



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

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 22/12/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«EBV ELITe MGB Kit» Ref. RTS020PLD

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

- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



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

REF RTS020PLD

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt «**EBV ELITe MGB® Kit**» ist Teil eines qualitativen und quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Epstein-Barr-Herpesvirus (EBV)** in DNA-Proben, die aus in EDTA entnommenem Vollblut, in EDTA entnommenem Plasma und Liquor extrahiert wurden.

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

TESTPRINZIPIEN

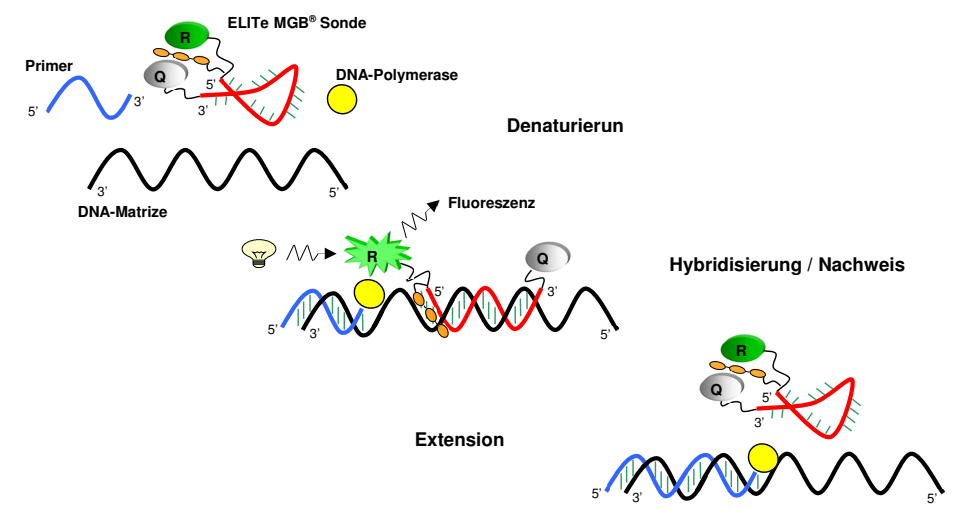
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion für eine Region des **EBNA-1-Gens** des EBV-Genoms und eine spezifische Reaktion für eine Region des **humanen beta-Globin-Gens** (Internal Control der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, EBV-spezifische ELITe MGB®-Sonde wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der EBV-Amplifikationsreaktion hybridisiert. Die mit einem AP525-Fluorophor (analog zu VIC) markierte, für die Internal Control spezifische ELITe MGB®-Sonde wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion für die Internal Control hybridisiert. Die Fluoreszenzemission erhöht sich mit Zunahme des spezifischen Produkts der Amplifikationsreaktion und wird vom Gerät gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verarbeitung der Daten lassen sich das Vorhandensein und der Titer von EBV-DNA in der Ausgangsprobe nachweisen.

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

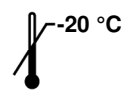
Der Test ist mit den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Systemen validiert.

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



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

REF RTS020PLD



INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	Seite 2
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 3
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 3
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	Seite 3
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 5
ELITE INGENIUS® UND ELITe BEGENIUS®	Seite 7
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 7
VERFAHREN ELITE INGENIUS®	Seite 8
VERFAHREN ELITE BEGENIUS®	Seite 16
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 22
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Seite 35
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 35
VERFAHREN	Seite 37
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 48
Roche cobas z 480 analyzer	Seite 59
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 59
VERFAHREN	Seite 60
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 65
QUELLENANGABEN	Seite 70
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 71
FEHLERBEHEBUNG	Seite 72
SYMBOLS	Seite 74
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 75

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

REF RTS020PLD

PRODUKTBESCHREIBUNG

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

Die Primer und die EBV-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine Region des **EBNA-1-Gens** von EBV.

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

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

Das Produkt reicht aus für **96 Tests mit dem «ELITE InGenius®» und «ELITE BeGenius®» System** einschließlich Standards und Kontrollen.

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

IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN

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

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

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

SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE

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

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

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

REF RTS020PLD

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) sind die folgenden generischen Produkte validiert: die Extraktionskartuschen «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200) oder «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT033SP1000), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nukleinsäuren aus biologischen Proben «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und «**300 µl Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, Art.-Nr. TF-350-L-R-S).

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

- für die Kalibratoren «**EBV ELITE STD**» oder «**EBV ELITE STD 1000 100**»,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation «**EBV ELITE PC**» oder «**EBV ELITE PC 1000 100**»,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation «**EBV ELITE NC**» oder «**EBV ELITE NC 1000 100**»,
- für die Probenanalyse «**EBV ELITE WB 200 100**», «**EBV ELITE PL 200 100**» und «**EBV ELITE PL 1000 100**».

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

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

- für die Kalibratoren «**EBV ELITE Be STD**»,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation «**EBV ELITE Be PC**»,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation «**EBV ELITE Be NC**»,
- für die Probenanalyse «**EBV ELITE Be WB 200 100**» und «**EBV ELITE Be PL 200 100**».

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

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

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

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

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

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

REF RTS020PLD

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

Beim Einsatz eines 7300 Real-Time-PCR-Systems wird die Verwendung des generischen Produkts «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC01), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, empfohlen.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument empfiehlt sich die Verwendung des generischen Produkts: «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. RTSACC02), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation.

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

Wird ein Nachweis von EBV-DNA benötigt (qualitative Analyse), muss das Produkt «**EBV - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR020PLD) oder das speziell für die Verwendung mit cobas z 480 Analyzer vorgesehene Produkt «**EBV - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR020PLD-R), Positivkontrolle von Plasmid-DNA, verwendet werden.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von EBV-DNA benötigt (quantitative Analyse), muss das Produkt «**EBV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD020PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve, verwendet werden.

Mithilfe eines Umrechnungsfaktors können die Ergebnisse der quantitativen EBV-Analyse in internationalen Einheiten gemäß dem „1st WHO International Standard for Human Epstein Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC-Code 09/260, Vereinigtes Königreich) ausgedrückt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

Geeignete Schutzkleidung und Handschuhe zum Schutz der Augen und des Gesichts tragen.

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind in den Arbeitsbereichen verboten.

Die Hände nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich waschen.

Übrig gebliebene Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Vor Durchführung des Tests alle dem Produkt beiliegenden Anweisungen aufmerksam lesen.

Bei der Durchführung des Tests die dem Produkt beiliegenden Anweisungen befolgen.

Das Produkt darf nach Ablauf des angegebenen Ablaufdatums nicht mehr verwendet werden.

Es dürfen nur die mit dem Produkt bereitgestellten und vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwendet werden.

Reagenzien von anderen Chargen dürfen nicht verwendet werden.

Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

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

REF RTS020PLD

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für molekularbiologische Anwendungen

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

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

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

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

Die Extraktionsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die zur Verarbeitung der Proben verwendeten Pipetten dürfen ausschließlich für diesen Zweck verwendet werden. Die Pipetten müssen nach dem Verdrängungsprinzip arbeiten oder in Verbindung mit Aerosol-Filterspitzen verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, frei von DNAsen und RNAsen sowie frei von DNA und RNA sein.

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

Amplifikationsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung weitestgehend reduziert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden.

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der **EBV Q - PCR Mix** muss bei einer Temperatur von unter -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

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

Der **EBV Q - PCR Mix** kann für bis zu fünf unabhängige Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) oder für drei aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block im Bestandsbereich des Geräts verbleiben.

ELITe InGenius® UND ELITe BeGenius®

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

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

In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **EBV ELITe_Be_WB_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

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

In EDTA entnommenes Plasma

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

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe InGenius Software**, Version **1.3** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **EBV ELITe_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl Wasser.

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **EBV ELITe_Be_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

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

Hinweis: Wird die DNA-Extraktion von 1000 µl Plasma mit dem **ELITe InGenius Software**, Version **1.3** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **EBV ELITe_PL_1000_100** zu verwenden. Diese Protokolle verarbeiten 1000 µl Probe, fügen den **CPE** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluieren die Nukleinsäuren in 100 µl.

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

Störende Substanzen

Verfügbare Daten zu einer Inhibition durch Arzneimittel und andere Substanzen sind im Abschnitt „Potenziell störende Substanzen“ des Kapitels „Leistungsmerkmale“ aufgeführt.

Verwenden Sie kein in Heparin entnommenes Vollblut oder Plasma, um eine Hemmung der Amplifikationsreaktion und häufige ungültige Ergebnisse zu verhindern.

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

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

als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **EBV ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll «**EBV ELITe_STD**» oder «**EBV ELITe_STD_1000_100**» für **ELITe InGenius** und «**EBV ELITe_Be_STD**» für **ELITe BeGenius** zu verwenden,

als Amplifikations-Positive Control ist die **EBV - ELITe Positive Control** gemeinsam mit dem Protokoll «**EBV ELITe_PC**» oder «**EBV ELITe_PC_1000_100**» für **ELITe InGenius** und «**EBV ELITe_Be_PC**» für **ELITe BeGenius** zu verwenden,

als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll «**EBV ELITe_NC**» oder «**EBV ELITe_NC_1000_100**» für **ELITe InGenius** und «**EBV ELITe_Be_NC**» für **ELITe BeGenius** zu verwenden.

Hinweis: **ELITe InGenius** mit der **ELITe InGenius Software** und **ELITe BeGenius** mit der **ELITe BeGenius Software** ermöglicht die Generierung der Kalibrationskurve und die Validierung der Amplifikationskontrollen für jede in der Datenbank zu speichernde Amplifikationsreagenzcharge.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kalibrationskurven laufen nach **60 Tagen** ab. Nach dem Ablaufdatum muss das Kalibratorset erneut verarbeitet werden.

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kontrollergebnisse der Amplifikationsvalidierung laufen nach **15 Tagen** ab. Nach dem Ablaufdatum müssen die Positive und die Negative Controls erneut verarbeitet werden.

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

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

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN ELITe InGenius®

Das beim Gebrauch des «**EBV - ELITe MGB® Kit**» mit dem System **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

Prüfung der Systembereitschaft

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

- **ELITe InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- prüfen, ob die Kalibratoren (Kalibration – **EBV Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und dass sie noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- prüfen (Kontrollen), ob die Amplifikationskontrollen (**EBV Positive Control**, **EBV Negative Control**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Control“ (Kontrolle) überprüft werden;

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

REF RTS020PLD

- den Typ des Laufs auswählen und den Lauf einrichten; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITechGroup bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits, Matrices und dem Gerät ELITe InGenius sowie dem Gerät **ELITe InGenius** und der genannten Matrix validiert.

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

Assay-Protokolle für EBV ELITe MGB® Kit und ELITe InGenius			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
EBV ELITe_WB_200_100	Vollblut	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
EBV ELITe_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
EBV ELITe_PL_1000_100	Plasma	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 1000 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

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

- A. Integrierter Lauf (Extraktion + PCR),
- B. Amplifikationslauf (nur PCR),
- C. Kalibrationslauf (nur PCR),
- D. Lauf für Amplifikations-Positive Control und/oder Negative Control (PCR Only),

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

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

Die Hauptarbeitsgänge zum Einrichten der vier Durchlauftypen sind nachfolgend beschrieben.

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

REF RTS020PLD

A. Integrierter Lauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrchen auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
6. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. EBV ELITe_WB_200_100).
7. Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
8. Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
 - wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen; das Primärröhrchen kann erst ab 200 µl Probe verwendet werden;
 - wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) auswählen.
9. CPE und EBV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die PCR-Kassette („PCR Cassette“), die Extraktionskartuschen „ELITe InGenius SP 200“ oder „ELITe InGenius SP1000“, alle benötigten Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden Proben in die unter Schritt 8 angegebenen Positionen laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: Der EBV Q - PCR Mix kann für bis zu fünf unabhängige Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) oder für drei aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block im Bestandsbereich des Geräts verbleiben.

B. Amplifikationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
4. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
5. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. EBV ELITE_WB_200_100).
6. In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
7. Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution tube (bottom row)“ (Elutionsröhr. (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Den EBV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die PCR-Kassette („PCR Cassette“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Gerätetür schließen.
12. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: Der **EBV Q - PCR Mix** kann für bis zu fünf unabhängige Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) oder für drei aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block im Bestandsbereich des Geräts verbleiben.

C. Kalibrationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. EBV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: EBV Q-PCR Standards 10^2 , Cal2: EBV Q-PCR Standards 10^3 , Cal3: EBV Q-PCR Standards 10^4 , Cal4: EBV Q-PCR Standards 10^5). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Beginnend mit der relevanten Spur das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. EBV ELITE_STD oder EBV ELITE_STD_1000_100) und die Chargennummer und das Ablaufdatum für den EBV Q - PCR Standard eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
6. Den EBV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
7. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden/kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Die Kalibratorröhrchen und die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) auf das Gerät laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren. Darauf achten, dass die PCR Standard-Flüssigkeiten in die richtigen Spuren eingesetzt werden, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben.
9. Die Gerätetür schließen.
10. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: Der **EBV Q - PCR Mix** kann für bis zu fünf unabhängige Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) oder für drei aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block im Bestandsbereich des Geräts verbleiben.

D. Amplifikationslauf für Positive Control und Negative Control

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Das Produkt EBV - ELITe Positive Control für die Amplifikation der Positive Control auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen auswählen: 200 µl zum Verarbeiten von 200 µl Probe bzw. 1000 µl zum Verarbeiten von 1000 µl Probe; dabei sicherstellen dass das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
6. Für die Positivkontrolle EBV ELITe_PC oder EBV ELITe_PC_1000_100 auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für die EBV Positive Control eintragen.
7. Für die Negativkontrolle EBV ELITe_NC oder EBV ELITe_NC_1000_100 auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für das hochreine Wasser für die Molekularbiologie eintragen.
8. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Den EBV Q - PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die Spitzenstände in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die PCR-Amplifikationskassette, die Positive Control und/oder die Negative Control gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

Hinweis: Der **EBV Q - PCR Mix** kann für bis zu fünf unabhängige Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) oder für drei aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils drei Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block im Bestandsbereich des Geräts verbleiben.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

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

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

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

A. Validierung der Kalibrationskurve

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

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

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

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

Hinweis: Erfüllt die Kalibrationskurve nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „not passed“ (nicht bestanden) im Menü „Calibration“ angezeigt und die Kurve kann nicht genehmigt werden. Die Kalibrator-Amplifikationsreaktionen müssen in diesem Fall wiederholt werden.

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

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

Die von der spezifischen EBV-Sonde („EBV“) in der Amplifikationsreaktion der Positive Control und Negative Control ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den in den Assay-Protokollen „EBV ELITe_PC“, „EBV ELITe_PC_1000_100“, „EBV ELITe_NC“ und „EBV ELITe_NC_1000_100“ enthaltenen Parametern interpretiert.

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

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

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

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

REF RTS020PLD

Hinweis: Erfüllt das Ergebnis der Positive Control bzw. Negative Control nicht die Annahmekriterien, wird die Meldung „not passed“ (nicht bestanden) im Menü „Controls“ angezeigt und das Ergebnis kann nicht genehmigt werden. Die Amplifikationsreaktion der Positive Control bzw. Negative Control muss wiederholt werden.

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

C. Validierung der Probenergebnisse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REF RTS020PLD

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

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

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

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

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

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

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

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

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

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

VERFAHREN ELITe BeGenius®

Das beim Gebrauch des «**EBV ELITe MGB® Kit**» mit dem System **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

Prüfung der Systembereitschaft

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

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

Die für das «EBV ELITE MGB® Kit» verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

Assay-Protokolle für «EBV ELITE MGB Kit» und ELITE BeGenius			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
EBV ELITE_Be_WB_200_100	Vollblut	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
EBV ELITE_Be_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml oder IU/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

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

Qualitative Assay-Protokolle sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

Das **EBV ELITE MGB Kit** kann zusammen mit **ELITE BeGenius** zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

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

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

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

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

A. Probenlauf

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

- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrchen auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Alle Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben ab dem Probenrack in L5 in den Kühlbereich laden.
- Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

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

- Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und extrahiertes Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d.h. EBV ELITE_Be_WB_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Wenn eine zweite Extraktion durchgeführt werden soll, die Schritte 6 bis 9 wiederholen und dafür das L4-Probenrack verwenden.
- Die barcodierten Eluטרöhrchen ab dem L3-Elutionsrack in den Kühlbereich laden.

Hinweis: Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit etikettiert werden.

- Das Elutionsrack L3 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Schritte 11 und 12 wiederholen und dafür das Reagenz-/Elutionsrack L2 verwenden.
- CPE und EBV Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
- Das Reagenzienrack L1 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Das Extraktionsrack mit den Extraktionskartuschen „ELITE InGenius SP 200“ und den für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

REF RTS020PLD

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

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

Hinweis: Der PCR Mix kann für 7 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

B. Amplifikationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
5. Die Proben ab dem Elutionsrack in L3 in den Kühlbereich laden.
6. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
7. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
8. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. EBV ELITE_Be_WB_200_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. EBV Q-PCR Mix in den Kühlbereich laden.
10. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Die Gerätetür schließen.
14. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

REF RTS020PLD

Hinweis: Der PCR Mix kann für 7 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

C. Kalibrationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Die EBV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: EBV Q-PCR Standards 10², Cal2: EBV Q-PCR Standards 10³, Cal3: EBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: EBV Q-PCR Standards 10⁵). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
5. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
6. Die Kalibratorröhrchen in das L3-Elutionsrack laden.
7. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
9. Das zu verwendende Assay-Protokoll „EBV ELITE_Be_STD“ in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. EBV Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
11. Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
14. Die Gerätetür schließen.
15. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: Der PCR Mix kann für 7 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

D. Lauf für die Positive Control und Negative Control

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrrchen EBV Q - PCR Mix auftauen. Jedes neue Röhrrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Das Produkt EBV - ELITe Positive Control für die Amplifikation der Positive Control auftauen. Jedes Röhrrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (wie Negative Control) in ein Elutionsröhrrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
6. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
7. Die Röhrrchen für die Positive Control und Negative Control in das Elutionsrack L3 laden.
8. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
10. Das zu verwendende Assay-Protokoll EBV ELITe_Be_PC und EBV ELITe_Be_NC in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. EBV Q-PCR Mix in das L2-Reagenz-/Elutionsrack laden.
12. Das L2-Reagenz-/Elutionsrack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Die Spitzenständer in den Bestandsbereich („Inventory Area“) laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
14. Das PCR-Rack mit „PCR-Kassette“ in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
15. Die Gerätetür schließen.
16. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: Der PCR Mix kann für 7 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden im gekühlten Block des Geräts verbleiben. Vorsichtig mischen und den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren, bevor der nächste Lauf beginnt.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

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

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

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

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze (LoD), wurde in Verbindung mit in EDTA entnommenem Vollblut und Plasma und **ELITe InGenius** mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus mindestens sechs Punkten rund um die Grenzkonzentration. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Laufeinrichtung, Extraktion von Nukleinsäuren, Echtzeit-Amplifikation und Dateninterpretation, mit **ELITe InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze mit ELITe InGenius (IU/ml)				
Probenvolumen	Matrix	LoD	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Untere Grenze
200 µl	Vollblut	104 IU/ml	75 IU/ml	175 IU/ml
	Plasma	124 IU/ml	77 IU/ml	290 IU/ml
1000 µl	Plasma	18 IU/ml	13 IU/ml	28 IU/ml

Die analytische Sensitivität in Kopien/ml für jede Matrix und **ELITe InGenius** wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 30 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze mit ELITe InGenius (Kopien/ml)				
Probenvolumen	Matrix	LoD	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	Vollblut	36 Kopien/ml	26 Kopien/ml	60 Kopien/ml
	Plasma	65 Kopien/ml	41 Kopien/ml	153 Kopien/ml
1000 µl	Plasma	11 Kopien/ml	8 Kopien/ml	18 Kopien/ml

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

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

REF RTS020PLD

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze bei Vollblut- und Plasmaproben und ELITe InGenius					
Probe	Titer	Ziel	Anzahl	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	104 IU/ml	EBV	20	20	0
In EDTA entnommenes Plasma	124 IU/ml	EBV	20	20	0

Nachweisgrenze bei Vollblut- und Plasmaproben und ELITe BeGenius					
Probe	Titer	Ziel	Anzahl	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	104 IU/ml	EBV	20	19	1
In EDTA entnommenes Plasma	124 IU/ml	EBV	20	20	0

Der LoD-Wert der EBV-Zielsequenz wurde für in EDTA entnommenes Vollblut bei 104 IU/ml und für in EDTA entnommenes Plasma bei 124 IU/ml bestätigt.

Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen

Der lineare Messbereich des EBV ELITe MGB® Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem Vollblut und Plasma (Probenvolumen 200 µl) und **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) von 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungsstufen eine lineare Reaktion aufweist.

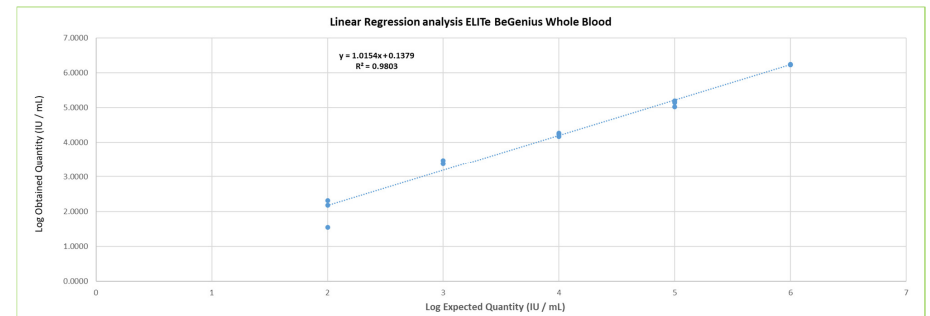
EBV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS020PLD

Bei Vollblut:

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Vollblutproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R²) eine lineare Reaktion von 0,999 bei **ELITe InGenius** und 0,980 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde mit 104 IU/ml auf die LoD-Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2968 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2486 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,4035 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1329 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden.

Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde mit 1.000.001 IU/ml auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0299 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0079 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,3459 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2311 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden. Der lineare Messbereich in Kopien/ml für Vollblut wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 30 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
200 µl	IU/ml	104	1.000.001
	Kopien/ml	36	344.828

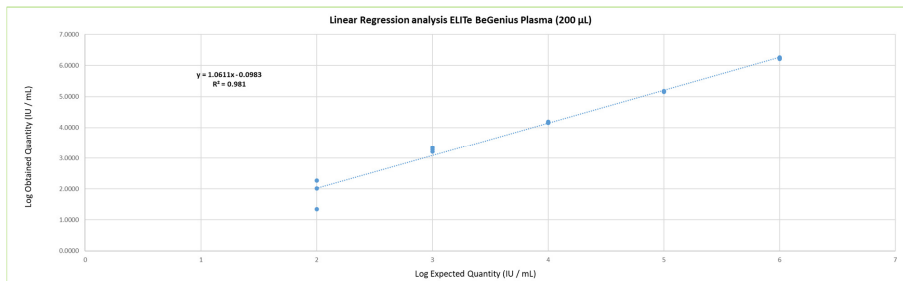
EBV ELITe MGB® Kit
Reagenz für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTS020PLD

Für Plasma (Probenvolumen 200 µl):

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit in EDTA gesammelten Plasmaproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,994 bei **ELITe InGenius** und 0,981 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) wurde auf die LoD-Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2728 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,3457 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,0556 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1089 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml ausgegeben werden: 124 IU/ml.

Die obere Quantifizierungsgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0154 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0252 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,0761 log IU/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2348 log IU/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml ausgegeben werden: 1.000.000 IU/ml.

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für in EDTA entnommenes Plasma wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 30 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius (200 µl)		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	124	1.000.000
Kopien/ml	65	526.316

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

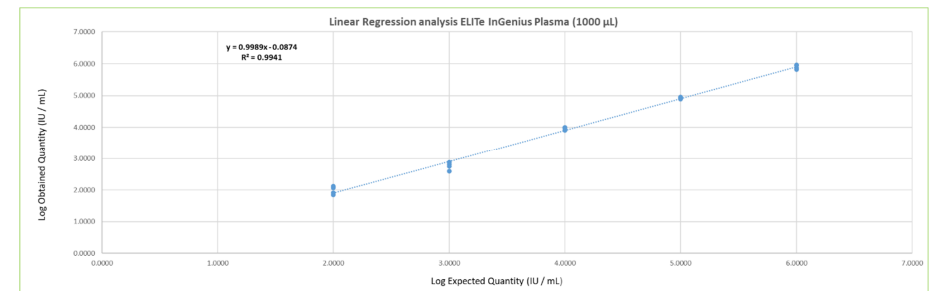
REF RTS020PLD

Für Plasma (Probenvolumen 1000 µl):

Der lineare Messbereich des EBV ELITe MGB® Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem Plasma (Probenvolumen 1000 µl) und **ELITe InGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) von 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungsstufen eine lineare Reaktion aufweist.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Plasmaproben (Probenvolumen 1000 µl) bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,994 bei **ELITe InGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) wurde auf die LoD-Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,126 log IU/ml bei **ELITe InGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = -0,015 log IU/ml bei **ELITe InGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml ausgegeben werden: 99 IU/ml.

Die obere Quantifizierungsgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,064 log IU/ml bei **ELITe InGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = -0,102 log IU/ml bei **ELITe InGenius**) quantitative Ergebnisse innerhalb von ±0,5 log IU/ml ausgegeben werden: 1.000.000 IU/ml.

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für in EDTA entnommenes Plasma wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 30 angegeben ist.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius (1000 µl)			
Probenvolumen	Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
1000 µl	IU/ml	99	1.000.000
	Kopien/ml	62	625.000

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die niedrigste Konzentration festgesetzt, bei der 100 % Positivität sowie ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Die obere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die höchste Konzentration festgesetzt, bei der ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden.

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

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der mit dem Produkt EBV ELITE MGB Kit in Kombination mit den Systemen **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von in EDTA entnommenen Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 312 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1040 IU/ml) mit zertifiziertem EBV-Referenzmaterial (1st WHO EBV International Standard, NIBSC) dotiert waren.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITE InGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in zwei Läufen pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät durch ein und denselben Bediener bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITE InGenius, Charge U0521-016								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	23,97	0,38	1,60
3 x LoD	8/8	35,68	0,57	1,60				
10 x LoD	8/8	34,22	0,24	0,70				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITE InGenius, Charge U0521-016								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/14	-	-	-	46/46	24,21	0,46	1,91
3 x LoD	16/16	35,72	0,53	1,48				
10 x LoD	16/16	34,39	0,37	1,07				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die EBV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,6 % bei EBV und 1,9 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Die Wiederholpräzision innerhalb des Laufs wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, am selben Tag mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

Die laufübergreifende Wiederholpräzision wurde auf **ELITE BeGenius** durch die Analyse von Panel-Proben in acht Wiederholungen, in einem Lauf pro Tag und mit derselben Produktcharge, an zwei verschiedenen Tagen mit demselben Gerät bestimmt. Die Proben wurden an zufälligen Positionen verarbeitet.

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITE BeGenius, Charge U0521-016								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	27,13	0,76	2,80
3 x LoD	8/8	37,32	0,49	1,30				
10 x LoD	8/8	35,97	0,43	1,19				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITE BeGenius, Charge U0521-016								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/14	-	-	-	46/46	27,32	0,69	2,53
3 x LoD	16/16	37,29	0,67	1,79				
10 x LoD	16/16	35,82	0,67	1,86				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITE BeGenius** erkannte der Assay die EBV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,9 % bei EBV und 2,8 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt EBV ELITE MGB Kit in Kombination mit den Systemen **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** erhaltenen Ergebnisse wurde durch Analyse einer Reihe von Vollblutproben getestet. Die Reihe umfasste eine negative Probe und zwei Proben, die in Konzentrationen von 3 x LoD (zirka 312 IU/ml) und von 10 x LoD (zirka 1040 IU/ml) mit zertifiziertem EBV-Referenzmaterial (1st WHO EBV International Standard, NIBSC) dotiert waren.

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

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

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITE InGenius								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	25,25	0,70	2,77
3 x LoD	8/8	35,78	0,44	1,24				
10 x LoD	8/8	30,38	0,36	1,17				

Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITE InGenius								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	25,25	0,70	2,77
3 x LoD	8/8	35,91	0,38	1,06				
10 x LoD	8/8	34,48	0,15	0,43				

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

REF RTS020PLD

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die EBV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 1,24 % bei EBV und 2,77 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

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

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

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITE BeGenius								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/7	-	-	-	23/23	28,39	0,61	2,14
3 x LoD	8/8	36,79	0,86	2,32				
10 x LoD	8/8	35,15	0,65	1,84				

Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITE BeGenius								
Probe	EBV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/7	-	-	-	23/23	28,23	0,57	2,02
3 x LoD	8/8	37,45	0,65	1,72				
10 x LoD	8/8	35,57	0,42	1,18				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITE InGenius** erkannte der Assay die EBV-Zielsequenz wie erwartet und wies niedrige VK % der Ct-Werte aus, die 2,32 % bei EBV und 2,14 % bei der Internal Control nicht überstiegen.

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

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

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log ₁₀ IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,835
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,843
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,899
EBVMQP01-Negative	Negativ	-	0/2	-

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

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

REF RTS020PLD

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log IU/ml
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,765
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,795
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,592
EBVMQP01-Negative	negativ	-	0/2	-

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

Für die Durchführung weiterer Tests wurde die kalibrierte Reihe «AcroMatrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit dem **ELITE InGenius** System und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Nenntiter IU/ml	Nenntiter log ₁₀ IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
Acromatrix EBV 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	5,791
Acromatrix EBV 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,044
Acromatrix EBV 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,776
Acromatrix EBV 1E3	10 ³	3,000	2/2	2,541
Acromatrix EBV 1E2	10 ²	2,000	2/2	2,034

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

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von EBV-Verdünnungen, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Konsensus Viruskonz. log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVDNA14-01	3,504	0,212	2/2	3,439
EBVDNA14-02	3,169	0,295	2/2	2,876
EBVDNA14-03	2,500	0,310	2/2	2,275
EBVDNA14-04	3,956	0,208	2/2	4,190
EBVDNA14-05	negativ	-	0/2	-
EBVDNA14-06	3,957	0,259	2/2	3,999
EBVDNA14-07	2,962	0,220	2/2	2,953
EBVDNA14-08	3,465	0,221	2/2	3,419

Alle Proben wurden richtig erkannt. Sechs (6) von sieben positiven Proben wurden innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert und eine Probe (EBVDNA14-04) wurde innerhalb von ± 2 SD quantifiziert. Diese Probe ist jedoch leicht überquantifiziert (+0,234 log IU/ml, während die SD 0,208 log IU/ml beträgt).

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

REF RTS020PLD

Für die Durchführung weiterer Tests wurde ab einem Probenvolumen von 1000 µl die Reihe « QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Konsensus Viruskonz. log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVDNA15C1-01	3,418	0,343	2/2	3,220
EBVDNA15C1-02	3,415	0,345	0/2	3,098
EBVDNA15C1-03	Negativ	-	2/2	-
EBVDNA15C1-04	3,955	0,305	2/2	3,697
EBVDNA15C1-05	2,493	0,516	2/2	2,136
EBVDNA15C2-01	3,956	0,350	2/2	3,662
EBVDNA15C2-02	3,942	0,347	2/2	3,697
EBVDNA15C2-03	2,886	0,374	2/2	2,622
EBVDNA15C2-04	3,952	0,377	2/2	3,732
EBVDNA15C2-05	2,912	0,340	2/2	2,723

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

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial QCMD 2014 Epstein-Barr Virus Whole Blood EQA Panel (Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von EBV-Verdünnungen, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 4 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITE InGenius				
Probe	Konsensus Viruskonz. log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVWB14-01	3,361	0,439	4/4	3,242
EBVWB14-02	2,960	0,641	4/4	2,037
EBVWB14-03	3,841	0,367	4/4	3,860
EBVWB14-04	3,845	0,362	4/4	3,786
EBVWB14-05	3,441	0,343	4/4	3,161
EBVWB14-06	4,255	0,451	4/4	4,466
EBVWB14-07	negativ	-	0/4	-
EBVWB14-08	4,889	0,290	4/4	4,955

Alle Proben wurden richtig erkannt. Sechs (6) von sieben positiven Proben wurden innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert und eine Probe (EBVWB14-02) wurde innerhalb von ± 2 SD quantifiziert. Diese Probe wies jedoch in der Ringversuchsstudie einen niedrigen Titer und eine hohe SD auf.

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

REF RTS020PLD

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der bei diesem Assay für die Umwandlung des quantitativen Ergebnisses von Kopien/ml in IU/ml zu verwendende Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von WHO („1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC, Vereinigtes Königreich, Code 09/162) anerkannten kalibrierten Referenzmaterialien in den negativen Matrices von in EDTA entnommenem Vollblut und Plasma für EBV-DNA und zusammen mit **ELITE InGenius** berechnet. Die Reihe bestand aus mindestens 3 Verdünnungsschritten von 1 log. Jeder Punkt der Reihe wurde in mindestens 10 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die gesamte Analyse, Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit **ELITE InGenius** und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Vollblut, Fc = 2,9 IU/Kopie						
Probe			Ergebnis			Differenz von Log (Ref.-Test)
IU/ml	log IU/ml	Anzahl	Mittelwert K./ml	Mittelwert IU/ml	Mittelwert log IU/ml	
100000	5,000	10	47041	135479	5,108	-0,108
10000	4,000	10	4509	12987	4,063	-0,063
1000	3,000	10	223	641	2,746	+0,254

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Plasma (Probenvolumen 200 µl), Fc = 1,9 IU/Kopie						
Probe			Ergebnis			Differenz von Log (Ref.-Test)
IU/ml	log IU/ml	Anzahl	Mittelwert K./ml	Mittelwert IU/ml	Mittelwert log IU/ml	
100000	5,000	10	72352	137469	5,128	-0,128
10000	4,000	10	5092	9674	3,967	0,033
1000	3,000	10	435	826	2,904	0,096

Umrechnungsfaktor in internationale Einheiten Plasma (Probenvolumen 1000 µl), Fc = 1,6 IU/Kopie						
Probe			Ergebnis			Differenz von Log (Ref.-Test)
IU/ml	log IU/ml	Anzahl	Mittelwert K./ml	Mittelwert IU/ml	Mittelwert log IU/ml	
316228	5,5	16	182001	291201	5,459	0,041
100000	5	16	57197	91515	4,953	0,047
31623	4,5	16	20626	33002	4,510	-0,010
10000	4	16	6911	11058	4,028	-0,028
3162	3,5	16	2086	3338	3,514	-0,014
1000	3	16	604	966	2,965	0,035

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

Faktor zur Umrechnung in internationale Einheiten mit ELITE InGenius		
Probenvolumen	Matrix	Umrechnungsfaktor Fc (IU/Kopien)
200 µl	Vollblut	2,9
	Plasma	1,9
1000 µl	Plasma	1,6

Der Umrechnungsfaktor zur Umrechnung eines quantitativen Ergebnisses von Kopien/ml in internationale Einheiten (IU)/ml wurde für **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius** verifiziert, indem die beim Linearitätstest erhaltenen Ergebnisse analysiert wurden.

Die Präzision der Zielquantifizierung als Standardabweichung von log IU/ml lag sowohl bei Vollblut als auch Plasma unter 0,5 log und erfüllte die Akzeptanzkriterien für **ELITE InGenius** und **ELITE BeGenius**.

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

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

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger EBV-DNA-positiver klinischer Proben von in EDTA entnommenem Vollblut und in EDTA entnommenem Plasma in Zusammenhang mit dem Gerät **ELITE InGenius** bewertet. Da **ELITE BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITE InGenius** aufwies, ist anzunehmen, dass die in Zusammenhang mit **ELITE InGenius** erhaltenen Ergebnisse für die diagnostische Sensitivität auch für **ELITE BeGenius** gelten.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

- 30 in EDTA entnommenen Vollblutproben, die EBV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation).
- 12 in EDTA entnommenen Plasmaproben von EBV-DNA-positiven Patienten (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und an 35 in EDTA entnommenen EBV-DNA-negativen Plasmaproben, die durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) mit EBV-DNA dotiert waren.

Der Test ab 1000 µl Probe wurde an 30 EBV-DNA-negativen, in EDTA entnommenen Plasmaproben durchgeführt, die durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) mit EBV-DNA dotiert waren.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Vollblut	30	30	0
	In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Plasma	12	12	0
	In EDTA entnommenes, mit EBV-DNA dotiertes Plasma	35	35	0
1000 µl	In EDTA entnommenes, mit EBV-DNA dotiertes Plasma	30	29	1

Alle Vollblutproben wurden als gültig EBV-DNA-positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Alle Plasmaproben (200 µl) wurden als gültig EBV-DNA-positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Neunundzwanzig (29) von 30 Plasmaproben (1000 µl) wurden als gültig EBV-DNA-positiv bestätigt, eine Probe war abweichend negativ. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesen Tests 96,7 %.

Alle analysierten Proben ab 1000 µl Probenvolumen waren zur Analyse valide, 29 von 30 Plasmaproben wurden als positiv bestätigt, eine Probe war abweichend negativ. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesen Tests 96,7 %.

Die diagnostische Gesamtsensitivität des Assays betrug bei diesen Tests 99 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger EBV-DNA-negativer klinischer Vollblut- und Plasmaproben zusammen mit **ELITE InGenius** bewertet. Da **ELITE BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITE InGenius** aufwies, ist anzunehmen, dass die in Zusammenhang mit **ELITE InGenius** erhaltenen Ergebnisse für die diagnostische Spezifität auch für **ELITE BeGenius** gelten.

Der Test ab 200 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an:

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

Der Test ab 1000 µl Probenvolumen wurde durchgeführt an 62 in EDTA entnommenen, vermutlich EBV-DNA-negativen Plasmaproben.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probenvolumen	Proben	Anzahl	positiv	negativ
200 µl	In EDTA entnommenes, EBV-DNA-negatives Vollblut	32	3	29
	In EDTA entnommenes, EBV-DNA-negatives Plasma	61	1	60
1000 µl	In EDTA entnommenes, vermutlich EBV-DNA-negatives Plasma	62	2	60

Neunundzwanzig (29) von 32 Vollblutproben wurden als gültig EBV-DNA-negativ bestätigt, drei Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer. Der Titer dieser Proben lag unter der Nachweisgrenze der Methode für EBV-DNA; die Tests dieser Proben können zufällig entweder negativ oder positiv ausfallen. Die abweichenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass EBV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test mit Vollblut 90,6 %.

Sechzig (60) von 61 Plasmaproben (200 µl) wurden als gültig EBV-DNA-negativ bestätigt, eine Probe war abweichend positiv bei niedrigem Titer. Der Titer dieser Probe lag nahe der Nachweisgrenze der Methode für EBV-DNA; der Test dieser Probe kann zufällig entweder negativ oder positiv ausfallen. Das abweichende Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass EBV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test mit Plasma 98,4 %.

Sechzig (60) von 62 Plasmaproben (1000 µl) wurden als gültig EBV-DNA-negativ bestätigt, zwei Proben waren abweichend positiv bei niedrigem Titer. Der Titer dieser Probe lag nahe der Nachweisgrenze der Methode für EBV-DNA; der Test dieser Probe kann zufällig entweder negativ oder positiv ausfallen. Das abweichende Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass EBV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 96,8 %.

Die diagnostische Gesamtspezifität des Assays betrug bei diesen Tests 96 %.

Der Grenzwert für die interne Kontrolle Ct (IC Ct) ist auf 35 festgelegt.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation des „EBV ELITE MGB® Kit“, FTP RTS020PLD, aufgeführt.

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

REF RTS020PLD

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

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

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

In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Kit «**EXTRAblood**» durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probenvolumen (nicht mehr als 2 Millionen Leukozyten) und eluieren Sie die DNA in **100 µl** Elutionspuffer.

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

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

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Gerät «**QIASymphony® SP/AS**» und dem Kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» und der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **Virus Blood_200_V4_default IC** und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **200 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Röhrchen mit dem ATE-Puffer wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angegeben in das Fach „Internal Control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **60 µl** angeben (tatsächlich erfolgt die Elution in 90 µl, wovon 60 µl aufgefangen werden). Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

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

REF RTS020PLD

In EDTA entnommenes Plasma

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

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

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit **ELITe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S_200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert (tatsächlich erfolgt die Elution in 115 µl, wovon 100 µl aufgefangen werden). Proben in Primärröhrchen können direkt auf «**ELITe STAR**» geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–600 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 (tatsächlich erfolgt die Elution in 210 µl, wovon 200 µl aufgefangen werden). Proben in Primärröhrchen können direkt auf «**ELITe GALAXY**» geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **10 µl / Probe von CPE** hinzufügen. Der CPE muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät „**QIASymphony® SP/AS**“ und dem Kit „**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**“ mit der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC** und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **500 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Lösung mit dem AVE-Puffer und dem RNA-Träger gemäß der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits ansetzen. Für jede angeforderte Probe **6 µl/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.

Liquor

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

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

Störende Substanzen

Die aus der Probe extrahierte DNA darf kein Heparin, Hämoglobin, Dextran oder 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.

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

REF RTS020PLD

Amplifikationskontrollen

Es ist unbedingt erforderlich, jede Amplifikation mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

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

Für die Positivkontrolle das Produkt «**EBV ELITe Positive Control**» oder das Produkt «**EBV ELITe Standard**» verwenden.

Qualitätskontrollen

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

Externe Kontrollen sind gemäß den einschlägigen Anforderungen der lokalen, staatlichen und föderalen Akkreditierungsorganisationen zu verwenden. Ein Beispiel für handelsübliche externe Kontrollen ist „EBV Molecular Q Panel“ (Art.-Nr. EBVMQP01 von Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich).

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

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

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

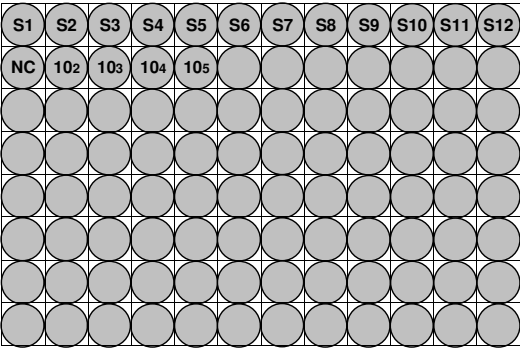
- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen und einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die EBV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „EBV“ nennen.
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Internal Control so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung 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** (10s Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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

REF RTS020PLD

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

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

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

Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
 - Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen und „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;
 - im Detector Manager den Detektor („detector“) für die EBV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „EBV“ 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** (10s Kopien, 104 Kopien, 103 Kopien, 102 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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

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

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

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

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

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

Einrichten der Amplifikation

(Im Bereich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktion 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 **EBV Q - PCR Mix** Röhrchen auftauen und beachten, dass jedes Röhrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern.
- Die **EBV - ELITe Positive Control** oder die **EBV 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.

1. **20 µl EBV 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 EBV-DNA): **20 µl EBV - ELITe 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 **EBV - ELITe Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

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

5. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit der **Amplifikations-Dichtungsfolie** dicht verschließen.

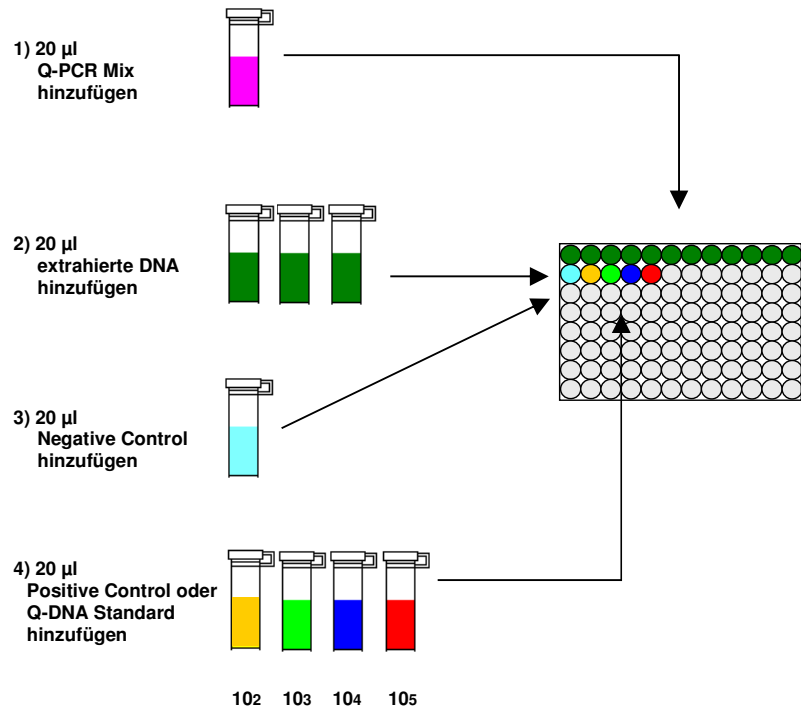
6. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-EBV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus müssen die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** und die Reaktionsprodukte 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.

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

REF RTS020PLD



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

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

Qualitative Analyse der Ergebnisse

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

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

Hinweis: Bei einer positiven Probe mit einem hohen EBV-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der EBV-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.

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

REF RTS020PLD

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

- manuell den **Schwellenwert** („Threshold“) für den FAM-Detektor „EBV“ 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 „EBV“ 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 EBV („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei EBV 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 EBV-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positive Control** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10s** (Ct ≤ 25) beachten.

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

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

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

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

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

Dieses Produkt ist in der Lage, eine Mindestmenge von zirka 10 Kopien von DNA des EBNA-1-Gens von EBV in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen, die 10 Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (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 Probe	Assayergebnis	EBV-DNA
FAM-Detektor „EBV“	VIC-Detektor „IC“			
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	ungeeignet	ungültig	-
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, negativ	NICHT ERKANNT
Ct Determined (Ct bestimmt)	Ct > 35 oder Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	geeignet*	gültig, positiv	ERKANNT
	Ct ≤ 35	geeignet	gültig, positiv	ERKANNT

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei EBV und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass die EBV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der EBV-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 EBV-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der Internal Control „Ct > 35“ oder „Ct Undetermined“ (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der Internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei EBV-DNA verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe dennoch geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

Quantitative Analyse der Ergebnisse

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

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** ermöglichen die **Ct**-Werte für EBV 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 „EBV“	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 **EBV-Ct**-Werte in der Amplifikationsreaktion der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** des Amplifikationslaufs dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, zwischen 1.000.000 und 10 Kopien von DNA des EBNA-1-Gens von EBV in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich des Produkts, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

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

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

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

Dabei ist:

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

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

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

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

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

Wird «**ELITE GALAXY**» zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

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

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

REF RTS020PLD

Wird das Extraktionssystem «NucliSENS® easyMAG®» zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 50 \times \text{Menge}$

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 23 \times \text{Menge}$

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» zusammen mit in EDTA entnommenen Plasmaproben verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Plasma und «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 12 \times \text{Menge}$

Berechnung der Messbereichsgrenzen

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

$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$

Wird das Extraktionskit «EXTRAblood» zusammen mit zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «EXTRAblood»
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 25 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 25 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 250 bis 25.000.000 gEq/ml

Wird das Extraktionssystem «ELITE STAR» zusammen mit zellulären und nicht zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei ELITE STAR
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 28 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 28 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 280 bis 28.000.000 gEq/ml

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

REF RTS020PLD

Wird das Extraktionssystem «ELITE GALAXY» zusammen mit zellulären und nicht zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «ELITE GALAXY»
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 35 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 35 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 350 bis 35.000.000 gEq/ml

Wird das Extraktionssystem «NucliSENS® easyMAG®» zusammen mit zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «NucliSENS® easyMAG®»
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 50 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 50 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 500 bis 50.000.000 gEq/ml

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» zusammen mit zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «QIASymphony® SP/AS»
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 23 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 23 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 230 bis 23.000.000 gEq/ml

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» zusammen mit nicht zellulären Proben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «QIASymphony® SP/AS»
$\text{Untere Grenze (gEq/ml)} = 12 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Obere Grenze (gEq/ml)} = 12 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
von 120 bis 12.000.000 gEq/ml

Umrechnung der Ergebnisse internationale Einheiten (IU)

Wird das Extraktionskit «EXTRAblood» 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 «EXTRAblood»
$F_c = 2,0 \text{ IU/gEq}$
$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times F_c$
$Nc \text{ (IU/ml)} = 50 \times \text{Menge}$

Wird das Extraktionssystem «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»
$F_c = 2,09 \text{ IU/gEq}$
$Nc \text{ (IU/ml)} = Nc \text{ (gEq/ml)} \times F_c$
$Nc \text{ (IU/ml)} = 58,2 \times \text{Menge}$

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

REF RTS020PLD

Wird das Extraktionssystem «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 = 2,15 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 60,2 x Menge	

Wird das Extraktionssystem «ELITe GALAXY» 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 GALAXY»	
Fc = 0,89 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 31,2 x Menge	

Wird das Extraktionssystem «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 = 0,76 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 26,6 x Menge	

Wird das Extraktionssystem «NucliSENS® easyMAG®» 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 «NucliSENS® easyMAG®»	
Fc = 1,7 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 85 x Menge	

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» 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 «QIASymphony® SP/AS»	
Fc = 1,8 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 41 x Menge	

Wird das Extraktionssystem «QIASymphony® SP/AS» 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 «QIASymphony® SP/AS»	
Fc = 2,3 IU/gEq	
Nc (IU/ml) = Nc (gEq/ml) x Fc	
Nc (IU/ml) = 28 x Menge	

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

REF RTS020PLD

Dabei ist **Fc** der Umrechnungsfaktor, der mithilfe des von der WHO anerkannten kalibrierten Referenzmaterials „1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich, festgelegt wurde (siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

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

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

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und ELITe STAR verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3,160 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 8 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit ELITe STAR und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (IU/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	212 IU/ml	113 IU/ml	805 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe STAR (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	101 gEq/ml	54 gEq/ml	385 gEq/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und ELITe STAR verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativem EDTA-Plasma angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 3,160 IU/ml und 1000 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit ELITe STAR und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

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

REF RTS020PLD

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITE STAR (IU/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	229 IU/ml	108 IU/ml	1571 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITE STAR (gEq/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	107 gEq/ml	50 gEq/ml	731 gEq/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITE GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativem EDTA-Vollblut angesetzt. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 IU/ml und 560 IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITE GALAXY** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITE GALAXY (IU/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	99 IU/ml	57 IU/ml	376 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITE GALAXY (gEq/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	111 gEq/ml	64 gEq/ml	422 gEq/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITE GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-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.

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

REF RTS020PLD

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	97 IU/ml	66 IU/ml	284 IU/ml

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITE GALAXY (gEq/ml)			
95 %-Konfidenzintervall			
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	128 gEq/ml	87 gEq/ml	374 gEq/ml

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays, als linearer Messbereich, wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit den Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Punkten der Reihe eine lineare Reaktion aufweist (Quadrat des Korrelationskoeffizienten über 0,99).

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

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

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich (gEq/Reaktion)	
Obere Grenze	1.000.000 gEq/Reaktion
Untere Grenze	10 gEq/Reaktion

Die Messbereichsgrenzen in gEq/ml in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 34 berechnet.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten derselben innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 21,0 % 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 11,1 % 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.

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

REF RTS020PLD

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 EBV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2008 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «EXTRAblood» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien				
Probe	Konsensus für Viruskonz. bei kommerziell verfügbaren Assays log ₁₀ gEq/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
EBV08-01	EBV, 2,394	0,473	2/2	1,937
EBV08-02	EBV, 3,177	0,476	2/2	3,185
EBV08-03	EBV, 3,443	0,400	2/2	3,021
EBV08-04	EBV, 4,159	0,391	2/2	4,089
EBV08-05	EBV, 2,707	0,504	2/2	2,408
EBV08-06	Negativ, n. z.	-	0/2	-
EBV08-07	EBV, 3,857	0,349	2/2	3,796
EBV08-08	EBV, 5,131	0,361	2/2	4,930
EBV08-09	EBV, 4,414	0,358	2/2	4,186
EBV08-10	EBV, 2,651	0,456	2/2	2,458

Alle Proben wurden richtig erkannt. Die quantitativen Ergebnisse liegen wie erforderlich innerhalb des vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung, außer bei Probe EBV08-03.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von EBV innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Epstein-Barr Virus DNA 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 gEq/ml sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe STAR				
Probe	Konsensus für Viruskonz. bei kommerziell verfügbaren Assays log ₁₀ gEq/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
EBV12-01	EBV, 2,719	0,446	1/2	1,885
EBV12-02	EBV, 3,802	0,417	2/2	3,794
EBV12-03	EBV, 5,173	0,358	2/2	5,168
EBV12-04	EBV, 4,790	0,421	2/2	4,569
EBV12-05	EBV, 4,313	0,371	2/2	4,064
EBV12-06	EBV, 4,458	0,373	2/2	4,334
EBV12-07	EBV, 4,769	0,384	2/2	4,416
EBV12-08	EBV, 3,471	0,403	2/2	3,324
EBV12-09	EBV, 3,313	0,446	2/2	3,128
EBV12-10	Negativ, n. z.	-	0/2	-

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

REF RTS020PLD

Alle negativen Proben wurden richtig erkannt. Bei der quantitativen Analyse wurden 8/9 positive Proben innerhalb des vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung richtig quantifiziert. Eine Probe (EBV12-01) wurde innerhalb von ± 2 SD quantifiziert. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass der Titer der Probe nahe der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lag.

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 Viruskonz. bei kommerziell verfügbaren Assays log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBV12-01	EBV, 2,473	0,386	1/2	2,217
EBV12-02	EBV, 3,635	0,422	2/2	4,126
EBV12-03	EBV, 4,987	0,307	2/2	5,500
EBV12-04	EBV, 4,646	0,295	2/2	4,901
EBV12-05	EBV, 4,138	0,300	2/2	4,396
EBV12-06	EBV, 4,345	0,333	2/2	4,666
EBV12-07	EBV, 4,631	0,270	2/2	4,749
EBV12-08	EBV, 3,470	0,442	2/2	3,657
EBV12-09	EBV, 3,161	0,394	2/2	3,460
EBV12-10	Negativ, n. z.	-	0/2	-

Alle negativen Proben wurden richtig erkannt. Bei der quantitativen Analyse wurden 7/9 positive Proben innerhalb des vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung richtig quantifiziert. Zwei Proben (EBV12-02 und EBV12-03) wurden innerhalb von ± 2 SD quantifiziert.

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

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

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe GALAXY				
Probe	Konsensus für Viruskonz. bei kommerziell verfügbaren Assays log ₁₀ gEq/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
EBV12-01	EBV, 2,719	0,446	2/2	2,763
EBV12-02	EBV, 3,802	0,417	2/2	3,638
EBV12-03	EBV, 5,173	0,358	2/2	5,060
EBV12-04	EBV, 4,790	0,421	2/2	4,598
EBV12-05	EBV, 4,313	0,371	2/2	4,063
EBV12-06	EBV, 4,458	0,373	2/2	4,319
EBV12-07	EBV, 4,769	0,384	2/2	4,597
EBV12-08	EBV, 3,471	0,403	2/2	3,258
EBV12-09	EBV, 3,313	0,446	2/2	3,224
EBV12-10	Negativ, n. z.	-	0/2	-

In Übereinstimmung mit den vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben wurden richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt.

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

REF RTS020PLD

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 Viruskonz. bei kommerziell verfügbaren Assays log ₁₀ IU/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBV12-01	EBV, 2,473	0,386	2/2	2,644
EBV12-02	EBV, 3,635	0,422	2/2	3,518
EBV12-03	EBV, 4,987	0,307	2/2	4,941
EBV12-04	EBV, 4,646	0,295	2/2	4,479
EBV12-05	EBV, 4,138	0,300	2/2	3,944
EBV12-06	EBV, 4,345	0,333	2/2	4,200
EBV12-07	EBV, 4,631	0,270	2/2	4,478
EBV12-08	EBV, 3,470	0,442	2/2	3,139
EBV12-09	EBV, 3,161	0,394	2/2	3,105
EBV12-10	Negativ, n. z.	-	0/2	-

In Übereinstimmung mit den vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt.

Analytische Sensitivität: Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der bei diesem Assay für die Umrechnung quantitativer Ergebnisse von gEq/ml in internationale Einheiten / ml zu verwendende Umrechnungsfaktor wurde definiert als 2,0 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Vollblutproben und des Kits «EXTRAblood» für die manuelle Extraktion, als 2,2 internationale Einheiten / gEq, bei Verwendung von Vollblutproben und des automatischen Extraktionssystems ELITe STAR, als 0,8 internationale Einheiten / gEq, bei Verwendung von Vollblutproben und des automatischen Extraktionssystems ELITe GALAXY, als 1,7 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Vollblutproben und des automatischen Extraktionssystems «NucliSENS® easyMAG®», als 1,8 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Vollblutproben und des automatischen Extraktionssystems «QIASymphony® SP/AS», als 2,0 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Plasmaproben und ELITe STAR, als 0,7 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Plasma und des automatischen Extraktionssystems ELITe GALAXY, als 2,3 internationale Einheiten / gEq bei Verwendung von Plasma und des automatischen Extraktionssystems «QIASymphony® SP/AS».

In EDTA entnommenes Vollblut

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von vier Verdünnungen (0,5 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Vollblut berechnet.

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 2,0 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «EXTRAblood» (Fc = 2,0 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	154.718	30,4034	5,48
100.000	5,000	51.264	100.737	5,00
31.625	4,500	15.602	30.660	4,49
10.000	4,000	5.438	10.686	4,03

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

REF RTS020PLD

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 2,2 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „ELITe STAR“ (Fc = 2,09 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
3.162	3,500	1.295	2.709	3,339
10.000	4,000	5.116	10.703	3,976
31.623	4,500	18.300	38.283	4,559
100.000	5,000	55.188	115.453	5,034
316.228	5,500	177.128	370.551	5,537

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 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und „ELITe GALAXY“ (Fc = 0,89 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
3.162	3,500	3.821	3.400	3,518
10.000	4,000	13.623	12.124	4,101
31.623	4,500	32.547	28.967	4,460
100.000	5,000	120.239	107.013	5,028
316.228	5,500	281.782	250.786	5,390

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglicht die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 1,7 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 1,7 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	212.198	366.796	5,56
100.000	5,000	56.930	98.407	4,99
31.625	4,500	20.334	35.148	4,55
10.000	4,000	4.734	8.183	3,91

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

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

REF RTS020PLD

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 1,8 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Vollblutproben nachgewiesenem EBV. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 1,8 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	203251	365852	5,563
100.000	5,000	61830	111294	5,046
31.625	4,500	18174	32713	4,515
10.000	4,000	4546	8183	3,913
3.162	3,500	1850	3330	3,522
1.000	3,000	575	1035	3,015

In EDTA entnommenes Plasma

Der Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von vier Verdünnungen (0,5 log₁₀ zwischen Verdünnungen) des von der WHO („1st WHO International Standard for Epstein Barr virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) anerkannten kalibrierten Referenzmaterials in in EDTA entnommenem Plasma berechnet.

Jeder Punkt der Reihe wurde in 15 Wiederholungen getestet; dabei wurde das gesamte Analyseverfahren 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 2,0 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Plasmaproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „ELITe STAR“ (Fc = 2,15 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	167.105	359.275	5,537
100.000	5,000	45.185	97.147	4,961
31.625	4,500	17.428	37.470	4,555
10.000	4,000	4.536	9.753	3,993
3.162	3,500	1.435	3.084	3,454

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 0,7 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Plasmaproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und „ELITe GALAXY“ (Fc = 0,76 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
3.162	3,500	5.610	4.263	3,608
10.000	4,000	15.554	11.821	4,050
31.623	4,500	39.837	30.276	4,451
100.000	5,000	148.584	112.924	5,035
316.228	5,500	308.566	234.510	5,334

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

REF RTS020PLD

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

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von 2,3 internationalen Einheiten (IU) pro gEq in Plasmaproben nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 2,3 IU/gEq)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge gEq/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
316.255	5,500	110.437	249.588	5,39
100.000	5,000	37.691	85.181	4,93
31.625	4,500	14.498	32.765	4,51
10.000	4,000	7.442	16.819	4,22

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

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

Die Analyse der für die Hybridisierung der Primer und des Fluoreszenzmarkers ausgewählten Regionen in der Anordnung der in der Datenbank für das EBNA 1-Gen von EBV verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde mithilfe einiger positiv auf EBV-DNA getesteter klinischer Proben von Liquor und Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 21 in EDTA entnommene Vollblutproben, die alle EBV-DNA-positiv waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation), und 21 EBV-DNA-negative Liquorproben, die mit Proben EBV09-04, EBV09-05 und EBV09-06 aus QCMD 2009 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich) dotiert waren, verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde die gesamte Analyse, 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, EBV-DNA-positives Vollblut	21	21	0
Mit EBV-DNA dotierter Liquor	21	21	0

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

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 31 in EDTA entnommene, EBV-DNA- positive Plasmaproben sowie 31 in EDTA entnommene, EBV-DNA- negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **ELITe STAR** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Plasma	31	29	2
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Vollblut	31	30	1

Drei Proben ergaben mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein negatives Ergebnis. Diese Nichtübereinstimmung ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass der EBV-Titer der Proben nahe der Nachweisgrenze der Methode lag.

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

REF RTS020PLD

Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 95,2 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 30 in EDTA entnommene, EBV-DNA-positive Plasmaprobe (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) sowie 32 in EDTA entnommene, EBV-DNA-positive Vollblutproben verwendet (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation). 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, EBV-DNA-positives Plasma	30	29	1
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-positives Vollblut	32	32	0

Eine Plasmaprobe ergab mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. ein negatives Ergebnis. Diese Nichtübereinstimmung lässt sich möglicherweise durch eine wahrscheinlich schlechte Konservierung der Probe erklären.

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

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 EBV, darunter das komplette HHV8-Genom, verfügbaren Sequenzen ergab, dass das humane Herpesvirus, das EBV am meisten ähnelt, deren Spezifität und die Abwesenheit einer signifikanten Homologie aufzeigte.

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

Für die Überprüfung der analytischen Spezifität wurden 20 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative, jedoch CMV-DNA- oder HHV6-DNA-positive (getestet mit CE-IVD-Produkten zur Echtzeit-Amplifikation) Vollblutproben 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, CMV-DNA-positives Vollblut	11	0	11
In EDTA entnommenes, HHV6-DNA-positives Vollblut	9	0	9

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 EBV-DNA getesteter klinischer Proben von Liquor und Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden als Referenzmaterial 29 in EDTA entnommene Vollblutproben und 21 Liquorproben, die EBV-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde die gesamte Analyse, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
EBV-DNA-negatives Vollblut	29	1	28
EBV-DNA-negativer Liquor	21	0	18

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

REF RTS020PLD

Eine Vollblutprobe ergab im ersten Analyselauf ein positives Ergebnis für EBV-DNA mit sehr niedrigem Titer (etwa 3 Kopien/Reaktion). Dieselbe Probe ergab im zweiten Lauf ein negatives, gültiges Ergebnis. Dieses widersprüchliche Ergebnis lässt sich möglicherweise durch den sehr niedrigen Titer von EBV-DNA erklären, der unter der Nachweisgrenze der Referenzmethode lag.

Drei Liquorproben ergaben ein ungültiges Ergebnis, möglicherweise wegen des Vorhandenseins eines Inhibitors, und wurden nicht zur Berechnung der Spezifität herangezogen. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 97,9 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 40 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative Plasmaprobe sowie 60 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung 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, EBV-DNA-negatives Plasma	40	0	40
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-negatives Vollblut	60	3	53

Vier Vollblutproben waren ungültig. Drei Vollblutproben waren abweichend positiv (jeweils 58 gEq/ml, 107 gEq/ml und 37 gEq/ml). Der Titer dieser Proben lag unter der Nachweisgrenze der Methode für EBV-DNA; die Tests dieser Proben können zufällig entweder negativ oder positiv ausfallen. Die abweichenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass EBV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 96,9 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 30 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative Plasmaprobe sowie 32 in EDTA entnommene, EBV-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, EBV-DNA-negatives Plasma	30	0	30
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-negatives Vollblut	32	1	31

Eine Vollblutprobe ergab ein abweichend positives Ergebnis (18 gEq/ml). Der Titer dieser Probe lag unterhalb der Nachweisgrenze der Methode für EBV-DNA; der Test dieser Probe kann zufällig entweder negativ oder positiv ausfallen. Das abweichende Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass EBV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist.

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

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation des „EBV ELITe MGB® Kit“, FTP RTS020PLD, aufgeführt.

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

REF RTS020PLD

Roche cobas z 480 analyzer

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

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

In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

In EDTA entnommenes Plasma

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

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

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

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

Störende Substanzen

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

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

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

Amplifikationskontrollen

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

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

Für die Positivkontrolle das Produkt «**EBV - ELITE Positive Control**» oder alternativ das Produkt «**EBV - ELITE Positive Control RF**» oder das Produkt «**EBV ELITE Standard**» verwenden.

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

REF RTS020PLD

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

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

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

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

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

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

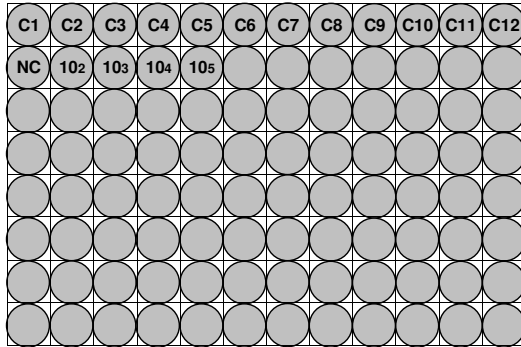
Das am Ende dieses Benutzerhandbuchs angehängte **Arbeitsblatt** ausfüllen; dazu diese Informationen übertragen oder das Layout der Mikrotitierplatte ausdrucken. Dieses **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen der Konzentration von DNA in der Ausgangsprobe müssen Sie eine Reaktionsreihe mit dem **Q - PCR Standard** (10⁵ gEq, 10⁴ gEq, 10³ gEq und 10² gEq) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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

REF RTS020PLD

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



Legende: C1 - C12: Zu analysierende Proben; NC: Negative Amplifikationskontrolle; 10²: Standard 10² gEq; 10³: Standard 10³ gEq; 10⁴: Standard 10⁴ gEq; 10⁵: Standard 10⁵ gEq.

Einrichten der Amplifikation

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

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

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

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

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

2. **20 µl extrahierte DNA** aus der ersten Probe präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor auf dem **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Probe gut mischen, dazu die **extrahierte DNA** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden. Mit der übrigen **extrahierten DNA** auf die gleiche Weise verfahren.
3. **20 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie** (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch überführen, das zuvor im **Arbeitsblatt** als negative Amplifikationskontrolle festgelegt wurde. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das **hochreine Wasser für die Molekularbiologie** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Sicherstellen, dass sich keine Bläschen bilden.
4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

- Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von EBV-DNA): **20 µl EBV - ELITE Positive Control** oder alternativ **EBV - ELITE Positive Control RF** präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **EBV - ELITE Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

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

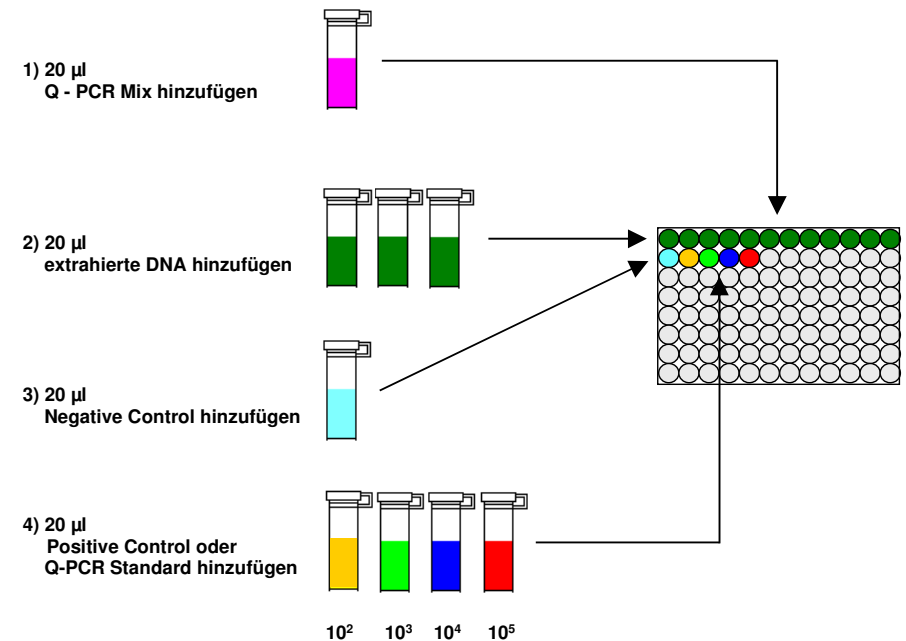
REF RTS020PLD

- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von EBV-DNA): **20 µl EBV Q - PCR Standard 10²** präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **EBV Q - PCR Standard** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **Q - PCR Standards (10³, 10⁴, 10⁵)** auf die gleiche Weise verfahren.

5. Die **AD-Platte** vorsichtig mit der **Dichtungsfolie** dicht verschließen.
6. Die **AD-Platte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellungen mit einer eindeutigen und wiedererkennbaren ID (z. B. „Jahr-Monat-Tag-EBV-EGSpA“) speichern.

Hinweis: Am Ende des Temperaturzyklus müssen die **AD-Platte** und die Reaktionsprodukte aus dem Gerät entfernt und umweltgerecht entsorgt werden. **Niemals** die Dichtungsfolie von der **Amplifikations-Mikrotiterplatte entfernen**, um ein Entweichen der Reaktionsprodukte zu vermeiden.

In der folgenden Abbildung ist die Vorbereitung der Amplifikationsreaktion zusammengefasst.



Analyse der qualitativen Ergebnisse

Die Werte der ausgesendeten Fluoreszenz, die vom EBV-Detektor und dem IC-Detektor während der Amplifikationsreaktionen aufgezeichnet wurden, müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

Im Menü „Analysis“ (Analyse) „Absolute Quant/Fit Points“ (Absolute Quant./Anpass.Punkte) auswählen (2 Punkte)

Die Gruppe der zu analysierenden Proben auswählen

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

- manuell den Berechnungsbereich (Schaltfläche „Background“ (Hintergrund)) für das Fluoreszenz-Hintergrundniveau („**Background Fluorescence Level**“) von Zyklus 2 bis Zyklus 6 eingeben.

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

REF RTS020PLD

Bei **Plasmaproben**:

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

Bei **Vollblutproben**:

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „EBV“ auf **0,80** einstellen;
- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den VIC-Detektor „IC“ auf **1,5** einstellen.

Die Werte der von den spezifischen Detektoren in der Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenz sowie der Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) der Fluoreszenz dienen zur Bestimmung des Schwellenwertzyklus („**Threshold Cycle (Ct)**“), d. h. des Zyklus, in dem der **Fluoreszenzschwellenwert** erreicht wird.

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

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei EBV **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 EBV-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positive Control** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)** beachten.

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

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** für EBV nicht **Ct Undetermined**, wurde das Vorhandensein der Ziel-DNA nachgewiesen. Während der Amplifikationsphase sind Probleme aufgetreten (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Bei den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** dient der **Ct-Wert** für EBV zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct-Wert** für die Internal Control zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

Hinweis: Überprüfen Sie mithilfe der Gerätesoftware (Fenster „Analysis“ (Analyse)), dass der **Ct-Wert** anhand eines schnellen und regelmäßigen Anstiegs der Fluoreszenzwerte und nicht anhand von Spitzen oder eines Anstiegs des Hintergrundsignals (unregelmäßiger oder rauschender Hintergrund) ermittelt wurde.

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

REF RTS020PLD

Ergebnisse, wie der **Ct-Wert**, aus den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** (Fenster „Analysis“) werden wie in der folgenden Tabelle dargestellt verwendet:

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) für EBV und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** für die internal Control, konnte die internal Control-DNA nicht effizient nachgewiesen werden. In diesem Fall sind während der Amplifikationsphase (ineffiziente oder Null-Amplifikation) oder während der Extraktionsphase (abgebaute Proben-DNA, Probe mit zu niedriger Zellzahl, Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren in der extrahierten DNA) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei EBV und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, wurde die EBV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die EBV-DNA in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“) vorliegt. In diesem Fall wäre das Ergebnis falsch-negativ.

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

Hinweis: Wird während der Amplifikationsreaktion einer Probe EBV-DNA nachgewiesen, kann die Amplifikation der internal Control zu einem Ergebnis von **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) führen. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten EBV-Reaktion verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Assay-Ergebnis gültig.

Analyse der quantitativen Ergebnisse

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10⁵ Ct > 25** oder **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist oder die Ct-Werte der vier Q-PCR Standards nicht im Bereich der Standardkurve liegen, wurde die Ziel-DNA nicht korrekt nachgewiesen. Während der Amplifikations- oder der Detektionsphase sind Probleme aufgetreten (falsche Dispensierung des Reaktionsgemischs oder der Standards, Abbau des Reaktionsgemischs oder der Standards, falsche Einstellung der Standardpositionen, falsche Einstellung des Temperaturzyklus), die zu falschen Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab der Amplifikationsphase wiederholt werden.

Die **Ct-Werte** für EBV in den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** (Schaltfläche **Standard Curve**) aus dem Amplifikationslauf dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

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

REF RTS020PLD

Dieses Produkt ist in der Lage, von 1.000.000 bis zirka 10 Kopien pro Reaktion bzw. von 25.000.000 bis 250 Kopien pro ml Vollblut mit dem Extraktionssystem **MagNA Pure 24** zu quantifizieren (siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Probenergebnis FAM-Detektor „EBV“	EBV-Kopien pro Reaktion
Menge > 1 x 10 ⁶	ÜBER 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Menge ≤ 1 x 10 ⁶	= Menge
Menge < 1,0 x 10 ¹	WENIGER ALS 10

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** (Fenster „Analysis“ (Analyse)) dienen zur Berechnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen Kopien von EBV (**Nc**) gemäß dieser Formel:

$$Nc = \frac{V_e \times \text{Menge}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Dabei ist:

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

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

Vereinfachte Formel für Vollblut und Plasma und MagNA Pure 24

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

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität dieses Assays, ausgedrückt als Nachweisgrenze, ermöglicht den Nachweis von zirka 10 Kopien in 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die analytische Sensitivität dieses Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 10 Kopien / 20 µl in 150.000 Kopien von pBETAGLOBIN / 20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 18 Wiederholungen zur Durchführung der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet. Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
10 Kopien Plasmid-DNA + 150.000 Kopien pBETAGLOBIN	18	18	0

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblut, Plasma und **MagNA Pure 24** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus sechs Punkten rund um die Grenzkonzentration. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

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

REF RTS020PLD

Die endgültigen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Nachweisgrenze mit MagNA Pure 24 (IU/ml)			
Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Untere Grenze
Vollblut	143 IU/ml	87 IU/ml	413 IU/ml
Plasma	163 IU/ml	82 IU/ml	1137 IU/ml

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 51 angegeben ist.

Die analytische Sensitivität als Kopien/ml ist nachfolgend angegeben.

Nachweisgrenze mit MagNA Pure 24 (Kopien/ml)			
Matrix	95 %-Positivität	95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Vollblut	102 Kopien/ml	62 Kopien/ml	295 Kopien/ml
Plasma	125 Kopien/ml	63 Kopien/ml	875 Kopien/ml

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA bewertet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Punkte der Reihe von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen zur Durchführung der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Punkten der Reihe eine lineare Reaktion aufweist (linearer Korrelationskoeffizient über 0,99).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs lag bei rund 10 Kopien/Reaktion innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10² Kopien / 20 µl).

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

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

Die Umrechnungen von Kopien/ml in Kopien/Reaktion und umgekehrt erfolgten wie auf Seite 51 angegeben.

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

REF RTS020PLD

Die Linearität dieses Assays, der in Verbindung mit verschiedenen Matrizes und **MagNA Pure 24** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von EBV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen des „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code 09/260, Vereinigtes Königreich) in EBV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus fünf Verdünnungspunkten (1 log₁₀-Verdünnungsschritte) von 10⁶ IU/ml bis 10² IU/ml. Jede Probe der Reihe wurde in vier Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Verdünnungen über der Nachweisgrenze eine lineare Reaktion aufweist.

Bestimmungsgrenze

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die niedrigste Konzentration festgesetzt, bei der 100 % Positivität sowie ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden. Die obere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der ausreichend genaue und präzise quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Der lineare Messbereich als Kopien/ml für jede Matrix wird unter Anwendung des spezifischen Umrechnungsfaktors berechnet, der auf Seite 51 angegeben ist.

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

Linearer Messbereich für Vollblutproben und MagNA Pure 24		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	178	1.000.000
Kopien/ml	127	714.286

Linearer Messbereich für Plasmaproben und MagNA Pure 24		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
IU/ml	178	1.000.000
Kopien/ml	137	769.231

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der Ct-Werte unter 2 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der gemessenen Mengen von zirka 11 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit dieses Assays als die Differenz zwischen dem Mittelwert der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden und dem theoretischen Konzentrationswert der Probe, ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit der gemessenen log-Menge von zirka 1,1% im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision und Genauigkeit wurden mithilfe der während der Experimente zur Untersuchung des linearen Messbereichs erhaltenen Daten ermittelt.

Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts des kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe «EBV Molecular “Q” Panel» (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

REF RTS020PLD

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für das System **MagNA Pure 24** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und MagNA Pure 24				
Probe	Nennititer IU/ml	Nennititer log ₁₀ IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,586
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,553
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,664
EBVMQP01-Negative	negativ	-	0/2	-

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

Für die Durchführung weiterer Tests wurde die kalibrierte Reihe «AcroMatrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für das System **MagNA Pure 24** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und MagNA Pure 24				
Probe	Nennititer IU/ml	Nennititer log ₁₀ IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
Acromatrix EBV 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	5,987
Acromatrix EBV 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,152
Acromatrix EBV 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	4,208
Acromatrix EBV 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,147
Acromatrix EBV 1E2	10 ²	2,000	2/2	2,246

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

Bei weiteren Tests wurde als Referenzmaterial QCMD 2017 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von EBV-Verdünnungen, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen System **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse in IU/ml wurden unter Anwendung des Umrechnungsfaktors für das System **MagNA Pure 24** und Plasma berechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und MagNA Pure 24			
Probe	Konsensus Viruskonz. log ₁₀ IU/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ IU/ml
EBVDNA17S-01	3,885	2/2	3,884
EBVDNA17S-02	3,906	2/2	3,742
EBVDNA17S-03	2,903	2/2	2,928
EBVDNA17S-04	2,952	2/2	2,819
EBVDNA17S-05	2,181	2/2	1,817
EBVDNA17S-06	3,215	2/2	3,188
EBVDNA17S-07	3,899	2/2	3,974
EBVDNA17S-08	2,315	2/2	1,908
EBVDNA17S-09	-	0/2	-
EBVDNA17S-10	2,333	2/2	2,184

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

Faktor für die Umrechnung in internationale Einheiten

Der bei diesem Assay für die Umwandlung des quantitativen Ergebnisses von Kopien/ml in IU/ml zu verwendende Umrechnungsfaktor wurde mithilfe einer Reihe von WHO („1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus (EBV) for Nucleic Acid Amplification Techniques“, NIBSC, Vereinigtes Königreich, Code 09/162) anerkannten kalibrierten Referenzmaterialien in den verschiedenen negativen Matrices für EBV-DNA und zusammen mit **MagNA Pure 24** berechnet. Die Reihe bestand aus 6 Verdünnungsschritten von 1 log. Jeder Punkt der Reihe wurde in 16 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von **1,4** internationalen Einheiten (IU) pro Kopie von in **Vollblutproben** nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Vollblut und «MagNA Pure 24» (Fc = 1,4 IU/Kopien)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge Kopien/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
111.055	5,046	81.828	119.952	5,074
34.903	4,543	26.663	38.395	4,575
10.970	4,040	7.705	11.095	4,033
3.448	3,538	2.275	3.276	3,503
1.084	3,035	711	1.024	2,994
341	2,532	275	395	2,572

Die Analyse der erhaltenen Daten ermöglichte die Berechnung eines mittleren Umrechnungsfaktors (Fc) von **1,3** internationalen Einheiten (IU) pro Kopie in **Plasmaproben** nachgewiesenem EBV.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Umrechnung in internationale Einheiten bei Plasma und «MagNA Pure 24» (Fc = 1,3 IU/Kopien)				
Erwartete Konz. IU/ml	Erwartete Konz. log ₁₀ IU/ml	Mittlere Menge Kopien/ml	Mittlere Menge IU/ml	Mittlere Menge log ₁₀ IU/ml
111.055	5,046	77.250	101.313	4,993
34.903	4,543	26.743	34.766	4,523
10.970	4,040	8.462	11.000	4,028
3.448	3,538	2.616	3.401	3,519
1.084	3,035	687	893	2,937
341	2,532	255	332	2,486

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden als Referenzmaterial 34 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative, durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard für Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC, Vereinigtes Königreich, code 09/260) mit EBV-DNA dotierte Vollblutproben sowie 30 in EDTA entnommene, EBV-DNA-negative, durch Hinzufügen von „1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC, Vereinigtes Königreich, code 09/260) mit EBV-DNA dotierte Plasmaproben verwendet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-dotiertes Vollblut	34	34	0
In EDTA entnommenes, EBV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle Proben waren beim ersten Test gültig.

Alle Vollblut- und Plasmaproben wurden als EBV-DNA-positiv bestätigt. Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Vollblut- und Plasmaproben betrug 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 34 in EDTA entnommene, vermutlich EBV-DNA-negative Vollblutproben und 31 in EDTA entnommene, vermutlich EBV-DNA-negative Plasmaproben als Referenzmaterial verwendet.

Für jede Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positive	negative
In EDTA entnommenes, vermutlich EBV-DNA-negatives Vollblut	34	0	34
In EDTA entnommenes, vermutlich EBV-DNA-negatives Plasma	31	1	30

Alle Vollblutproben waren beim ersten Test gültig und wurden als EBV-DNA-negativ bestätigt. Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Vollblutproben betrug 100 %.

Alle Plasmaproben waren beim ersten Test gültig. Dreißig (30) von 31 Plasmaproben wurden als EBV-DNA-negativ bestätigt, während eine Probe ein abweichend positives Ergebnis aufwies.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Plasmaproben betrug 96,8 %.

Die diagnostische Gesamtspezifität des Assays betrug 98,5 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrices und Geräten durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der technischen Dokumentation des „EBV ELITe MGB® Kit“, FTP RTS020PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf nur mit DNA verwendet werden, die aus den folgenden Humanproben extrahiert wurde: in EDTA entnommenes Vollblut, in EDTA entnommenes Plasma und Liquor.

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 oder Ficol® kontaminierte extrahierte DNA zusammen mit diesem Produkt verwenden: Diese Stoffe hemmen die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren und können zu ungültigen Ergebnissen führen.

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

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

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

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von einer angemessenen Identifizierung, Entnahme, Transportierung, Aufbewahrung und Verarbeitung der Proben ab. Zur Vermeidung falscher Ergebnisse ist es daher notwendig, bei diesen Schritten vorsichtig vorzugehen und die den Produkten für die Nukleinsäureextraktion beiliegenden Gebrauchsanweisungen sorgfältig zu befolgen.

Aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität ist die bei diesem Produkt verwendete Methode zur Echtzeit-Amplifikation empfindlich für Kreuzkontaminationen durch EBV-positive Proben, die Positivkontrollen und die gleichen Amplifikationsprodukte. Kreuzkontaminationen führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch das Produktformat werden Kreuzkontaminationen begrenzt. Trotzdem können Kreuzkontaminationen nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

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

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

Dieses Produkt darf nur von qualifiziertem Personal, das im Umgang mit molekularbiologischen Techniken, wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren geschult ist, verwendet werden. Dadurch sollen falsche Ergebnisse vermieden werden.

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

Für die Verwendung des Produkts werden Spezialkleidung und Instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

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

Ein mit diesem Produkt erhaltenes negatives Ergebnis bedeutet, dass die EBV-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Erregerlast unter dem Detektionslimit des Produkts liegt (siehe „Leistungsmerkmale“). In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein und eine Wiederholung des Tests erfordern. Eine erneute Testung ab der Extraktion kann zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen.

Etwaige Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregion des viralen Genoms können den Nachweis und die Quantifizierung der EBV-DNA beeinträchtigen.

Wie bei allen diagnostischen Produkten müssen bei der Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse alle klinischen Daten und sonstigen Laborbefunde des Patienten berücksichtigt werden.

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen, falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen, wie in der Notfalldiagnostik, kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen Auswirkungen auf den Patienten beitragen.

FEHLERBEHEBUNG

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

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reaktionen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle oder des dispensierten Standards kontrollieren.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch und Negativkontrolle oder Standards kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch und Positivkontrolle oder Standards kontrollieren.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Positivkontrolle oder Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Positionseinstellungen für die Positivkontrolle oder Standardreaktionen des Geräts überprüfen. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negativkontrolle erkannt

Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen und Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch oder Negativkontrolle kontrollieren. Volumina des Reaktionsgemischs oder der Negativkontrolle kontrollieren.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen und Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot Wasser verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.












Ziel-DNA und Internal Control-DNA in den Probenreaktionen nicht erkannt	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch oder Proben kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch oder Proben kontrollieren.
Abbau der Internal Control.	Neue Aliquote der Internal Control verwenden.
Inhibition durch die Probe störende Substanzen.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen. Extraktion und Amplifikation der Probe wiederholen.
Falsche Lagerung der Reagenzien.	Sicherstellen, dass das Reaktionsgemisch nicht mehr als 30 Minuten der Raumtemperatur ausgesetzt war.
Probleme bei der Extraktion.	Qualität und Konzentration der extrahierten DNA überprüfen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Unregelmäßige oder hohe Niveaus der Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsche Dispensierung der Probe.	Beim Einmischen von Proben, Negativ- und Positivkontrollen oder Standards in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.
Einstellfehler der Grundlinie.	Bereich für die Grundlinienberechnung innerhalb von Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat (die Daten unter „Results“ (Ergebnisse), „Component“ (Komponente) überprüfen) und die Zunahme des Fluoreszenzsignals noch nicht begonnen hat, z. B. von Zyklus 9 auf Zyklus 15. Die automatische Grundlinienberechnung durch Aktivieren der Option „Auto Baseline“ verwenden.

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

Fehler 30103 bei ELITe InGenius	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe.	Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist: - Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen oder - Extraktion mit einer 1:10-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.

SYMBOLE

-  Katalognummer.
-  Temperaturobergrenze.
-  Chargenbezeichnung.
-  Verwendbar bis (letzter Tag des Monats).
-  *In-vitro*-Diagnostikum.
-  Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.
-  Genügend für „n“ Tests.
-  Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.
-  Inhalt.
-  Vor Sonneneinstrahlung schützen.
-  Hersteller.

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

REF RTS020PLD

**HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE
LIZENZ**

Dieses Produkt enthält Reagenzien, die von Life Technologies Corporation hergestellt wurden und im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S.p.A. und deren Tochtergesellschaften und Life Technologies Corporation vertrieben werden. Im Kaufpreis dieses Produkts eingeschlossen sind eingeschränkte, nicht übertragbare Rechte zum Gebrauch nur dieser Produktmenge ausschließlich für Aktivitäten des Käufers mit direktem humandiagnostischem Bezug. Informationen zum Kauf einer Lizenz für dieses Produkt zu anderen als den oben genannten Zwecken sind erhältlich bei Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-Mail: outlicensing@thermofisher.com.

ELITe® MGB Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800 und 9,169,256 und der EP-Patente mit den Nummern 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256 und 2714939 sowie durch abhängige Patentanmeldungen geschützt.

Diese eingeschränkte Lizenz gestattet es der natürlichen oder juristischen Person, der dieses Produkt zur Verfügung gestellt wurde, das Produkt zu verwenden und die mithilfe des Produkts generierten Daten nur für humandiagnostische Zwecke zu verwenden. Weder die ELITechGroup S.p.A. noch deren Lizenzgeber gewähren weitere, ausdrückliche oder stillschweigende Lizenzen für andere Zwecke.

ELITe MGB® und das ELITe MGB®-Gerätelogo sind eingetragene Marken in der Europäischen Union.

ELITe InGenius® und ELITe BeGenius® sind eingetragene Marken der ELITechGroup.

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

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

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

EBV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › EBV ELITE Standard : STD020PLD › EBV - ELITE Positive Control : CTR020PLD › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|---|---|

F. Protocol

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

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	104 IU/mL – 36 cp/mL	100% 30/30*	90.6% 29/32*
Plasma (200 µL)	124 IU/mL – 65 cp/mL	100% 47/47*	98.4% 60/61*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Whole Blood	36 - 344,828	104 – 1,000,001	2.9
Plasma (200 µL)	65 - 526,316	124– 1,000,000-	1.9

H. Reference material tested with ELITE InGenius

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
AcroMatrix EBV Plasma Panel	Life Technologies	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (8/8)*	Titre as expected value ± 1 log 1 sample Titer as expected value ± 2 log

*confirmed samples/ tested samples

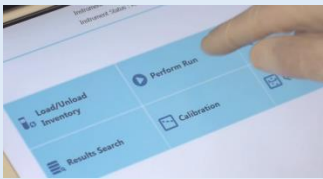
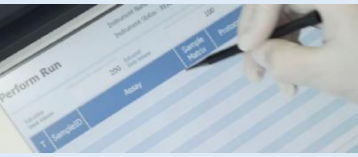

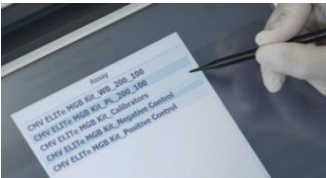

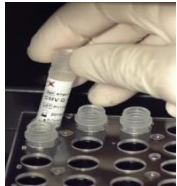

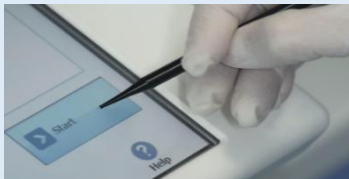

I. Procedures ELITE InGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>



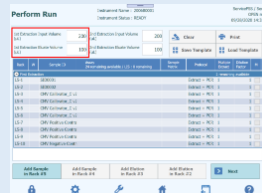
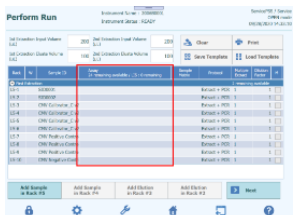
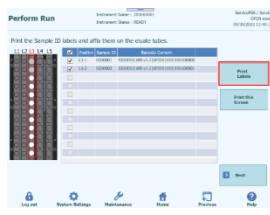




L. Procedures ELITE BeGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»

2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active

3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area

7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

EBV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP1000** Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS
- › **EBV ELITE Standard :** STD020PLD
- › **EBV ELITE Positive Control:** CTR020PLD
- › **CPE Internal Control:** CTCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| › Sample volume | 1000 µL | › Unit of quantitative result | International Unit: IU/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › EBV Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma (1000 µL)	18 IU/mL – 11 cp/mL	96.7% 29/30*	96.8% 60/62 <small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Plasma (1000 µL)	62 - 625,000	99 - 1,000,000	1.6

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log

*confirmed samples/ tested samples

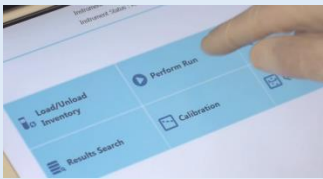
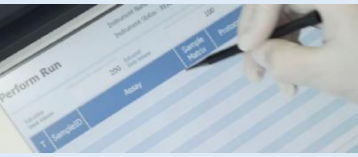

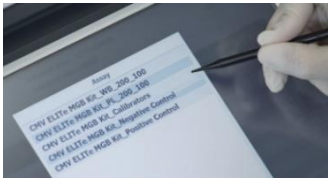

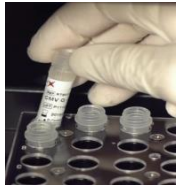



I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

EBV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITe MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITe STAR: INT010
- › ELITe STAR 200 extraction kit: INT011EX
- › ELITe GALAXY: INT020
- › ELITe GALAXY 300 extraction kit: INT021EX

- › EBV ELITe Positive Control: CTR020PLD
- › EBV ELITe Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITe STAR - ABI	Whole Blood	212 IU/mL – 101 gEq/mL	95.2% (30/31)*	96.9% (53/60)*
	Plasma	229 IU/mL – 107 IU/mL-	95.2% (29/30)*	100% (40/40)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole Blood	99 IU/mL – 111 gEq/mL	100% (32/32)*	96.9% (31/32)*
	Plasma	97 IU/mL – 128 gEq/mL	96.67% (29/30)*	100% (30/30)*

System	Linearity	Conversion factor cp/reaction to cp/mL
ELITe STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	28 (WB, PL)
ELITe GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	35 (WB, PL)
easyMAG - ABI	500 → 50 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB)
QIASymphony - ABI	230 → 23 x 10 ⁶ (WB)	23 (WB)
	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	12 (PL)

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELITE Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	Whole Blood, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Whole Blood, Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

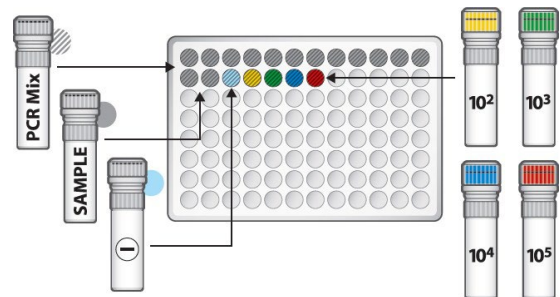
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw EBV Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, **20 µL** of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	EBV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶gEq/reaction.

EBV ELITE MGB® kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.
The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM (465 – 510)
Internal Control	Human beta globin gene	VIC (540 - 580)

C. Validated matrix

- › Whole Blood
- › Plasma EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System = software 1.0
- › EBV - ELITE Positive Control: CTR020PLD
EBV – ELITE Positive Control RF: CTR020PLD-R
- › EBV ELITE Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole Blood	143 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (34/34)*	100% (34/34)*
	Plasma	163 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (30/30)*	96.8% (30/31)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	Whole Blood, Plasma	200 μ L	350 μ L	100 μ L	20 μ L diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

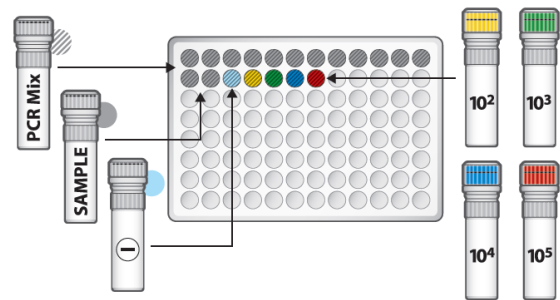
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw EBV - Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes or the Positive Control tube
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 μ L of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 μ L of extracted DNA in sample wells, 20 μ L of molecular grade water in Negative Control well, and 20 μ L of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, 20 μ L of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background Fluorescence Level FAM	EBV FAM	Background Fluorescence Level VIC	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Whole Blood	from cycle 2 to cycle 6	0.80	from cycle 6 to cycle 10	1.5
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	from cycle 2 to cycle 6	0.55	from cycle 6 to cycle 10	1.2

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct \leq 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ copies/mL.

