterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNasen und RNasen sowie frei von DNA und RNA sein.

Die Extraktionsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die Pipetten, die für die Handhabung von Extraktionsprodukten verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden.

Amplifikationsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die Pipetten, die für die Handhabung von Amplifikationsprodukten verwendet werden, dürfen nur für diesen Zweck verwendet werden.

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der **CMV Q - PCR Mix** muss bei -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

Der **CMV Q - PCR Mix** darf maximal **fünf Mal** eingefroren und wieder aufgetaut werden; weitere Gefrier- und Auftauzyklen können zu einem Verlust der Produktleistung führen.

Der **CMV Q - PCR Mix** kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

ELITe InGenius®

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden:

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

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

Hinweis: Wird die Nukleinsäureextraktion aus Vollblut mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius® Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **CMV ELITe_WB_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl Wasser.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Bei Verwendung des Primärrohrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, sind die Extraktionsprotokolle **CMV ELITe_PL_200_100** zu verwenden. Diese Protokolle verarbeiten 200 µl Probe, fügen die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluieren die Nukleinsäuren in 100 µl Wasser.

Hinweis: Wird die Nukleinsäureextraktion aus 1000 µl Plasma mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, sind die Extraktionsprotokolle **CMV ELITe_PL_1000_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 1000 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Primärrohrchen können NICHT zusammen mit dem Assay-Protokoll **CMV ELITe_PL_1000_100** verwendet werden.

Liquor

Die Liquorproben für die Nukleinsäureextraktion müssen unter Vermeidung einer Kontamination mit Patientenblut gemäß den Laborrichtlinien entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set“ enthaltene Extraktionsröhrchen überführt werden.

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

Hinweis: Wird die Nukleinsäureextraktion aus Liquor mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **CMV ELITe_CSF_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Urin

Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set“ enthaltene Extraktionsröhrchen überführt werden.

Falls möglich, das Einfrieren von Morgenurinproben vermeiden. Das Einfrieren kann die Fällung von Inhibitoren und den Verlust des DNA-Titers verursachen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus Urin mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, sind die Extraktionsprotokolle **CMV ELITe_U_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Mundschleimhautabstrich

Die Mundschleimhaut-Abstrichproben für die Nukleinsäureextraktion müssen mit den Entnahme- und Transportsystemen „eSwab Collection Kit“ (COPAN Italia S.p.A., Art.-Nr. 480CE) genommen und gemäß den Laborrichtlinien identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal fünf Tage bei Raumtemperatur (+18 bis

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

+25 °C) bzw. maximal sieben Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal sechs Monate oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set“ enthaltene Extraktionsröhrchen überführt werden.

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

Hinweis: Wird die Nukleinsäureextraktion aus Mundschleimhautabstrichen mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, sind die Extraktionsprotokolle **CMV ELITe_BS_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Fruchtwasser

Die Fruchtwasserproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set“ enthaltene Extraktionsröhrchen überführt werden.

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

Hinweis: Wird die Nukleinsäureextraktion aus Fruchtwasser mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, sind die Extraktionsprotokolle **CMV ELITe_AF_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Bronchialaspirat (BA)

Die für die DNA-Extraktion vorgesehenen BAL-/BA-Proben müssen gemäß den Laborrichtlinien in steriler physiologischer Lösung oder steriler PBS entnommen und dürfen maximal eine Woche bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden. Anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für bis zu ein Jahr aufbewahrt werden.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml Probe in das im „ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set“ enthaltene Extraktionsröhrchen überführt werden.

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

Besonders muköse BAL-/BA-Proben können gemäß den Laborrichtlinien mit Dithiothreitol-basierten Reagenzien (z. B. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) verflüssigt werden.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus BAL/BA mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Assay Protocol **CMV ELITe_BAL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Andere Proben:

Es liegen keine Daten zur Produktleistung mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Leukozytensuspensionen und Granulozytensuspensionen.

Störende Substanzen

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

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

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve und die Reagenzienvalidierung für jede Amplifikationsreagenzcharge zu generieren und zu genehmigen:

als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **CMV ELITE Standard** zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITE STD**“ oder „**CMV ELITE STD 1000_100**“ zu verwenden, als Amplifikations-Positive Control ist **CMV - ELITE Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITE_PC**“ oder „**CMV ELITE_PC_1000_100**“ zu verwenden, als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITE_NC**“ oder „**CMV ELITE_NC_1000_100**“ zu verwenden.

Hinweis: Das System **ELITE InGenius** mit der **ELITE InGenius Software** benötigt für jede in seiner Datenbank gespeicherte Amplifikationsreagenzcharge genehmigte und gültige Ergebnisse der Kalibrationskurve und der Amplifikationskontrollen.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kalibrationskurven laufen nach 60 Tagen ab. Am Ablaufdatum müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

Die genehmigten und in der Datenbank gespeicherten Ergebnisse der Amplifikationskontrolle laufen nach 15 Tagen ab. Am Ablaufdatum müssen die Positive Control und Negative Control zusammen mit der Amplifikationsreagenzcharge erneut verarbeitet werden.

Die Kalibratoren und Amplifikationskontrollen müssen neu getestet werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- eine neue Charge von Amplifikationsreagenzien gestartet wird,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- eine größere Wartung wird am Gerät durchgeführt.

Qualitätskontrollen

Externe Qualitätskontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen anzuwenden. Externe Qualitätskontrollen sind auf dem Markt erhältlich.

VERFAHREN BEI ELITE InGenius®

Das beim Gebrauch des **CMV ELITE MGB® Kit** mit dem System **ELITE InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

- Prüfung der Systembereitschaft
- Einrichtung des Laufs
- Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Prüfung der Systembereitschaft

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

- **ELITE InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- prüfen, ob die Kalibratoren (**CMV Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und dass sie noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- prüfen (Kontrollen), ob die Amplifikationskontrollen (**CMV Positive Control, CMV Negative Control**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Control“ (Kontrolle) überprüft werden;
- den Typ des Laufs auswählen und den Lauf einrichten; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITechGroup bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITE MGB® Kits, Matrizes und dem Gerät ELITE InGenius validiert.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die für das „**CMV ELITE MGB® Kit**“ verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay-Protokolle für CMV ELITE MGB® Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
CMV ELITE_WB_200_100	Vollblut	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_PL_200_100	Plasma	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_PL_1000_100	Plasma	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 1000 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_CSF_200_100	Liquor	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_U_200_100	Urin	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_BS_200_100	Mundschleimhaut abstrich	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_AF_200_100	Fruchtwasser	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
CMV ELITE_BAL_200_100	BAL/BA	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

Das **CMV ELITe MGB® Kit** kann zusammen mit **ELITe InGenius** zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- Integrierter Lauf (Extraktion + PCR),
- Amplifikationslauf (nur PCR),
- Kalibrationslauf (nur PCR),
- Amplifikationslauf für die Positiv- und Negativkontrolle (nur PCR).

Alle für den Lauf benötigten Parameter sind in dem auf dem Gerät verfügbaren Assay-Protokoll enthalten und werden bei Auswahl des Assay-Protokolls automatisch abgerufen.

Hinweis: Das ELITe InGenius System kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Informationen geladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die Hauptarbeitsgänge zum Einrichten der vier Durchlauftypen sind nachfolgend beschrieben.

A. Integrierter Lauf

Gehen Sie zum Einrichten des integrierten Laufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der **grafischen Benutzeroberfläche der Software**:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrchen auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
- Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. CMV ELITe_WB_200_100).
- Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
 - wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen; das Primärröhrchen kann erst ab 200 µl Probe verwendet werden;
 - wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) auswählen.Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- CPE und CMV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die PCR-Kassette („PCR Cassette“), die Extraktionskartuschen „ELITe InGenius SP 200“ oder „ELITe InGenius SP1000“, alle benötigten Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden

Proben in die unter Schritt 8 angegebenen Positionen laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

12. Die Gerätetür schließen.

13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

B. Amplifikationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl beträgt, um 200 µl Probe zu bearbeiten, bzw. 1000 µl, um 1000 µl Probe zu verarbeiten, und dass das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Elute Volume“) 100 µl beträgt.
- Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. CMV ELITe_WB_200_100).
- In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
- Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution tube (bottom row)“ (Elutionsröhr. (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den CMV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die PCR-Kassette („PCR Cassette“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

Nach Beendigung des Vorgangs ermöglicht **ELITe InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse

anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

C. Kalibrationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Kalibrationslaufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. CMV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl beträgt, um 200 µl Probe zu bearbeiten, bzw. 1000 µl, um 1000 µl Probe zu verarbeiten; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Elute Volume“) 100 µl beträgt.
5. Beginnend mit der relevanten Spur das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (CMV ELITe_STD oder CMV ELITe_STD_1000_100) und die Chargennummer und das Ablaufdatum für den CMV Q - PCR Standard eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
6. Den CMV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
7. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Die **CMV Q-PCR Standard**-Röhrchen und die PCR-Kassette („PCR Cassette“) auf das Gerät laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren. Darauf achten, dass die PCR Standard-Flüssigkeiten in die richtigen Spuren eingesetzt werden, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben.
9. Die Gerätetür schließen.
10. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs können die übrigen Kalibratoren aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für

bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

D. Amplifikationslauf für Positive Control und Negative Control

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs für die Positivkontrolle und Negativkontrolle wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

1. CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. CMV - ELITe Positive Control-Röhrchen für die Amplifikation der Positive Control 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius® SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Auch wenn keine Extraktion durchgeführt wird sicherstellen dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“): 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
6. Für die Positivkontrolle CMV ELITe_PC oder CMV ELITe_PC_1000_100 auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für die CMV Positive Control eintragen.
7. Für die Negativkontrolle CMV ELITe_NC oder CMV ELITe_NC_1000_100 auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für das hochreine Wasser für die Molekularbiologie eintragen.
8. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Den CMV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Amplifikations-„PCR-Kassette“, das CMV Positive Control-Röhrchen und/oder das Negative Control-Röhrchen gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Die Positive Control und die Negative Control müssen als Amplifikationskontrollen ausgeführt werden, um die Regelkarten („Control Charts“) einzurichten. Zum Einrichten der Regelkarte sind vier Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control aus 4 verschiedenen Läufen erforderlich. Anschließend werden die Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control zur Überwachung der Leistung der Amplifikationsstufen herangezogen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige Positive Control aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Die übrige Negative Control muss entsorgt werden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die übrigen Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/Kalibrator-/Kontrollergebnisse sowie die Informationen zum Lauf angezeigt. Über diesen Bildschirm kann das Ergebnis genehmigt und können die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden.

Hinweis: Das **ELITe InGenius** System kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Ergebnisse an das Rechenzentrum des Labors gesendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Hinweis: Ausführliche Informationen sind dem Benutzerhandbuch des Geräts **ELITe InGenius** zu entnehmen.

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

- A. Validierung der Kalibrationskurve,
- B. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control,
- C. Validierung der Probenergebnisse,
- D. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

A. Validierung der Kalibrationskurve

Die von der spezifischen CMV-Sonde („CMV“) in den Kalibrator-Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay Protocol „CMV ELITe_STD“ bzw. „CMV ELITe_STD_1000_100“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifische Kalibrationskurve wird in der Datenbank („Calibration“) gespeichert, nachdem der „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die Genehmigung dazu erteilt hat.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifische Kalibrationskurve läuft **nach 60 Tagen** ab.

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve für die verwendete Amplifikationsreagenzcharge zu generieren und zu genehmigen. Die Verfügbarkeit von Kalibrationskurven-Ergebnissen mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Calibration“ (Kalibration) der ELITe InGenius Software angezeigt.

Hinweis: Erfüllt die Kalibrationskurve nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „Failed“ (nicht bestanden) auf dem Bildschirm „Calibration“ angezeigt und die Kurve kann nicht genehmigt werden. Die Kalibrator-Amplifikationsreaktionen müssen in diesem Fall wiederholt werden.

Hinweis: Wird die Kalibrationskurve zusammen mit Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, so werden die Proben nicht quantifiziert und können nicht freigegeben werden. In diesem Fall muss die Amplifikation aller Proben ebenfalls wiederholt werden.

B. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control

Die von der spezifischen CMV-Sonde („CMV“) in der Amplifikationsreaktion der Positiv- und Negativkontrolle ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay-Protokoll „CMV ELITe_PC_1000_100“, „CMV ELITe_NC“ bzw. „CMV ELITe_NC_1000_100“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die Ergebnisse der Amplifikation der Positive Control und Negative Control, die für die verwendete Amplifikationsreagenzcharge spezifisch sind, werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert. Sie können von Mitarbeitern mit der Qualifikation „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control laufen nach 15 Tagen ab.

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich zu prüfen, ob die Amplifikation der Positive Control und Negative Control mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge durchgeführt wurde und genehmigte und gültige Ergebnisse vorliegen. Die Verfügbarkeit der Ergebnisse der Amplifikation der Positive

Control und Negative Control mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

Die Ergebnisse der Amplifikationsläufe für die Positive Control und Negative Control werden von der Gerätesoftware verwendet, um die Einrichtung der Regelkarten („Control Charts“) zu berechnen. Zum Einrichten der Regelkarte sind vier Ergebnisse der Positive Control und Negative Control aus vier verschiedenen Läufen erforderlich. Anschließend werden die Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control zur Überwachung der Leistung der Amplifikationsstufen herangezogen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Hinweis: Erfüllt das Ergebnis des Amplifikationslaufs für die Positive Control bzw. Negative Control nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „Failed“ (nicht bestanden) im Bildschirm „Controls“ angezeigt und das Ergebnis kann nicht genehmigt werden. In diesem Fall muss die Amplifikationsreaktion der Positive Control bzw. Negative Control wiederholt werden.

Hinweis: Wird die Positive Control bzw. Negative Control als Amplifikationskontrolle zusammen mit Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, dann ist der gesamte Lauf ungültig und die Amplifikation aller Proben muss wiederholt werden.

C. Validierung der Probenergebnisse

Die von der spezifischen CMV-Sonde („CMV“) und der spezifischen Sonde für die interne Kontrolle („IC“) in der jeweiligen Proben-Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay Protocol enthaltenen Parametern interpretiert.

Hinweis: Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve und die Amplifikationskontrollen für die verwendete Reagenziencharge zu generieren und zu genehmigen. Es wird empfohlen, die Positive und die Negative Control zusammen mit den Kalibratoren auszuführen. Dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Die Verfügbarkeit einer Kalibrationskurve sowie von Ergebnissen des Amplifikationslaufs für die Positive und Negative Control mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird in den Fenstern „Calibration“ (Kalibration) und „Control“ (Kontrolle) der ELITe InGenius Software angezeigt und im Abschnitt „Assay Parameters“ (Assayparameter) angegeben.

Die Ergebnisse sind in den vom Gerät generierten Berichten beschrieben („Result Display“ (Ergebnisanzeige)).

Der Probenlauf ist gültig, wenn die drei in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen erfüllt sind.

1) Kalibrationskurve	Status
CMV Q-PCR Standard	APPROVED (Genehmigt)
2) Positive Control	Status
CMV Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
3) Negative Control	Status
CMV Negative Control	APPROVED (Genehmigt)

Das System interpretiert das Assay-Ergebnis für jede Probe automatisch gemäß dem Algorithmus der **ELITe InGenius Software** und den Parametern des Assay-Protokolls.

Das System berechnet die Viruslast für jede Probe automatisch. Das Ergebnis wird wie im Assay Protocol festgelegt entweder in „gEq/ml“ oder „IU/ml“ angegeben.

Die möglichen Ergebnismeldungen einer Probe sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Ergebnis des Probenlaufs	Interpretation
CMV: DNA Detected, quantity equal to XXX gEq / mL or IU / mL (CMV: DNA erkannt, Menge gleich XXX gEq/ml bzw. IU/ml)	CMV-DNA erkannt innerhalb des Messbereich des Tests, Menge wie angezeigt.
CMV: DNA Detected, quantity below LLoQ gEq / mL or IU / mL (CMV: DNA erkannt, Menge unter LLoQ gEq/ml bzw. IU/ml)	CMV-DNA erkannt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Tests
CMV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ gEq / mL or IU / mL (CMV: DNA erkannt, Menge über ULoQ gEq/ml bzw. IU/ml)	CMV-DNA erkannt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Tests
CMV: DNA Not Detected or below LoD gEq / mL or IU / mL (CMV: DNA nicht erkannt oder Menge unter LoD gEq/ml bzw. IU/ml)	CMV-DNA nicht erkannt oder unterhalb der Nachweisgrenze des Tests
Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	Ungültiges Testergebnis aufgrund von fehlerhafter Internal Control (falsche Extraktion oder Verschleppung des Inhibitors).

Nicht für die Ergebnisinterpretation geeignete Proben werden von der **ELITe InGenius Software** als „Invalid - Retest Sample“ (Ungültig - Probe erneut testen) ausgegeben. In diesem Fall wurde die Internal Control-DNA aufgrund von Problemen beim Amplifikations- oder Extraktionsschritt nicht effizient erkannt (Abbau von DNA, Verlust von DNA während der Extraktion oder Verschleppung von Inhibitoren im Eluat), was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann.

Wenn das Eluatvolumen ausreicht, kann die extrahierte Probe mithilfe eines Amplifikationslaufs im Modus „PCR Only“ (nur PCR) erneut getestet werden. Ist auch das zweite Ergebnis ungültig, muss die Probe beginnend mit der Extraktion eines neuen Aliquots im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) erneut getestet werden.

Proben, die sich für die Analyse eignen, in denen jedoch keine DNA erkannt werden konnte, werden ausgegeben mit: „DNA Not Detected or below LoD“ (DNA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze). In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Resistenzgen-DNA bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden ist (siehe „Leistungsmerkmale“).

Hinweis: Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

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

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

Die Probenergebnisse werden in der Datenbank gespeichert und können als „Sample Report“ (Probenbericht) und „Track Report“ angezeigt werden.

Der „Sample Report“ zeigt die Details eines Probenlaufs sortiert nach Proben-ID (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Details eines Probenlaufs spurweise an.

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

ELITe BeGenius®

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden:

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem **ELITe BeGenius®** und mit der **ELITe BeGenius® Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **CMV ELITe_Be_WB_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärrohrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe BeGenius®** und mit der **ELITe BeGenius® Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **CMV ELITe_Be_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Andere Proben:

Es liegen keine Daten über die Leistung des Produkts bei der Extraktion von DNA aus folgenden klinischen Proben vor: Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Bronchialaspirat (BA), Leukozytensuspensionen oder Granulozytensuspensionen.

Störende Substanzen

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

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

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich, die Kalibrationskurve und die Reagenzienvalidierung für jede Amplifikationsreagenzcharge zu generieren und zu genehmigen:

als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **CMV ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITe_Be_STD**“ zu verwenden,

als Amplifikations-Positive Control ist **CMV - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITe_Be_PC**“ zu verwenden,

als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**CMV ELITe_Be_NC**“ zu verwenden.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Hinweis: Das System **ELITe BeGenius** mit der **ELITe BeGenius Software** benötigt für jede in seiner Datenbank gespeicherte Amplifikationsreagenzcharge genehmigte und gültige Ergebnisse der Kalibrationskurve und der Amplifikationskontrollen.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kalibrationskurven laufen nach 60 Tagen ab. Am Ablaufdatum müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenzcharge erneut verarbeitet werden.

Die genehmigten und in der Datenbank gespeicherten Ergebnisse der Amplifikationskontrolle laufen nach 15 Tagen ab. Am Ablaufdatum müssen die Positive Control und Negative Control zusammen mit der Amplifikationsreagenzcharge erneut verarbeitet werden.

Die Kalibratoren und Amplifikationskontrollen müssen neu getestet werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- eine neue Charge von Amplifikationsreagenzien gestartet wird,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- eine größere Wartung wird am Gerät durchgeführt.

Qualitätskontrollen

Externe Qualitätskontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen anzuwenden. Externe Qualitätskontrollen sind auf dem Markt erhältlich.

VERFAHREN BEI ELITe BeGenius®

Das beim Gebrauch des „**CMV ELITe MGB® Kit**“ mit dem System **ELITe BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

- Prüfung der Systembereitschaft
- Einrichtung des Laufs
- Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Prüfung der Systembereitschaft

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

- **ELITe BeGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- prüfen, ob die Kalibratoren (**CMV Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und dass sie noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden,
- prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**CMV - Positive Control, CMV Negative Control**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Control“ (Kontrolle) überprüft werden,
- den Typ des Laufs auswählen und den Lauf einrichten; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITeGroup bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits, Matrices und dem Gerät ELITe BeGenius validiert.

Die für das „**CMV ELITe MGB® Kit**“ verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay-Protokolle für „CMV ELITe MGB® Kit“ und ELITe BeGenius			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
CMV ELITe_Be_WB_200_100	Vollblut	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Assay-Protokolle für „CMV ELITe MGB® Kit“ und ELITe BeGenius			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
CMV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	gEq/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

Falls das betreffende Assay-Protokoll nicht im System vorhanden ist, wenden Sie sich an Ihren ELITeGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

Das **CMV ELITe MGB® Kit** zusammen mit **ELITe BeGenius** kann zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- Probenlauf (EXTR + PCR),
- Amplifikationslauf (nur PCR),
- Kalibrationslauf (nur PCR),
- Lauf für Positive und Negative Control (nur PCR).

Alle für den Lauf benötigten Parameter sind in dem auf dem Gerät verfügbaren Assay-Protokoll enthalten und werden bei Auswahl des Assay-Protokolls automatisch abgerufen.

Hinweis: Das System **ELITe BeGenius** kann mit dem Laborinformationssystem (LIS) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Informationen versendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlaufotypen sind nachfolgend beschrieben.

A. Probenlauf

Gehen Sie zum Einrichten des integrierten Laufs wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der **grafischen Benutzeroberfläche der Software**:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Die CPE-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben in die Racks 5 und 4 laden (immer mit Rack 5 beginnen).
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

Hinweis: Beim Laden von Sekundärröhrchen „2-ml-Röhrchen“ angeben. Bei Sekundärröhrchen ohne Barcode die Proben-ID manuell eingeben.

- Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und extrahiertes Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. CMV ELITe_Be_PL_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Schritt 7 bis 9 ggf. für Rack 4 wiederholen.
- Die Elutionsröhrchen in die Racks 3 und 2 laden (immer mit Rack 3 beginnen).

Hinweis: Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit etikettiert werden.

- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Schritt 12 ggf. für Rack 2 wiederholen.
- CPE und CMV Q-PCR Mix in Rack 1 laden.
- Das Rack 1 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenstände in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den Korb mit den Extraktionskartuschen „ELITE InGenius SP 200“ und den für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten und die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

B. Amplifikationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs mit eluierten Proben wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
- Die Proben in die Racks 3 und 2 laden (immer mit Rack 3 beginnen).
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. CMV ELITE_Be_PL_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Schritt 7 bis 9 für Rack 2 wiederholen.
- CMV Q-PCR Mix in Rack 1 laden.
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenstände in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs muss die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

C. Kalibrationslauf

Gehen Sie zum Einrichten des Kalibrationslaufs mit den Q-PCR Standards wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Die CMV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
- Die Kalibratorröhrchen in Rack 3 laden.
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (CMV ELITE_Be_STD). Auf die

- Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren. .
- CMV Q-PCR Mix in Rack 2 laden.
 - Das Rack 2 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
 - Die Gerätetür schließen.
 - Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs können die übrigen Kalibratoren aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der Q-PCR Standards vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs muss die PCR-Kassette („PCR Cassette“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

D. Lauf für die Positive Control und Negative Control

Gehen Sie zum Einrichten des Laufs für die Positive Control und Negative Control wie folgt vor und befolgen Sie die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche:

- CMV Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: CMV Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Das CMV - ELITe Positive Control-Röhrchen für die Amplifikation der Positive Control 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Für den Lauf mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (wie Negative Control) in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
- Die Röhrchen für die Positive und Negative Control in Rack 3 laden.
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll „CMV ELITe_Be_PC“ und „CMV ELITe_Be_NC“ in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- CMV Q-PCR Mix in Rack 2 laden.
- Das Rack 2 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs kann die übrige Positive Control aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der Positive Control vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Der PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/Kalibrator-/Kontrollergebnisse sowie die Informationen zum Lauf angezeigt. Über diesen Bildschirm kann das Ergebnis genehmigt und können die Berichte („Sample Report“ (Probenbericht) oder „Track Report“ (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden.

Hinweis: Das **ELITE BeGenius** System kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Arbeitslauf-Ergebnisse an das Rechenzentrum des Labors gesendet werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

ELITE BeGenius generiert Ergebnisse mithilfe des CMV ELITe MGB Kits und geht dabei folgendermaßen vor:

- Validierung der Kalibrationskurve,
- Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control,
- Validierung der Probenergebnisse,
- Ausgabe des Probenergebnisberichts.

Hinweis: Einzelheiten sind den entsprechenden Kapiteln des **ELITE InGenius** Handbuchs zu entnehmen.

LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) der DNA-Amplifikation, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/20 µl in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng/20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. auf zwei verschiedenen ELITe InGenius-Geräten durchgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA	24	23	1

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit verschiedenen Matrices und **ELITE InGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus mindestens sechs Punkten rund um die Grenzkonzentration. Jede Probe der Reihe wurde in mindestens 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Laufeinrichtung, Extraktion von Nukleinsäuren, Echtzeit-Amplifikation und Dateninterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

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

Nachweisgrenze mit ELITE InGenius (IU/ml)				
Probenvolumen	Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	Vollblut	109 IU/ml	71 IU/ml	239 IU/ml
	Plasma	88 IU/ml	50 IU/ml	291 IU/ml
	Liquor	58 IU/ml	48 IU/ml	82 IU/ml
	Urin	151 IU/ml	119 IU/ml	214 IU/ml
	Mundschleimhautabstrich	44 IU/ml	36 IU/ml	57 IU/ml
	Fruchtwasser	57 IU/ml	46 IU/ml	78 IU/ml
1000 µl	Plasma	17 IU/ml	14 IU/ml	22 IU/ml

Die analytische Sensitivität als gEq/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 25 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität als gEq/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze mit ELITE InGenius (gEq/ml)				
Probenvolumen	Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	Vollblut	156 gEq/ml	99 gEq/ml	332 gEq/ml
	Plasma	293 gEq/ml	167 gEq/ml	970 gEq/ml
	Liquor	193 gEq/ml	160 gEq/ml	273 gEq/ml
	Urin	216 gEq/ml	170 gEq/ml	306 gEq/ml
	Mundschleimhautabstrich	220 gEq/ml	180 gEq/ml	285 gEq/ml
	Fruchtwasser	285 gEq/ml	230 gEq/ml	390 gEq/ml
1000 µl	Plasma	57 gEq/ml	47 gEq/ml	73 gEq/ml

Der berechnete LoD-Wert für **Vollblut- und Plasma**-Matrices (Probenvolumen 200 µl) wurde in Verbindung mit **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** durch Testen von 20 Replikaten von in EDTA entnommenem Vollblut und 20 Replikaten von in EDTA entnommenem Plasma, die mit zertifiziertem CMV-Referenzmaterial (1th WHO International Standard, NIBSC) in den behaupteten Konzentrationen dotiert waren, verifiziert. Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten gemäß CLSI-Standard EP17-A ein positives Ergebnis haben.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Nachweisgrenze bei Vollblut- und Plasmaproben und ELITE InGenius					
Probe	Titer	Ziel	Anzahl	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	109 IU/ml	CMV	20	20	0
In EDTA entnommenes Plasma	88 IU/ml	CMV	20	20	0

Nachweisgrenze bei Vollblut- und Plasmaproben und ELITE BeGenius					
Probe	Titer	Ziel	Anzahl	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	109 IU/ml	CMV	20	20	0
In EDTA entnommenes Plasma	88 IU/ml	CMV	20	19	1

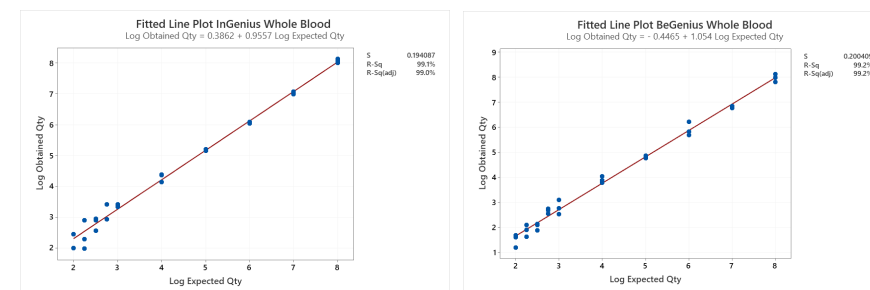
Der LoD-Wert der CMV-Zielsequenz wurde für in EDTA entnommenes Vollblut bei 109 IU/ml und für in EDTA entnommenes Plasma bei 88 IU/ml bestätigt.

Linearer Messbereich

Vollblut:

Der lineare Messbereich des CMV ELITE MGB® Kits, der in Verbindung mit Vollblut sowie **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verwendet wird, wurde mit einer Reihe getestet, die durch Verdünnen eines CMV-Referenzmaterials (Notovir, Italien) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt wurde. Die Reihe bestand aus acht Verdünnungspunkten von 10⁸ bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay zusammen mit Vollblutproben bei allen Verdünnungsstufen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R²) eine lineare Reaktion von 0,991 bei **ELITE InGenius** und 0,992 bei **ELITE BeGenius** aufweist.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde auf die Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2702 log IU/ml bei ELITE InGenius und 0,1925 log IU/ml bei ELITE BeGenius) und genaue (systematische Messabweichung = 0,3453 log IU/ml bei ELITE InGenius und -0,1462 log IU/ml bei ELITE BeGenius) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 178 IU/ml.

Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde festgesetzt auf die höchste getestete Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0597 log IU/ml bei ELITE InGenius und 0,1590 log IU/ml bei ELITE BeGenius) und genaue (systematische Messabweichung bis -0,0683 log IU/ml bei ELITE InGenius und 0,0249 log IU/ml bei ELITE BeGenius) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 100.000.000 IU/ml.

Der lineare Messbereich in gEq/ml für Vollblut wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 32 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Vollblutproben bei ELITE InGenius und ELITE BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	178	100.000.000
gEq/ml	254	142.857.143

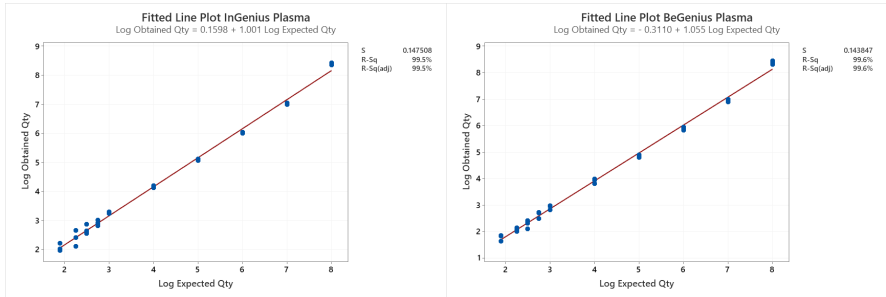
Plasma (Probenvolumen 200 µl):

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Der lineare Messbereich des CMV ELITE MGB® Kits, der in Verbindung mit Plasma sowie ELITE InGenius und ELITE BeGenius verwendet wird, wurde mit einer Reihe getestet, die durch Verdünnen eines CMV-Referenzmaterials (Notovir, Italien) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt wurde. Die Reihe bestand aus acht Verdünnungspunkten von 10⁸ bis 80 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay zusammen mit Plasmaproben bei allen Verdünnungsstufen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R²) eine lineare Reaktion von 0,995 bei ELITE InGenius und 0,996 bei ELITE BeGenius aufweist.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde auf die LoD-Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2701 log IU/ml bei ELITE InGenius und 0,2114 log IU/ml bei ELITE BeGenius) und genaue (systematische Messabweichung = 0,3314 log IU/ml bei ELITE InGenius und -0,0619 log IU/ml bei ELITE BeGenius) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 88 IU/ml.

Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde festgesetzt auf die höchste getestete Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0351 log IU/ml bei ELITE InGenius und 0,0675 log IU/ml bei ELITE BeGenius) und genaue (systematische Messabweichung bis -0,3988 log IU/ml bei ELITE InGenius und -0,3865 log IU/ml bei ELITE BeGenius) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 100.000.000 IU/ml.

Der lineare Messbereich als gEq/ml für Plasma wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 32 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITE InGenius und ELITE BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	88	100.000.000
gEq/ml	293	333.333.334

Andere Matrices

Die Linearität dieses Assays in Verbindung mit ELITE InGenius wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen in den folgenden verschiedenen Matrices überprüft: Plasma (Probenvolumen 1000 µl), Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, BAL/BA.

Die Linearität im Modus „PCR Only“ (nur PCR) wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) einer Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 2 x 10⁶ Genomäquivalenten pro Reaktion bis 2 x 10¹ Genomäquivalenten pro Reaktion wurden in 5 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit den Produkten der ELITEchGroup S.p.A. durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungen eine lineare Reaktion aufweist (Quadrat des Korrelationskoeffizienten über 0,99).

Die Linearität im Modus „Extract+PCR“ (Extraktion + PCR) dieses Assays, der in Verbindung mit verschiedenen Matrices und ELITE InGenius verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) von 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in mindestens 3 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Laufeinrichtung, Extraktion von Nukleinsäuren, Echtzeit-Amplifikation und

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Dateninterpretation, mit ELITE InGenius und Produkten der ELITEchGroup S.p.A. durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungsstufen eine lineare Reaktion aufweist.

Bestimmungsgrenzen

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die niedrigste Konzentration festgesetzt, bei der 100 % Positivität sowie quantitative Ergebnisse mit einer Genauigkeit und Präzision innerhalb von ±0,5 log IU/ml erzielt werden. Die obere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der quantitative Ergebnisse mit einer Genauigkeit und Präzision innerhalb von ±0,5 log IU/ml erzielt werden.

Der lineare Messbereich als gEq/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 32 angegeben ist.

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

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
1000 µl	IU/ml	178	1.500.000
	gEq/ml	593	5.000.000

Linearer Messbereich für Liquorproben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	101	15.000.000
	gEq/ml	335	50.000.000

Linearer Messbereich für Urinproben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	316	35.000.000
	gEq/ml	451	50.000.000

Linearer Messbereich für Mundschleimhaut-Abstrichproben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	100	10.000.000
	gEq/ml	500	50.000.000

Linearer Messbereich für Fruchtwasserproben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	100	10.000.000
	gEq/ml	500	50.000.000

Linearer Messbereich für BAL/BA-Proben und ELITE InGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	178	10.000.000
	gEq/ml	890	50.000.000

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der mit dem Produkt CMV ELITE MGB Kit in Kombination mit den Systemen ELITE InGenius und ELITE BeGenius erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von in EDTA entnommenen Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 327 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1090 IU/ml) mit zertifiziertem CMV-Referenzmaterial („1st WHO International Standard for CM Virus DNA“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) dotiert waren.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf ELITE InGenius durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem ELITE InGenius System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE InGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der Internal Control wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Wiederholpräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITE InGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	24,18	0,17	0,69
3 x LoD	8/8	35,91	0,51	1,42				
10 x LoD	8/8	33,98	0,29	0,86				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITE InGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-	48/48	24,20	0,22	0,90
3 x LoD	16/16	36,09	0,78	2,15				
10 x LoD	16/16	34,07	0,25	0,75				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die CMV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 2,2 % bei CMV und 0,9 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der Internal Control wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Wiederholpräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITE BeGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	27,21	0,38	1,39
3 x LoD	8/8	37,21	0,49	1,33				
10 x LoD	8/8	35,03	0,52	1,48				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITE BeGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-	48/48	27,18	0,37	1,38
3 x LoD	16/16	37,51	0,61	1,63				
10 x LoD	16/16	35,06	0,44	1,25				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITE BeGenius** erkannte der Assay die CMV-Zielsequenz wie

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,6 % bei CMV und 1,4 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt CMV ELITE MGB Kit in Kombination mit den Systemen **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 327 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1090 IU/ml) mit zertifiziertem CMV-Referenzmaterial („1st WHO International Standard for CM Virus DNA“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) dotiert waren.

Die geräteübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch zwei verschiedene Bediener in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, an zwei Tagen unter Verwendung derselben Charge und von zwei verschiedenen Geräten bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE InGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die chargenübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch ein und denselben Bediener in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, unter Verwendung von zwei verschiedenen Chargen und mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE InGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der Internal Control wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITE InGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	25,31	0,71	2,82
3 x LoD	8/8	35,96	0,81	2,26				
10 x LoD	8/8	33,62	0,36	1,07				

Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITE InGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	25,20	0,65	2,59
3 x LoD	8/8	35,97	0,65	1,82				
10 x LoD	8/8	33,72	0,29	0,86				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die CMV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 2,3 % bei CMV und 2,8 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Die geräteübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch zwei verschiedene Bediener in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag, an zwei Tagen unter Verwendung derselben Charge und von zwei verschiedenen Geräten bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die chargenübergreifende Vergleichspräzision wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben durch ein und denselben Bediener in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, unter Verwendung von zwei verschiedenen Chargen und mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen auf dem **ELITE BeGenius** System im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verarbeitet.

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der Internal Control wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITE BeGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	28,29	0,48	1,69
3 x LoD	8/8	36,06	0,46	1,27				
10 x LoD	8/8	34,12	0,23	0,66				

Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITE BeGenius								
Probe	CMV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	28,30	0,47	1,65
3 x LoD	8/8	36,19	0,51	1,41				
10 x LoD	8/8	34,22	0,12	0,36				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITE BeGenius** erkannte der Assay die CMV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,4 % bei CMV und 1,7 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays wurde die kalibrierte Reihe «CMV Molecular „Q“ Panel» (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit dem **ELITE InGenius** System und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die ab 200 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,024
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,996
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,060
CMVMQP01-Negative	negativ	-	0/2	-

Alle positiven Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log nachgewiesen.

Die ab 1000 µl Probe erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	4,679
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,717
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	2,733
CMVMQP01-Negative	negativ	-	0/2	-

Alle positiven Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log nachgewiesen.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde die Reihe „QCMD 2014 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für **ELITE InGenius** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Konsensus log IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMVDNA14-01	2,468	0,343	2/2	2,256
CMVDNA14-02	3,034	0,281	2/2	2,915
CMVDNA14-03	3,383	0,368	2/2	3,185
CMVDNA14-04	3,014	0,251	2/2	2,976
CMVDNA14-05	1,859	0,462	2/2	1,706
CMVDNA14-06	2,767	0,325	2/2	2,526
CMVDNA14-07	4,030	0,280	2/2	3,924
CMVDNA14-08	Negativ	-	0/2	-
CMVDNA14-09	2,065	0,512	2/2	1,273
CMVDNA14-10	3,947	0,278	2/2	3,946

Alle Proben wurden richtig erkannt. Acht (8) von neun positiven Proben wurden innerhalb des vom EQA-Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert und eine Probe (CMVDNA14-09) wurde innerhalb von 2 SD quantifiziert. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Probentiter unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze liegt.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde die kalibrierte Reihe „AcroMetrix® CMV_{ic} Panel“ (Acrometrix, Life Technologies, USA) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für **ELITE InGenius** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMV DNA 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,386
CMV DNA 3E5	300.000	5,477	2/2	5,444
CMV DNA 3E4	30.000	4,477	2/2	4,473
CMV DNA 3E3	3.000	3,477	2/2	3,441
CMV DNA 3E2	300	2,477	2/2	2,575

Alle Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log nachgewiesen.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde ab einem Probenvolumen von 1000 µl die Reihe „QCMD 2017 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für **ELITE InGenius** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius			
Probe	Konsensus log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMVDNA17S-01	2,431	2/2	2,362
CMVDNA17S-02	3,762	2/2	3,665
CMVDNA17S-03	3,920	2/2	3,822
CMVDNA17S-04	2,847	2/2	2,671
CMVDNA17S-05	2,572	2/2	2,189
CMVDNA17S-06	2,849	2/2	2,658
CMVDNA17S-07	3,902	2/2	3,785
CMVDNA17S-08	3,746	2/2	3,667
CMVDNA17S-09	Negativ	0/2	-
CMVDNA17S-10	3,900	2/2	3,707

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Alle Proben wurden richtig erkannt. Die positiven Proben wurden mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log angegeben.

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der Umrechnungsfaktor zur Umrechnung eines quantitativen Ergebnisses von gEq/ml in internationale Einheiten (International Units, IU) / ml wurde mithilfe einer Reihe von mindestens drei Verdünnungen (1 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in verschiedenen, negativ auf CMV-DNA getesteten Matrices berechnet.

Jeder Punkt der Reihe wurde in mindestens 10 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die gesamte Analyse, Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

Faktor zur Umrechnung in internationale Einheiten mit ELITE InGenius		
Probenvolumen	Matrix	Umrechnungsfaktor Fc (IU/gEq)
200 µl	Vollblut	0,7
	Plasma	0,3
	Liquor	0,3
	Urin	0,7
	Mundschleimhautabstrich	0,2
	Fruchtwasser	0,2
	BAL/BA	0,2
1000 µl	Plasma	0,3

Der Umrechnungsfaktor des CMV ELITE MGB® Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem **Vollblut** und **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus sieben Verdünnungspunkten von zirka 10⁶ IU/ml bis 10^{2,5} IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Präzision der Zielquantifizierung als Standardabweichung von log IU/ml lag sowohl bei **ELITE InGenius** als auch bei **ELITE BeGenius** unter 0,5 log.

Die Genauigkeit der Zielquantifizierung als Differenz zwischen der theoretischen und der gemessenen Konzentration in log IU/ml lag sowohl bei **ELITE InGenius** als auch bei **ELITE BeGenius** unter 0,5 log.

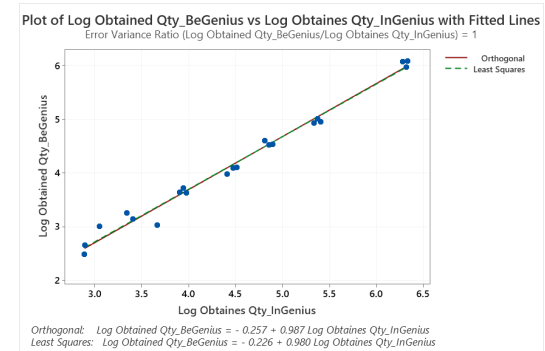
Diese Ergebnisse bestätigten den für Vollblut mit **ELITE InGenius** berechneten Umrechnungsfaktor.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen den Methoden wurden die mit **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von -0,257 (95%-KI: -0,503 bis -0,011) und eine Steigung von 0,987 (95%-KI: 0,934 bis 1,040). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R²-Wert von 0,986.

Der Umrechnungsfaktor des CMV ELITE MGB® Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem **Plasma** (Probenvolumen 200 µl) und **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus acht Verdünnungspunkten von zirka 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

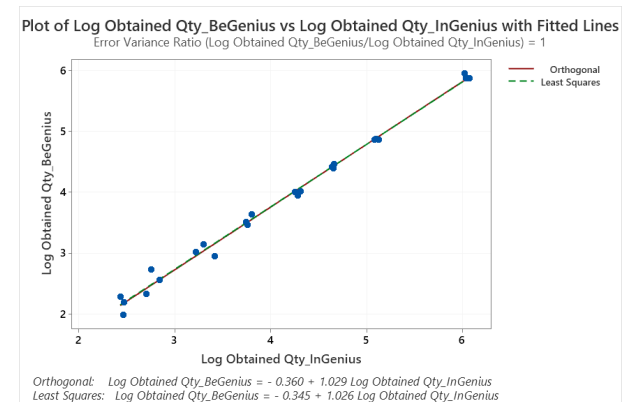
Die Präzision der Zielquantifizierung als Standardabweichung von log IU/ml lag sowohl bei **ELITE InGenius** als auch bei **ELITE BeGenius** unter 0,5 log.

Die Genauigkeit der Zielquantifizierung als Differenz zwischen der theoretischen und der gemessenen Konzentration in log IU/ml lag sowohl bei **ELITE InGenius** als auch bei **ELITE BeGenius** unter 0,5 log.

Diese Ergebnisse bestätigten die für Vollblut mit **ELITE InGenius** berechneten Umrechnungsfaktoren.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen den Methoden wurden die mit **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



In diesem Test ergab die orthogonale Regressionsanalyse eine Steigung von 1,029 (95%-KI: 0,993 - 1,065) und einen Achsenabschnitt von -0,360 (95%-KI: -0,510; -0,209). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R²-Wert von 0,993.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Robustheit: Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination

Die Robustheit des Assays als das Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination wurde mittels Analyse der Ergebnisse aus fünf Läufen, in denen CMV-DNA-negative Proben abwechselnd mit CMV-DNA-dotierten Proben untersucht wurden, verifiziert. Keine der CMV-DNA-negativen Proben erzielte ein positives Ergebnis.

Das Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination wurde mithilfe einer CMV-DNA-negativen Vollblutprobe, die mit von der WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) anerkanntem kalibriertem Referenzmaterial dotiert war, bei einer Viruslast von 10.000 IU/ml, und einer CMV-DNA-negativen Vollblutprobe verifiziert. Es wurden fünf Reihen von 12 Proben getestet, wobei sich jeweils eine dotierte Probe mit einer negativen Probe abwechselte. Dabei wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	30	0	30

Robustheit: Fehlerrate des Gesamtsystems

Die Robustheit des Assays als die Fehlerrate des Gesamtsystems in Bezug auf falsch-negative Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von CMV-DNA-dotierten, niedrigtitrigen Proben verifiziert und lag demnach bei 1,7 %.

Die Fehlerrate des Gesamtsystems wurde mithilfe einer CMV-DNA-negativen Vollblutprobe, die mit kalibriertem und zertifiziertem Referenzmaterial CMVDNA12-01, einer Probe des „QCMD 2012 Human Cytomegalovirus EQA Panel“ (Qnostics, Vereinigtes Königreich), dotiert war, bei einer Viruslast von 750 IU/ml verifiziert. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-dotiertes Vollblut	60	59	1

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Vollblut und Plasma (Probenvolumen 200 µl):

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-positiver klinischer Proben in Verbindung mit **ELITe InGenius** bewertet. Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufweist, Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit **ELITe InGenius** erhaltene diagnostische Sensitivität des Assays auch für **ELITe BeGenius**.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

- 60 in EDTA entnommenen Vollblutproben, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).
- 54 in EDTA entnommenen Plasmaproben von Patienten, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Vollblut	60	60	0
	In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Plasma	54	54	0

Alle Vollblut- und Plasmaproben wurden als positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug in diesen Tests bei Vollblut- und Plasmaproben 100 %.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Andere Matrizes

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-positiver klinischer Proben in Verbindung mit **ELITe InGenius** und den folgenden Matrizes bewertet: Plasma (Probenvolumen 1000 µl), Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, BAL/BA.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

- 20 CMV-DNA-negativen Liquorproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) mit CMV-DNA dotiert waren.
- 31 Urinproben von Patienten, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).
- 50 CMV-DNA-negativen Mundschleimhaut-Abstrichproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) mit CMV-DNA dotiert waren.
- 11 Fruchtwasserproben von CMV-DNA-positiven Patienten (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und an 20 CMV-DNA-negativen Fruchtwasserproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) mit CMV-DNA dotiert waren.
- 49 BAL/BA-Proben von Patienten, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).

Der Test ab 1000 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an in 60 EDTA entnommenen Plasmaproben von Patienten, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	Mit CMV-DNA dotierter Liquor	20	20	0
	CMV-DNA-positiver Urin	31	31	0
	Mit CMV-DNA dotierter Mundschleimhautabstrich	50	50	0
	CMV-DNA-positives oder mit CMV-DNA dotiertes Fruchtwasser	31	31	0
	BAL/BA, CMV-DNA-positiv	49	49	0
1000 µl	In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Plasma	60	58	2

Alle Proben aller Matrizes, die ab einem Volumen von 200 µl analysiert wurden, wurden als positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug in diesen Tests 100 % bei jeder Matrix.

Alle analysierten Plasmaproben ab 1000 µl Probenvolumen waren zur Analyse valide, 58 von 60 Plasmaproben wurden als positiv bestätigt, zwei Proben waren abweichend negativ.

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug in diesem Test 96,6 % bei Plasma.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Vollblut und Plasma (Probenvolumen 200 µl):

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-negativer klinischer Proben in Verbindung mit **ELITe InGenius** bewertet. Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit **ELITe InGenius** erhaltene diagnostische Sensitivität des Assays auch für **ELITe BeGenius**.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

- 59 in EDTA entnommenen Vollblutproben, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).
- 58 in EDTA entnommenen Plasmaproben von Patienten, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	59	4	55
	In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Plasma	58	1	57

Alle Proben waren zur Analyse valide. Der Ct-Grenzwert für die IC wurde auf 35 für beide Matrizes festgelegt.

Fünfundfünfzig (55) von 59 Vollblutproben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, vier Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass die Nachweisgrenze der Referenzmethode höher liegt als die Nachweisgrenze des untersuchten Produkts.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Vollblut betrug bei diesem Test 93,2 %.

Siebenundfünfzig (57) von 58 Vollblutproben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, eine Probe war abweichend positiv bei niedrigem Titer.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Plasma betrug bei diesem Test 98,3 %.

Andere Matrizes

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-negativer klinischer Proben in Verbindung mit **ELITE InGenius** und den folgenden Matrizes bewertet: Plasma (Probenvolumen 1000 µl), Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, BAL/BA.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

- 7 CMV-DNA-negativen Liquorproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und 3 vermutlich CMV-DNA-negativen Liquorproben.
- 8 CMV-DNA-negativen Urinproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und 46 vermutlich CMV-DNA-negativen Urinproben.
- 52 vermutlich CMV-DNA-negativen Mundschleimhaut-Abstrichproben.
- 10 CMV-DNA-negativen Fruchtwasserproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und 22 vermutlich CMV-DNA-negativen Fruchtwasserproben.
- 49 CMV-DNA-negativen BAL/BA-Proben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).

Der Test ab 1000 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an 57 in EDTA entnommenen, vermutlich CMV-DNA-negativen Plasmaproben.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	CMV-DNA-negativer oder vermutlich CMV-DNA-negativer Liquor	20	0	20
	CMV-DNA-negativer oder vermutlich CMV-DNA-negativer Urin	54	0	54
	Vermutlich CMV-DNA-negativer Mundschleimhautabstrich	52	2	50
	CMV-DNA-negatives oder vermutlich CMV-DNA-negatives Fruchtwasser	32	0	32
	BAL/BA, CMV-DNA-negativ	49	0	49
1000 µl	In EDTA entnommenes, vermutlich CMV-DNA-negatives Plasma	57	3	54

Alle analysierten Proben ab 200 µl Probenvolumen waren zur Analyse valide. Der Ct-Grenzwert für die IC wurde auf 35 für alle Matrizes festgelegt.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Fünzig (50) von 52 Mundschleimhaut-Abstrichproben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, zwei Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Mundschleimhautabstrichen betrug 96 %.

Alle Fruchtwasser-, Urin-, Liquor- und BAL/BA-Proben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Fruchtwasser, Urin und Liquor betrug 100 %.

Alle analysierten Proben ab 1000 µl Probenvolumen waren zur Analyse valide.

Vierundfünfzig (54) von 57 Proben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, drei (3) Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 94,7 %.

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

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden:

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die DNA-Extraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut (Zellprobe) mit dem Kit „**EXTRABlood**“ durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probenvolumen und eluieren Sie die Nukleinsäuren in **100 µl** Elutionspuffer.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit **ELITE STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100_S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärrohrröhrchen können direkt auf „**ELITE STAR**“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit **ELITE GALAXY** und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)**, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 200 µl eluiert. Proben in Primärrohrröhrchen können direkt auf „**ELITE GALAXY**“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrentyp, erforderlich. **10 µl/Probe von CPE** hinzufügen. Der **CPE** muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Gerät «**NucliSENS® easyMAG®**» durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und die folgenden Anweisungen: **100 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, den Streifen auf das Gerät laden und die Extraktion **ohne Lyseinkubation** ausführen. Nachdem das Gerät **EasyMAG® Lysis Buffer** hinzugefügt hat, den Streifen nicht herausnehmen und den Streifeninhalt dreimal mit der mitgelieferten Mehrkanalpipette unter Anwendung des Programms Nr. 3 mischen. 10 Minuten inkubieren, dann mithilfe der Mehrkanalpipette **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** unter Anwendung des Programms Nr. 3 zum Streifeninhalt hinzufügen und mit der Extraktion fortfahren. Die Nukleinsäuren in **50 µl** Elutionspuffer eluieren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Gerät «**QIASymphony® SP/AS**» und dem Kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» und der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **Virus Blood 200_V4_default IC** und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärrohrröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **200 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Röhrrchen mit dem ATE-Puffer wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angegeben in das Fach „internal control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **60 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit **ELITe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100_S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „**ELITe STAR**“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit **ELITe GALAXY** und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)**, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 200 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf „**ELITe GALAXY**“ geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **10 µl/Probe von CPE** hinzufügen. Der **CPE** muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ und dem Kit „**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**“ mit der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**“ und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **500 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Lösung mit dem AVE-Puffer und dem RNA-Träger gemäß der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits ansetzen. Für jede angeforderte Probe **6 µl CPE** zur Lösung hinzufügen. Die Röhrchen mit der Lösung wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angeben in das Fach „internal control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **85 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Liquor

Die Liquorproben für die Nukleinsäureextraktion müssen unter Vermeidung einer Kontamination mit Patientenblut gemäß den Laborrichtlinien entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Liquor mit dem Gerät „**NucliSENS® easyMAG®**“ durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und die folgenden Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen und die Extraktion ausführen. Nach der 10-minütigen Inkubation **5 µl CPE** für die interne Kontrolle und anschließend das **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen und mit der Extraktion fortfahren. Die Nukleinsäuren in **100 µl** Elutionspuffer eluieren.

Urin

Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie bei +2 bis +8 °C für maximal drei Tage aufbewahrt werden. Falls möglich, das Einfrieren von Morgenurinproben vermeiden. Das Einfrieren kann die Fällung von Inhibitoren und den Verlust des DNA-Titers verursachen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen, und maximal dreißig Tage bei -20 °C bzw. länger bei -70 °C aufzubewahren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Urinproben mit dem Gerät „**NucliSENS® easyMAG®**“ durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und die folgenden Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, den Streifen auf das Gerät laden und die Extraktion ausführen. Nach der 10-

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

minütigen Inkubation **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend mithilfe der Mehrkanalpipette das **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** unter Anwendung des Programms Nr. 3 zum Streifeninhalt hinzufügen und mit der Extraktion fortfahren. Die Nukleinsäuren in **100 µl** Elutionspuffer eluieren.

Andere Proben:

Es liegen keine Daten über die Leistung des Produkts bei der Extraktion von DNA aus folgenden klinischen Proben vor: Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Bronchialaspirat (BA), Leukozytensuspensionen oder Granulozytensuspensionen.

Störende Substanzen

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

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

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

Amplifikationskontrollen

Es ist unbedingt erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Für die Negativkontrolle hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) verwenden.

Für die Positivkontrolle das Produkt „**CMV - ELITe Positive Control**“ oder das Produkt „**CMV ELITe Standard**“ verwenden.

Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren für jeden Extraktions- und Amplifikationslauf durch Testen von Prozesskontrollen, d. h. einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden. Ein Beispiel für handelsübliche externe Kontrollen ist „**CMV Molecular Q Panel**“ (Art.-Nr. CMVMQP01 von Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich).

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

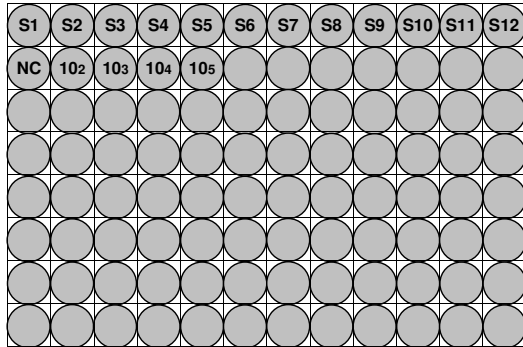
Bei Verwendung des Geräts **7300 Real-Time PCR System**.

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

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

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

Nachfolgend ist beispielhaft aufgeführt, wie die quantitative Analyse von 12 Proben organisiert werden kann.



Legende: S1 - S12: Zu analysierende Proben; NC: Negative Control der Amplifikation;
102: 102-Standard-gEq; 103: 103-Standard-gEq; 104: 104-Standard-gEq; 105: 105-Standard-gEq.

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

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

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

- die Zeitsteuerung wie in der Tabelle „**Temperaturzyklus**“ angegeben ändern;
- die Anzahl Zyklen auf **45** einstellen;
- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion („Sample volume“ (Probenvolumen)) auf **30 µl** einstellen;
- optional: die Dissoziationsphase hinzufügen („Add Dissociation Stage“) und den Temperaturbereich von **40 °C bis 80 °C** einstellen.

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

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

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

- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen und „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die CMV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „CMV“ nennen.

- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ähnelt VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen;
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „Cy5“ (AP593 wird statt Cy5 verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

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

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

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

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

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

- die Zeitsteuerung wie in der Tabelle „**Temperaturzyklus**“ angegeben ändern;
- die Anzahl Zyklen auf **45** einstellen;
- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion („Sample volume“ (Probenvolumen)) auf **30 µl** einstellen;
- optional: die Dissoziationsphase hinzufügen („Add Dissociation Stage“) und den Temperaturbereich von **40 °C bis 80 °C** einstellen.

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

Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Röhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten **CMV Q - PCR Mix** Röhrchen auftauen und beachten, dass jedes Röhrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern;
- die Röhrchen **CMV Q - PCR Standard** auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern;
- die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Mikrotiterplatte** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und darauf achten, dass die Vertiefungen nicht beschädigt werden.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

1. **20 µl CMV Q - PCR Mix** präzise auf den Boden der Vertiefungen in der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

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

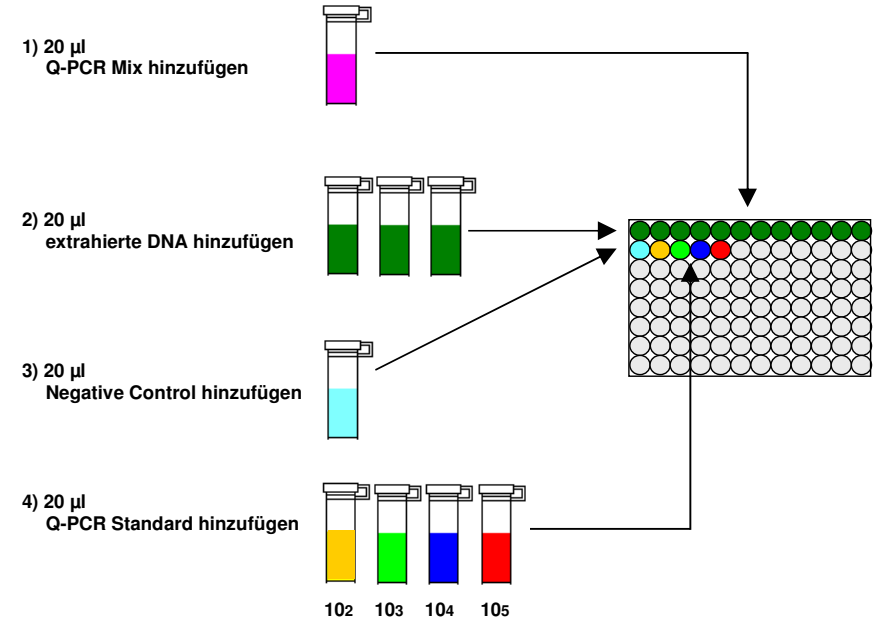
2. **20 µl DNA-Extrakt** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen Proben **extrahierter DNA** auf die gleiche Weise verfahren.
3. **20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** der Negativkontrolle der Amplifikation mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
4. **20 µl CMV Q - PCR Standard 102** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **Mikrotiterplatte für die Amplifikation** pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **CMV Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **CMV Q - PCR Standards (103, 104, 105)** auf die gleiche Weise verfahren.
5. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit der **Amplifikations-Dichtungsfolie** dicht verschließen.
6. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-CMV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus muss die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit den Reaktionsprodukten aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt beseitigt werden. Um ein Verschütten der Reaktionsprodukte zu vermeiden **darf die Amplifikations-Dichtungsfolie nicht von der Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernt werden.**

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

In der folgenden Abbildung ist die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion zusammengefasst dargestellt.



Hinweis: Wenn die Amplifikation mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ vorbereitet wird, die Mikrotiterplatte, welche die Extrakte, die Reagenzien und die Amplifikations-Mikrotiterplatte enthält, mithilfe der Spezialadapter in die dafür vorgesehenen Fächer einsetzen, anschließend die Angaben in der Gebrauchsanweisung des Einrichtmoduls und die von der Software geforderten Schritte befolgen.

Hinweis: Wenn die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion mit dem Gerät „**ELITe GALAXY**“ durchgeführt wird, die Elutions-Mikrotiterplatte, den Q-PCR Mix und die Amplifikations-Mikrotiterplatte wie in der Gebrauchsanweisung des Geräts angegeben laden und die Schritte auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.

Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen CMV-Sonde (FAM-Detektor „CMV“) und der spezifischen Sonde für die interne Kontrolle (VIC-Detektor „IC“) in den Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
- manuell („Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle“ (Ergebnisse > Amplifikationsdarstellung > Delta Rn vs. Zyklus)) den Berechnungsbereich für die **Grundlinie** (Fluoreszenz-Hintergrundniveau) von Zyklus 6 auf Zyklus 15 ändern;

Hinweis: Bei einer positiven Probe mit einem hohen CMV-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der CMV-spezifischen Sonde bereits vor dem Zyklus 15 beginnen anzusteigen. In diesem Fall muss der Berechnungsbereich für die **Grundlinie** vom Zyklus 6 auf den von der Gerätesoftware („Results > Component“ (Ergebnisse > Komponente)) erkannten Zyklus, bei dem die FAM-Fluoreszenz der Probe anzusteigen beginnt, angepasst werden.

Bei Verwendung des Geräts **7300 Real-QIAs PCR System:**

- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den FAM-Detektor „CMV“ auf **0,1** einstellen;
- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,05** einstellen.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

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

- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den FAM-Detektor „CMV“ auf **0,2** einstellen;
- manuell den **Schwellenwert („Threshold“)** für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,1** einstellen.

Die Werte der von den spezifischen Sonden in der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz und der **Schwellenwert („Threshold“)** der Fluoreszenz ermöglichen die Bestimmung des **Schwellenwertzyklus („Threshold cycle (Ct“)**, d. h. des Zyklus, in dem die Fluoreszenz den **Schwellenwert** erreicht.

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

Reaktion Q - PCR Standard 10s FAM-Detektor „CMV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

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

Ist das Ergebnis der **Q - PCR Standard 10s** Amplifikationsreaktion **Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) oder liegt der Wert des **Korrelationskoeffizienten (R2)** nicht innerhalb der Grenzen des Akzeptanzbereichs, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikations- oder des Detektionsschritts Probleme aufgetreten sind (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardposition, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct**-Wert von CMV („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negativkontrolle FAM-Detektor „CMV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Weicht das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für die **Negative Control** bei CMV von „**Ct Undetermined“ (CT unbestimmt)** ab, wurde die Ziel-DNA nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion jeder **Probe** dient der **Ct**-Wert von CMV zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct**-Wert der Internal Control zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

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

Dieses Produkt ist in der Lage, eine Mindestmenge von zirka 10 Genomäquivalenten in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen (siehe „Leistungsmerkmale“).

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Ergebnisse als **Ct** der Amplifikationsreaktionen jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) werden wie in der folgenden Tabelle beschrieben verwendet:

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei CMV und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die interne Kontrolle effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder nicht vorhandene Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Abbau von Proben-DNA, Probe mit zu niedriger Zellzahl, Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei CMV und **Ct ≤ 35** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass die CMV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der CMV-DNA unter der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“) liegt. In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Hinweis: Wird in der Amplifikationsreaktion einer Probe die CMV-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der internen Kontrolle „Ct > 35“ oder „Ct Undetermined“ (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der Internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei CMV-DNA verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe dennoch geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

Quantitative Analyse der Ergebnisse

Nach Durchführung des Verfahrens für die qualitative Analyse der Ergebnisse kann die quantitative Analyse der Ergebnisse der positiven Proben durchgeführt werden.

Die **CMV-Ct**-Werte in den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) des Amplifikationslaufs dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, von zirka 1.000.000 bis zirka 10 Genomäquivalente pro Amplifikationsreaktion zu quantifizieren (siehe „Leistungsmerkmale“).

Probenergebnis FAM-Detektor „CMV“	CMV-Genomäquivalente pro Reaktion
Menge > 1 x 10 ⁶	MEHR ALS 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Menge ≤ 1 x 10 ⁶	= Menge
Menge < 1 x 10 ¹	WENIGER ALS 10

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

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

Dabei ist:

Vc die Menge der bei der Extraktion verwendeten Probe im Verhältnis zur gewünschten Maßeinheit;
Ep die Effizienz des Verfahrens, der Extraktion und der Amplifikation, **ausgedrückt als Dezimalzahl**;
Ve das Gesamtvolumen des extrahierten Produkts **ausgedrückt in µl**;
Va das Volumen des in der Amplifikationsreaktion verwendeten Extraktionsprodukts **ausgedrückt in µl**;
Menge ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der Probe **ausgedrückt in gEq pro Reaktion**.

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionskit „EXTRAblood“ verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „EXTRAblood“

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 25 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblut- und Plasmaproben und **ELITe STAR** verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Vollblut und Plasma und ELITe STAR

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 28 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblut- und Plasmaproben und **ELITe GALAXY** verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Vollblut und Plasma und ELITe GALAXY

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 35 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „NucliSENS® easyMAG®“

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 50 \times \text{Menge}$$

Werden Liquor- und Urinproben und das Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Liquor und Urin und „NucliSENS® easyMAG®“

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 10 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und «QIASymphony® SP/AS»

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 24 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und das Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und „QIASymphony® SP/AS“

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 12 \times \text{Menge}$$

Umrechnung des Ergebnisses in internationale Einheiten

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionskit „EXTRAblood“ verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „EXTRAblood“

$$Fc = 0,76 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 19,0 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und **ELITe STAR** verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Vollblut und ELITe STAR

$$Fc = 0,79 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 22,1 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und **ELITe STAR** verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Plasma und ELITe STAR

$$Fc = 1,10 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 30,8 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und **ELITe GALAXY** verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Vollblut und ELITe GALAXY

$$Fc = 0,51 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 17,9 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und **ELITe GALAXY** verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, lautet die Formel:

Vereinfachte Formel für Plasma und ELITe GALAXY

$$Fc = 0,27 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 9,5 \times \text{Menge}$$

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „NucliSENS® easyMAG®“

$$Fc = 0,61 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/ml)} = 30,5 \times \text{Menge}$$

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und das Extraktionssystem „**QIASymphony® SP/AS**“ verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „ QIASymphony® SP/AS “	
Fc = 0,46 IU/gEq	Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc
	Nc (IU/ml) = 11,0 x Menge

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und das Extraktionssystem „**QIASymphony® SP/AS**“ verwendet und muss das Ergebnis in **IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und „ QIASymphony® SP/AS “	
Fc = 0,87 IU/gEq	Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc
	Nc (IU/ml) = 10,4 x Menge

Dabei ist **Fc** der Umrechnungsfaktor, der mithilfe des von der WHO anerkannten kalibrierten Referenzmaterials „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich, berechnet wurde (siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze, ermöglicht den Nachweis von zirka 11 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien / 20 µl in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng / 20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 50 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA	50	50	0

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und „**EXTRAblood**“ verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde unter Verwendung von CMV-DNA-negativen, mit kalibriertem und zertifiziertem Referenzmaterial OptiQuant CMV DNA (AD169-Stamm, AcroMetrix Europe B.V., Niederlande) dotierten Vollblutproben angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 1 gEq/ml und 3.160 gEq/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 24 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und „ EXTRAblood “ (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	279 gEq/ml	198 gEq/ml	466 gEq/ml

Nachweisgrenze für Vollblutproben und „ EXTRAblood “ (gEq/Reaktion)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	11,2 gEq/Reaktion	7,9 gEq/Reaktion	18,6 gEq/Reaktion

Die Umrechnung von gEq/ml in gEq/Reaktion erfolgte wie auf Seite 38 angegeben.

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITe STAR** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3.160 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (IU/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	263 IU/ml	128 IU/ml	1.208 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	332 gEq/ml	162 gEq/ml	1.529 gEq/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml bei Vollblutproben und **ELITe STAR** wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 38 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITe STAR** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativem EDTA-Plasma angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3.160 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe STAR (IU/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	222 IU/ml	126 IU/ml	1.638 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe STAR (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	201 gEq/ml	114 gEq/ml	1.489 gEq/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml bei Plasmaproben und **ELITe STAR** wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 38 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 IU/ml und 560 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe GALAXY (IU/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	127 IU/ml	75 IU/ml	435 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe GALAXY (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	249 gEq/ml	147 gEq/ml	853 gEq/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml bei Vollblutproben und **ELITe GALAXY** wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 38 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativem EDTA-Plasma angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 IU/ml und 560 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe GALAXY (IU/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	140 IU/ml	86 IU/ml	381 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe GALAXY (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	519 gEq/ml	319 gEq/ml	1.411 gEq/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml bei Plasmaproben und **ELITe GALAXY** wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 38 angegeben ist.

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als linearer Messbereich, ermöglicht die Quantifizierung von zirka 1.000.000 bis zirka 10 Genomäquivalenten in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log10-Verdünnungsschritte) einer Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 2,5 x 107 Genomäquivalenten pro Reaktion bis 2,5 x 101 Genomäquivalenten pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit den Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungen eine lineare Reaktion aufweist (Quadrat des Korrelationskoeffizienten über 0,99).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und „**EXTRAblood**“ verwendet wurde, wurde auf etwa 13 gEq/Reaktion festgelegt, weil in der Untersuchung der Nachweisgrenze 316 gEq/ml die niedrigste Konzentration war, die eine 100 %ige Positivität ergab. Die untere Grenze des linearen Messbereichs liegt innerhalb von 1 Logarithmus ab dem Q - PCR Standard Amplifikationsstandard mit der niedrigsten Konzentration (102 gEq / 20 µl).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und „**EXTRAblood**“ verwendet wurde, wurde auf 10⁶ gEq/Reaktion festgelegt und liegt innerhalb von 1 Logarithmus ab dem Q - PCR Standard Amplifikationsstandard mit der höchsten Konzentration (105 gEq / 20 µl). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und „EXTRAblood“		
	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	240	19.000.000
gEq/ml	316	25.000.000
gEq/Reaktion	12,6	1.000.000

Die Umrechnung von gEq/ml in gEq/Reaktion und umgekehrt erfolgte wie auf Seite 38 angegeben. Die Umrechnung von gEq/ml in IU/ml und umgekehrt erfolgte wie auf Seite 39 angegeben.

Die untere Grenze des linearen Messbereichs dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde auf etwa 10 gEq/Reaktion festgelegt, weil in der Untersuchung der Nachweisgrenze 350 gEq/ml die niedrigste Konzentration war, die eine 100 %ige Positivität ergab. Die untere Grenze des linearen Messbereichs liegt innerhalb von 1 Logarithmus ab dem Q - PCR Standard Amplifikationsstandard mit der niedrigsten Konzentration (102 gEq / 20 µl).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde auf 10⁶ gEq/Reaktion festgelegt und liegt innerhalb von 1 Logarithmus ab dem Q - PCR Standard Amplifikationsstandard mit der höchsten Konzentration (105 gEq / 20 µl). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und ELITe GALAXY		
	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	178	17.800.000
gEq/ml	350	35.000.000
gEq/Reaktion	10	1.000.000

Die Umrechnung von gEq/ml in gEq/Reaktion und umgekehrt erfolgte wie auf Seite 38 angegeben. Die Umrechnung von gEq/ml in IU/ml und umgekehrt erfolgte wie auf Seite 39 angegeben.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) für Ct von unter 2 % innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 21 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit des Assays als die Differenz zwischen dem mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhaltenen Mittelwert der Ergebnisse und der theoretischen Konzentration der Probe ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit (% Ungenauigkeit) von zirka 20 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision und die Genauigkeit wurden anhand von für die Untersuchung des linearen Messbereichs gewonnenen Daten berechnet.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Die analytische Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, die verglichen wurden mit Ergebnissen, die mit anderen Assays in verschiedenen Laboren erhalten wurden, wurde durch Testen von zertifiziertem Referenzmaterial überprüft.

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von CMV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes und zertifiziertes Referenzmaterial verwendet (AD169-Stamm, QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die manuelle Extraktion mit „EXTRAblood“ und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit zertifiziertem Referenzmaterial „EXTRAblood“				
Probe	Konsensus log ₁₀ Viruskonz.	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
CMV09-01	4,368	0,465	2/2	4,064
CMV09-02	2,995	0,400	2/2	2,984
CMV09-03	2,297	0,583	2/2	2,038
CMV09-04	5,407	0,442	2/2	5,026
CMV09-05	2,996	0,444	2/2	2,902
CMV09-06	3,493	0,421	2/2	3,231
CMV09-07	4,379	0,412	2/2	4,129
CMV09-08	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
CMV09-09	6,374	0,457	2/2	5,943
CMV09-10	2,352	0,542	2/2	1,996
CMV09-11	2,407	0,513	2/2	2,105
CMV09-12	3,645	0,449	2/2	3,539

Alle Proben wurden richtig erkannt. Die erhaltenen quantitativen Ergebnisse liegen wie erforderlich innerhalb des vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten Bereichs ± 1 SD.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von CMV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit ELITe STAR und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für ELITe STAR und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe STAR				
Probe	Konsensus log ₁₀ Viruskonz.	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,580
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	4,111
CMV12-03	2,297	0,507	1/2	2,423
CMV12-04	2,021	0,617	1/2	2,320
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	3,529
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,594

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,321
CMV12-08	Negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	4,580
CMV12-10	2,826	0,456	1/2	4,111

Alle Proben wurden richtig erkannt. Die quantitativen Ergebnisse liegen innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 SD.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von CMV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit ELITe GALAXY und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für ELITe GALAXY und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe GALAXY				
Probe	Konsensus log ₁₀ Viruskonz.	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,010
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	3,484
CMV12-03	2,297	0,507	1/1	1,811
CMV12-04	2,021	0,617	2/2	1,647
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	2,511
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,106
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,319
CMV12-08	Negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	3,486
CMV12-10	2,826	0,456	2/2	2,593

Ein Replikat von CMV12-03 wurde wegen eines Systemfehlers während des ersten Extraktionsschritts aus der Analyse ausgeschlossen. In der qualitativen Analyse wurden alle Proben richtig erkannt. In der quantitativen Analyse wurden 8/9 Proben innerhalb einer Differenz von 0,5 log zum erwarteten Titer richtig quantifiziert. Die Proben CMV12-01 und CMV12-07 sind gepaarte Proben. Die Differenz zwischen CMV12-01 (4,035 Log₁₀) und CMV12-07 (3,296 Log₁₀) lag bei 0,691 und fällt damit in das erwartete Intervall. Das Ergebnis von CMV12-07 wurde als gültig betrachtet.

Analytische Sensitivität: Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Für die Umrechnung des quantitativen Ergebnisses von gEq/ml in internationale Einheiten / ml wurde der bei diesem Assay und in EDTA entnommenen **Vollblutproben** zu verwendende Umrechnungsfaktor definiert als:

0,76 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Kits „EXTRAblood“ für die manuelle Extraktion;

0,79 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „ELITe STAR“ für die automatische Extraktion;

0,51 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „ELITe GALAXY“ für die automatische Extraktion;

0,61 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „NucliSENS® easyMAG®“ für die automatische Extraktion;

0,46 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „QIA Symphony® SP/AS“ für die automatische Extraktion;

Für die Umrechnung des quantitativen Ergebnisses von gEq/ml in internationale Einheiten / ml wurde der bei diesem Assay und in EDTA entnommenen **Plasmaproben** zu verwendende Umrechnungsfaktor definiert als:

1,10 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „ELITe STAR“ für die automatische Extraktion;

0,27 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „ELITe GALAXY“ für die automatische Extraktion;

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

0,87 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung des Systems „QIASymphony® SP/AS“ für die automatische Extraktion.

Die Daten zu den jeweiligen Umrechnungsfaktoren sind nachfolgend aufgeführt.

In EDTA entnommenes Vollblut

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von vier Verdünnungen (0,5 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Vollblut berechnet.

Jeder Punkt der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden die gesamte Analyse, die Extraktion mit «**EXTRAblood**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,76 internationalen Einheiten pro gEq nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „EXTRAblood“ (Fc = 0,76 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	362.383	275.411	5,440
100.000	5,000	155.738	118.361	5,073
31.625	4,500	39.503	30.022	4,477
10.000	4,000	13.623	10.353	4,015

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet. Die gesamte Analyse wurde mit „**ELITe STAR**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,79 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „ELITe STAR“ (Fc = 0,79 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	566.090	464.398	5,620
100.000	5,000	135.119	106.744	4,997
31.625	4,500	42.655	33.698	4,488
10.000	4,000	14.486	11.444	4,014
3.162	3,500	3.717	2.936	3,401

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden die gesamte Analyse, Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITE GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,51 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „ELITe GALAXY“ (Fc = 0,51 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	473.265	240.507	5,370
100.000	5,000	217.626	110.595	5,036
31.625	4,500	55.656	28.284	4,438
10.000	4,000	24.229	12.313	4,076
3.162	3,500	7.809	3.968	3,575

Jeder Punkt der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem «NucliSENS® easyMAG®» und die

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,61 internationalen Einheiten pro gEq nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 0,61 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	564.835	344.549	5,537
100.000	5,000	178.704	109.009	5,037
31.625	4,500	51.454	31.387	4,497
10.000	4,000	14.141	8.626	3,936

Jeder Punkt der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,46 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,46 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	599.940	275.972	5,435
100.000	5,000	222.073	102.153	5,004
31.625	4,500	70.712	32.527	4,497
10.000	4,000	24.326	11.190	4,038

In EDTA entnommenes Plasma

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von vier Verdünnungen (0,5 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Plasma berechnet.

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet. Die gesamte Analyse wurde mit „**ELITE STAR**“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 1,10 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Plasmaproben nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „ELITe STAR“ (Fc = 1,10 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	282.851	311.136	5,481
100.000	5,000	107.043	117.747	5,048
31.625	4,500	30.868	33.955	4,512
10.000	4,000	8.632	9.495	3,972
3.162	3,500	2.814	3.096	3,468

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden die gesamte Analyse, Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITE GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,27 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Plasmaproben nachgewiesenem CMV.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „ELITe GALAXY“ (Fc = 0,27 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.228	5,500	1.095.881	301.020	5,413
100.000	5,000	460.141	126.393	5,033
31.623	4,500	117.258	32.209	4,448
10.000	4,000	43.980	12.081	4,053
3.162	3,500	13.713	3.767	3,546

Jeder Punkt der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,87 internationalen Einheiten (IU) pro gEq mittels Plasmaproben nachgewiesenem CMV.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „QIASymphony® SP/AS“ (Fc = 0,87 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	330.340	287.396	5,458
100.000	5,000	101.683	88.464	4,947
31.625	4,500	40.963	35.638	4,551
10.000	4,000	13.148	11.438	4,058

Diagnostische Sensitivität: Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nukleotid-Datenbanken bewertet.

Die Analyse der für die Hybridisierung der Primer und des Fluoreszenzmarkers ausgewählten Regionen in der Anordnung der in den Datenbanken u. a. für den Exon-4-CMV MIEA-Gen-, den AD169- und den Merlin-Stamm verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen wurde mittels eines Plasmidkonstrukts, das die amplifizierte Region des CMV-Stamms Merlin enthält, bewertet.

Für die Bewertung der Nachweis- und Quantifizierungseffizienz wurde ein Plasmidkonstrukt als Referenzmaterial verwendet, das die amplifizierte Region des CMV-Stamms Merlin (GENEART AG, Deutschland) enthielt. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 100.000, 10.000, 1.000, 100 und 10 Kopien pro Reaktion verdünnt. Jede Probe wurde mittels Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. getestet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Nachweis- und Quantifizierungseffizienz beim CMV-Stamm Merlin			
Probe	Theoretische Konzentration Kopien/Reaktion	Positive/Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse Kopien/Reaktion
Plasmid pMerlin 105	100.000	3/3	93.699
Plasmid pMerlin 104	10.000	3/3	8.815
Plasmid pMerlin 103	1.000	3/3	898
Plasmid pMerlin 102	100	3/3	100
Plasmid pMerlin 101	10	9/9	11

Das Plasmid pMerlin wurde bis zur Konzentration von 10 Kopien pro Reaktion richtig erkannt und quantifiziert.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-positiver klinischer Vollblutproben bewertet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 54 in EDTA entnommene Vollblutproben, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die manuelle Extraktion mit „EXTRAblood“ und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Vollblut	54	53	0

Eine Probe fiel in zwei unabhängigen Analyseläufen „ungültig“ aus. Das Ergebnis „ungültig“ wurde möglicherweise durch einen nicht identifizierten Inhibitor in der Probe verursacht. Diese Probe wurde nicht in die Berechnung der diagnostischen Sensitivität einbezogen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 60 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Vollblut	60	57	0

Drei Proben fielen in zwei unabhängigen Analyseläufen „ungültig“ aus.

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 68 in EDTA entnommene Plasmaproben verwendet, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Plasma	68	66	2

Zwei Proben ergaben mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein negatives Ergebnis. Diese Nichtübereinstimmung kann dadurch erklärt werden, dass der CMV-Titer der Probe nahe oder unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lag (280 gEq/ml).

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 97,1 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 60 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Vollblut	60	59	1

Eine Probe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein negatives Ergebnis. Diese Nichtübereinstimmung lässt sich möglicherweise durch einen Abbau der Probe erklären.

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 98,3 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 51 in EDTA entnommene Plasmaproben verwendet, die CMV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Plasma	51	47	4

Vier Proben ergaben mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein negatives Ergebnis. Die Titer der abweichenden Proben (<350 gEq/ml, <350 gEq/ml, 961 gEq/ml bzw. 534 gEq/ml) liegen nahe der Nachweisgrenze der verwendeten Methode.

In diesem Test lag die diagnostische Sensitivität bei 92,2 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 50 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern stammten und mit einer Probe von zertifiziertem kalibriertem Referenzmaterial (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen Titer von 1500 Kopien/ml dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, mit CMV-DNA dotiertes Vollblut	50	50	0

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 60 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern stammten und mit einer Probe von zertifiziertem kalibriertem Referenzmaterial (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen Titer von 700 Kopien/ml dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, mit CMV-DNA dotiertes Vollblut	60	60	0

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 60 in EDTA entnommene Plasmaproben verwendet, die von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern stammten und mit einer Probe von zertifiziertem kalibriertem Referenzmaterial (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen Titer von 360 Kopien/ml dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, mit CMV-DNA dotiertes Plasma	60	60	0

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 60 CMV-DNA-negative, mit einer Probe von zertifiziertem kalibriertem Referenzmaterial (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) positiv getestete Liquorproben verwendet, die auf einen Titer von 300 Kopien/ml dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
Mit CMV-DNA dotierter Liquor	60	60	0

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 52 CMV-DNA-positiv (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) klinische Urinproben als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
CMV-DNA-positiver Urin	52	52	0

Die diagnostische Sensitivität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Analytische Spezifität: Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Markern

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nukleotid-Datenbanken bewertet.

Die Analyse der Anordnung der Sequenzen der Primer und des Fluoreszenzmarkers mit den in Datenbanken für andere Organismen als CMV, darunter das komplette HHV6-Genom, verfügbaren Sequenzen ergab, dass das humane Herpesvirus, das CMV am meisten ähnelt, deren Spezifität und die Abwesenheit einer signifikanten Homologie aufzeigte.

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch Testen einiger CMV-DNA-negativer klinischer, HHV6-, EBV- oder VZV-DNA-positiver Proben verifiziert. Die Proben wurden als negativ bestätigt.

Für die Verifizierung der analytischen Spezifität wurden 16 in EDTA entnommene Vollblutproben, die CMV-DNA-negativ und HHV6-, EBV- oder VZV-DNA-positiv waren (getestet mit CE-IVD-Produkten zur Echtzeit-Amplifikation) als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, HHV6-DNA-positives Vollblut	8	0	8
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Vollblut	7	0	7
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-positives Vollblut	1	0	1

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger CMV-DNA-negativer klinischer Vollblutproben bewertet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 56 in EDTA entnommene Vollblutproben, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die manuelle Extraktion mit „EXTRAblood“ und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	56	0	56

Die diagnostische Spezifität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 70 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	70	0	63

Sieben Proben fielen in zwei unabhängigen Analyseläufen „ungültig“ aus.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 61 in EDTA entnommene Plasmaproben verwendet, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Plasma	61	0	61

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 66 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	66	0	65

Eine Probe fiel „ungültig“ aus, was möglicherweise durch einen nicht identifizierten Inhibitor in der Probe verursacht wurde. Diese Probe wurde nicht in die Berechnung der diagnostischen Sensitivität einbezogen.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 64 in EDTA entnommene Plasmaproben verwendet, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Plasma	64	0	64

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 50 in EDTA entnommene Vollblutproben von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-negatives Vollblut	50	0	50

Die diagnostische Spezifität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 60 in EDTA entnommene Vollblutproben von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-negatives Vollblut	60	1	59

Eine CMV-negative Blutprobe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein CMV-positives Ergebnis bei einem sehr niedrigen Virustiter (zirka 2 gEq/Reaktion). Diese Nichtübereinstimmung lässt sich durch eine latente CMV-Infektion erklären, da das Virus in der Bevölkerung weit verbreitet ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 98,3 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 60 in EDTA entnommene Plasmaproben von normalen, vermutlich CMV-DNA-negativen Spendern als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-negatives Plasma	60	1	59

Eine CMV-negative Plasmaprobe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein CMV-positives Ergebnis bei einem sehr niedrigen Virustiter (zirka 2 gEq/Reaktion). Diese Nichtübereinstimmung lässt sich durch eine latente CMV-Infektion erklären, da das Virus in der Bevölkerung weit verbreitet ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 98,3 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 60 Liquorproben, die CMV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
CMV-negativer Liquor	60	0	60

Die diagnostische Spezifität des Assays lag bei diesem Test über 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 56 CMV-DNA-negative (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) klinische Urinproben als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die automatische Nukleinsäureextraktion mit „NucliSENS® easyMAG®“ und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
CMV-DNA-negativer Urin	56	1	55

Eine CMV-negative Urinprobe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein CMV-positives Ergebnis. Diese Nichtübereinstimmung lässt sich durch einen sehr niedrigen Virustiter (4 gEq/Reaktion) erklären, der wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze der Referenzmethode lag. Die diagnostische Spezifität betrug 98,2 %.

Robustheit: Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination

Die Robustheit des Assays als das Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination wurde mittels Analyse der Ergebnisse aus fünf Läufen, in denen CMV-DNA-negative Proben abwechselnd mit CMV-DNA-dotierten Proben untersucht wurden, verifiziert. Keine der CMV-DNA-negativen Proben erzielte ein positives Ergebnis.

Das Nichtvorhandensein von Kreuzkontamination wurde mithilfe einer CMV-DNA-negativen, mit kalibriertem und zertifiziertem Referenzmaterial OptiQuant CMV DNA (AD169-Stamm, AcroMetrix Europe B.V., Niederlande) dotierten Vollblutprobe mit einer Viruslast von 8.300 gEq/ml und einer CMV-DNA-negativen Vollblutprobe verifiziert. Es wurden fünf Reihen von 12 Proben getestet, wobei sich jeweils eine dotierte Probe mit einer negativen Probe abwechselte. Dabei wurde das gesamte Analyseverfahren, d. h. die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-negatives Vollblut	30	0	30

Robustheit: Fehlerrate des Gesamtsystems

Die Robustheit des Assays als die Fehlerrate des Gesamtsystems in Bezug auf falsch-negative Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von CMV-DNA-dotierten, niedrigtitrigen Proben verifiziert und lag demnach unter 1,7 %.

Die Fehlerrate des Gesamtsystems wurde mithilfe einer Reihe von CMV-DNA-negativen, mit kalibriertem und zertifiziertem Referenzmaterial OptiQuant CMV DNA (AD169-Stamm, AcroMetrix Europe B.V., Niederlande) dotierten Vollblutproben mit einer Viruslast von 900 gEq/ml verifiziert. Für die Testung jeder Probe der Reihe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-dotiertes Vollblut	60	60	0

Roche cobas z 480 analyzer
PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden:

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die DNA-Extraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblutproben mit dem Gerät „MagNA Pure 24 System“ und der **Softwareversion 1.0** (oder entsprechenden späteren Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „Pathogen200“ und befolgen Sie diese Anweisungen: **350 µl** Probe in das MagNA Pure Tube 2.0 mL dispensieren, das Röhrchen in das Gerät einsetzen und mit der Extraktion beginnen. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt **CPE** bei 20 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl. Der **CPE** muss im Verhältnis 1:2 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie verdünnt werden. Nähere Details zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal drei Tage bei +2 bis +8 °C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen.

Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben unmittelbar vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasmaproben mit dem Gerät „MagNA Pure 24 System“ und der **Softwareversion 1.0** (oder entsprechenden späteren Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „Pathogen200“ und befolgen Sie diese Anweisungen: **350 µl** Probe in das MagNA Pure Tube 2.0 mL dispensieren, das Röhrchen in das Gerät einsetzen und mit der Extraktion beginnen. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt **CPE** bei 20 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl. Der **CPE** muss im Verhältnis 1:2 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie verdünnt werden. Nähere Details zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Urin

Urinproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in konservierungsmittelfreien Behältern entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal vier Stunden bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie bei +2 bis +8 °C für maximal drei Tage aufbewahrt werden. Falls möglich, das Einfrieren von Morgenurinproben vermeiden. Das Einfrieren kann die Fällung von Inhibitoren und den Verlust des DNA-Titers verursachen.

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen, und maximal dreißig Tage bei -20 °C bzw. länger bei -70 °C aufzubewahren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Urinproben mit dem Gerät „MagNA Pure 24 System“ und der **Softwareversion 1.0** (oder entsprechenden späteren Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „Pathogen200“ und befolgen Sie diese Anweisungen: **350 µl** Probe in das MagNA Pure Tube 2.0 mL dispensieren, das Röhrchen in das Gerät einsetzen und mit der Extraktion beginnen. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt **CPE** bei 20 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl. Der **CPE** muss im Verhältnis 1:2 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie verdünnt werden. Nähere Details zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Andere Proben:

Es liegen keine Daten über die Leistung des Produkts bei der Extraktion von DNA aus folgenden klinischen Proben vor: Liquor, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser, bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Bronchialaspirat (BA), Leukozytensuspensionen oder Granulozytensuspensionen.

Störende Substanzen

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

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

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

Amplifikationskontrollen

Es ist unbedingt erforderlich, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

Bei der Negativkontrolle muss statt der aus der Probe extrahierten DNA hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang des Kits enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt „**CMV - ELITE Positive Control**“ oder alternativ das Produkt „**CMV - ELITE Positive Control RF**“ oder das Produkt „**CMV ELITE Standard**“ verwenden.

Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, das gesamte Analyseverfahren für jeden Extraktions- und Amplifikationslauf durch Testen von Prozesskontrollen, d. h. einer negativ getesteten Probe und einer positiv getesteten Probe oder eines kalibrierten Referenzmaterials, zu validieren.

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

Bei Verwendung des Geräts **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

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

- den Steuerrechner und den Echtzeit-Thermocycler einschalten; Die dedizierte Software öffnen und im Hauptfenster unter „New Experiment“ (Neuer Versuch) einen Lauf öffnen;
- das Reaktionsvolumen („Reaction volume“) auf 40 µl einstellen;
- jeder Probe im Probeneditor („Sample editor“) eine ID zuweisen;
- den Temperaturzyklus der Reaktion gemäß der folgenden Tabelle definieren:

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

Hinweis: Die Fluoreszenzerfassung erfolgt einzeln; die Heizrate (°C/s) auf 4,4 °C/s einstellen.

- die Kanäle der Signalerfassung auswählen: „detector“ (Detektor) für den CMV-Sensor mit „channel FAM 465-510“ und „detector“ für den IC-Sensor mit „channel VIC 540-580“;

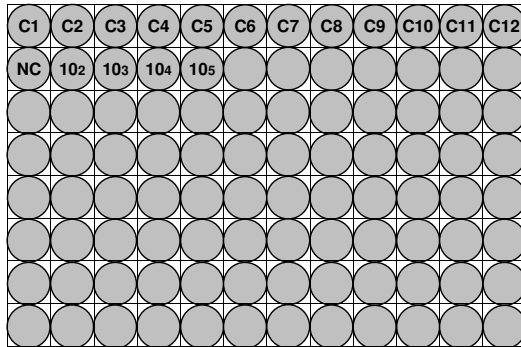
CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

Das am Ende dieses Benutzerhandbuchs angehängte **Arbeitsblatt** ausfüllen; dazu diese Informationen übertragen oder das Layout der Mikrotiterplatte ausdrucken. Dieses **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen der Konzentration von DNA in der Ausgangsprobe müssen Sie eine Reaktionsreihe mit dem **Q - PCR Standard** (10^5 gEq, 10^4 gEq, 10^3 gEq und 10^2 gEq) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

Nachfolgend ist beispielhaft aufgeführt, wie die quantitative Analyse von 12 Proben organisiert werden kann.



Legende: C1 - C12: Zu analysierende Proben; NC: Negative Amplifikationskontrolle;
10²: Standard 10^2 gEq; 10³: Standard 10^3 gEq; 10⁴: Standard 10^4 gEq; 10⁵: Standard 10^5 gEq.

Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen durchzuführen)

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Teströhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Teströhrchen mit dem **CMV Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass der Inhalt jedes Röhrchen für **25 Reaktionen** ausreicht. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- das Teströhrchen mit **CMV - Positive Control** oder alternativ **CMV - ELITe Positive Control RF** oder die Teströhrchen mit **CMV Q - PCR Standard** auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigte **AD-Platte** bereitlegen; darauf achten, dass sie nur mit puderfreien Handschuhen angefasst wird und die Vertiefungen nicht beschädigt werden.

1. **20 µl** des Reaktionsgemischs **CMV Q - PCR Mix** unter Vermeidung von Bläschenbildung präzise auf den Boden der Vertiefungen der **AD-Platte** überführen, wie zuvor auf dem **Arbeitsblatt** festgelegt.

Hinweis: Wenn das Reaktionsgemisch nicht vollständig aufgebraucht wird, das restliche Gemisch maximal einen Monat bei -20 °C aufbewahren. Das Reaktionsgemisch maximal 5 Gefrier- und Auftauzyklen unterziehen.

2. **20 µl extrahierte DNA** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor auf dem **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden. Mit der übrigen **extrahierten DNA** auf die gleiche Weise verfahren.

3. **20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch überführen, das zuvor im **Arbeitsblatt** als negative Amplifikationskontrolle festgelegt wurde. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTK015PLD

4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

- Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von CMV-DNA): **20 µl CMV - Positive Control** oder alternativ **CMV - ELITe Positive Control RF** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **CMV - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

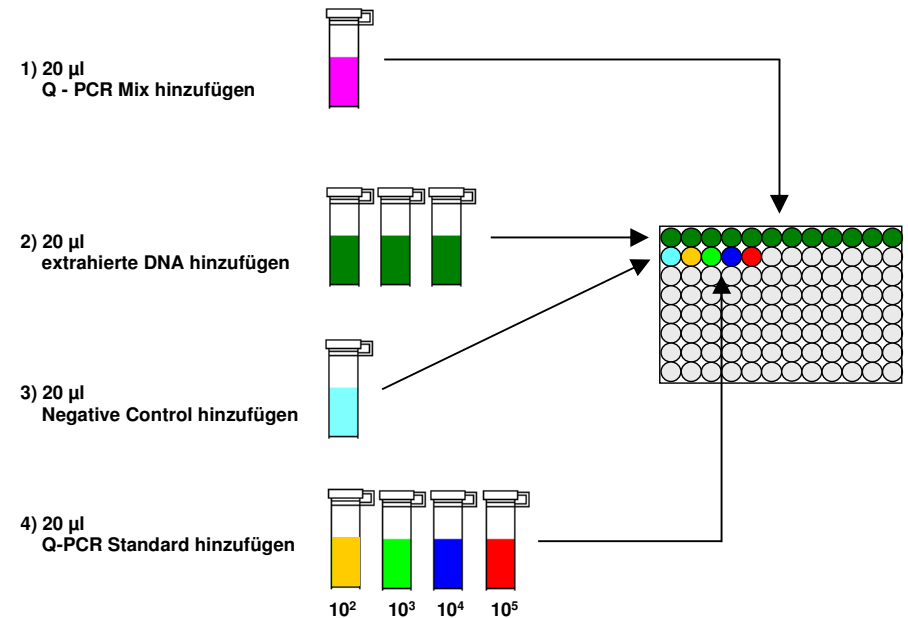
- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von CMV-DNA): **20 µl CMV Q - PCR Standard 102** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **CMV Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **CMV Q - PCR Standards (103, 104, 105)** auf die gleiche Weise verfahren.

5. Die **AD-Platte** vorsichtig mit der **Dichtungsfolie** dicht verschließen.

6. Die **AD-Platte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellungen mit einer eindeutigen und wiedererkennbaren ID (z. B. „Jahr-Monat-Tag-CMV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus müssen die **AD-Platte** und die Reaktionsprodukte aus dem Gerät entfernt und umweltgerecht entsorgt werden. **Niemals** die Dichtungsfolie von der **Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernen**, um ein Entweichen der Reaktionsprodukte zu vermeiden.

In der folgenden Abbildung ist die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion zusammengefasst.



Analyse der qualitativen Ergebnisse

Die Werte der ausgesendeten Fluoreszenz, die vom CMV-Detektor und dem IC-Detektor während der Amplifikationsreaktionen aufgezeichnet wurden, müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Im Menü „Analysis“ (Analyse) „Absolute Quant/Fit Points“ (Absolute Quant./Anpass.Punkte) auswählen (2 Punkte)

Die Gruppe der zu analysierenden Proben auswählen

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:

- manuell den Berechnungsbereich (Schaltfläche „Background“ (Hintergrund)) für das Fluoreszenz-Hintergrundniveau („**Background Fluorescence Level**“) von Zyklus 2 bis Zyklus 6 eingeben.

Bei Plasma- und Urinproben:

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „CMV“ auf **0,55** einstellen;
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den VIC-Detektor „IC“ auf **1,2** einstellen.

Bei Vollblutproben:

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „CMV“ auf **0,80** einstellen;
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den VIC-Detektor „IC“ auf **1,5** einstellen.

Die Werte der von den spezifischen Detektoren in der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz sowie der Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) der Fluoreszenz dienen zur Bestimmung des Schwellenwertzyklus („**Threshold Cycle (Ct)**“), d. h. des Zyklus, in dem der **Fluoreszenzschwellenwert** erreicht wird.

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** dienen die **Ct**-Werte für CMV zur Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) dieses Amplifikationslaufs sowie zur Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle gezeigt:

Reaktion Q - PCR Standard 10 ⁵ Detektor „CMV“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Standardkurve Detektor „CMV“	Akzeptanzbereich	Amplifikation/Detektion
Korrelationskoeffizient (R2)	0,99 ≤ R2 ≤ 1,0	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10⁵ Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist oder der Wert des Korrelationskoeffizienten (R2) („**Correlation Coefficient (R2)**“) außerhalb der Grenzen des Akzeptanzbereichs liegt, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Während der Amplifikations- oder der Detektionsphase sind Probleme aufgetreten (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardpositionen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct**-Wert von CMV (Fenster „Analysis“ (Analyse)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** für CMV nicht **Ct Undetermined**, wurde das Vorhandensein der Ziel-DNA nachgewiesen. Während der Amplifikationsphase sind Probleme aufgetreten (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Bei den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** dient der **Ct**-Wert für CMV zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct**-Wert für die Internal Control zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

Hinweis: Überprüfen Sie mithilfe der Gerätesoftware (Fenster „Analysis“ (Analyse)), dass der **Ct**-Wert anhand eines schnellen und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenzwerte und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrundsignals (unregelmäßiger oder rauschender Hintergrund) ermittelt wurde.

Ergebnisse, wie der **Ct**-Wert, aus den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** (Fenster „Analysis“) werden wie in der folgenden Tabelle dargestellt verwendet:

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) für CMV und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** für die internal Control, konnte die internal Control-DNA nicht effizient nachgewiesen werden. In diesem Fall sind während der Amplifikationsphase (ineffiziente oder Null-Amplifikation) oder während der Extraktionsphase (abgebaute Proben-DNA, Probe mit zu niedriger Zellzahl, Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei CMV und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, wurde die CMV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die CMV-DNA in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“) vorliegt. In diesem Fall wäre das Ergebnis falsch-negativ.

Bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Hinweis: Wird während der Amplifikationsreaktion einer Probe CMV-DNA nachgewiesen, kann die Amplifikation der internal Control zu einem Ergebnis von **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) führen. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten CMV-Reaktion verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Assay-Ergebnis gültig.

Analyse der quantitativen Ergebnisse

Nach Durchführung des Verfahrens für die qualitative Analyse kann die quantitative Analyse der Ergebnisse der positiven Probe durchgeführt werden.

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10⁵ Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist oder die **Ct**-Werte der vier Q-PCR Standards nicht im Bereich der Standardkurve liegen, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Während der Amplifikations- oder der Detektionsphase sind Probleme aufgetreten (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardpositionen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Die Ct-Werte für CMV in den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** (Schaltfläche **Standard Curve**) aus dem Amplifikationslauf dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, von 1.000.000 bis zirka 10 Genomäquivalente pro Reaktion bzw. von 25.000.000 bis 250 Genomäquivalente pro ml mit dem Extraktionssystem **MagNA Pure 24** zu quantifizieren (siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Probenergebnis FAM-Detektor „CMV“	CMV Genomäquivalente pro Reaktion
Menge > 1 x 10 ⁶	ÜBER 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Menge ≤ 1 x 10 ⁶	= Menge
Menge < 1,0 x 10 ¹	WENIGER ALS 10

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** (Fenster „Analysis“ (Analyse)) dienen zur Berechnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen Genomäquivalente (**gEq**) von CMV (**Nc**) gemäß dieser Formel:

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

Dabei ist:

Vc die Menge der bei der Extraktion verwendeten Probe im Verhältnis zur gewünschten Maßeinheit;
Ep die Effizienz des Verfahrens, der Extraktion und der Amplifikation, **ausgedrückt als Dezimalzahl**;
Ve das aus der Extraktion erhaltene Gesamtvolumen **ausgedrückt in µl**;
Va das Volumen des in der Amplifikationsreaktion verwendeten Extraktionsprodukts **ausgedrückt in µl**;
Menge das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der Probe **ausgedrückt in gEq pro Reaktion**.

Werden in EDTA entnommene Vollblut- und Plasmaproben und das Extraktionssystem **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml ausgegeben** werden, so ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma und Urin und MagNA Pure 24
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 25 \times \text{Menge}$

Umrechnung des Ergebnisses in internationale Einheiten

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben und **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis **in IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und MagNA Pure 24
$Fc = 0,5 \text{ IU/gEq}$
$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$
$Nc \text{ (IU/ml)} = 12,5 \times \text{Menge}$

Werden in EDTA entnommene Plasmaproben und **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis **in IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und MagNA Pure 24
$Fc = 0,4 \text{ IU/gEq}$
$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$
$Nc \text{ (IU/ml)} = 10 \times \text{Menge}$

CMV ELITE MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Werden Urinproben und **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis **in IU/ml** ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Urin und MagNA Pure 24
$Fc = 1,1 \text{ IU/gEq}$
$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times Fc$
$Nc \text{ (IU/ml)} = 27,5 \times \text{Menge}$

Dabei ist **Fc** der Umrechnungsfaktor, der mithilfe des von der WHO anerkannten kalibrierten Referenzmaterials „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich, berechnet wurde (siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 10 Kopien/20 µl in 150.000 Kopien von pBETAGLOBIN/20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 27 Wiederholungen zur Durchführung der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
10 Kopien Plasmid-DNA + 150.000 Kopien beta-Globin	27	26	1

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblut, Plasma und Urin und **MagNA Pure 24** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus sechs Punkten rund um die Grenzkonzentration. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

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

Nachweisgrenze mit MagNA Pure 24 (IU/ml)			
Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Vollblut	135 IU/ml	84 IU/ml	354 IU/ml
Plasma	88 IU/ml	54 IU/ml	279 IU/ml
Urin	296 IU/ml	174 IU/ml	851 IU/ml

Die analytische Sensitivität als gEq/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 66 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität als gEq/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze mit MagNA Pure 24 (gEq/ml)			
Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Vollblut	270 gEq/ml	168 gEq/ml	708 gEq/ml
Plasma	220 gEq/ml	108 gEq/ml	698 gEq/ml
Urin	269 gEq/ml	158 gEq/ml	774 gEq/ml

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als linearer Messbereich, ermöglicht die Quantifizierung von zirka 1.000.000 bis 10 Genomäquivalenten in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA bewertet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Punkte der Reihe von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen zur Durchführung der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Punkten der Reihe eine lineare Reaktion aufweist (linearer Korrelationskoeffizient über 0,99).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs lag bei rund 10 gEq/Reaktion innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10² gEq / 20 µl).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10⁶ gEq/Reaktion innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10⁵ gEq / 20 µl).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Linearer Messbereich mit MagNA Pure 24		
	Untere Grenze	Obere Grenze
gEq/ml	250	25.000.000
gEq/Reaktion	10	1.000.000

Die Umrechnungen von gEq/ml in gEq/Reaktion und umgekehrt erfolgten wie auf Seite 60 angegeben.

Die Linearität dieses Assays, der in Verbindung mit verschiedenen Matrices und **MagNA Pure 24** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von CMV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) in CMV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) von 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in vier Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungen über der Nachweisgrenze eine lineare Reaktion aufweist.

Bestimmungsgrenze

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die niedrigste Konzentration festgesetzt, bei der 100 % Positivität sowie ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden. Die obere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Der lineare Messbereich als gEq/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 66 angegeben ist. Die Ergebnisse für jede Matrix sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und MagNA Pure 24		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	178	1.000.000
gEq/ml	356	2.000.000

Linearer Messbereich für Plasmaproben und MagNA Pure 24		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	100	1.000.000
gEq/ml	250	2.500.000

Linearer Messbereich für Urinproben und MagNA Pure 24		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	1000	1.000.000
gEq/ml	909	909.091

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen maximalen prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der Ct-Werte unter 1,36 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der gemessenen Mengen von zirka 12,5 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit dieses Assays als die Differenz zwischen dem Mittelwert der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden und dem theoretischen Konzentrationswert der Probe, ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit der gemessenen log-Menge von zirka 2,2 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision und Genauigkeit wurden mithilfe der während der Experimente zur Untersuchung des linearen Messbereichs erhaltenen Daten ermittelt.

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays wurde die kalibrierte Reihe „AcroMetrix® CMV_{ic} Panel“ (Acrometrix, Life Technologies, USA) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für **MagNA Pure 24** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und MagNA Pure 24				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
CMV DNA 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,299
CMV DNA 3E5	300.000	5,477	2/2	5,280
CMV DNA 3E4	30.000	4,477	2/2	4,298
CMV DNA 3E3	3.000	3,477	2/2	3,364
CMV DNA 3E2	300	2,477	2/2	2,262

Alle Proben wurden als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts ± 0,5 log nachgewiesen.

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der bei diesem Assay für die Umwandlung des quantitativen Ergebnisses von gEq/ml in IU/ml zu verwendende Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von WHO („1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterialien in den verschiedenen negativen Matrices für CMV-DNA und zusammen mit **MagNA Pure 24** berechnet. Die Reihe bestand aus 6 Verdünnungsschritten von 1 log. Jeder Punkt der Reihe wurde in 16 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von **0,5** internationalen Einheiten (IU) pro gEq in **Vollblutproben** nachgewiesenem CMV.

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

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „MagNA Pure“ (Fc = 0,5 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
111.055	5,046	197.188	98.594	4,991
34.903	4,543	73.891	36.945	4,556
10.970	4,040	23.428	11.714	4,050
3.448	3,538	8.863	4.431	3,605
1.084	3,035	2.963	1.481	3,136
341	2,532	995	497	2,638

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von **0,4** internationalen Einheiten (IU) pro gEq in **Plasmaproben** nachgewiesenem CMV.

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

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „MagNA Pure“ (Fc = 0,4 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
111.055	5,046	235.469	94.188	4,969
34.903	4,543	89.375	35.750	4,548
10.970	4,040	25.950	10.380	4,008
3.448	3,538	9.683	3.873	3,576
1.084	3,035	3.189	1.276	3,086
341	2,532	910	364	2,526

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von **1,1** internationalen Einheiten (IU) pro gEq in **Urinproben** nachgewiesenem CMV.

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

Umrechnung in internationale Einheiten bei Urin und „MagNA Pure“ (Fc = 1,1 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.228	5,500	217.719	242.110	5,379
100.000	5,000	91.719	100.891	4,995
31.623	4,500	33.484	36.833	4,557
10.000	4,000	10.550	11.605	4,053
3.162	3,500	3.434	3.777	3,565
1.000	3,000	1.050	1.155	3,054

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 51 in EDTA entnommene, CMV-DNA-positive (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) Vollblutproben, 63 in EDTA entnommene, CMV-DNA-positive (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) Plasmaproben, 6 CMV-DNA-positive (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) Urinproben und 45 CMV-DNA-negative, durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/162, Vereinigtes Königreich) mit CMV-DNA dotierte Urinproben verwendet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Vollblut	51	51	0
In EDTA entnommenes, CMV-DNA-positives Plasma	63	62	1
CMV-DNA-positiver Urin	6	6	0
CMV-DNA-dotierter Urin	45	44	1

Alle Proben waren beim ersten Test gültig.

Alle Vollblutproben wurden als CMV-DNA-positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Vollblutproben betrug 100 %.

Zweiundsechzig (62) von 63 Plasmaproben wurden als CMV-DNA-positiv bestätigt, während eine Probe ein abweichend negatives Ergebnis aufwies. Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Plasmaproben betrug 98 %.

Alle klinischen Urinproben wurden als CMV-DNA-positiv bestätigt.

Eine dotierte Urinprobe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein abweichend negatives Ergebnis. Eine Erklärung für diese Abweichung kann ein Präparationsfehler der Bedienungsperson sein.

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Urinproben betrug 98 %.

Die diagnostische Gesamtsensitivität des Assays betrug 98,8 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 53 in EDTA entnommene, vermutlich CMV-DNA-negative Vollblutproben, 50 in EDTA entnommene, vermutlich CMV-DNA-negative Plasmaproben und 49 vermutlich CMV-DNA-negative Urinproben als Referenzmaterial verwendet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, vermutlich CMV-DNA-negatives Vollblut	53	1	52
In EDTA entnommenes, vermutlich CMV-DNA-negatives Plasma	50	2	48
Vermutlich CMV-DNA-negativer Urin	49	0	49

Alle Vollblutproben waren beim ersten Test gültig und zweiundfünfzig (52) von 53 Vollblutproben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, während eine Probe ein abweichend positives Ergebnis aufwies. Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Vollblutproben betrug 98 %.

Neunundvierzig (49) von 50 Plasmaproben waren beim ersten Test gültig, eine ungültige Probe ergab nach Reamplifikation ein negatives Ergebnis. Achtundvierzig (48) von 50 Plasmaproben wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt, während zwei Proben abweichend positive Ergebnisse aufwiesen. Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Plasmaproben betrug 96 %.

Alle Urinproben waren beim ersten Test gültig und wurden als CMV-DNA-negativ bestätigt. Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Urinproben betrug 100 %.

Die diagnostische Gesamtspezifität des Assays betrug 98 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrices und Geräten durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation des „CMV ELITe MGB® Kit“, FTP RTK015PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

T. E. Fenner et al. (1991) *J Clin Microbiology* 29: 2621–2622
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf nur mit DNA verwendet werden, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: in EDTA entnommenes Vollblut, in EDTA entnommenes Plasma, Liquor, Urin, Mundschleimhautabstrich, Fruchtwasser und BAL.

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

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

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

Es liegen keine Daten zur Produktleistung mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Leukozytensuspensionen und Granulozytensuspensionen.

Dieses Produkt nur mit den validierten Instrumenten und den in Abschnitt „Proben und Kontrollen“ angegebenen zugehörigen klinischen Proben verwenden.

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

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von einer angemessenen Identifizierung, Entnahme, Transportierung, Aufbewahrung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es daher notwendig, bei diesen Schritten vorsichtig vorzugehen und die den Produkten für die Nukleinsäureextraktion beiliegenden Gebrauchsanweisungen sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Methode zur Echtzeit-Amplifikation empfindlich für Kreuzkontaminationen durch CMV-positive klinische Proben, die Positivkontrollen und die gleichen Amplifikationsprodukte. Kreuzkontaminationen führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch das Produktformat werden Kreuzkontaminationen begrenzt. Trotzdem können Kreuzkontaminationen nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

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

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

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen falsche Ergebnisse vermieden werden.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs ist eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs werden für die Verwendung des Produkts Spezialkleidung und Instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

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

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis bedeutet, dass die CMV-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter dem Detektionslimit des Produkts liegt (siehe „Leistungsmerkmale“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein und eine Wiederholung des Tests erfordern. Eine erneute Testung ab der Extraktion kann zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen.

Etwaige Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion des viralen Genoms können den Nachweis und die Quantifizierung der CMV-DNA beeinträchtigen.

Wie bei allen diagnostischen Produkten müssen bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen, falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen, wie in der pränatalen oder Notfalldiagnostik, kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen Auswirkungen auf den Patienten beitragen.

FEHLERBEHEBUNG

Ziel-DNA nicht in der Positive Control oder den Q - PCR Standard Reaktionen erkannt oder ungültiger Korrelationskoeffizient der Standardkurve	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reagenzien in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle oder des dispensierten Standards kontrollieren.
Lauf wurde auf ELITE InGenius und ELITE BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Positivkontrolle oder Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Positionseinstellungen für die Standardreaktionen des Geräts überprüfen. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrolle und Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITE InGenius und ELITE BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch oder Negativkontrolle kontrollieren. Volumina des Reaktionsgemischs oder der Negativkontrolle kontrollieren.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrolle und Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot Wasser verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Ziel-DNA und Internal Control-DNA in den Probenreaktionen nicht erkannt

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch oder Proben kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch oder Proben kontrollieren.
Abbau der Internal Control.	Neue Aliquote der Internal Control verwenden.
Inhibition durch die Probe störende Substanzen.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen. Extraktion und Amplifikation der Probe wiederholen.
Falsche Lagerung der Reagenzien.	Sicherstellen, dass das Reaktionsgemisch nicht mehr als 30 Minuten der Raumtemperatur ausgesetzt war.
Probleme bei der Extraktion.	Qualität und Konzentration der extrahierten DNA überprüfen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsche Dispensierung der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negativkontrolle und Standards in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
Einstellfehler der Grundlinie.	Bereich für die Grundlinienberechnung innerhalb von Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat (die Daten unter „Results“ (Ergebnisse), „Component“ (Komponente) überprüfen) und die Zunahme des Fluoreszenzsignals noch nicht begonnen hat, z. B. von Zyklus 6 auf Zyklus 15. Die automatische Grundlinienberechnung durch Aktivieren der Option „Auto Baseline“ verwenden.

Anomale Dissoziationskurve

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

CMV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTK015PLD

Fehler 30103 bei ELITe InGenius

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe.	Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist: - Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen oder - Extraktion mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.

Ungewöhnlich hoher Anteil positiver Ergebnisse innerhalb ein und desselben Laufs (Reaktionen mit ähnlich späten Ct-Werten)

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Kontamination von Probe zu Probe bei Präanalyse-schritten	Kontakt zwischen Mikropipette und Röhrchenwand vermeiden. Mikropipette nach dem Pipettieren jeder Probe mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Keine Pasteur-Pipetten verwenden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden. Proben in die letzten Positionen der Geräte einsetzen, wie in der Gebrauchsanweisung von ELITe InGenius angegeben. Die von der Software angegebene Ladefolge beachten
Kontamination der Laborumgebung	Alle Oberflächen, die mit dem Bediener und den Proben (einschließlich Pipetten) in Kontakt kommen, mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung oder DNA/RNA-Cleaner reinigen. Einen UV-Dekontaminationszyklus durchführen. Ein neues Röhrchen mit PCR Mix und/oder KbE verwenden.

SYMBOLE

-  Katalognummer.
-  Temperaturobergrenze.
-  Chargenbezeichnung.
-  Verwendbar bis (letzter Tag des Monats).
-  *In-vitro*-Diagnostikum.
-  Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika. Zertifizierung ausgestellt von DEKRA Certification B.V., Niederlande.
-  Genügend für „n“ Tests.
-  Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.
-  Inhalt.
-  Vor Sonneneinstrahlung schützen.
-  Hersteller.

HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

Dieses Produkt enthält Reagenzien, die von Life Technologies Corporation hergestellt wurden und im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S.p.A. und deren Tochtergesellschaften und Life Technologies Corporation vertrieben werden. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-Mail: outlicensing@thermofisher.com.

ELITe MGB® Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800 und 9,169,256 und der EP-Patente mit den Nummern 0819133,1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256 und 2714939 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz gestattet es der natürlichen oder juristischen Person, der dieses Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt zu verwenden und die mithilfe des Produkts generierten Daten nur für humandiagnostische Zwecke zu verwenden. Weder die ELITechGroup S.p.A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

„ELITe MGB®“ und das „ELITe MGB®“-Gerätelogo sind eingetragene Marken in der Europäischen Union.

ELITe InGenius® und ELITe BeGenius® sind eingetragene Marken der ELITechGroup.

«NucliSENS® easyMAG®» sind eingetragene Marken von bioMérieux SA.

«QIASymphony®» ist eine eingetragene Marke der QIAGEN GmbH.

Ficoll® ist eine eingetragene Marke von GE Healthcare Bio-Sciences AB.

MagNA Pure ist eine Marke von Roche.

CMV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The «**CMV ELITE MGB® Kit**» product is a **qualitative** and **quantitative** nucleic acids amplification assay for the detection and quantification of the DNA of Human Cytomegalovirus (CMV) in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, cerebrospinal fluid (CSF), urine, buccal swab, amniotic fluid and bronchoalveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of CMV infections, alongside patient clinical data and other laboratory test outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA and Plasma EDTA** and the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA** and the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



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

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	›	CMV - ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE BeGenius instrument: INT040	›	CMV ELITE Standard: STD015PLD
ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200	›	ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR	›	300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S (for INT030)
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	›	1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040)
CPE – Internal Control: CTCPE		

F. ELITE InGenius protocol

- › Sample volume 200 µL
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › CMV Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result International Unit: IU/mL genome equivalent: gEq/mL (equivalent to copies/mL)
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. ELITE InGenius/ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	109 IU/mL – 156 gEq/mL	100% 60/60*	93% 55/59*
Plasma	88 IU/mL – 293gEq/mL	100% 54/54*	98% 57/58*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Whole Blood	254 – 1.4x10 ⁸	178 – 1 x10 ⁸	0.7
Plasma	293 – 3.3x10 ⁸	88 – 1 x10 ⁸	0.3

H. ELITe InGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cerebrospinal fluid	58 IU/mL – 193 gEq/mL	100% 20/20*	100% 20/20*
Urine	151 IU/mL – 216 gEq/mL	100% 31/31*	100% 54/54*
Buccal swab	44 IU/mL – 220 gEq/mL	100% 50/50*	96% 50/52*
Amniotic fluid	57 IU/mL – 285 gEq/mL	100% 31/31*	100% 32/32*
BAL / BA	97 IU/mL – 485 gEq/mL	100% 49/49*	100% 49/49*

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Cerebrospinal fluid	335 – 5x10 ⁷	101 – 1,5 x10 ⁷	0.3
Urine	451 – 5x10 ⁷	316 – 3,5 x10 ⁷	0.7
Buccal swab	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
Amniotic fluid	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
BAL / BA	890 – 5x10 ⁷	178 – 1,0 x10 ⁷	0.2

H. Reference Material

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
Acrometrix: CMVDNA3E	Thermo-Fisher	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014: CMVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

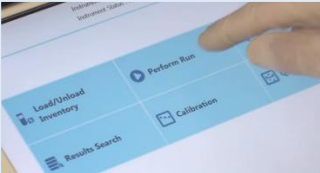
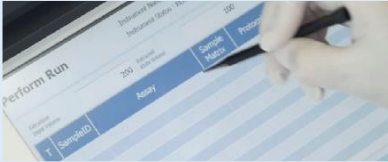

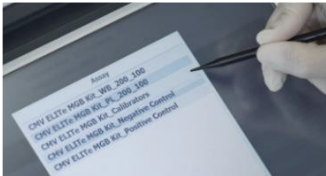


I. ELITe InGenius Procedures

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

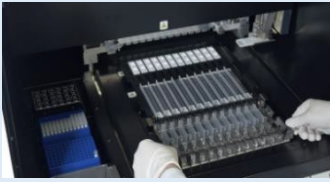
Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, elute: “100 µL” 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the “Assay protocol” of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 

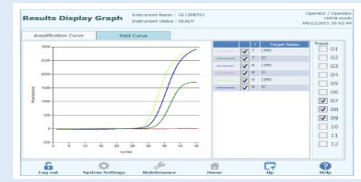
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the Q-PCR Mix in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position :
Primary tube or Secondary tube

6. Load the CPE Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

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

Before analysis

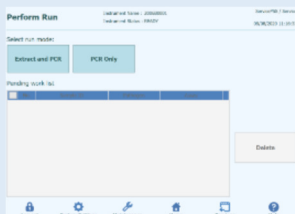
1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

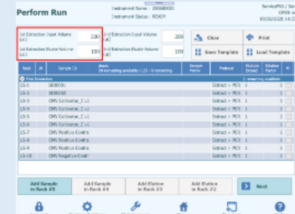
1. Select "Perform Run" on the touch screen



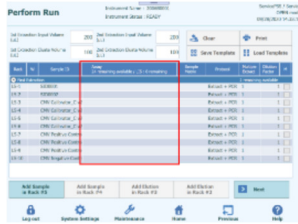
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

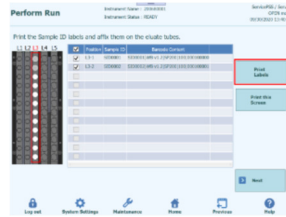


4. Select the "Assay protocol" of interest



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

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



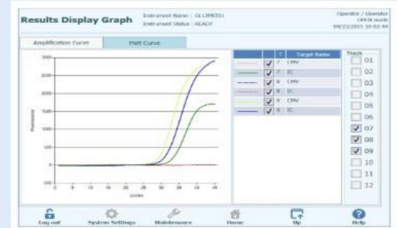
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

5. Close the door.
Start the run

3. Select the "Assay protocol" of interest

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack

5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.

8. Close the door
Start the run

6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area

9. Archive the eluate sample

CMV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

ELITE InGenius® SP 1000

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**.
The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030

ELITE InGenius SP1000 Extraction Cartridge:
INT033SP1000

ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR

ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS

CPE – Internal Control: CTCRCPE

- › **CMV ELITE Positive Control:** CTR015PLD
- › **CMV ELITE Standard:** STD015PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL genome equivalent:
› CPE Internal Control volume	10 µL		gEq/mL (<i>equivalent to</i>
› Total eluate volume	100 µL		<i>copies/mL</i>) 15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of controls	60 days
› CMV Q-PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	17 IU/mL – 57 gEq/mL	97% 58/60*	95% 54/57*
			<small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Plasma	593 – 5x10⁶	178 – 1,5 x10⁷	0.3

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2017: CMVDNA17-S	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 0.5 log**
		<small>*confirmed samples/ tested samples</small>	<small>**within the range of quantification</small>

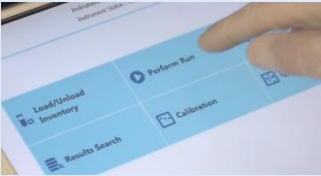
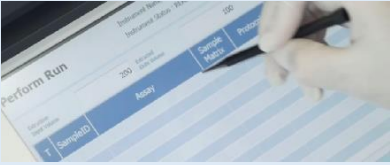

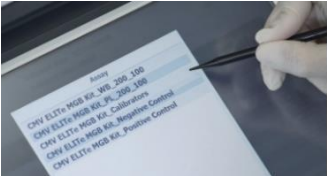

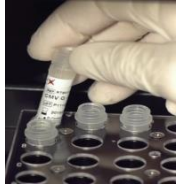



I. Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

CMV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA › **Cerebrospinal fluid** › **Urine**

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



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

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › CMV – ELITE Positive Control: CTR015PLD › CMV ELITE Standard: STD015PLD › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|---|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	263 IU/mL - 332 gEq/mL	100% (57/60)*	100% (63/70)*
	Plasma	222 IU/mL - 201 gEq/mL	97.1% (66/68)*	100% (61/61)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	127 IU/mL - 249 gEq/mL	98.3% (59/60)*	100% (65/66)*
	Plasma	140 IU/mL - 519 gEq/mL	92.2% (47/51)*	100% (64/64)*
easyMAG - ABI	Whole blood	-	100% (50/50)*	100% (50/50)*
	Cerebrospinal fluid	-	100% (60/60)*	100% (60/60)*
	Urine	-	100% (52/52)*	98.2% (55/56)*
QIASymphony - ABI	Whole blood	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*
	Plasma	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*

*confirmed samples/tested samples

System	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
ELITE STAR - ABI	221 → 22 x 10 ⁶ (WB), 308 → 30.8 x 10 ⁶ (PL)	28 (WB,PL)	0.79 (WB), 1.10 (PL)
ELITE GALAXY - ABI	178 → 17.8 x 10 ⁶ (WB), 105 → 10 x 10 ⁶ (PL)	35 (WB,PL)	0.51 (WB), 0.27 (PL)
easyMAG - ABI	305 → 30.5 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB), 10 (CSF, Urine)	0.61 (WB)
QIASymphony - ABI	110 → 11 x 10 ⁶ (WB), 104 → 10 x 10 ⁶ (PL)	24 (WB), 12 (PL)	0.46 (WB), 0.87 (PL)

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL for 12 samples
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	CSF, Urine	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	300 µL	60 µL	-
	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

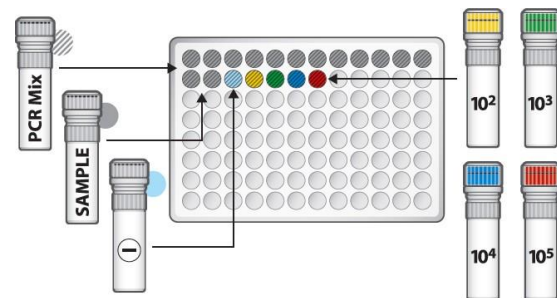
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

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

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 100 to 10⁷ gEq/mL.

CMV ELITE MGB® Kit used with Cobas Z 480 PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA › Plasma EDTA › Urine

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System
- › CMV – ELITE Positive Control:CTR015PLD
- › CMV – ELITE Positive Control RF:CTR015PLD-R
- › CMV ELITE Standard:STD015PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	135 IU/mL 270 gEq/mL	100% (51/51)*	98% (52/53)*
	Plasma	88 IU/mL - 220 gEq/mL	98% (62/63)*	96% (48/50)*
	Urine	296 IU/mL - 269 gEq/mL	98% (50/51)*	100% (49/49)*

*confirmed samples/tested samples

System	Matrix	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
MagNA Pure 24	Whole blood	178 IU/mL -> 10⁶ IU/mL		0.5
	Plasma	100 IU/mL -> 10⁶ IU/mL	25 (WB, PL, Urine)	0.4
	Urine	10³ IU/mL -> 10⁶ IU/mL		1.1

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "465-510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540-580"

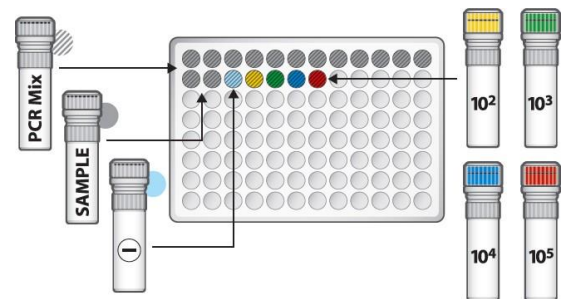
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

acquisition must be set during hybridation step at 60°C

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	CMV FAM	Internal Control VIC
Cobas – Z 480	WB	0.80	1.5
	Plasma	0.55	1.2
	Urine	0.55	1.2

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ gEq/mL.

