

NOTICE of CHANGE dated 28/10/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:







«HSV2 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS032PLD

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

- Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040);
- Internal Control Ct cut-off update in association with «ELITe InGenius®» (REF INT030) and «ELITe BeGenius®» (REF INT040)

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 KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt „**HSV2 ELITe MGB® Kit**“ ist Bestandteil eines qualitativen und quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Herpes-simplex-Virus vom Typ 2 (HSV2)** in DNA-Proben, die aus Liquor, in EDTA entnommenem Vollblut und in EDTA entnommenem Plasma extrahiert wurden.

Das Produkt ist zur Verwendung bei der Diagnose und Überwachung von HSV2-Infektionen, sowie für klinische Daten des Patienten und weitere Laborbefunden bestimmt.

TESTPRINZIPIEN

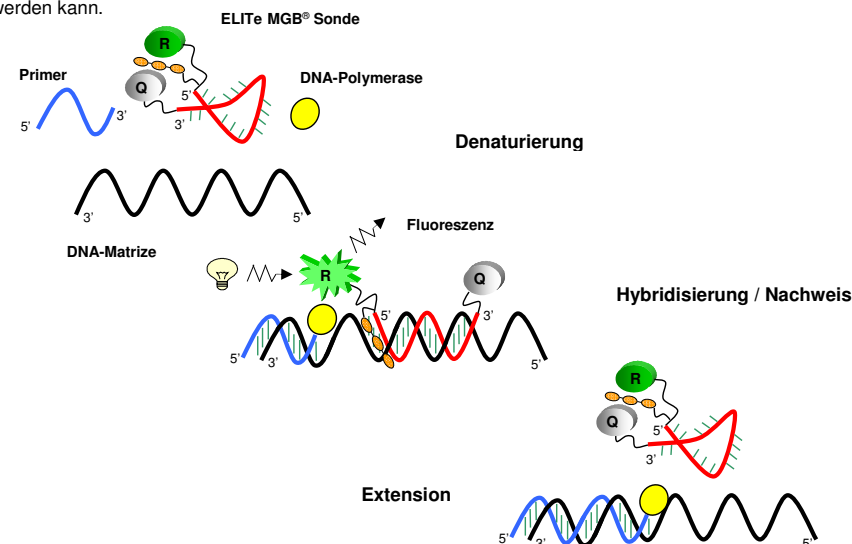
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis (Thermocycler für die Echtzeit-Amplifikation) ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion für eine Region des **Glykoproteins G (gpG)** von HSV2 und eine spezifische Reaktion für eine Region des **humanen beta-Globin-Gens** (Internal Control der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, HSV2-spezifische Sonde mit ELITe MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der HSV2-Amplifikationsreaktion hybridisiert. Die mit einem AP525-Fluorophor (analog zu VIC) markierte, für die Internal Control spezifische Sonde mit ELITe MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion für die Internal Control 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 HSV2-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.

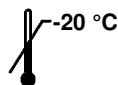
Der Test ist mit den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Systemen validiert.

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



HSV2 ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS032PLD



INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	Seite 2
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 3
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 3
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	Seite 3
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 5
ELITe InGenius	Seite 6
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 6
VERFAHREN	Seite 8
ELITe BeGenius	Seite 16
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 16
VERFAHREN	Seite 17
LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius	Seite 23
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Seite 32
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 32
VERFAHREN	Seite 34
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 43
Roche cobas z 480 analyzer	Seite 48
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 48
VERFAHREN	Seite 49
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 54
QUELLENANGABEN	Seite 56
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 57
FEHLERBEHEBUNG	Seite 58
SYMBOLS	Seite 60
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 61

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das Produkt „**HSV2 ELiTe MGB Kit**“ enthält das **gebrauchsfertige** Komplettgemisch „**HSV2 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** mit dem „**ELiTe InGenius®**“ und „**ELiTe BeGenius®**“ System und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die Primer und die HSV2-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine Region des **gpG** von HSV2 (Region US4).

Die Primer und die Sonde für die Internal Control (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 den Systemen „**ELiTe InGenius**“ und „**ELiTe BeGenius**“ einschließlich Standards und Kontrollen.

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

IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
HSV2 Q - PCR Mix	Komplettes Reaktionsgemisch	4 x 540 µl	-

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG 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 Produkt enthalten.

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), 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, Echtzeit-Amplifikation und -Interpretation der zu analysierenden Probe werden das Gerät „**ELiTe InGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) und den folgenden spezifischen Assay-Protokollen (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

- für die Kalibratoren „**HSV2 ELiTe STD**“,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation „**HSV2 ELiTe PC**“,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation „**HSV2 ELiTe NC**“,
- für die Probenanalyse „**HVS2 ELiTe_WB_200_100**“, „**HSV2 ELiTe_PL_200_100**“, und „**HSV2 ELiTe_CSF_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, Echtzeit-Amplifikation und -Interpretation der zu analysierenden Probe werden das Gerät „**ELiTe BeGenius**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) und die folgenden spezifischen Assay-Protokolle (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

- für die Kalibratoren „**HSV2 ELiTe_Be_STD**“,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation „**HSV2 ELiTe_Be_PC**“,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation „**HSV2 ELiTe_Be_NC**“,
- für die Probenanalyse „**HSV2 ELiTe_Be_WB_200_100**“, „**HSV2 ELiTe_Be_PL_200_100**“ und „**HSV2 ELiTe_Be_CSF_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 DNA und RNA aus nicht zellulären und zellulären 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 DNA und RNA aus nicht zellulären und zellulären Proben, mit dem Gerät „**ELiTe GALAXY**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT020) validiert.

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben ist auch die Verwendung der 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) 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.

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.

Beim Einsatz eines 7300 Real-Time PCR System muss das generische Produkt „**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate**“ (Life Technologies, Art.-Nr. N8010560), 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 „**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**“ (Life Technologies, Art.-Nr. 4346906), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation.

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 HSV2-DNA für die qualitative Analyse benötigt, verwenden Sie das Produkt «**HSV2 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR032PLD) oder das Produkt «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR032PLD-R), Positivkontrolle von Plasmid-DNA.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von HSV2-DNA für die quantitative Analyse benötigt, muss das Produkt „**HSV2 ELITe Standard**“ (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD032PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve, verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist 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. Materialien, die mit den biologischen Proben in Kontakt kommen, müssen vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten mit 3 % Natriumhypochlorit (Bleiche) behandelt oder eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden. Extraktionsreagenzien dürfen nicht mit Natriumhypochlorit (Bleiche) in Kontakt kommen.

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 enthaltenden Nukleinsäuren sowie der Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte.

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 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.

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 **HSV2 Q - PCR Mix** muss bei -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

Der **HSV2 Q - PCR Mix** muss nach dem ersten Öffnen innerhalb von einem Monat verwendet werden.

Der **HSV2 Q - PCR Mix** darf maximal **fünf Mal** eingefroren und wieder aufgetaut werden; weitere Gefrier- und Auftauzyklen können zu einem Verlust der Produktleistung führen.

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 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: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Vollblut mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das die Extraktionsprotokoll **HSV2 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.

Bei Verwendung des Primärröhrchens 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 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 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.

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, ist das die Extraktionsprotokoll **HSV2 ELITe_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.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits 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. 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 Liquor mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.1 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV2 ELITe CSF_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 Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Andere Proben

Momentan liegen keine Daten zur Produktleistung mit anderen klinischen Proben, wie Leukozytensuspensionen, Granulozytensuspensionen und Fruchtwasser, vor.

Störende Substanzen

Die Probe darf kein Heparin enthalten, um das Problem einer Inhibition 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.

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

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

- als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **HSV2 ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELITe STD**“ zu verwenden,
- als Amplifikations-Positive Control ist **HSV2 - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELITe_PC**“ zu verwenden,
- als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELITe_NC**“ zu verwenden.

Hinweis: Das System **ELITe InGenius** 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 Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

Darüber hinaus müssen die Kalibratoren und Amplifikationskontrollen erneut generiert werden, wenn:

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

Qualitätskontrollen

Die geplante Validierung des Extraktions- und Amplifikationsverfahrens wird empfohlen. Es können getestete Proben oder zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Externe Qualitätskontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen anzuwenden.

VERFAHREN BEI ELITe InGenius

Die Verwendung des „**HSV2 - ELITe MGB® Kit**“ mit dem System **ELITe InGenius** 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 InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- Prüfen, ob die Kalibratoren (**HSV2 Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- Prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**HSV2 - Positive Control**, **HSV2 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.

Die für das Testen von Proben mit dem Produkt **HSV2 ELITe MGB Kit** verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay-Protokolle für HSV2 ELITe MGB Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
HSV2 ELITe MGB Kit_WB_200_100	Vollblut	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
HSV2 ELITe MGB Kit_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
HSV2 ELITe MGB Kit_CSF_200_100	Liquor	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE 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 **HSV2 ELITe MGB Kit** zusammen mit **ELITe InGenius** kann zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- A. Integrierter Lauf (Extraktion + PCR),
- B. Amplifikationslauf (nur PCR),

- C. Kalibrationslauf (nur PCR),
D. Amplifikationslauf für Positive Control und Negative Control (nur PCR).

Alle Parameter sind in den auf dem Gerät verfügbaren Assay Protocols enthalten und werden bei Auswahl des Assay Protocol automatisch abgerufen.

Hinweis: ELITe InGenius kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Laufinformationen geladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

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

A. Integrierter Lauf

Zum Einrichten des integrierten Laufs führen Sie die folgenden Schritte durch, wie auf der **grafischen Benutzeroberfläche der Software** angegeben:

1. Die Proben bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen und gemäß den Laborrichtlinien und dem Abschnitt „Proben und Kontrollen“ handhaben.
2. Die HSV2 Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: Den HSV2 Q-PCR Mix lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

3. Die CPE-Röhrchen für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
6. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
7. Das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. HSV2 ELITe_WB_200_100).
8. Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
9. Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen.
wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Sonication Tube“ (Ultraschallröhrchen) auswählen.
Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. CPE und HSV2 Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die „PCR Cassettes“ (PCR-Kassetten), die Extraktionskartuschen „ELITe InGenius SP 200“, 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.
13. Die Gerätetür schließen.
14. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs 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-Kassetten mit den Reaktionsprodukten und anderen Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann der PCR Mix im gekühlten Block des Geräts insgesamt bis zu 16 Stunden verbleiben.

B. Amplifikationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV2 Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: Den HSV2 Q-PCR Mix lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
4. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
5. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. HSV2 ELITe_WB_200_100).
6. In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
7. Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „ExtraTube (bottom row)“ (Zusatzröhrchen (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Den HSV2 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.
9. 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.
10. Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Gerätetür schließen.
12. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs 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-Kassetten und Verbrauchsmaterialien unter Berücksichtigung sämtlicher gesetzlicher und umweltrechtlicher Vorschriften entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

Hinweis: Am Ende des Laufs kann der PCR Mix im gekühlten Block des Geräts insgesamt bis zu 16 Stunden verbleiben.

C. Kalibrationslauf

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

1. Die HSV2 Q - PCR Mix-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: Den HSV2 Q-PCR Mix lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. HSV2 Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: HSV2 Q - PCR Standards 10², Cal2: HSV2 Q - PCR Standards 10³, Cal3: HSV2 Q - PCR Standards 10⁴, Cal4: HSV2 Q - PCR Standards 10⁵). 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. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Beginnend mit der relevanten Spur das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen (HSV2 ELITe STD) und die Chargennummer und das Ablaufdatum für den HSV2 Q - PCR Standard eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
6. Den HSV2 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 Kalibratorröhrchen und die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) 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, 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: Die Kalibratoren kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs kann der PCR Mix im gekühlten Block des Geräts insgesamt bis zu 16 Stunden verbleiben.

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. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV2 Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: Den HSV2 Q-PCR Mix lichtgeschützt auftauen lassen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. Das Produkt HSV2 - Positive Control für die Amplifikation der Positive Control 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. In der relevanten Spur das zu verwendende Assay Protocol in der Spalte „Assay“ auswählen.
6. Für die Positivkontrolle „HSV2 ELITe_PC“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für die HSV2 Positive Control eintragen.
7. Für die Negativkontrolle HSV2 ELITe_NC 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 HSV2 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 PCR-Amplifikationskassette, die Positive Control und/oder die Negative Control 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, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

Hinweis: Die Positive Control muss als Amplifikationskontrollen ausgeführt werden, um die Regelkarte („Control Chart“) einzurichten. Zum Einrichten der Karte werden vier (4) Ergebnisse der Positive Control aus 4 verschiedenen Läufen benötigt. Anschließend werden die Werte der Positive Control zur Überwachung der Amplifikationsstufe herangezogen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

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

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

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

Hinweis: Der PCR Mix kann bis zu 16 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

ELITe InGenius überwacht die Fluoreszenzsignale der Zielsequenz und der Internal Control für jede Reaktion und wendet die Assay-Protokoll-Parameter automatisch zur Generierung von PCR-Kurven an, die dann für die Ergebnisse interpretiert werden.

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: ELITe InGenius kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, über das die Lauerergebnisse in das Rechenzentrum des Labors hochgeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

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

ELiTe InGenius generiert Ergebnisse mithilfe des „HSV2 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 **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die spezifische HSV2-Sonde (Kanal „HSV2“) und die spezifische Internal-Control-Sonde („IC“) in der Kalibrator-Amplifikationsreaktion mit den HSV2 ELITe_STD Assay-Protokoll-Parametern. Die sich daraus ergebenden Ct-Werte werden zur Validierung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) verwendet.

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

Die für die Amplifikationsreagenziencharge 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. In diesem Fall können die Ergebnisse nicht genehmigt werden und die Kalibrator-Amplifikationsreaktionen müssen wiederholt werden.

Hinweis: Wird der Kalibrationskurve zusammen mit Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, dann ist der gesamte Lauf ungültig und die Amplifikation aller Proben muss wiederholt werden.

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

Die **ELiTe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die spezifische HSV2-Sonde (Kanal „HSV2“) und die spezifische Internal-Control-Sonde („IC“) in der Amplifikationsreaktionen der Positive Control und der Negative Control mit den Assay-Protokoll-Parametern HSV2 ELiTe_PC und HSV2 ELiTe_NC. Die sich daraus ergebenden Ct-Werte werden zur Validierung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) verwendet.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und die Negative Control werden in der Datenbank („Controls“) gespeichert, nachdem der „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die Genehmigung dazu erteilt hat.

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

Der für die Amplifikationsreagenzcharge spezifischen Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control laufen **nach 15 Tagen** ab.

Vor der Analyse von Proben und nach der Genehmigung der Kalibrationskurve ist es unbedingt erforderlich, für die verwendete Amplifikationsreagenzcharge die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control zu generieren und zu genehmigen. Die Verfügbarkeit von Ergebnissen des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) der ELITE InGenius Software angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

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

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

Hinweis: Wenn das Ergebnis der Positive Control oder Negative Control ungültig ist und Proben im selben Lauf ausgeführt wurden, können die Proben genehmigt werden, aber ihre Ergebnisse werden nicht validiert. In diesem Fall müssen alle fehlgeschlagenen Kontrollen und Proben wiederholt werden.

C. Validierung der Probenergebnisse

Die ELITE InGenius Software interpretiert die PCR-Ergebnisse für die HSV2-Sonde (Kanal „HSV2“) und die Internal-Control-Sonde (Kanal „IC“) mit den Assay-Protokoll-Parametern HSV2 ELITe_WB_200_100, HSV2 ELITe_PL_200_100 und HSV2 ELITe_CSF_200_100. Die resultierenden HSV2-Ct-Werte werden in Konzentrationswerte umgerechnet.

Die Ergebnisse werden im Modul „Result Display“ (Ergebnisanzeige) angezeigt.

Der Probenlauf kann genehmigt werden, wenn die drei in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Bedingungen zutreffen.

1) Kalibrationskurve	Status
HSV2 Q - PCR Standard	APPROVED (Genehmigt)
2) Positive Control	Status
HSV2 - Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
3) Negative Control	Status
HSV2 - Negative Control	APPROVED (Genehmigt)

Die Probenergebnisse werden von der ELITe InGenius Software anhand der Assay-Protokoll-Parameter automatisch interpretiert. Die möglichen Ergebnismeldungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Ergebnis des Probenlaufs	Interpretation
HSV2: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge gleich XXX Kopien/ml)	HSV2-DNA erkannt innerhalb des Messbereich des Tests, Menge wie angezeigt.
HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge unter LLoQ Kopien/ml)	HSV2-DNA erkannt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Tests
HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge über ULoQ Kopien/ml)	HSV2-DNA erkannt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Tests
HSV2: DNA Not Detected or below LoD copies / mL (HSV1: DNA nicht erkannt oder Menge unter LoD Kopien/ml)	In der Probe wurde keine HSV2-DNA nachgewiesen . Die Probe wurde negativ auf HSV2-DNA getestet oder die HSV2-DNA-Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.
Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	Ungültiges Testergebnis durch fehlerhafte Internal Control (z. B. aufgrund von falscher Extraktion, Verschleppung von Inhibitoren). Der Test sollte wiederholt werden.

Als „HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ“ (HSV2: DNA nachgewiesen, Menge unter LLoQ) ausgegebene Proben sind für die Quantifizierung nicht geeignet. Die Konzentration der in der Probe nachgewiesenen HSV2-DNA liegt unter dem Niveau, bei dem sie präzise quantifizierbar ist. Wenn die Probe vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt wurde, kann sie ohne Verdünnung erneut getestet werden.

Als „HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULQ“ (HSV2: DNA nachgewiesen, Menge über ULQ) ausgegebene Proben sind für die Quantifizierung nicht geeignet. Die Konzentration der in der Probe nachgewiesenen HSV2-DNA liegt über dem Niveau, bei dem sie präzise quantifizierbar ist. Die Probe kann vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt und erneut getestet werden, um Ergebnisse innerhalb des linearen Assay-Bereichs zu erzielen.

Als „HSV2: DNA Not Detected or below LoD“ (HSV2: DNA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, es wurde jedoch keine HSV2-DNA nachgewiesen. In diesem Fall kann entweder die Probe für HSV2-DNA negativ sein oder die HSV2-DNA ist bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden (siehe „Leistungsmerkmale“).

HSV2-DNA-positive Proben mit einer Konzentration unter der Nachweisgrenze werden als „HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ“ (HSV2: DNA nachgewiesen, Menge unter LLoQ) ausgegeben (siehe „Leistungsmerkmale“).

Als „Invalid - Retest Sample“ (Ungültig - Probe erneut testen) ausgegebene Proben sind nicht für die Ergebnisinterpretation geeignet. In diesem Fall wurde die Internal-Control-DNA möglicherweise aufgrund von Problemen beim PCR- oder Extraktionsschritt nicht effizient erkannt (Abbau oder Verlust von DNA während der Extraktion oder Inhibitoren im Eluat), was zu falschen Ergebnissen führen kann.

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

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“ (Spurbericht) exportiert 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 nach ausgewählter Spur 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 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: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Vollblut mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version 2.0 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV2 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 Primärröhrchens 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 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 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.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version 2.0 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV2 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.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits 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. 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 Liquor mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version 2.0.0 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV2 ELITe_Be_CSF_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 Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zur Einrichtung und Durchführung des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Andere Proben:

Momentan liegen keine Daten zur Produktleistung mit anderen klinischen Proben, wie z. B. Leukozytensuspensionen, Granulozytensuspensionen und Fruchtwasser, vor.

Störende Substanzen

Die Probe darf kein Heparin enthalten, um das Problem einer Inhibition 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.

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

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

als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **HSV2 ELiTe Standard** zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELiTe_Be_STD**“ zu verwenden,
als Amplifikations-Positive Control ist **HSV2 - ELiTe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELiTe_Be_PC**“ zu verwenden,
als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll „**HSV2 ELiTe_Be_NC**“ zu verwenden.

Hinweis: Das System **ELiTe BeGenius** 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.

Darüber hinaus müssen die Kalibratoren und Amplifikationskontrollen erneut generiert werden, wenn:

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

Qualitätskontrollen

Die geplante Validierung des Extraktions- und Amplifikationsverfahrens wird empfohlen. Es können getestete Proben oder zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden. Externe Qualitätskontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen anzuwenden.

VERFAHREN BEI ELiTe BeGenius

Die Verwendung des „**HSV2 ELiTe MGB Kit**“ mit dem System **ELiTe BeGenius** 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 (**HSV2 Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- Prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**HSV2 - Positive Control, HSV2 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**, Matrices und dem Gerät **ELiTe BeGenius** validiert.

Die für das „**HSV2 ELiTe MGB Kit**“ verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay Protocols für „ HSV2 ELiTe MGB Kit “ und ELiTe BeGenius			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
HSV2 ELiTe_Be_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
HSV2 ELiTe_Be_WB_200_100	Vollblut	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
HSV2 ELiTe_Be_CSF_200_100	Liquor	Kopien/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 ELiTechGroup Kundendienstvertreter vor Ort.

Einrichtung des Laufs

Das **HSV2 ELiTe MGB Kit** kann mit **ELiTe BeGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- Probenlauf (EXTR + PCR),
- Amplifikationslauf (nur PCR),
- Kalibrationslauf (nur PCR),
- Amplifikationslauf für Positive Control 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 geladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlaufstypen 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**:

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen **HSV2 Q - PCR Mix** auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: **HSV2 PCR Mix** im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrchen 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.
- Alle Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben ab dem Probenrack in L5 in den Kühlbereich laden.
- 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. HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Wenn eine zweite Extraktion durchgeführt werden soll, die Schritte 6 bis 9 wiederholen und dafür das L4-Probenrack verwenden.
- Die barcodierten Eluatröhrchen ab dem L3-Elutionsrack in den Kühlbereich laden.

Hinweis: Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit etikettiert werden.

- Das Elutionsrack L3 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Schritte 11 und 12 wiederholen und dafür das Reagenz-/Elutionsrack L2 verwenden.
- CPE und HSV2 Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
- Das Reagenzienrack L1 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.
- Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das Extraktionsrack 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:

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV2 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: HSV2 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 ab dem Elutionsrack in L3 in den Kühlbereich laden.
- 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. HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- HSV2 Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
- Das Rack 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.
- Das PCR-Rack mit „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:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV2 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: HSV2 PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. Die HSV2 Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: HSV2 Q-PCR Standards 10^2 , Cal2: HSV2 Q-PCR Standards 10^3 , Cal3: HSV2 Q-PCR Standards 10^4 , Cal4: HSV2 Q-PCR Standards 10^5). 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. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
5. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
6. Die Kalibratorröhrchen in das L3-Elutionsrack laden.
7. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
9. Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HSV2 ELITe_Be_STD). Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. HSV2 Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
11. Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. 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.
13. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
14. Die Gerätetür schließen.
15. 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. Amplifikationslauf für 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:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV2 Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Hinweis: HSV2 PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. Das Produkt HSV2 - ELITe Positive Control für die Amplifikation der Positive Control 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 (wie Negative Control) in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
6. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
7. Die Röhrchen für die Positive Control und Negative Control in das Elutionsrack L3 laden.
8. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
10. Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (HSV2 ELITe_Be_PC und HSV2 ELITe_Be_NC). Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. HSV2 Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
12. Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. 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.
14. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
15. Die Gerätetür schließen.
16. 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 HSV2 ELITe MGB Kit 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 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 24 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. auf zwei verschiedenen Geräten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA	24	24	0

Die Nachweisgrenze (LoD) des HSV2 ELITe MGB Kit wurde in Kombination mit **Vollblutproben**, in **ETDA entnommenen Plasmaproben** sowie **Liquorproben** und den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** verifiziert (Modus „Extr + PCR“ (Extraktion + PCR)).

Bei Vollblut

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 171 Kopien/ml dotierten Vollblutproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit dem zertifizierten Referenzmaterial „Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid“ (ZeptoMetrix Corporation) dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten ein positives Ergebnis haben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	171 Kopien/ml	20	20	20	0

Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	171 Kopien/ml	20	20	20	0

Der LoD-Wert der HSV2-Zielssequenz wurde für in EDTA entnommenes Vollblut bei 171 Kopien/ml bestätigt.

Bei Plasma

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 119 Kopien/ml dotierten Plasmaproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit dem zertifizierten Referenzmaterial „Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid“ (ZeptoMetrix Corporation) dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten ein positives Ergebnis haben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Plasma	119 Kopien/ml	20	20	20	0

Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Plasma	119 Kopien/ml	20	20	20	0

Der LoD-Wert der HSV2-Zielssequenz wurde für in EDTA entnommenes Plasma bei 119 Kopien/ml bestätigt.

Bei Liquor

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 119 Kopien/ml dotierten Liquorproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit der hitzeinaktivierten Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2), ZeptoMetrix, als Referenzmaterial dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten ein positives Ergebnis haben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
Liquor	119 Kopien/ml	20	20	20	0

Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
Liquor	119 Kopien/ml	20	20	19	1

Der LoD-Wert der HSV2-Zielssequenz wurde für Liquor bei 119 Kopien/ml bestätigt.

Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen

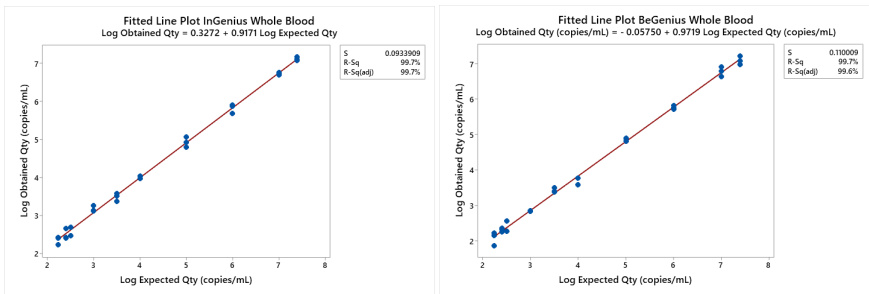
Der lineare Messbereich des HSV2 ELITe MGB Kits, das zusammen mit Proben von **Vollblut**, in **EDTA entnommenem Plasma** und **Liquor** in Kombination mit **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV2-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen von „Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid“ (ZeptoMetrix) in HSV2-DNA-negativen Matrices vorbereitet.

Bei Vollblut

Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von zirka $2,5 \times 10^7$ Kopien/ml bis zirka 171 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Vollblutproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R^2) eine lineare Reaktion von 0,997 bei **ELITe InGenius** und 0,997 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,1081 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1900 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = -0,1221 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1591 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 171 Kopien/ml.

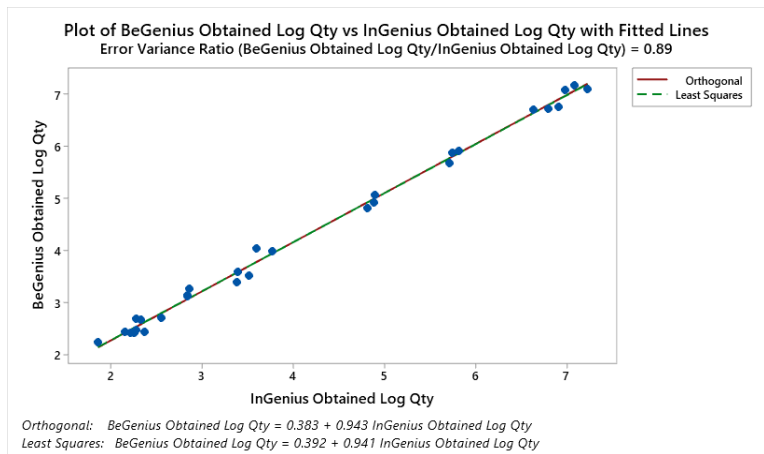
Die obere Nachweisgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0472 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1191 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,2744 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,3029 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
Kopien/ml	171	25.000.000

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.



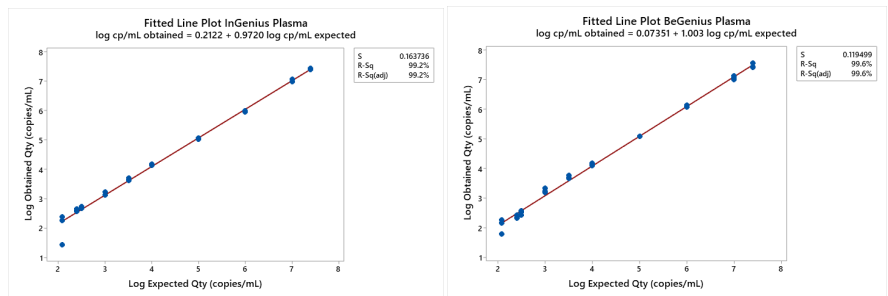
In diesem Test ergab die orthogonale Regressionsanalyse eine Steigung von 0,943 (95%-KI: 0,919; 0,967) und einen Achsenabschnitt von 0,383 (95%-KI: 0,276 bis 0,491). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,996.

Bei Plasma

Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von zirka $2,5 \times 10^7$ Kopien/ml bis zirka 119 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Plasmaproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R^2) eine lineare Reaktion von 0,992 bei **ELITe InGenius** und 0,996 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2529 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2931 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,0503 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0005 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 119 Kopien/ml.

Die obere Nachweisgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0234 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0761 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis -0,0258 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und -0,0646 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
Kopien/ml	119	25.000.000

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.

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS032PLD

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELiTe InGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-	48/48	23,40	0,82	3,49
3 x LoD	16/16	35,87	0,71	1,99				
10 x LoD	16/16	33,92	0,22	0,66				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELiTe InGenius** erkannte der Assay die HSV2-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV2 und bei der Internal Control aus.

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 bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen 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 bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen 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	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-				
3 x LoD	8/8	37,58	0,67	1,78	24/24	27,16	0,87	3,19
10 x LoD	8/8	35,25	0,56	1,58				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELiTe BeGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-				
3 x LoD	16/16	37,59	0,66	1,75	48/48	26,87	0,94	3,49
10 x LoD	16/16	35,41	0,84	2,37				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELite BeGenius** erkannte der Assay die HSV2-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV2 und bei der Internal Control aus.

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt HSV2 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 513 Kopien/ml) bzw. 10 x LoD (zirka 1710 Kopien/ml) mit dem zertifiziertem HSV2-Referenzmaterial „Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid“ (Zeptomatrix) 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 mit 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 in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, mit 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.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS032PLD

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELiTe InGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	23,91	0,35	1,45
3 x LoD	8/8	36,33	0,55	1,51				
10 x LoD	8/8	34,46	0,26	0,86				

Chargenübergreifende Wiederholpräzision, ELITE InGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	24,18	0,42	1,76
3 x LoD	8/8	36,45	0,46	1,26				
10 x LoD	8/8	34,66	0,26	0,76				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELiTe InGenius** erkannte der Assay die HSV2-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV2 und bei der Internal Control aus.

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 mit 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 in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag, mit 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 Wiederholpräzision, ELiTe BeGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	28,32	0,41	1,46
3 x LoD	8/8	37,43	0,42	1,15				
10 x LoD	8/8	35,88	0,25	0,75				

Chargenübergreifende Wiederholpräzision, ELITE BeGenius								
Probe	HSV2				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	27,86	0,66	2,37
3 x LoD	8/8	36,90	0,58	1,59				
10 x LoD	8/8	35,17	0,49	1,39				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELite BeGenius** erkannte der Assay die HSV2-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV2 und bei der Internal Control aus.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe „AcroMetrix HSV2 Plasma Panel“ (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 sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe InGenius				
Probe	Nennntiter Kopien/ml	Nennntiter log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/ml
HSV2 DNA 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	6,035
HSV2 DNA 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,067
HSV2 DNA 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,978
HSV2 DNA 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,190
HSV2 DNA 1E2	10 ²	2,000	2/2	1,711

Alle Proben wurden richtig als positiv mit einem Titer innerhalb des erwarteten Werts $\pm 0,5$ log nachgewiesen.

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial „QCMD 2014 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von HSV2-Verdünnungen, 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 sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe InGenius		
Probe	Probenstatus	Positiv / Wiederholungen
HSVDNA14-01	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-02	HSV1- und HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-03	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-04	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-05	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-06	HSV2 häufig erkannt	2/2
HSVDNA14-07	HSV2 erkannt	2/2
HSVDNA14-08	HSV2 häufig erkannt	2/2
HSVDNA14-09	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA14-10	HSV1- und HSV2-negativ	0/2

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger HSV2-DNA-positiver klinischer Proben von in EDTA entnommenem Vollblut, in EDTA entnommenem Plasma und Liquor in Zusammenhang 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**.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden verwendet: 23 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV2MQP01-Medium-Probe aus „HSV2 Molecular Q Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit einem Titer von 740 Kopien/ml mit HSV2-DNA dotiert waren, 30 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von „HSV2 ELITe-IQC High“ (ELITech Group S.p.A.) mit einem Titer von 750 Kopien/ml mit HSV2-DNA dotiert waren, sowie 20 HSV2-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von „HSV2 ELITe-IQC High“ (ELITech Group S.p.A.) mit einem Titer von 750 Kopien/ml mit HSV2-DNA dotiert waren.

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.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-positives Vollblut	23	22	1
In EDTA entnommenes, mit HSV2-DNA dotiertes Plasma	30	30	0
Mit HSV2-DNA dotierter Liquor	20	20	0

Alle Plasma- und Liquorproben waren gültig und positiv. Alle Vollblutproben waren gültig; 22 Proben wurden als positiv bestätigt. Eine Probe war abweichend negativ, möglicherweise durch Hemmung. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 99 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger HSV2-DNA-negativer klinischer, in EDTA entnommener Vollblut- und Plasmaproben sowie HSV2-DNA-negativer klinischer Liquorproben 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 Spezifität des Assays auch für **ELITe BeGenius**.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 34 in EDTA entnommene Vollblutproben von gesunden, vermutlich HSV2-DNA-negativen Spendern, 39 in EDTA entnommene Plasmaproben von gesunden, vermutlich HSV2-DNA-negativen Spendern und 22 Liquorproben von gesunden, vermutlich HSV2-DNA-negativen Spendern bewertet. 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.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-negatives Vollblut	34	0	34
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-negatives Plasma	39	0	39
HSV2-DNA-negativer Liquor	22	0	22

Alle Vollblut-, Plasma- und Liquorproben waren gültig und negativ. Der Ct-Grenzwert für die Internal Control (IC Ct) wurde auf 35 festgelegt. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

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

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

Dieses Produkt muss mit aus den folgenden biologischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden: Liquor, in EDTA entnommenes Vollblut in EDTA entnommenes Plasma.

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.

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 Liquor mit **ELITe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S200_EL1**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primäröhrchen 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 Liquor 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 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.

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die DNA-Extraktion 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 Vollblut mit **ELiTe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S200_EL1**, 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 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 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 Vollblut mit dem Kit **„EXTRAblood“** durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probenvolumen (nicht mehr als 2 Millionen Leukozyten) und eluieren Sie die DNA in **100 µl** Elutionspuffer.

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_E100S200_EL1**, 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 **«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.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät **„QIAasymphony® SP/AS“** und dem Kit **„QIAasymphony® 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/Probe CPE** zur Lösung hinzufügen. Die Röhrchen mit der Lösung 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 **85 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Störende Substanzen

Die aus der Probe extrahierte DNA darf kein Heparin, Hämoglobin, Dextran, Ficoll®, Ethanol oder 2-Propanol enthalten, um das Problem einer Inhibition 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, jede Amplifikation 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 dieses Produkts enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt **«HSV2 - ELiTe Positive Control»** oder das Produkt **«HSV2 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 **7300 Real-Time PCR System**.

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

- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen und einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die HSV2-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „HSV2“

Seite 36/61

Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen HSV2-Sonde (FAM-Detektor „HSV2“) und der spezifischen Sonde für die Internal Control (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 HSV2-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der HSV2-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-Time PCR System**:

- manuell den **Schwellenwert** („Threshold“) für den FAM-Detektor „HSV2“ auf **0,1** einstellen;
- manuell den **Schwellenwert** („Threshold“) für den VIC-Detektor „IC“ auf **0,05** einstellen.

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

- manuell den **Schwellenwert** („Threshold“) für den FAM-Detektor „HSV2“ 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.

In der Amplifikationsreaktion der **Positive Control*** dient der **Ct-Wert** von HSV2 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Positive Control FAM-Detektor „HSV2“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei HSV2 **Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist, 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 Positivkontrolle, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrolle, falsche Einstellung der Position der Positivkontrolle, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

*** Hinweis:** Wenn dieses Produkt zur Quantifizierung von HSV2-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positive Control** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)** beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct-Wert** von HSV2 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negative Control FAM-Detektor „HSV2“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** bei HSV2 **Ct Undetermined (unbestimmt)** ist, 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 HSV2 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 Kopien von DNA des gpG-Gens von HSV2 in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen, die 10 Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (Nachweisgrenze, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

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	HSV2 DNA
FAM-Detektor „HSV2“	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 HSV2 und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die Internal Control effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder nicht vorhandene Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren) 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 HSV2 und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass die HSV2-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der HSV2-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 HSV2-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der Internal Control „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 HSV2-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.

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** ermöglichen die **Ct-Werte** für HSV2 die Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) für den Amplifikationslauf sowie die Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Standardkurve FAM-Detektor „HSV2“	Akzeptanzbereich	Amplifikation/Detektion
Korrelationskoeffizient (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	KORREKT

Wenn der Wert des **Korrelationskoeffizienten (R2)** außerhalb der Bereichsgrenzen liegt, heißt dies, 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 Position der Standards, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

Die HSV2-Ct-Werte in der Amplifikationsreaktion der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** des Amplifikationslaufs dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, zwischen 1.000.000 und 10 Kopien von DNA des gpG-Gens von HSV2 in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich, siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Probenergebnis FAM-Detektor „HSV2“	HSV2-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 (**Kopien**) von HSV2, die in der extrahierten Probe vorhanden sind (**Nc**), gemäß dieser Formel:

$$Nc \text{ (Kopien)} = \frac{Ve \times Menge}{Vc \times Va \times Ep}$$

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 Kopien pro Reaktion**.

Wird das „**ELiTe STAR**“ zusammen mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder in EDTA entnommenen Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma, Liquor und „ELiTe STAR“
Nc (Kopien/ml) = 28 x Menge

Wird das „**ELiTe GALAXY**“ zusammen mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder in EDTA entnommenen Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma, Liquor und „ELiTe GALAXY“
Nc (Kopien/ml) = 35 x Menge

Wird das Extraktionskit „**EXTRAblood**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und „EXTRAblood“
Nc (Kopien/ml) = 25 x Menge

Wird das Extraktionssystem „**NucliSENS® easyMAG®**“ mit in EDTA entnommenen Plasma- oder Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma, Liquor und „NucliSENS® easyMAG®“
Nc (Kopien/ml) = 10 x Menge

Wird das Extraktionssystem „**QIAasympy® SP/AS**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und „QIAasympy® SP/AS“
Nc (Kopien/ml) = 12 x Menge

Berechnung der Grenzen des linearen Messbereichs

Bei Verwendung einer bestimmten Extraktionsmethode können die Grenzen des linearen Messbereichs als Kopien/ml der Probe anhand des linearen Messbereichs der Amplifikationsreaktion gemäß der folgenden Formel berechnet werden:

Untere Grenze (Kopien/ml) = $\frac{Ve \times 10 \text{ Kopien}}{Vc \times Va \times Ep}$
Obere Grenze (Kopien/ml) = $\frac{Ve \times 1.000.000 \text{ Kopien}}{Vc \times Va \times Ep}$

Wird das Extraktionskit „**EXTRAblood**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/ml) bei „EXTRAblood“
Untere Grenze (Kopien/ml) = 25 x 10 Kopien
Obere Grenze (Kopien/ml) = 25 x 1.000.000 Kopien
von 250 bis 25.000.000 Kopien/ml

Wird das Extraktionssystem „**ELiTe STAR**“ mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/ml) bei „ELiTe STAR“
Untere Grenze (Kopien/ml) = 28 x 10 Kopien
Obere Grenze (Kopien/ml) = 28 x 1.000.000 Kopien
von 280 bis 28.000.000 Kopien/ml

Wird das Extraktionssystem „**ELiTe GALAXY**“ mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/ml) bei „ELiTe GALAXY“
Untere Grenze (Kopien/ml) = 35 x 10 Kopien
Obere Grenze (Kopien/ml) = 35 x 1.000.000 Kopien
von 350 bis 35.000.000 Kopien/ml

Wird das Extraktionssystem „**NucliSENS® easyMAG®**“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/ml) bei „NucliSENS® easyMAG®“
Untere Grenze (Kopien/ml) = 10 x 10 Kopien
Obere Grenze (Kopien/ml) = 10 x 1.000.000 Kopien
von 100 bis 10.000.000 Kopien/ml

Wird das Extraktionssystem „QIASymphony® SP/AS“ zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/ml) bei „QIASymphony® SP/AS“
Untere Grenze (Kopien/ml) = 12 x 10 Kopien
Obere Grenze (Kopien/ml) = 12 x 1.000.000 Kopien
von 120 bis 12.000.000 Kopien/ml

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Ziel-DNA-Molekülen 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 verwendet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	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 „ELITE GALAXY“ verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV2-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der HSV08-12-Probe aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in HSV2-DNA-negativem EDTA-Vollblut zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 Kopien/ml und 560 Kopien/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 analytische Sensitivität in Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und „ELITE GALAXY“ (Kopien/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Unterer Grenzwert	Obere Grenze
95 %-Positivität	171 Kopien/ml	112 Kopien/ml	505 Kopien/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und „ELITE GALAXY“ verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV2-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der HSV08-12-Probe aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in HSV2-DNA-negativem EDTA-Plasma zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 Kopien/ml und 560 Kopien/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 analytische Sensitivität in Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und „ELITE GALAXY“ (Kopien/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Unterer Grenzwert	Obere Grenze
95 %-Positivität	119 Kopien/ml	75 Kopien/ml	547 Kopien/ml

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Die analytische Sensitivität dieses Assays ermöglicht die Quantifizierung von 1.000.000 bis 10 Ziel-DNA-Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays, als linearer Messbereich, wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 107 Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen 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 Punkten der Reihe eine lineare Reaktion aufweist (Quadrat des Korrelationskoeffizienten über 0,99).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10⁶ Molekülen pro Reaktion, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10⁵ Moleküle/20 µl).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf 10 Moleküle pro Reaktion festgelegt, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10² Moleküle/20 µl).

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich (Kopien/Reaktion)	
Obere Grenze	1.000.000 Kopien/Reaktion
Unterer Grenzwert	10 Kopien/Reaktion

Die Grenzen des linearen Messbereichs in Kopien/ml in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 26 berechnet.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten derselben innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 18,6 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10 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 14,4 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10 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 ermittelt.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit kalibriertem 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 einer Ringversuchsreihe überprüft.

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV2 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit „ELITE STAR“ und die Amplifikation mit Produkten der

ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe STAR»				
Probe	Virus	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standardabweichung	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/ml
HSV09-01	HSV1	2,215	0,789	-
HSV09-02	HSV2	2,236	0,938	1,687
HSV09-03	HSV2	3,293	0,915	3,700
HSV09-04	HSV2	2,314	0,898	2,329
HSV09-05	Negativ	n. z.	-	-
HSV09-06	HSV1	2,402	0,665	-
HSV09-07	HSV1	4,189	0,599	-
HSV09-08	HSV2	2,389	0,827	2,352
HSV09-09	Negativ	n. z.	-	-
HSV09-10	HSV1	3,205	0,767	-

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

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV2 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «ELITe GALAXY» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle in Kopien/ml aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe GALAXY»				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/ml
HSV12-01	Negativ, n. z.	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	0/2	-
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	1/2	2,128
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	0/2	-
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	0/2	-
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	2/2	3,634
HSV12-09	Negativ, n. z.	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	2/2	3,861

Alle negativen Proben wurden richtig angegeben. Die positiven Proben innerhalb der theoretischen Nachweisgrenze des Systems (350 Kopien/ml) wurden im Bereich des durchschnittlichen „Konsens“-Werts des kommerziellen Assays ± 1 Standardabweichung richtig erkannt. Eine Probe unterhalb der theoretischen Nachweisgrenze des Systems (22,5 Kopien/ml) ergab ein negatives Ergebnis. Proben mit Titer unter der Nachweisgrenze können stochastisch als positiv oder negativ angegeben werden.

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 der Datenbank für das gpG-Gen von HSV2 verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde mithilfe einiger positiv auf HSV2-DNA getesteter klinischer Proben von in EDTA entnommenem Vollblut getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 20 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die von vermutlich negativen Spendern stammten (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Frankreich) und mit „QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) bei niedrigem HSV2-DNA-Titer positiv getestet wurden. Mit jeder Vollblutprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die 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, HSV2-DNA-positives Vollblut	20	20	0

Alle dotierten Proben wurden richtig als HSV2-DNA-positiv erkannt.

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 22 HSV2-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von IQC032RH-Probe von ELITechGroup S.p.A. mit HSV2-DNA dotiert waren, 30 HSV2-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV08-12-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, und 30 HSV2-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV08-12 aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die 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
Mit HSV2-DNA dotierter Liquor	22	22	0
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-dotiertes Vollblut	30	29	0

Das Ergebnis von einer HSV2-positiven Probe war ungültig.

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 21 HSV2-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von „HSV2MQP01 - High sample“ aus dem „Molecular Q Panel HSV2MQP01“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, 30 HSV2-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV08-12-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, und 32 HSV2-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV08-12-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) und HSV10-01-Proben aus dem „QCMD 2010 Herpes Simplex Human virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion 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
Mit HSV2-DNA dotierter Liquor	21	21	0
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-dotiertes Vollblut	32	32	0

Alle dotierten Proben wurden richtig als HSV2-DNA-positiv erkannt.

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 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 HSV2, darunter die kompletten HSV1- und VZV-Genome, verfügbaren Sequenzen ergab, dass das humane Herpesvirus, das HSV2 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 einer Ringversuchsreihe überprüft.

Für die Bewertung der analytischen Spezifität wurde eine Reihe einschließlich HSV1-positiver und VZV-positiver Proben (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung getestet. Hierzu wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

Die Ergebnisse sind im Abschnitt „Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit kalibriertem Referenzmaterial“ aufgeführt.

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit HSV1- und VZV-positiven Proben nachgewiesen.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde mithilfe einiger negativ auf HSV2-DNA getesteter klinischer Proben von Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 24 in EDTA entnommene Vollblutproben von vermutlich HSV2-DNA-negativen Spendern (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Frankreich) als Referenzmaterial verwendet. Mit jeder Vollblutprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit „**EXTRA**blood“ 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, HSV2-DNA-negatives Vollblut	24	0	24

Alle Proben wurden als HSV2-DNA-negativ erkannt.

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 24 HSV2-DNA-negative Liquorproben, 30 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Plasmaproben sowie 30 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die 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
HSV2-DNA-negativer Liquor	24	0	24
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-negatives Plasma	30	0	30
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-negatives Vollblut	30	0	30

Alle Proben wurden als HSV2-DNA-negativ erkannt.

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 22 HSV2-DNA-negative Liquorproben, 34 in EDTA entnommene, vermutlich HSV2-DNA-negative Plasmaproben sowie 36 in EDTA entnommene, vermutlich HSV2-DNA-negative Vollblutproben verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion 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
HSV2-DNA-negativer Liquor	22	0	22
In EDTA entnommenes, vermutlich HSV2-DNA-negatives Plasma	34	0	34
In EDTA entnommenes, vermutlich HSV2-DNA-negatives Vollblut	36	0	36

Alle Proben wurden richtig als HSV2-DNA-negativ erkannt.

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

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizen und Geräten durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation „HSV2 ELITe MGB Kit“, FTP RTS032PLD, aufgeführt.

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.

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 immun supprimierende 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 „**HSV2 - ELITe Positive Control**“ oder alternativ das Produkt „**HSV2 - ELITe Positive Control RF**“ oder das Produkt „**HSV2 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)

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

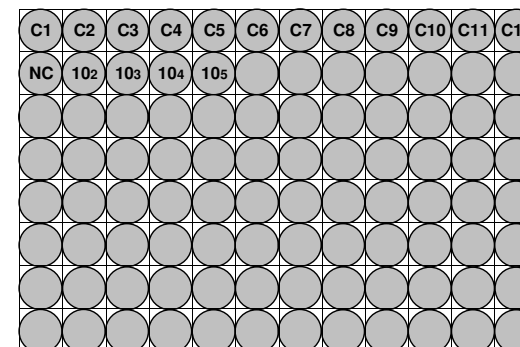
Hinweis: Die Fluoreszenzerfassung erfolgt einzeln; die Heizrate (°C/s) auf 4,4°C/s einstellen.

- die Kanäle der Signalerfassung auswählen: „detector“ (Detektor) für den HSV2-Sensor mit „channel FAM 465-510“ und „detector“ für den IC-Sensor mit „channel VIC 540-580“;

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** (10⁵ Kopien, 10⁴ Kopien, 10³ Kopien und 10² Kopien) 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 10² Kopien; 10³: Standard 10³ Kopien; 10⁴: Standard 10⁴ Kopien; 10⁵: Standard 10⁵ Kopien.

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 **HSV2 Q – PCR Mix** auftauen und daran denken, dass der Inhalt jedes Röhrchens für **25 Reaktionen** ausreicht. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die Teströhrchen mit **HSV2 – Positive Control** oder alternativ **HSV2 - ELITe Positive Control RF** oder die Teströhrchen mit **HSV2 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 **HSV2 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.
4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:
 - Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von HSV2-DNA): **20 µl HSV2 - Positive Control** oder alternativ „**HSV2 - 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 **HSV2 - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
 - Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von HSV2-DNA): **20 µl HSV2 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 **HSV2 Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **HSV2 Q - PCR Standards (103, 104, 105)** auf die gleiche Weise verfahren.

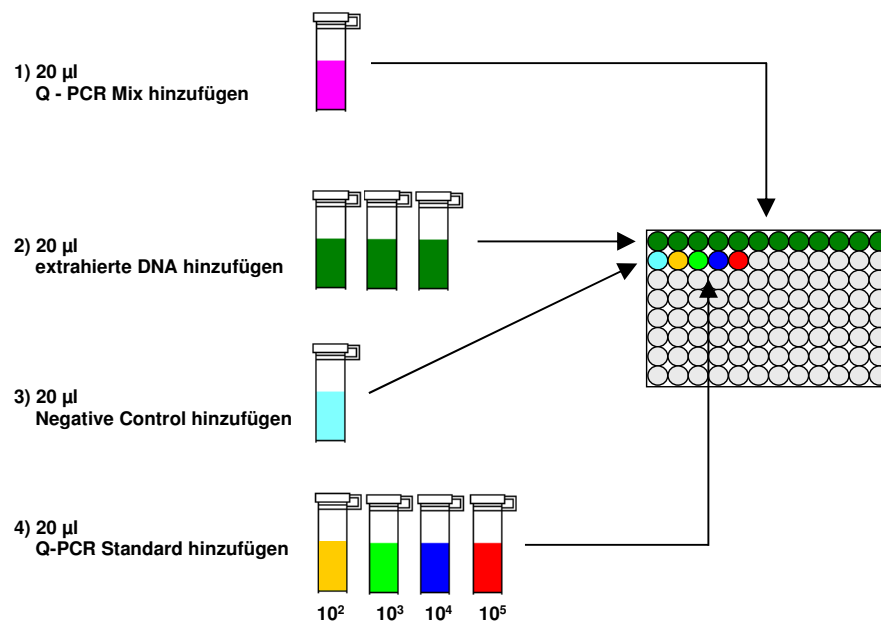
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS032PLD

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-HSV2-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 HSV2-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 Plasmaproben

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „HSV2“ auf **0,55** einstellen;
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den VIC-Detektor „C“ auf **1,2** einstellen.

Bei Vollblutproben

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS032PLD

- Detektor „HSV2“ 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 HSV2 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 „HSV2“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei HSV2 **Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist, 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 Positivkontrolle, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Positivkontrolle, falsche Einstellung der Position der Positivkontrolle, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

* **Hinweis:** Wenn dieses Produkt zur Quantifizierung von HSV2-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positive Control** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)** beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct-Wert** von HSV2 (Fenster „Analysis“ (Analyse)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negative Control Detektor „HSV2“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** für HSV2 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 ungenügend und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Bei den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** dient der **Ct-Wert** für HSV2 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	HSV2 DNA
Detektor „HSV2“	Detektor „IC“			
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	ungeeignet	ungültig	-
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, negativ	NICHT ERKANNT

Probenreaktion		Eignung der Probe	Assayergebnis	HSV2 DNA
Detektor „HSV2“	Detektor „IC“			
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 HSV2 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 HSV2 und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, wurde die HSV2-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die HSV2-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 HSV2-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 HSV2-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.

Die **Ct-Werte** für HSV2 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 Kopien pro Reaktion bzw. von 25.000.000 bis 250 Kopien pro ml Vollblut und Plasma mit dem Extraktionssystem **MagNA Pure 24** zu quantifizieren (siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Probenresultat FAM-Detektor „HSV2“	HSV2-Kopien 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 **Kopien** von HSV2 (**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 Kopien pro Reaktion**.

Werden in EDTA entnommene Vollblutproben oder in EDTA entnommene Plasmaproben und das Extraktionssystem **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis **in Kopien/ml ausgegeben** werden, so ändert sich die Formel wie folgt:

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

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	27	0

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als linearer Messbereich, ermöglicht die Quantifizierung von zirka 25.000.000 bis 25 Kopien 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 Kopien/Reaktion innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10² Kopien/20 µl).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10⁶ Kopien/Reaktion innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10⁵ Kopien/20 µl).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Linearer Messbereich mit MagNA Pure 24		
	Unterer Grenzwert	Obere Grenze
Kopien/ml	250	25.000.000
Kopien/Reaktion	10	1.000.000

Die Umrechnungen von Kopien/ml in Kopien/Reaktion und umgekehrt erfolgten wie auf Seite 39 angegeben.

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 mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der Ct-Werte unter 1 % 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 9 % 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 logarithmische Größe von zirka 6,4 % 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.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde «HSV2 Molecular 'Q' Panel» (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jeder Punkt der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür 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 aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «MagNA Pure 24»	
Probe	Positive/Wiederholungen
HSV2MQP01-High	2/2
HSV2MQP01-Medium	2/2
HSV2MQP01-Low	2/2
HSV2MQP01-Negative	0/2

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde das „QCMD 2017 Herpes Simplex Virus DNA Panel“ (HSVDNA17S, Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von HSV2-Verdünnungen, als Referenzmaterial verwendet. Jeder Punkt der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür 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 aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «MagNA Pure 24»		
Probe	Probenstatus	Positiv / Wiederholungen
HSVDNA17S-01	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «MagNA Pure 24»		
Probe	Probenstatus	Positiv / Wiederholungen
HSVDNA17S -02	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA17S -03	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA17S -04	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA17S -05	HSV1-positiv, HSV2-negativ	0/2
HSVDNA17S -06	HSV2 häufig erkannt	2/2
HSVDNA17S -07	HSV2 häufig erkannt	2/2
HSVDNA17S -08	HSV2 häufig erkannt	2/2
HSVDNA17S -09	HSV2 erkannt	2/2
HSVDNA17S -10	HSV2 häufig erkannt	2/2

Alle Proben wurden richtig erkannt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 30 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV2MQP01-High-Proben (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, und 30 in EDTA entnommene, HSV2-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV2MQP01-High-Proben (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV2-DNA dotiert waren, 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, HSV2-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, HSV2-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle Proben waren beim ersten Test gültig und wurden als HSV2-DNA-positiv bestätigt.

Die diagnostische Gesamtsensitivität des Assays betrug 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 40 in EDTA entnommene, vermutlich HSV2-DNA-negative Vollblutproben und 34 in EDTA entnommene, vermutlich HSV2-DNA-negative Plasmaproben 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 HSV2-DNA-negatives Vollblut	40	0	40
In EDTA entnommenes, vermutlich HSV2-DNA-negatives Plasma	34	0	34

Alle Proben waren beim ersten Test gültig und wurden als HSV2-DNA-negativ bestätigt.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug 100 %.

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 „HSV2 ELITe MGB Kit“, FTP RTS032PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179–186
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt muss mit aus den folgenden klinischen Proben extrahierter DNA verwendet werden: Liquor, in EDTA entnommenes Vollblut, in EDTA entnommenes Plasma.

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, Suspensionen von Granulozyten und Fruchtwasser.

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 immun supprimierende 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 die HSV2-positiven Proben, die Positive Control 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 ernsten 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 ernsten 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.

Eine räumliche Trennung von Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten ist zu beachten, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Für die Verwendung des Produkts werden 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 HSV2-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 HSV2-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 Reaktionen 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 falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch und Negativkontrolle oder Standards kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch und 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 Positivkontrolle oder 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, Negativkontrollen, Positivkontrollen und Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITe InGenius falsch eingerichtet	Position von Reaktionsgemisch oder Negativkontrolle kontrollieren. Volumina des Reaktionsgemischs oder der Negativkontrolle kontrollieren.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen 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.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der 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 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 Niveaus der Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsche Dispensierung der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negativ- und Positivkontrollen oder 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.

Bei ELITe InGenius: Fehler 30103	
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 in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen oder - die Extraktion mit einer Verdünnung der Primärprobe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.

SYMBOLE

REF	Katalognummer.
	Temperaturobergrenze.
LOT	Chargenbezeichnung.
	Verwendbar bis (letzter Tag des Monats).
IVD	In-vitro-Diagnostikum.
	Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika.
	Genügend für „n“ Tests.
	Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.
FORT	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 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®, das ELITE MGB®-Gerätelogo, ELITE InGenius® und ELITE BeGenius® sind eingetragene Marken in der Europäischen Union.

«NucliSENS® easyMAG®» sind eingetragene Marken von bioMérieux SA.

«QIASymphony®» ist eine eingetragene Marke der QIAGEN GmbH.

Ficoll® ist eine eingetragene Marke von GE Healthcare.

HSV2 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS032PLD



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 «HSV2 ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence


Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole Blood** EDTA, **Plasma** EDTA, **CSF**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
96 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius® instrument: INT030 › ELITE BeGenius® instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 extraction cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridge: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set consumable for extraction: INT032CS | <ul style="list-style-type: none"> › HSV2 - ELITE Standard: STD032PLD › HSV2 - ELITE Positive Control: CTR032PLD › CPE – Internal Control: CTRCPE › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|--|--|

F. Protocol

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 20 µL › Q-PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of quantitative result Copies/mL › Frequency of controls 15 days › Frequency of calibration 60 days |
|--|--|

G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	171 cp / mL	171 – 25,000,000	96% 22/23*	100% 34/34*
Plasma	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 39/39*
CSF	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

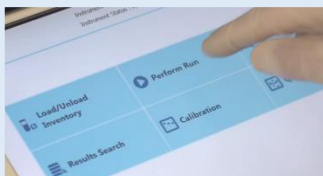
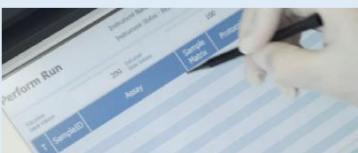

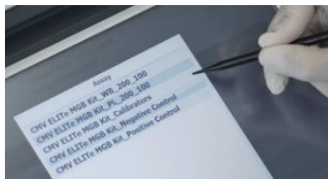




H. Procedures ELITE InGenius®

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: HSV2 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV2 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the Q-PCR-Mix and the 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 volume: Input: "200 µL", eluate: "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 extraction tube 	6. Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction 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 Elution tubes rack
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 Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample


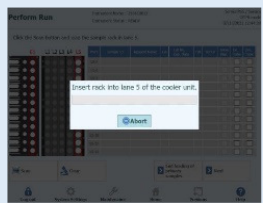
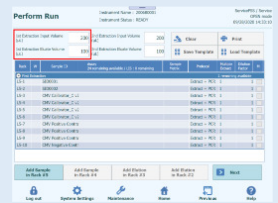
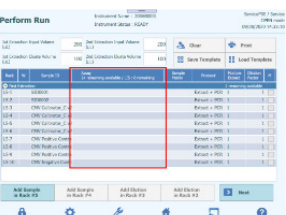
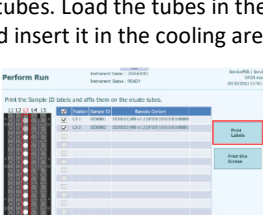




L. Procedures ELITE BeGenius®

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius 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 BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	2. Verify calibrators: HSV2 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV2 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the HSV2 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 and then click on the run mode «Extraction and PCR» 	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 	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 

Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

Procedure 2 - PCR only

1. Select “Perform Run” on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	3. Select the “Assay protocol” of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	5. Close the door. Start the run	6. 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” in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

HSV2 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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 **QIAasymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **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
- ›

- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **CPE - Internal Control**: CTCRPE
- › **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
- › **QIAasymphony** - 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	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	171 gEq/mL	100% (32/32)*	100% (36/36)*
	Plasma	119 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (21/21)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

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, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAasympphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

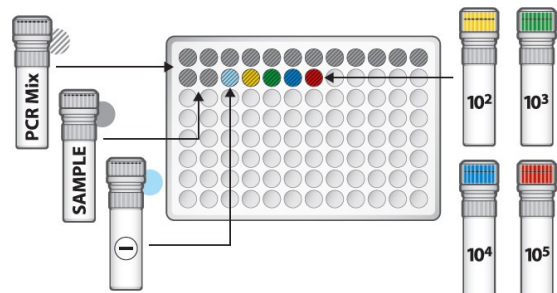
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition 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
45 cycles	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV2 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 – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV2 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV2 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 HSV2 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 cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

HSV2 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood** EDTA
- › **Plasma** EDTA

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › 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**, software 1.0
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (40/40)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

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, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

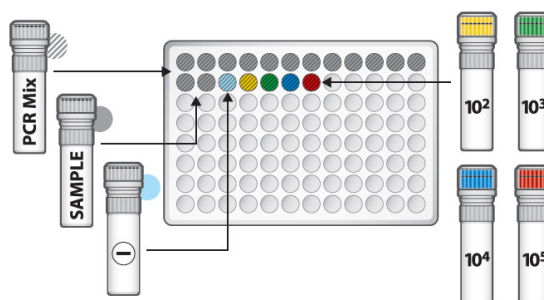
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

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

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV2 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 – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV2 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

HSV-1 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 HSV2 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 copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.