

NOTICE of CHANGE dated 03/06/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«PVB19 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS070PLD

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

- Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040) and amniotic fluid matrix.

Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.16):

- Linear measuring range
- Conversion factor to International Units
- Addition of UDI information.

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
O	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





Seite 47 Seite 50 HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ Seite 51 Seite A

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt **Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das für die Anwendung durch medizinisches Fachpersonal bestimmt ist. Es dient als gualitativer und guantitativer Nukleinsäure-Real-Time-PCR-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung der DNA von humanem Parvovirus B19 (PVB19), Genotypen 1, 2, 3a und 3b, in DNA-Proben, die aus klinischen Proben extrahiert wurden.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten ELITe InGenius® und ELITe BeGenius®, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen, in EDTA entnommenen Vollblutproben (aus peripherem Blut und Knochenmark) und Fruchtwasserproben validiert.

Dieser Assay ist außerdem in Verbindung mit dem 7300 Real-Time PCR System und dem 7500 Real-Time PCR Instrument, mit humanen, in EDTA entnommenen Vollblutproben (aus peripherem Blut und Knochenmark) und in EDTA entnommenen Plasmaproben validiert.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



Dieses Produkt ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose und Überwachung von Parvovirus-B19-Infektionen bestimmt. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen Beobachtungen und Laborbefunde herangezogen werden.

TESTPRINZIP

Der Assav ist eine quantitative Real-Time-PCR für den Nachweis der DNA des Parvovirus, die aus Proben isoliert und mit dem Testreagenz PVB19 Q PCR Mix, das Primer und ELITE MGB-Technologie-Sonden enthält, amplifiziert wurde.

Die ELITe MGB-Sonden werden aktiviert, wenn sie mit den jeweiligen PCR-Produkten hybridisieren. ELITe InGenius und ELITe BeGenius überwachen den Fluoreszenzanstieg und berechnen den Schwellenwertzyklus (Ct) sowie die Schmelztemperaturen (Tm). Die Berechnung der PVB19-DNA-Menge erfolgt auf der Grundlage einer gespeicherten Kalibrationskurve.

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

BESCHREIBUNG DES PRODUKTS

Das Parvovirus B19 ELITE MGB Kit enthält das Assay-Reagenz PVB19 Q PCR Mix, ein optimiertes und stabilisiertes PCR-Gemisch, das die spezifischen Primer und Sonden enthält für:

- die VP1-Region von PVB19, nachgewiesen im Kanal PVB19; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher
 gequencht und mit einem FAM-Farbstoff markiert.

die Internal Control (IC), die für die Promoter- und 5'-UTR-Region des humanen beta-Globin-Gens spezifisch ist, nachgewiesen in Kanal IC; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher® gequencht und mit dem Farbstoff AquaPhluor® 525 (AP525) markiert.

Der PVB19 Q PCR Mix enthält außerdem Puffer, Magnesiumchlorid, Nulkeotidtriphosphate, AP593-Fluorophor (analog zu ROX oder Cy5) als Passivreferenz für die Fluoreszenz-Normalisierung, das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie die "Warmstart"-DNA-Polymerase.

Das Produkt Parvovirus B19 ELITE MGB Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius (24 Tests pro Röhrchen) und für 100 Tests auf anderen Systemen (25 Tests pro Röhrchen), wobei 20 µl pro Reaktion verwendet werden.

Der Parvovirus B19 ELITe MGB Kit kann auch in Verbindung mit anderen gleichwertigen Geräten verwendet werden.

MIT DEM PRODUKT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
PVB19 Q - PCR Mix Ref. RTS070PLD	Gemisch aus Reagenzien für die Real-Time-PCR in Röhrchen mit durchsichtigem Verschluss	4 x 540 µl	-

SCH mRTS070PLD de

SYMBOLE

ANHANG: KURZANLEITUNG

REF RTS070PLD

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Sicherheitswerkbank.

- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tisch-Mikrozentrifuge (~13.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (0,5–10 µl, 2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- sterile 2,0-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Deutschland, Ref. 72.694.005).
- 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.

ANDERE ERFORDERLICHE PRODUKTE

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

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

Geräte und Software	Produkte und Reagenzien
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030)	
ELITe InGenius Software, Version 1.3.0.17 (oder später)	
PVB19 ELITe_STD , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse	
PVB19 ELITe_PC , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Positive Control-Analyse	
PVB19 ELITe_NC , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Negative Control-Analyse	ELITe InGenius SP200 (EG SpA., ref. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA. ref.
PVB19 ELITe_WB_200_100, Assay Protocol (Assay-	INT032CS)
Protokoll) mit Parametern für die Vollblutproben-Analyse	ELITE InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR),
PVB19 ELITE_AF_200_100, Assay Protocol (Assay- Protokoll) mit Parametern für die Analyse von	300 uL Filter Tips Axvaen (Corning Life Sciences Inc., ref.
Fruchtwasserproben	TF-350-L-R-S), nur mit ELITe InGenius
ELITE BeConius (FC Sed ref INTO40)	1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Schweiz, ref. 30180118)
ELITE Begenius (EG SpA ref. IN1040)	CPE - Internal Control (EG SpA ref CTRCPE)
PVB19 ELITe_Be_STD, Assay Protocol (Assay-	Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, ref.
Protokoll) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse	STD070PLD)
PVB19 ELITe_Be_PC , Assay Protocol (Assay-Protokoll) mit Parametern für die Positive Control-Analyse	CTR070PLD)
PVB19 ELITe_Be_NC , Assay Protocol (Assay- Protokoll)mit Parametern für die Negative Control- Analyse	
PVB19 ELITe_Be_WB_200_100 , Assay Protocol (Assay-Protokoll)mit Parametern für die Vollblutproben- Analyse	
PVB19 ELITe_Be_AF_200_100, Assay Protocol (Assay- Protokoll)mit Parametern für die Analyse von Fruchtwasserproben	
7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, ref. 4351101)	MicroAmp [™] Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies, ref. N8010560)
QIAsymphony [®] SP/AS (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301)	CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE)
NucliSENS [®] easyMAG [®] (bioMérieux SA, ref. 200111)	Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD)



Geräte und Software	Produkte und Reagenzien
ELITe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020) ELITe STAR (EG S.p.A., ref. INT010)	Parvovirus B19 – ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD) QIAsymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, ref. 931236) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), ELITE GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX) InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) QIAsymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, ref. 200111) ELITE GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020) ELITE STAR (EG S.p.A., ref. INT010)	 «MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate» with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE) Parvovirus B19 ELITe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD) Parvovirus B19 – ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD) QIAsymphony[®] Midi kit (QIAGEN GmbH, ref. 931236) NucliSENS[®] easyMAG[®] Reagents (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), ELITE GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX) InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).

Mithilfe eines Umrechnungsfaktors (Fc) können die Ergebnisse der quantitativen Analyse in internationalen Einheiten (IU) von PVB19 gemäß dem "3rd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay" (NIBSC code 12/208, Vereinigtes Königreich) ausgedrückt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist nur für die In-vitro-Anwendung bestimmt.

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

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

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

Das Essen, Trinken, Rauchen oder die Verwendung von Kosmetika ist in den Arbeitsbereichen untersagt.

Nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen. Restliche Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen. Vor der Durchführung des Assays alle bereitgestellten Anweisungen aufmerksam lesen. Bei der Durchführung des Tests die bereitgestellten Produktanweisungen befolgen.



Das Produkt nicht nach dem angegebenen Ablaufdatum verwenden.

Es dürfen nur mit dem Produkt bereitgestellte und vom Hersteller empfohlene Reagenzien verwendet werden.

Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen verwenden. Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

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

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.

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

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

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

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

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

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Komponente	Umgebungstempera tur bei Lagerung	Haltbarkeit nach Anbruch	Gefrier- und Auftauzyklen	On-Board-Stabilität (ELITe InGenius und ELITe BeGenius)
PVB19 Q PCR Mix	-20°C oder darunter (lichtgeschützt)	einen Monat	bis zu fünf	bis zu fünf separate* Läufe von je drei Stunden oder bis zu 7 aufeinanderfolgende Stunden (2 Läufe von je 3 Stunden und die Zeit, die für den Beginn eines dritten Laufs benötigt wird)

* mit zwischenzeitlichem Gefrierzyklus

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



PROBEN UND KONTROLLEN bei ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Proben

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

		Transport-/Lagerbedingungen				
Probe	Anforderungen an die Entnahme	+16 / +26 °C (Raumtemperatur)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C	
Vollblut	EDTA	≤ 24 Stunden	≤ 3 Tage	≤ 30 Tage	≤ 30 Tage	
Fruchtwasser	Ohne Konservierungsmittel entnommen	≤ 4 Stunden	≤4 Stunden	≤ 30 Tage	≤ 30 Tage	

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

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

	Assay Protocol (Assay-Protokoll) für Parvovirus B19 ELITe MGB Kit					
	Probe	Instrument	Probentra nsfer	Name des Assay Protocol (Assay- Protokoll)	Melden Sie	Eigenschaften
Vollt	Vollblut	ELITe InGenius	Nicht erforderlic h	PVB19 ELITe_WB_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
		ELITe BeGenius	Nicht erforderlich	PVB19 ELITe_Be_WB_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
	Fruittan	ELITe InGenius	benötigt, in Extraction Tube (Extraktion sröhrchen)	PVB19 ELITe_AF_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
Fruchtwa	nucliwasser	ELITe BeGenius	benötigt, in 2-ml- Starstedt- Röhrchen	PVB19 ELITe_Be_AF_200_100	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktion Eingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

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



Hinweis: Das Pipettieren in das Extraktionsröhrchen oder das 2-ml-Sarstedt-Röhrchen kann Kontamination verursachen. Die geeigneten Pipetten verwenden und alle im Abschnitt "Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen" aufgeführten Empfehlungen befolgen.

Hinweis: Das Volumen der Probe in einem Primärröhrchen variiert je nach Art des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen zum Einrichten und Durchführen des Extraktionsverfahrens sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits oder dem Handbuch zu **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** zu entnehmen.

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

Daten zu störenden Substanzen sind im Abschnitt "Leistungsmerkmale" sind "Potenziell interferierende Substanzen" aufgeführt.

PCR-Kalibratoren und -Kontrollen

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

- Für die Kalibrationskurve die vier Konzentrationen des Produkts **Parvovirus B19 ELITe Standard** (nicht im Lieferumfang dieses Kits enthalten) mit dem Assay Protocol (Assay-Protokoll) **PVB19 ELITe_STD** oder **PVB19 ELITe_Be_STD** verwenden.

Hinweis: Die Konzentrationen des Q – PCR Standard sind in Kopien/Reaktion (10⁵ Kopien/rxn, 10⁴ Kopien/rxn, 10³ Kopien/rxn, 10² Kopien/rxn) ausgedrückt.

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

- Für die Positive Control das Produkt **Parvovirus B19 - ELITe Positive Control** (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay Protocol (Assay-Protokoll) **PVB19 ELITe_PC** oder **PVB19 ELITe_Be_PC** verwenden,

- Für die Negative Control hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay Protocol (Assay-Protokoll) **PVB19 ELITe_NC** oder **PVB19 ELITe_Be_NC** verwenden.

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

Kalibrierungskurven verfallen nach **60 Tagen**, danach muss die Kalibration erneut durchgeführt werden. Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen verfallen nach **15 Tagen**, danach müssen die Positive Control und die Negative Control erneut durchgeführt werden.

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

- es wird eine neue Reagenziencharge verwendet,

- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,

- es werden größere Wartungs- oder Instandhaltungsarbeiten an ELITe InGenius oder ELITe BeGenius durchgeführt.

Qualitätskontrollen

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

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



VERFAHREN BEI ELITe InGenius

Das beim Gebrauch des **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** mit **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- ELITe InGenius einschalten und den Modus "CLOSED" (geschlossen) auswählen,

- auf der Startseite im Menü "Calibration" (Kalibration) bestätigen, dass die Kalibratoren (**PVB19 Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **PVB19 PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **PVB19 PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

 auf der Startseite im Menü "Controls" (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (PVB19 - Positive Control, PVB19 Negative Control) für die zu verwendende Charge des PCR Mix genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge PVB19 PCR Mix verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay Protocol (Assay-Protokoll) verwenden (siehe "Proben und Kontrollen").

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** kann mit **ELITe InGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

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

- B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),
- C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR]),
- D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]).

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

Hinweis: ELITe InGenius kann mit dem "Laboratory Information System" (Laborinformationssystem - LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **PVB19 Q PCR Mix-**Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

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

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

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

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



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

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

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

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

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

Hinweis: Der PVB19 Q-PCR Standard kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.



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

Hinweis: Die PVB19 Positive Control kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

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

SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm "Results Display" (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können die Ergebnisse genehmigt und die Berichte ("Sample Report" (Probenbericht) oder "Track Report" (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

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

ELITE InGenius generiert Ergebnisse mithilfe des PVB19 ELITE MGB Kit und geht dabei folgendermaßen vor:

A. Validierung der Kalibrationskurve,

B. Validierung der Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control,

C. Validierung der Probenergebnisse,

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

A. Validierung der Kalibrationskurve

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Kalibratorreaktionen mit den **PVB19 ELITe_STD** Assay-Protokoll-Parametern. Die Kalibrationskurve ergibt sich aus dem resultierenden Ct-Wert bei der jeweiligen Konzentration.

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

Die Kalibrationskurve läuft nach 60 Tagen ab.

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

B. Validierung der Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positivkontrolle und Negativkontrolle

Die ELITe InGenius Software interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Reaktionen der Positive Control und der Negative Control mit den Parametern der Assay Protocols (Assay-Protokolle) **PVB19 ELITe_PC** und **PVB19 ELITe_NC**. Die resultierenden Ct-Werte werden in Konzentrationswerte umgerechnet und zur Überprüfung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) herangezogen.

Die für die PCR-Reagenziencharge spezifischen Positive Control- und Negative Control-Ergebnisse werden in der Datenbank (Controls [Kontrollen]) aufgezeichnet. Sie können von Benutzern mit der Qualifikation "Administrator" oder "Analyst" durch Befolgen der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt oder genehmigt werden.

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

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



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

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

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

C. Validierung der Probenergebnisse

Die ELITe InGenius Software interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenz (Kanal PVB19) und die Internal Control (Kanal IC) mit den Assay-Protokoll-Parametern PVB19 ELITe_WB_200_100 und PVB19 ELITe_AF_200_100. Die resultierenden Ct-Zielwerte werden in Konzentrationswerte umgerechnet.

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

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

1) Kalibrationskurve	"Status"
PVB19 Q-PCR Standard	APPROVED (Genehmigt)
2) Positivkontrolle	"Status"
PVB19 Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
3) Negativkontrolle	"Status"
PVB19 Negative Control	APPROVED (Genehmiat)

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

Die möglichen Ergebnismeldungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

03.06.2024

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

Ergebnis des Probenlaufs	Interpretation
PVB19: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL (PVB19: DNA erkannt, Menge gleich XXX Kopien/ml bzw. IU/ml)	In der Probe wurde PVB19-DNA innerhalb des Messbereichs des Assays nachgewiesen , ihre Konzentration wird angezeigt.
PVB19: DNA Detected, quantity below LLOQ copies / mL or IU / mL (PVB19: DNA erkannt, Menge unter LLoQ Kopien/ml bzw. IU/ml)	In der Probe wurde PVB19-DNA nachgewiesen , ihre Konzentration liegt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Assays.
PVB19: DNA Detected, quantity beyond ULQ copies / mL or IU / mL (PVB19: DNA erkannt, Menge über ULoQ Kopien/ml bzw. IU/ml)	In der Probe wurde PVB19-DNA nachgewiesen , ihre Konzentration liegt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Assays.
PVB19: DNA Not Detected or below LoD copies / mL or IU / mL (PVB19: DNA nicht erkannt oder unter LoD Kopien/ml bzw. IU/ml)	In der Probe wurde keine PVB19-DNA nachgewiesen . Die Probe wurde negativ auf die Ziel-DNA getestet oder die Konzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Assays.
Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)	Ungültiges Testergebnis durch fehlerhafte Internal Control (z. B. aufgrund von falscher Extraktion, Verschleppung von Inhibitoren). Der Test sollte wiederholt werden.



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

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

Als "PVB19:DNA Not detected or below "LoD" copies/mL" (PVB19: DNA nicht erkannt oder unter LoD Kopien/ml bzw. IU/ml) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, PVB19 wurde jedoch nicht nachgewiesen. In diesem Fall kann entweder die Probe für PVB19-DNA negativ sein oder die PVB19-DNA ist bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden (siehe "Leistungsmerkmale").

PVB19-DNA-positive Proben mit einer Konzentration unter der Nachweisgrenze (und der unteren Bestimmungsgrenze) des Assays werden, falls nachgewiesen, als "PVB19:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL" (PVB19: DNA erkannt, menge unter LLoQ Kopien/ml) ausgegeben (siehe "Leistungsmerkmale").

PVB19-DNA-positive Proben innerhalb des linearen Messbereichs werden erkannt und als "PVB19: DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies / mL" (PVB19: DNA erkannt, Menge gleich "XXX" Kopien/ml) ausgegeben (siehe "Leistungsmerkmale").

PVB19-DNA-positive Proben, die oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze liegen, werden als "PVB19: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL" (PVB19: DNA erkannt, Menge über "ULoQ" Kopien/ml) ausgegeben und sind nicht zur Quantifizierung geeignet. Falls erforderlich muss die Probe vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt und erneut getestet werden, um Ergebnisse innerhalb des linearen Messbereichs des Assays zu erzielen (siehe "Leistungsmerkmale").

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

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

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

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

Der "Sample Report" zeigt die Ergebnisdetails sortiert nach ausgewählter Probe (SID, "Sample ID")

Der "Track Report" zeigt die Ergebnisdetails nach ausgewählter Spur an.

an.

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



VERFAHREN BEI ELITe BeGenius

Das beim Gebrauch des **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** mit **ELITe BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

	SCHRITT 1	Prüfung der System	bereitschaft
	SCHRITT 2	Einrichtung des Laufs	A) Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])
			B) Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
			C) Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])
			D) Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
	SCHRITT 3		A) Validierung der Kalibrationskurve
		Überprüfung und	B) Validierung der Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control
		Genehmigung der	C) Validierung der Probenergebnisse
		2.902000	D) Ausgabe des Probenergebnisberichts

SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- ELITe BeGenius einschalten und den Modus "CLOSED" (geschlossen) auswählen,

- auf der Startseite im Menü "Calibrations" (Kalibrationen) bestätigen, dass die Kalibratoren (**PVB19 Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **PVB19 PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **PVB19 PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

 - auf der Startseite im Menü "Controls" (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (PVB19 Positive Control, PVB19 Negative Control) für die zu verwendende Charge des PVB19 PCR Mix genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge PVB19 PCR Mix verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden (siehe "Proben und Kontrollen").

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.



SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **PVB19 ELITe MGB Kit** kann mit **ELITe BeGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR]),
- B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR]),
- C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR]),
- D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR]).

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

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

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **PVB19 PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

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

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



	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
1	Proben identifizieren und, falls erforderlich, auf Raumtemperatur auftauen, vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Falls erforderlich, 200 µl Probe in ein zuvor etikettiertes 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) überführen. Die benötigten CPE-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen.	Falls erforderlich, das Elutionsröhrchen mit den extrahierten Nukleinsäuren auf Raumtemperatur auftauen . Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.
2	Auf der Startseite "Perform Run" (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite "Perform Run" (Lauf durchführen) auswählen.
3	Alle Racks aus der "Cooler Unit" entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen	Die "Racks" aus "Lane 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3)" der "Cooler Unit" entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4	Den Laufmodus ("Run mode") wählen: "Extract + PCR" (Extraktion + PCR).	Den Laufmodus ("Run mode") wählen: "PCR Only" (Nur PCR).
5	Die Proben in das "Sample Rack" (Probenständer) laden. (Hinweis: Wenn als Sekundärröhrchen "2 mL Tubes" (2-ml- Röhrchen) geladen werden, verwenden Sie die blauen Adapter für das "Sample Rack" [Probenständer]).	Die Proben in das "Elution Rack" (Elutionsablage) laden.
6	Das "Sample Rack" in die "Cooler Unit" einsetzen, beginnend mit "Lane 5" (L5). Falls erforderlich unter "Sample ID" (SID) die Proben-ID für jede verwendete "Position" eingeben. (Beim Laden von Sekundärröhrchen "2- ml-Röhrchen" angeben. Bei Sekundärröhrchen ohne Barcode die Proben-ID manuell eingeben.	Das "Elution Rack" in die "Cooler Unit" einsetzen, beginnend mit "Lane 3" (L3). Falls erforderlich, für jede "Position" die Proben-ID ("Sample ID"), die Probenmatrix ("Sample Matrix"), das Extraktionskit ("Extraction Kit") und das extrahierte Eluatvolumen ("Extracted eluate vol.") eingeben.
7	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8	Sicherstellen, dass das "Extraction Input Volume" (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte "Extracted Elute Volume" (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.	Sicherstellen, dass das "Extraction Input Volume" (Extraktion Eingangsvolumen) 200 µl und das extrahierte "Extracted Elute Volume" (Extrahiertes Eluatvolumen) 100 µl beträgt.
9	Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte "Assay" (Prüfung) auswählen (siehe "Proben und Kontrollen").	Das Assay Protocol (Assay-Protokoll) in der Spalte "Assay" (Prüfung) auswählen (siehe "Proben und Kontrollen").
10	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11	Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren ab Punkt 6 wiederholen.	Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren ab Punkt 6 wiederholen.
12	Die "Elution tubes " (Elutionsröhr) in das "Elution Rack " (Elutionsablage) laden (Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit mit einem Barcode etikettiert werden).	Nicht anwendbar
13	Das " Elution Rack " in die "Cooler Unit" einsetzen, beginnend mit "Lane 3" (L3). Bei Verarbeitung von mehr als 12 Proben das Verfahren wiederholen und dabei "Lane 2" (L2) verwenden.	Nicht anwendbar
14	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Nicht anwendbar
15	CPE und PCR Mix in das "Reagent/Elution Rack" (Reagenz- /Elutionsablage) laden.	Den PCR Mix in das "Reagent/Elution Rack" (Reagenz- /Elutionsablage) laden.
16	Das "Reagent/Elution Rack" in die "Cooler Unit" in "Lane 2" (L2), falls verfügbar, oder in "Lane 1" (L1) einsetzen. Falls erforderlich, für jeden PCR-Mix und/oder CPE unter "S/N" die Seriennummer, unter "Lot No." die Chargennummer, unter "Exp. Date" das Verfallsdatum und unter "T/R" die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das "Reagent/Elution Rack" in die "Cooler Unit" in "Lane 2" (L2), falls verfügbar, oder in "Lane 1" (L1) einsetzen. Falls erforderlich für jeden PCR-Mix unter "S/N" die Seriennummer, unter "Lot No." die Chargennummer, unter "Exp. Date" das Verfallsdatum und unter "T/R" die Anzahl der Reaktionen eingeben.



	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
17	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
18	Die Spitzen in dem/den Spitzenständer/n ("Tip Rack(s)") im Inventory Area (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in dem/den Spitzenständer/n ("Tip Rack(s)") im Inventory Area (Inventarbereich) prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
19	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
20	Das " PCR Rack " mit " PCR Cassette " (PCR-Kassette) in den Inventarbereich laden.	Das "PCR Rack" mit "PCR Cassette" (PCR-Kassette) in den Inventarbereich laden.
21	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
22	Den " Extraction Rack " (Extraktionsrack) mit den "ELITe InGenius SP 200" Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden.	Nicht anwendbar
23	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
24	"Start" (Starten) drücken.	"Start" (Starten) drücken.

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

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
14	Die Spitzen in den Spitzenständern ("Tip Racks") im Bestandsbereich ("Inventory Area") prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.	Die Spitzen in den Spitzenständern ("Tip Racks") im Bestandsbereich ("Inventory Area") prüfen und Spitzenständer ggf. ersetzen.
15	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
16	Das "PCR Rack" mit "PCR Cassette" (PCR-Kassette) in den Inventarbereich laden.	Das " PCR Rack " mit " PCR Cassette " (PCR-Kassette) in den Inventarbereich laden.
17	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf "Next" (Weiter) klicken, um fortzufahren.
18	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
19	"Start" (Starten) drücken.	"Start" (Starten) drücken.

REF RTS070PLD

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

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

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

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

Hinweis: Der PVB19 Q-PCR Standard kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.

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

Hinweis: Die PVB19 Positive Control kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

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

SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm "Results Display" (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Ergebnisse und Laufdaten angezeigt. Über diesen Bildschirm können die Ergebnisse genehmigt und die Berichte ("Sample Report" (Probenbericht) oder "Track Report" (Spurbericht)) ausgedruckt oder gespeichert werden. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Hinweis: ELITE BeGenius kann mit dem "Laboratory Information System" (Laborinformationssystem – LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

ELITE BeGenius generiert Ergebnisse mithilfe des Parvovirus B19 ELITE MGB Kit und geht dabei folgendermaßen vor:

- A. Validierung der Kalibrationskurve,
- B. Validierung der Ergebnisse der Positive Control und der Negative Control,

03.06.2024

- C. Validierung der Probenergebnisse,
- D. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

Hinweis: Einzelheiten sind dem entsprechenden Abschnitt unter Verfahren bei ELITe InGenius zu entnehmen.

REF RTS070PLD

LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze (LoD)

Die 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 Tests auf ELITe InGenius bestimmt. Dabei wurde Plasmid-DNA verwendet, die das Amplifikationsprodukt enthielt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/20 µl bei Vorhandensein von humaner genomischer DNA mit einem Titer von 500 ng/20 µl verdünnt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

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

In EDTA entnommenes Vollblut

Der theoretische LoD-Wert wurde verifiziert, indem auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius ein Pool aus in EDTA entnommenen Vollblutproben getestet wurde, die mit Referenzmaterial des Parvovirus B19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) in der angegebenen Konzentration (125 IU/ml) dotiert waren. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

-	-	-				
Nachweisgrenze bei Vollblutproben auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius						
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ	
In EDTA entnommenes Vollblut	125 IU/ml	20	20	20	0	

250 Kopien/ml

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die behauptete Konzentration für das Zielgen des Parvovirus B19 ELITe MGB Kit sowohl bei ELITe BeGenius als auch bei ELITe InGenius. Dem LoD-Wert für die PVB19-Zielsequenz in Verbindung mit Vollblutproben wurde bei 125 IU/ml bestätigt, was 250 Kopien/ml entspricht.

Der Wert als Kopien/ml wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im Abschnitt "Analytische Sensitivität" angegeben ist.

Fruchtwasser

Die Nachweisgrenze des in Verbindung mit Fruchtwasserproben verwendeten Assays wurde auf dem Gerät ELITe InGenius bestimmt, indem eine Reihe von Parvovirus-B19 (PVB19)-negativen Fruchtwasserproben, die mit Referenzmaterial von PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) dotiert waren, getestet wurde. Es wurde eine Probit-Regressionsanalyse der Ergebnisse durchgeführt und die Nachweisgrenze als die Konzentration geschätzt, bei der eine 95 %-ige Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses vorliegt.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Fruchtwasserproben und ELITe InGenius						
Zieleenuur-	LeD	95 % Konfidenzintervall				
Zielsequenz	LOD	Untergrenze	Obergrenze			
D) (D 40	40 IU/ml	35 IU/ml	50 IU/ml			
PVB19	40 Kopien/ml	35 Kopien/ml	50 Kopien/ml			

Die Nachweisgrenze in Kopien/ml wurde für Fruchtwasserproben unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors (1 IU/Kopie) berechnet, der im Abschnitt "Analytische Sensitivität" angegeben ist.

Der berechnete LoD-Wert wurde überprüft, indem mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius ein Pool aus Fruchtwasserproben, die mit zertifiziertem PVB19-Referenzmaterial (3rd WHO International Standard, NIBSC) dotiert waren, in der behaupteten Konzentration getestet wurden.

Parvovirus B19 ELITe MGB [®] Kit	
Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR	



Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die behauptete Konzentration für das Zielgen des Parvovirus B19 ELITe MGB Kit sowohl bei ELITe BeGenius als auch bei ELITe InGenius.

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

Der lineare Messbereich des Assays wurde mit Vollblut- und Fruchtwasserproben mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius verifiziert.

Bei in EDTA entnommenem Vollblut

Der lineare Messbereich wurde anhand einer Reihe von Verdünnungen PVB19-Referenzmaterial (3rd WHO International Standard, NIBSC) in negativen EDTA-Vollblutproben verifiziert.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt.



Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Vollblutproben bei ELITe InGenius und ELITe BeGenius					
Einheit	Obere Grenze				
IU/mI	125	25,000,000			
Kopien/ml	250	50,000,000			

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für EDTA-Vollblut wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im folgenden Abschnitt angegeben ist.

Bei Fruchtwasser

Der lineare Messbereich wurde mithilfe einer Reihe von Verdünnungen von PVB19-Referenzmaterial (NIBSC) in negativen Fruchtwasserproben verifiziert.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt.





Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Fruchtwasserproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius						
Einheit	Untere Grenze	Obere Grenze				
IU/ml	40	25,000,000				
Kopien/ml	40	25,000,000				

Der lineare Messbereich in Kopien/ml für Fruchtwasser wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der im folgenden Abschnitt angegeben ist.

Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs und der laufübergreifenden Wiederholpräzision des Assays wurde mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius eine Reihe von in EDTA entnommenen Vollblutproben analysiert, einschließlich einer negativen Probe und zweier Proben, die mit zertifiziertem PVB19-Referenzmaterial (3rd WHO International Standard, NIBSC) dotiert waren.

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

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITe InGenius							
Droho	PVB19						
Prope	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung		
Negativ	8	-	n. a.:	-	100 %		
3 x LoD	8	35,81	0,52	1,46	100 %		
10 x LoD	8	34,31	0,28	0,83	100 %		

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITe BeGenius								
PVB19								
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung			
Negativ	8	-	-	-	100 %			
3 x LoD	8	36,53	0,53	1,46	100 %			
10 x LoD	8	34.79	0.21	0.61	100 %			

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

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe InGenius									
Droho	Pvb19								
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung				
Negativ	16	-	-	-	100 %				
3 x LoD	16	35,87	0,44	1,23	100 %				
10 x LoD	16	34,19	0,28	0,83	100 %				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe BeGenius									
Brohe	PVB19								
Flobe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung				
Negativ	16	-	-	-	100 %				
3 x LoD	16	36,40	0,45	1,23	100 %				
10 x LoD	16	34,68	0,27	0,79	100 %				

Beim Test der Wiederholpräzision erkannte der Parvovirus B19 ELITe MGB Kit die Zielsequenz und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% gleich 1,46 % aus.

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



Vergleichspräzision

Zur Bewertung der geräteübergreifenden und chargenübergreifenden Vergleichspräzision des Assays wurde eine Reihe von in EDTA entnommenen Vollblutproben auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius analysiert, einschließlich einer negativen Probe und zweier Proben, die mit zertifiziertem PVB19-Referenzmaterial (3rd WHO International Standard, NIBSC) dotiert waren.

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

	Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITe InGenius							
Brohe			PVB19					
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung			
Negativ	8	-	-	-	100 %			
3 x LoD	8	36,89	0,62	1,68	100 %			
10 x LoD	8	34,85	0,26	0,74	100 %			

	Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITe BeGenius							
Broho	PVB19							
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung			
Negativ	8	-	-	-	100 %			
3 x LoD	8	37,00	0,37	1,00	100 %			
10 x LoD	8	35,14	0,51	1,46	100 %			

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

	Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITe InGenius							
Droho	PVB19							
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung			
Negativ	8	-	-	-	100 %			
3 x LoD	8	36,80	0,67	1,82	100 %			
10 x LoD	8	35,18	0,71	2,02	100 %			

	Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITe BeGenius								
Droho	PVB19								
Probe	Anz.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	% Übereinstimmung				
Negativ	8	-	-	-	100 %				
3 x LoD	8	37,41	0,27	0,72	100 %				
10 x LoD	8	35,31	0,32	0,90	100 %				

Beim Test der geräteübergreifenden und der chargenübergreifenden Vergleichspräzision erkannte der Parvovirus B19 ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet korrekt und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% gleich 2,02 % aus.

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit von Werten eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe "QCMD 2014 B19 Virus DNA EQA Panel" (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von PVB19-Verdünnungen, als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.



Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors (Fc = 0,3 IU/Kopie) für **ELITe InGenius** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe InGenius®								
Probe	Konsensus Viruskonz. Iog ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Replikate	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml				
B19DNA14-01	4,788	0,507	2/2	4,948				
B19DNA14-02	2,878	0,437	2/2	2,902				
B19DNA14-03	4,848	0,400	2/2	4,850				
B19DNA14-04	Negativ	n. z.	0/2	n. z.				
B19DNA14-05	5,802	0,465	2/2	5,847				
B19DNA14-06	1,936	0,672	2/2	1,779				
B19DNA14-07	3,913	0,371	2/2	3,955				
B19DNA14-08	3,844	0,507	2/2	4,063				

Alle Proben wurden richtig erkannt. Alle positiven Proben wurden innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) guantifiziert.

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der Umrechnungsfaktor (Fc) zur Angabe der quantitativen Ergebnisse von Kopien/ml in internationale Einheiten (IU) / ml wurde mit ELITe InGenius unter Verwendung des zertifizierten kalibrierten PVB19-Referenzmaterials (NIBSC) berechnet.

In EDTA entnommenes Vollblut

Der Umrechnungsfaktor wurde mit ELITe InGenius anhand einer Reihe von Verdünnungen von PVB19-Referenzmaterial (2nd WHO International Standard, NIBSC) in negativen EDTA-Vollblutproben mit 0,5 IU/Kopie ermittelt.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

	Umrechnungsfaktor in internationalen Einheiten, Fc = 0,5 IU/Kopie								
	Probe			Ergebnis					
IU/ml	log IU/ml	Anzahl	Mittlere Kopien/ml	Mittelwert IU/ml	Mittelwert log IU/ml	Log (RefTest)			
100000	5,0000	10	21,4661	107331	5,0210	-0,0210			
10000	4,0000	10	21433	10716	4,0080	-0,0080			
1000	3,0000	10	2136	1068	2,9850	+0,0150			

Der Wert des Umrechnungsfaktors wurde mit **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** unter Verwendung des zertifizierten kalibrierten Referenzmaterials (3rd WHO International Standard, NIBSC) verifiziert und von 5,0000 Log IU/ml auf 2,0970 Log IU/ml berichtigt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert, um ihre Korrelation zu berechnen.



Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von 0,050 (95%-KI: 0,197–0,296) und eine Steigung von 0,969 (95%-KI: 0,889–1,048). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R²-Wert von 0,963.

Fruchtwasser

Der Umrechnungsfaktor wurde mit ELITe InGenius anhand einer Reihe von Verdünnungen von PVB19-Referenzmaterial (3rd WHO International Standard, NIBSC) in negativen Fruchtwasserproben mit 1 IU/Kopie ermittelt.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

	Umrechnungsfaktor in internationalen Einheiten, Fc = 1 IU/Kopie							
	Probe			Ergebnis		Differenz von		
IU/ml	log IU/ml	Anzahl	Mittlere Kopien/ml	Mittelwert IU/ml	Mittelwert log IU/ml	Log (RefTest)		
316228	5,5000	16	273604	273604	5,4360	0,0640		
100000	5,0000	16	88997	88997	4,9470	0,0530		
31623	4,5000	16	34559	34559	4,5340	-0,0340		
10000	4,0000	16	11089	11089	4,0390	-0,0390		
3162	3,5000	15*	3704	3704	3,5580	-0,0580		
1000	3,0000	16	932	932	2,9520	0,0480		

* Ein Ergebnis erwies sich als Ausreißer und wurde von der Analyse ausgeschlossen.

Der Wert des Umrechnungsfaktors wurde mit **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** unter Verwendung des zertifizierten kalibrierten Referenzmaterials (3rd WHO International Standard, NIBSC) verifiziert und von 5,0000 Log IU/ml auf 2,0970 Log IU/ml berichtigt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert, um ihre Korrelation zu berechnen.



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von 0,0112 (95%-KI: 0,2879– 0,3103) und eine Steigung von 0,9928 (95%-KI: 0,9046–1,0810). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R²-Wert von 0,957.

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

Faktor zur Umrechnung in internationale Einheiten mit ELITe InGenius und ELITe BeGenius						
Matrix	Umrechnungsfaktor Fc (IU/Kopien)					
Vollblut	0,5					
Fruchtwasser	1,0					



Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität des Assays, die anhand positiver klinischer Proben bewertet wurde, wurden mit **ELITe InGenius** klinische Proben von in EDTA entnommenem Vollblut und Fruchtwasser, die für die Zielsequenz als positiv bestätigt oder mit Referenzmaterial dotiert waren, analysiert. 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**.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	Positiv	Negativ	Diagnostische Sensitivität in %
In EDTA entnommenes, mit PVB19-DNA dotiertes Vollblut	30	30	0	100
Mit PVB19-DNA dotiertes Fruchtwasser	30	30	0	100

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Spezifität des Assays als Bestätigung negativer Proben wurden klinische Proben von in EDTA entnommenem Vollblut und Fruchtwasser mit **ELITe InGenius** analysiert und für die Zielsequenz als negativ bestätigt. 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**.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	Positiv	Negativ	Diagnostische Spezifität in %
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA- negatives Vollblut	30	0	30	100
PVB19-DNA-negatives Fruchtwasser	30	0	30	100

Der Ct-Grenzwert für die IC wurde beim Test mit ELITe InGenius bzw. ELITe BeGenius für in EDTA entnommene Vollblutproben und für Fruchtwasserproben auf 35 festgelegt



PROBEN UND KONTROLLEN BEI ANDEREN SYSTEMEN

Proben

Dieses Produkt muss mit aus den folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden: in EDTA entnommenes Vollblut (aus peripherem Blut und aus Knochenmark), in EDTA entnommenes Plasma.

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben (aus peripherem Blut und aus Knochenmark) 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 Vollblut mit **ELITe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUN_E100_S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf **«ELITE STAR»** geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

HINWEIS: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus 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.

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.

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 **UUN_E100_S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf **«ELITE STAR»** geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

HINWEIS: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit ELITE GALAXY und der Softwareversion 1.3.1 (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll xNA Extraction (Universal), das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 200 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf "ELITE GALAXY" geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. 10 µl/

Probe 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 befolgen Sie diese Anweisungen:500 µl Probe in den 8-Well-Streifen überführen, 5 µl CPE für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend das NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica hinzufügen. Die Nukleinsäuren in 100 µl Elutionspuffer eluieren.

HINWEIS: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät "QlAsymphony[®] SP/AS" und dem Kit "QlAsymphony[®] 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.

Andere Proben:

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

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, 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 dieses Produkts enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt "Parvovirus B19 - ELITe Positive Control" oder das Produkt "Parvovirus B19 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 BEI ANDEREN SYSTEMEN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

03 06 2024

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 PVB19-Sonde so einrichten, dass "reporter" (Reporter) = "FAM" und "quencher" (Quencher) = "none" (nicht fluoreszenzierend) ist, und "PVB19" nennen.

- im Detector Manager den Detektor ("detector") für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass "reporter" (Reporter) = "VIC" (AP525 ist analog zu VIC) und "quencher" (Quencher) = "none" (nicht fluoreszenzierend) ist, und "IC" nennen.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor ("detector") (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass "passive reference" (passive Referenz) = "ROX" (AP593 wird statt ROX verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum Arbeitsblatt am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das Arbeitsblatt muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

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

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



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

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

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

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

- die Zeitsteuerung wie in der folgenden Tabelle angegeben ändern;

- die Anzahl Zyklen auf 45 einstellen;
- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion ("Sample volume" (Probenvolumen)) auf **30 μl** einstellen;

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

REF RTS070PLD

Temperaturzyklus				
Phase	Temperaturen	Zeitsteuerung		
Dekontamination	50 °C	2 min		
Erste Denaturierung	94 °C	2 min		
	94 °C	10 s		
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	60 °C (Fluoreszenzerfassung)	30 s		
	72 °C	20 s		
Disconiction	95 °C	15 s		
Dissoziation	40 °C	30 s		
(optional)	0° 08	15 s		

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

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

- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die "absolute Quantifizierung" öffnen und "Run mode: Fast 7500" (Laufmodus: Fast 7500) einstellen:

- im Detector Manager den Detektor ("detector") für die PVB19-Sonde so einrichten, dass "reporter" (Reporter) = "FAM" und "quencher" (Quencher) = "none" (nicht fluoreszenzierend) ist, und "PVB19" nennen.

- im Detector Manager den Detektor ("detector") für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass "reporter" (Reporter) = "VIC" (AP525 ähnelt VIC) und "quencher" (Quencher) = "none" (nicht fluoreszenzierend) ist, und "IC" nennen;

- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor ("detector") (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass "passive reference" (passive Referenz) = "Cy5" (AP593 wird statt Cy5 verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum Arbeitsblatt am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das Arbeitsblatt muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

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

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

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

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

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

- die Zeitsteuerung wie in der Tabelle "Temperaturzyklus" angegeben ändern;

- die Anzahl Zyklen auf 45 einstellen;

- das Volumen für die Softwareemulation der Wärmeübertragung zur Reaktion ("Sample volume" (Probenvolumen)) auf **30 µl** einstellen;

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

Temperaturzyklus				
Phase	Temperaturen	Zeitsteuerung		
Dekontamination	50 °C	2 min		
Erste Denaturierung	94 °C	2 min		
	94 °C	10 s		
Amplifikation und Detektion (45 Zyklen)	60 °C (Datenerfassung)	30 s		
	72 °C	20 s		
	95 °C	15 s		
	40 °C	1 min		
(optional)	80 °C	15 s		
Dissoziation (optional)	0° C	15 s		

Einrichten der Amplifikation

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

Vor Beginn des Laufs ist es wichtig, Folgendes durchzuführen:

- die Röhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern;

- die für den Lauf benötigten Röhrchen **PVB19 Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass jedes Röhrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern.

- die **PVB19 - Positive Control** oder die **PVB19 Q - PCR Standard**-Röhrchen auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern.

- die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Mikrotiterplatte** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und darauf achten, dass die Vertiefungen nicht beschädigt werden.
- 20 µl PVB19 Q PCR Mix präzise auf den Boden der Vertiefungen in der Amplifikations-Mikrotiterplatte pipettieren, wie zuvor im Arbeitsblatt festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

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

- 2. 20 µl extrahierte DNA aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der Amplifikations-Mikrotiterplatte mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im Arbeitsblatt festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die extrahierte DNA dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen Proben extrahierter DNA auf die gleiche Weise verfahren.
- 3. 20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der Amplifikations-Mikrotiterplatte der Negativkontrolle der Amplifikation mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im Arbeitsblatt festgelegt. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das hochreine Wasser für die Molekularbiologie dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
- 4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

Wenn ein qualitatives Ergebnis benötigt wird (Nachweis von PVB19-DNA):
 20 µl PVB19 - Positive Control präzise in die entsprechende Vertiefung der Amplifikations-Mikrotiterplatte mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im Arbeitsblatt festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die PVB19 - Positive Control dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

03.06.2024

REF RTS070PLD



Wenn ein quantitatives Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von PVB19-DNA): 20 µl PVB19 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 PVB19 Q - PCR Standard 10² dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen PVB19 Q - PCR Standards (10³, 10⁴, 10⁵) auf die gleiche Weise verfahren.

- 5. Die Amplifikations-Mikrotiterplatte mit der Amplifikations-Dichtungsfolie dicht verschließen.
- Die Amplifikations-Mikrotiterplatte in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. "Jahr-Monat-Tag-PVB19-EGSpA") speichern.

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

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



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

HINWEIS: Wenn die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion mit dem Gerät **"ELITE GALAXY"** durchgeführt wird, die Elutions-Mikrotiterplatte, das komplette Reaktionsgemisch und die Amplifikations-Mikrotiterplatte wie in der Gebrauchsanweisung des Geräts angegeben laden und die Schritte auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS070PLD

Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen PVB19-Sonde (FAM-Detektor "PVB19") und der spezifischen Sonde für die interne Kontrolle (VIC-Detektor "IC") in den Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Vor Beginn der Analyse gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:

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

HINWEIS: Bei einer positiven Probe mit einem hohen PVB19-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der PVB19-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 "PVB19" 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 "PVB19" 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 PVB19 ("Results > Report" (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Positive Control FAM-Detektor "PVB19"	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei PVB19 **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 PVB19-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der Positivkontrolle die Q - PCR Standard Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von Q - PCR Standard 105 (Ct ≤ 25) beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct**-Wert von PVB19 ("Results > Report" (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negativkontrolle FAM-Detektor "PVB19"	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

SCH mRTS070PLD_de



Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** bei PVB19 **Ct Undetermined** (Ct 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 PVB19 zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct**-Wert der internen Kontrolle 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 der VP1-Region von PVB19 in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen (Nachweisgrenze für das Produkt, 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	Assavorgobnis		
FAM-Detektor "PVB19"	VIC-Detektor "IC"	Probe	Assayergebhis	PVD19-DNA	
Ct Undetermined (Ct	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	ungeeignet	ungültig	-	
undestimitity	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 PVB19 und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die interne Kontrolle effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder nicht vorhandene Amplifikation) oder während des Extraktionschritts (Abbau von Proben-DNA, Probe mit unzureichender Zellzahl, 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 PVB19 und **Ct ≤ 35** bei der internen Kontrolle, bedeutet dies, dass die PVB19-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der PVB19-DNA unter der Nachweisgrenze des Produkts (siehe Abschnitt "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 PVB19-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der internen Kontrolle "Ct > 35" oder "Ct Undetermined" (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der internen Kontrolle durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei PVB19-DNA verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe dennoch geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



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 PVB19 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 "PVB19"	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 PVB19-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 der VP1-Region von PVB19 in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren (linearer Messbereich, siehe "Leistungsmerkmale"), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Probenergebnis FAM-Detektor "PVB19"	PVB19-Kopien 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 Kopien von PVB19, die in der extrahierten Probe vorhanden sind (Nc), gemäß dieser Formel:

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 **"ELITE STAR**" zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblut- oder Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma und "ELITe STAR"	
Nc (Kopien/ml) = 28 x Menge	

Wird **"ELITE GALAXY"** zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblut- oder Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma und "ELITe GALAXY" Nc (Kopien/ml) = 35 x Menge

Wird das Extraktionssystem "NucliSENS[®] easyMAG[®] 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 "NucliSENS [®] easyMAG [®] "	
Nc (Kopien/ml) = 10 x Menge	
Nc (Kopien/ml) = 10 x Menge	

Wird das Extraktionssystem "QIAsymphony® 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 "QIAsymphony [®] SP/AS"	
Nc (Kopien/ml) = 12 x Menge	

Berechnung der Grenzen des linearen Messbereichs

Bei Verwendung einer bestimmten Extraktionsmethode können die linearen Messbereichsgrenzen anhand des linearen Messbereichs der Amplifikationsreaktion gemäß der folgenden Formel berechnet werden:



Parvovirus B19 I	ELITe MGB [®] Kit
Reagenz für die DN	A-Real-Time-PCR



Wird das Extraktionssystem **"ELITE STAR"** zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblut- oder Plasmaproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (Kopien/mi) bei "ELITE STAK"
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" zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblut- oder Plasmaproben 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 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

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

Umrechnung der Ergebnisse internationale Einheiten (IU)

Fc ist der Umrechnungsfaktor, der mithilfe des von der WHO anerkannten kalibrierten Referenzmaterials "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich, festgelegt wurde (siehe Abschnitt "Leistungsmerkmale").

Wird "ELITE STAR" zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis in IU/ml ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und ELITE STAR				
Fc = 0,98 IU/Kopien				
Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc				
Nc (IU/mI) = 27,4 x Menge				

Wird "ELITE STAR" zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in IU/ml ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und "ELITe STAR"				
Fc = 0,69 IU/Kopien				
Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc				
	Nc (IU/ml) = 19,3 x Menge			



Wird **"ELITE GALAXY"** zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis **in IU/mI ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und "ELITe GALAXY"					
Fc = 0,82 IU/Kopien	Fc = 0,82 IU/Kopien				
	Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc				
	Nc (IU/ml) = 28,7 x Menge				

Wird "ELITE GALAXY" zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in IU/ml ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und "ELITe GALAXY"				
Fc = 0,87 IU/Kopien				
	Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc			
	Nc (IU/ml) = 30,5 x Menge			

Wird das Extraktionssystem "NucliSENS[®] easyMAG[®] zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in IU/ml ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und "NucliSENS [®] easyMAG [®] "					
Fc = 1 IU/Kopien	Fc = 1 IU/Kopien				
	Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc				
	Nc (IU/mI) = 10 x Menge				

Wird das Extraktionssystem «QIAsymphony[®] SP/AS» zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in IU/mI ausgegeben werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und "QIAsymphony [®] SP/AS"			
Fc = 1 IU/Kopien			
Nc (IU/ml) = Nc (Kopien/ml) x Fc			
Nc (IU/ml) = 12 x Menge			



LEISTUNGMERKMALE BEI ANDEREN SYSTEMEN

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 getestet. 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 STAR** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von Parvovirus-B19-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich, in Parvovirus-B19-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3,161 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet; dabei wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (IU/ml)				
95 %-Konfidenzintervall				
Untere Grenze Obere Grenze				
95 %-Positivität	293 IU/ml	159 IU/ml	1053 IU/ml	
Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (Kopien/ml)				
95 %-Konfidenzintervall				

		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	299 Kopien/ml	162 Kopien/ml	1074 Kopien/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITe STAR** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von Parvovirus-B19-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich, in Parvovirus-B19-DNA-negativem EDTA-Plasma angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3,161 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet; dabei wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.



1430 Kopien/ml

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

145 Kopien/ml

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe STAR (IU/ml)				
95 %-Konfidenzintervall				
Untere Grenze Obere Grenze				
95 %-Positivität 100 IU/mI		45 IU/ml	987 IU/ml	
Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe STAR (Kopien/ml)				
	95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze	

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITE GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von Parvovirus-B19-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich, in Parvovirus-B19-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 IU/ml und 560 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITE GALAXY** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

65 Kopien/ml

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe GALAXY (IU/ml)					
95 %-Konfidenzintervall					
		Untere Grenze	Obere Grenze		
95 %-Positivität	145 IU/ml	80 IU/ml	562 IU/ml		

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe GALAXY (Kopien/ml)				
95 %-Konfidenzintervall				
		Untere Grenze Obere Grenze		
95 %-Positivität 177 Kopien/ml 98 Kopien/ml 685 Kopien/ml				

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von Parvovirus-B19-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des "2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich, in Parvovirus-B19-DNA-negativem EDTA-Plasma angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 IU/ml und 560 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt. Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe GALAXY (IU/ml)				
	95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze Obere Grenze		
95 %-Positivität	79 IU/ml	54 IU/ml	174 IU/ml	
Nach	weisgrenze für Plasmaprob	en und ELITe GALAXY (Kop	ien/ml)	
		95 %-Konfide	nzintervall	
Untere Grenze Obere Grenze				
95 %-Positivität	91 Kopien/ml	62 Kopien/ml 200 Kopien/ml		

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



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 innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10⁵ Molekülen / 20 μl).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10 Molekülen pro Reaktion 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 (IU/Reaktion)				
Obere Grenze	1.000.000 DNA Kopien/Reaktion			
Untere Grenze	10 DNA Kopien/Reaktion			

Die linearen Messbereichsgrenzen in IU/ml in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 33 berechnet.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 20,4 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 106 Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit des Assays als die Differenz zwischen dem mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhaltenen Mittelwert der Ergebnisse und der theoretischen Konzentration der Probe ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit (% Ungenauigkeit) von zirka 12,4 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

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

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von PVB19 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2008 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden die gesamte Analyse, die Extraktion und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

95 %-Positivität



Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien					
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log₁₀ lU/ml	Standard- abweichung	Positiv / Replikate	Mittlere Ergebnisse log10 IU/ml	
B1908-01	PVB19, 2,396	0,534	2/2	2,636	
B1908-02	PVB19, 3,966	0,596	2/2	4,182	
B1908-03	PVB19, 2,822	0,574	2/2	2,750	
B1908-04	Negativ, n. z.	n. z.	0/2	nicht erkannt	
B1908-05	PVB19, 2,894	0,607	2/2	2,928	
B1908-06	PVB19, 2,061	0,577	2/2	1,969	
B1908-07	PVB19, 2,926	0,648	2/2	3,026	
B1908-08	PVB19, 3,575	0,595	2/2	3,627	

Alle Proben wurden richtig erkannt. Alle erhaltenen quantitativen Ergebnisse liegen innerhalb des vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD).

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von PVB19 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **ELITE STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe STAR					
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Replikate	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml	
B1912-01	PVB19, 1,684	0,488	2/2	2,242	
B1912-02	PVB19, 3,716	0,522	2/2	4,078	
B1912-03	Negativ, n. z.	-	0/2	-	
B1912-04	PVB19, 6,378	0,686	2/2	6,675	
B1912-05	PVB19, 4,486	0,641	2/2	4,849	
B1912-06	PVB19, 2,687	0,577	1/2	2,837	
B1912-07	PVB19, 5,565	0,487	2/2	5,639	
B1912-08	PVB19, 2,704	0,386	2/2	2,839	

Alle Proben wurden richtig erkannt. Sechs (6) von sieben positiven Proben wurden innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 SD quantifiziert und eine Probe (B1912-01) wurde innerhalb von ± 2 SD quantifiziert. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass der Probentiter unterhalb der Nachweisgrenze des Systems liegt.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von PVB19 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2014 B19 Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit dem **ELITE GALAXY** System und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



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

	Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe GALAXY						
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log10 IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Replikate	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml			
B19DNA14-01	PVB19, 4,788	0,507	2/2	4,977			
B19DNA14-02	PVB19, 2,878	0,437	2/2	3,115			
B19DNA14-03	PVB19, 4,848	0,400	2/2	4,848			
B19DNA14-04	Negativ, n. z.	-	0/2	-			
B19DNA14-05	PVB19, 5,802	0,465	2/2	5,996			
B19DNA14-06	PVB19, 1,936	0,672	2/2	1,653			
B19DNA14-07	PVB19, 3,913	0,371	2/2	3,972			
B19DNA14-08	PVB19, 3,844	0,507	2/2	4,555			

Alle Proben wurden richtig erkannt. Sechs (6) von sieben positiven Proben wurden innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs \pm 1 SD quantifiziert und eine Probe (B19DNA14-08) wurde innerhalb von \pm 2 SD quantifiziert.

Analytische Sensitivität: Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

In EDTA entnommenes Vollblut

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe aus drei Verdünnungen (0,5 log10-Verdünnungsschritte) des von der WHO ("2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Vollblut ermittelt.

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet; dabei wurde die gesamte Analyse durchgeführt: die Extraktion mit **ELITE STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,9 IU pro Kopie von in Vollblutproben nachgewiesenem PVB19. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Um	Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und ELITe STAR				
		Fc = 0,98 IU/Kopie			
Erwartete Konz.	Erwartete Konz.	Mittlere Menge	Mittlere Menge	Mittlere Menge	
IU/mi	log10 IU/mi	Kopien/ml	IU/ml	log10 IU/mi	
31,623	4,500	29,023	28,434	4,443	
10,000	4,000	9,631	9,435	3,947	
3,162	3,500	4,346	4,258	3,607	

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,8 IU pro Kopie von in Vollblutproben nachgewiesenem PVB19. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und ELITe GALAXY Fc = 0,82 IU/Kopie					
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge Kopien/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml	
31,623	4,500	48,688	39,924	4,471	
10,000	4,000	13,885	11,386	4,029	
3,162	3,500	6,085	4,990	3,506	



In EDTA entnommenes Plasma

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe aus drei Verdünnungen (0,5 log10-Verdünnungsschritte) des von der WHO ("2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay", NIBSC code 99/802, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Plasma ermittelt.

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet; dabei wurde die gesamte Analyse durchgeführt: die Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,6 IU pro Kopie von in Plasmaproben nachgewiesenem PVB19. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Um	Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und ELITe STAR				
		Fc = 0,69 IU/Kopie			
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge Kopien/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml	
31,623	4,500	39,888	27,403	4,425	
10,000	4,000	14,901	10,237	3,987	
3,162	3,500	5,862	4,027	3,588	

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 0,8 IU pro Kopie von in Plasmaproben nachgewiesenem PVB19. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Umre	Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und ELITe GALAXY				
		Fc = 0,87 IU/Kopie			
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge Kopien/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml	
31,623	4,500	30,768	26,768	4,423	
10,000	4,000	15,154	13,184	4,119	
3,162	3,500	3,378	2,939	3,458	

Der bei diesem Assay in Zusammenhang mit dem Extraktionssystem "NucliSENS[®] easyMAG[®]" bzw. "QIAsymphony[®] SP/AS" für die Umwandlung des quantitativen Ergebnisses von Kopien/ml in IU/ml zu verwendende mittlere Umrechnungsfaktor wurde als 1 IU pro Ziel-DNA-Kopie definiert.

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 die VP1-Region von PVB19, einschließlich der Genotypen 1, 2, 3a und 3b, verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen wurde mithilfe von Plasmidkonstrukten, die den Genotypen 1, 2 und 3a oder 3b entsprechen, geprüft.

Die diagnostische Sensitivität des Assays wurde mithilfe von drei Plasmiden, welche die Sequenz der amplifizierten Region der Genotypen 1, 2 und 3 enthielten (bei den Untertypen 3a und 3b identisch), geprüft. Die Plasmide wurden innerhalb des Bereichs von 105 Kopien pro Reaktion bis 102 Kopien pro Reaktion verdünnt. Diese Proben wurden in drei Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



REF RTS070PLD

Die Ergebnisse liegen innerhalb des durch den erwarteten Wert ± 0,2 log10 definierten Bereichs.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet mithilfe von 30 in EDTA entnommenen, PVB19-DNAnegativen Plasmaproben, die durchHinzufügen von B1912-05-Probe aus QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit PVB19-DNA dotiert waren, und 30 in EDTA entnommenen, PVB19-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von B1912-05-Probe aus QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit PVB19-DNA dotiert waren. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem System **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle dotierten Proben wurden richtig als PVB19-DNA-positiv erkannt.

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

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet mithilfe von 30 Parvovirus-B19-DNA-negativen Plasmaproben, die durch Hinzufügen von B1912-05-Probe aus QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit Parvovirus-B19-DNA dotiert waren, und 30 Parvovirus-B19-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von B1912-05-Probe aus QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit Parvovirus-B19-DNA dotiert waren. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit dem System **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, Parvovirus-B19-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, Parvovirus-B19-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle dotierten Proben wurden richtig als PVB19-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 PVB19, darunter die kompletten Parvovirus-4-, Bocaparvovirusund Dependoparvovirus-Genome, verfügbaren Sequenzen ergab, dass die humanen Viren, die PVB19 am meisten ähneln, deren Spezifität und die Abwesenheit einer signifikanten Homologie aufzeigten.

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde anhand einiger negativ auf PVB19-DNA und positiv auf die DNA anderer Pathogene getesteter klinischer Proben überprüft.

SCH mRTS070PLD_de



Für die Überprüfung der analytischen Spezifität wurden 22 in EDTA entnommene, PVB19-DNAnegative, jedoch positiv auf die DNA anderer Pathogene, wie PVB19, EBV, CMV, VZV, HSV1 und HHV8 getestete (getestet mit CE-IVD-Produkten zur Echtzeit-Amplifikation) Vollblutproben (aus peripherem Blut) als Referenzmaterial verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA-negatives und auf die DNA anderer Pathogene positiv getestetes Vollblut	22	0	22

Bei Proben, die positiv auf die DNA anderer Pathogene getestet wurden, war keine Kreuzreaktivität nachzuweisen.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde mithilfe einiger negativ auf PVB19-DNA getesteter klinischer Proben von Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 30 in EDTA entnommene, PVB19-DNAnegative Plasmaproben sowie 30 in EDTA entnommene, PVB19-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
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA-negatives Vollblut	30	0	30
In EDTA entnommenes, PVB19-DNA-negatives Plasma	30	0	30

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 34 in EDTA entnommene, Parvovirus-B19-DNA-negative Plasmaproben sowie 34 in EDTA entnommene, Parvovirus-B19-DNA-negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, vermutlich Parvovirus-B19-DNA-negatives Plasma	34	0	34
In EDTA entnommenes, vermutlich Parvovirus-B19-DNA-negatives Vollblut	33	1	32

Eine Vollblutprobe ergab ein abweichend positives Ergebnis (31 Kopien/ml). Der Titer dieser Probe lag unter der Nachweisgrenze der Methode. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 98,5 %.

HINWEIS: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Dokumentation "Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit", FTP RTS070PLD, aufgeführt.

REFERENZEN

F. McOmish et al. (1993) J. Clin. Microbiol. <u>31</u>: 323 - 328
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. <u>35</u>: e30
 K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. <u>50</u>: 732 - 740.

Parvovirus B19 ELITe MGB[®] Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf nur mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden: in EDTA entnommenes Vollblut (aus peripherem Blut und aus Knochenmark), in EDTA entnommenes Plasma und Fruchtwasser.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis zeigt, dass die Ziel-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter der Nachweisgrenze des Produkts liegt (siehe "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. In diesem Fall muss die Probe ab der Extraktion erneut getestet werden, was zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen kann.

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

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

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

REF RTS070PLD

FEHLERBEHEBUNG

ELITe InGenius und ELITe BeGenius

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

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

Ungültige Probenreaktion	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Einstellfehler des Geräts.	Position von PCR Mix, interner Kontrolle und Probe kontrollieren. Volumina von PCR Mix, Internal Control und Probe kontrollieren.
	Den PCR Mix nicht für mehr als 7 unabhängige Arbeitsläufe verwenden (jeweils 3 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit).
Abbau des PCR Mix.	Den PCR Mix nicht für mehr als 3 aufeinander folgende Läufe verwenden (7 Stunden im gekühlten Reagenzienblock oder in der Cooler Unit).
	Den PCR Mix nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahren. Ein neues Aliquot mit PCR Mix verwenden.
Abbau der Vorlage für die Internal Control.	Ein neues Aliquot der Internal Control verwenden.

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



Inhibition durch Störsubstanzen in der Probe.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem "PCR Only"-Lauf (nur PCR) wiederholen. Extraktion mit einer 1:2-Verdünnung der Probe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem "Extract + PCR"-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

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

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

Ungewöhnlich hoher Anteil positiver Ergebnisse innerhalb ein und desselben Laufs (Reaktionen mit ähnlich späten Ct-Werten)

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Kontamination von Probe zu Probe bei Präanalyseschritten. Kontamination der Laborumgebung.	Mikropipette nach dem Pipettieren jeder Probe mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA- Cleaner reinigen.
	Keine Pasteur-Pipetten verwenden. Die Pipetten müssen entweder Direktverdrängungspipetten sein oder zusammen mit Aerosolfilterspitzen verwendet werden.
	Proben in die letzten Positionen der Geräte einsetzen, wie auf der Benutzeroberfläche angegeben. Die von der Software angegebene Ladefolge beachten.
	Alle Oberflächen, die mit dem Bediener und den Proben (einschließlich Pipetten) in Kontakt kommen, mit frischer 3%iger Natriumhypochloritlösung (Bleiche) oder DNA/RNA-Cleaner reinigen.
	Einen UV-Dekontaminationszyklus durchführen. Fin neues Röhrchen mit PCR Mix und/oder KbE verwenden

REF RTS070PLD

Offene Plattform:

Ziel-DNA nicht in der Positive Control oder den Q Korrelationskoeffizient der Standardkurve	- PCR Standard Reaktionen erkannt oder ungültiger
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.
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.

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 oder Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen oder Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot sterilen Wassers 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.

Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsche Dispensierung der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negative Controls und Positive Controls 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 Ontion Auto Baseline" verwenden

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reagenz für die DNA-Real-Time-PCR



SYMBOLE

REF	Katalognummer.
X	Temperaturobergrenze.
LOT	Chargenbezeichnung.
><	Verfallsdatum (letzter Tag des Monats).
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum.
CE	Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika.
Σ	Ausreichend für "N" Tests
UDI	Unique Device Identification, eindeutige Gerätekennung
\triangle	Vorsicht, Gebrauchsanweisung beachten.
CONT	Inhalt.
*	Vor Sonneneinstrahlung schützen.

Hersteller.

SCH mRTS070PLD de



REF RTS070PLD

HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

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

ELITe MGB® Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 und der EP-Patente mit den Nummern 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

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

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

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

NucliSENS® und easyMAG® sind eingetragene Marken von bioMérieux SA.

QIAsymphony® ist eine eingetragene Marke der QIAGEN GmbH.

Ficoll® ist eine eingetragene Marke von GE Healthcare Bio-Sciences AB.