



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

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11  
E. mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
WEB site: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## NOTICE of CHANGE dated 29/09/2022

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

# «HSV1 ELITe MGB<sup>®</sup> Kit» Ref. RTS031PLD

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

- *Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius<sup>®</sup>» instrument (REF INT040).*
- *Confirmed LoD and ULoQ/LLoQ value calculated on CSF matrix*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

## PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



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



**HSV1 ELITE MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS031PLD

**TESTPRINZIPIEN**

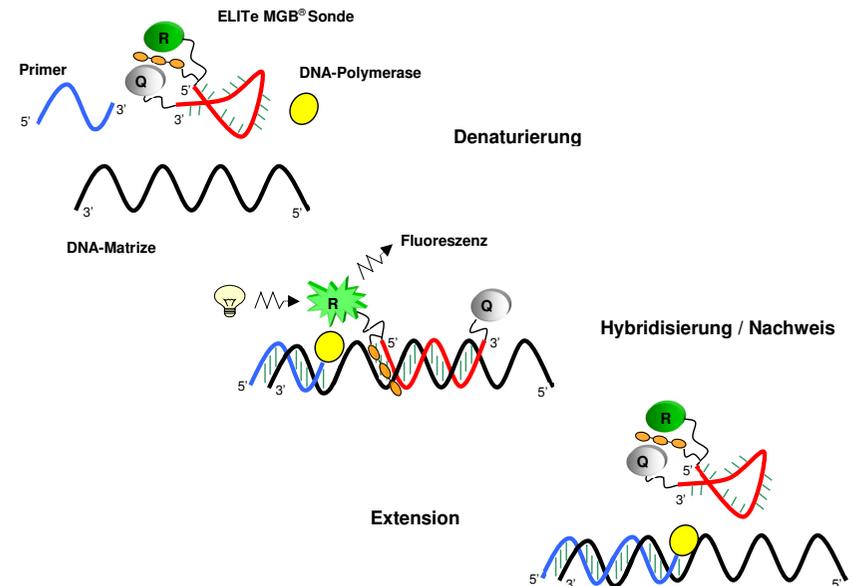
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis (Thermocycler für die Echtzeit-Amplifikation) ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion für eine Region des **Glykoproteins D (gpD)** von HSV1 und eine spezifische Reaktion für eine Region des **humanen beta-Globin-Gens** (Internal Control der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, HSV1-spezifische Sonde mit ELITE MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der HSV1-Amplifikationsreaktion hybridisiert. Die mit einem AP525-Fluorophor (analog zu VIC) markierte, für die Internal Control spezifische Sonde mit ELITE MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der Amplifikationsreaktion für die Internal Control hybridisiert. Die Fluoreszenzemission erhöht sich mit Zunahme des spezifischen Produkts der Amplifikationsreaktion und wird vom Gerät gemessen und aufgezeichnet. Durch die Verarbeitung der Daten lassen sich das Vorhandensein und der Titer von HSV1-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.

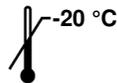
Der Test ist mit den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Systemen validiert.

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.



**HSV1 ELITE MGB® Kit**  
Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS031PLD



**INHALTSVERZEICHNIS**

|   |          |
|---|----------|
| VERWENDUNGSZWECK  | Seite 1  |
| TESTPRINZIPIEN  | Seite 2  |
| PRODUKTBESCHREIBUNG   | Seite 3  |
| IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN                 | Seite 3  |
| BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)             | Seite 3  |
| SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE   | Seite 3  |
| WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN                                | Seite 5  |
|   |          |
| ELITE INGENIUS®   | Seite 6  |
| PROBEN UND KONTROLLEN   | Seite 6  |
| VERFAHREN   | Seite 8  |
|   |          |
| ELITE BEGENIUS®   | Seite 15 |
| PROBEN UND KONTROLLEN   | Seite 15 |
| VERFAHREN   | Seite 17 |
| LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE InGenius® und ELITE BeGenius®           | Seite 22 |
|   |          |
| ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System | Seite 31 |
| PROBEN UND KONTROLLEN   | Seite 31 |
| VERFAHREN   | Seite 33 |
| LEISTUNGSMERKMALE   | Seite 41 |
|   |          |
| Roche cobas z 480 analyzer  | Seite 47 |
| PROBEN UND KONTROLLEN   | Seite 47 |
| VERFAHREN   | Seite 48 |
| LEISTUNGSMERKMALE   | Seite 53 |
|   |          |
| QUELLENANGABEN  | Seite 55 |
| GRENZEN DES VERFAHRENS  | Seite 55 |
| FEHLERBEHEBUNG  | Seite 56 |
| SYMBOLS   | Seite 59 |
| HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ                        | Seite 60 |

**VERWENDUNGSZWECK**

Das Produkt «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» ist ein qualitativer und quantitativer Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Herpes-simplex-Virus (HSV1)** in DNA-Proben, die aus Liquor, in EDTA entnommenem Vollblut und in EDTA entnommenem Plasma extrahiert wurden.

Das Produkt ist zur Verwendung bei der Diagnose und Überwachung von HSV1-Infektionen, sowie für klinische Daten des Patienten und weitere Laborbefunden bestimmt.

**PRODUKTBESCHREIBUNG**

Das Produkt «**HSV1 ELITe MGB® Kit**» enthält das **gebrauchsfertige** Komplettgemisch HSV1 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 «**ELITe InGenius®**» und «**ELITe BeGenius®**» und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die Primer und die HSV1-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine Region des **gD** von HSV1 (Region US6).

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

Das Reaktionsgemisch enthält Puffer, Magnesiumchlorid, Triphosphatnukleotide, AP593-Fluorophor (anstelle von ROX oder CY5 verwendet) als Passivreferenz für die Fluoreszenz-Normalisierung, 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 |
|------------------|-----------------------------|------------|----------------|
| HSV1 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 der generischen Produkte «**EXTRAgen**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. EXTG01), ein Kit zur Extraktion von DNA aus nicht-zellulären Proben, und «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. EXTB01), ein Kit zur Extraktion von DNA aus zellulären und nicht-zellulären Proben, validiert.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät «**ELITe InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) werden die folgenden generischen Produkte benötigt: die Extraktionskartuschen «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200), 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 «**HSV1 ELITe STD**»,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation «**HSV1 ELITe\_PC**»,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation «**HSV1 ELITe\_NC**»,
- für die Probenanalyse «**HSV1 ELITe\_WB\_200\_100**», «**HSV1 ELITe\_PL\_200\_100**» und «**HSV1 ELITe\_CSF\_200\_100**».

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

Für die automatische DNA-Extraktion, 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 «**HSV1 ELITe\_Be\_STD**»,
- für die Positivkontrolle der Amplifikation «**HSV1 ELITe\_Be\_PC**»,
- für die Negativkontrolle der Amplifikation «**HSV1 ELITe\_Be\_NC**»,
- für die Probenanalyse «**HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100**», «**HSV1 ELITe\_Be\_PL\_200\_100**» und «**HSV1 ELITe\_Be\_CSF\_200\_100**».

Für die automatische DNA-Extraktion aus zu analysierenden Proben ist die Verwendung des generischen Produkts «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT011EX), ein Kit zur Extraktion von 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 DNA und RNA aus nicht zellulären und zellulären Proben, mit dem Gerät «**ELITe GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT020) validiert.

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

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

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

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS031PLD

Beim Einsatz eines 7300 Real-Time-PCR-Systems muss das folgende generische Produkt verwendet werden: «**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate**» (Life Technologies, Art.-Nr. N8010560), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument muss das folgende generische Produkt verwendet werden:

«**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, Art.-Nr. 4346906), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation.

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

Wird ein Nachweis von HSV1-DNA für die qualitative Analyse benötigt, verwenden Sie das Produkt «**HSV1 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR031PLD) oder das Produkt «**HSV1 - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR031PLD-R), Positivkontrolle von Plasmid-DNA.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von HSV1-DNA für die quantitative Analyse benötigt, verwenden Sie das Produkt «**HSV1 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD031PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve.

**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 der Durchführung des Assays alle mit dem Produkt bereitgestellten Anweisungen aufmerksam lesen.

Während der Durchführung des Assays alle mit dem Produkt bereitgestellten Anweisungen befolgen.

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

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

Reagenzien von anderen Chargen dürfen nicht verwendet werden.

Reagenzien von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden.

**Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für molekularbiologische Anwendungen**

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

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,

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS031PLD

Schutzhandschuhe oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation/den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

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

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

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

**Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

Der **HSV1 Q - PCR Mix** muss bei -20 °C dunkel aufbewahrt werden.

Der **HSV1 Q - PCR Mix** darf maximal **fünf Mal** eingefroren und wieder aufgetaut werden; weitere Gefrier- und Auftauzyklen können zu einem Verlust der Produktleistung führen.

Der **HSV1 Q - PCR Mix** kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden (Laufmodus „Extraction + PCR“ (Extraktion + PCR)) im gekühlten Block des Geräts verbleiben.

**ELITe InGenius****PROBEN UND KONTROLLEN****Proben**

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

**In EDTA entnommenes Vollblut**

Die Vollblutproben für die 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** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV1 ELITe WB\_200\_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt den **CPE** bei 10 µl / Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärrohrröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

**In EDTA entnommenes Plasma**

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

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

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV1 ELITe\_PL\_200\_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die CPE Internal Control bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

**Liquor**

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

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software** Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV1 ELITe\_CSF\_200\_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die CPE Internal Control bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

**Andere Proben:**

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

**Störende Substanzen**

Die Probe darf kein Heparin enthalten, um das Problem einer Inhibition und die Möglichkeit häufiger ungültiger Ergebnisse zu verhindern.

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

**Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen**

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

- als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **HSV1 ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe STD**» zu verwenden,
- als Amplifikations-Positive Control ist **HSV1 - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe PC**» zu verwenden,
- als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe NC**» zu verwenden.

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

Genehmigte und in der Datenbank gespeicherte Kalibrationskurven laufen nach **60 Tagen** ab. Am Ablaufdatum müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden. Die genehmigten und in der Datenbank gespeicherten Ergebnisse der Amplifikationskontrolle laufen nach **15 Tagen** ab. Am Ablaufdatum müssen die Positive Control und Negative Control zusammen mit der Amplifikationsreagenzcharge erneut verarbeitet werden.

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

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

**Qualitätskontrollen**

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

**VERFAHREN**

Das beim Gebrauch des «**HSV1 - ELITe MGB Kit**» mit dem System **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

- Prüfung der Systembereitschaft,
- Einrichtung des Laufs,
- Überprüfung und Export der Ergebnisse.

**Prüfung der Systembereitschaft**

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

- **ELITe InGenius®** einschalten und den Anmeldemodus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.

- Prüfen, ob die Kalibratoren (**HSV1 Q - PCR Standard**) zusammen mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden: Liegen keine genehmigten oder gültigen Kalibratoren vor, sind diese wie in den folgenden Abschnitten beschrieben auszuführen.

- Prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**HSV1 - Positive Control, HSV1 Negative Control**) zusammen mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Control“ (Kontrolle) überprüft werden. Liegen keine genehmigten oder gültigen Amplifikationskontrollen vor, sind diese wie in den folgenden Abschnitten beschrieben auszuführen.

- 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** und dem Gerät **ELITe InGenius** sowie den genannten Matrices validiert.

Die für das «**HSV1 ELITe MGB® Kit**» verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

| Assay-Protokolle für HSV1 ELITe MGB Kit und ELITe InGenius |          |            |  |
|--|----------|------------|--|
| Name   | Matrix   | Maßeinheit | Eigenschaften  |
| HSV1 ELITe_WB_200_100                                      | Vollblut | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Sonifikation: KEINE<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl |
| HSV1 ELITe_PL_200_100                                      | Plasma   | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Sonifikation: KEINE<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl |
| HSV1 ELITe_CSF_200_100                                     | Liquor   | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Sonifikation: KEINE<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>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 Produkt **HSV1 ELITE MGB Kit** kann mit dem System **ELITE InGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

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

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

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

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der drei Durchlauftypen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### A. Integrierter Lauf

Zur Einrichtung eines integrierten Laufs mit Probenextraktion und -amplifikation führen Sie die folgenden Schritte durch, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben:

- HSV1 Q - PCR Mix**-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

**Hinweis:** **HSV1 Q - PCR Mix** im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Die CPE-Röhrchen für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 200 µl und das „Extracted Elute Volume“ (extrahierte Elutionsvolumen) 100 µl betragen.
- Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HSV1 ELITE\_PL\_200\_100).
- Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
- Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
  - wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen.
  - wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) auswählen.Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- CPE und HSV1 Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen und die Chargennummer und das Verfallsdatum von HSV1 Q - PCR Mix und CPE eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“), die Extraktionskartuschen „ELITE InGenius SP 200“, alle benötigten Verbrauchsmaterialien und die zu extrahierenden Proben 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 das System **ELITE InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

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

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

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

#### B. Amplifikationslauf

Zum Einrichten des Amplifikationslaufs ab der extrahierten DNA die folgenden Schritte ausführen, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben:

- Eine ausreichende Anzahl **HSV1 Q - PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

**Hinweis:** **HSV1 Q - PCR Mix** im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen 100 µl beträgt.
- Für jede relevante Spur die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HSV1 ELITE\_PL\_200\_100).
- In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
- Sicherstellen, dass die Ladeposition der Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „Elution Tube (bottom row)“ (Elutionsröhr. (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- HSV1 Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen und die Chargennummer und das Verfallsdatum von HSV1 Q - PCR Mix eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“ (Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) und die extrahierte Nukleinsäure-Proben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

### C. Kalibrationslauf

Zum Einrichten des Kalibrationslaufs für Q-PCR-Standards führen Sie die folgenden Schritte durch, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben:

1. **HSV1 Q - PCR Mix**-Röhrchen in ausreichender Anzahl für den Lauf 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

**Hinweis:** HSV1 Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. **HSV1 Q - PCR Standard**-Röhrchen auftauen (Cal1: HSV1 Q - PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HSV1 Q - PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal3: HSV1 Q - PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HSV1 Q - PCR Standards 10<sup>5</sup>) 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen 100 µl beträgt.
5. In der relevanten Spur das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen.
6. Das Assay-Protokoll „HSV1 ELITe STD“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für den HSV1 Q-PCR Standard eintragen.
7. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. HSV1 Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen und die Chargennummer und das Verfallsdatum von HSV1 Q - PCR Mix eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. Die Spitzenständer in den unter „Inventory Area“(Bestandsbereich) ausgewählten Bestandsbereich laden und kontrollieren; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“), die **HSV1 Q-PCR Standard**-Röhrchen 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 das System ELITe InGenius® es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

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

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

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

### D. Amplifikationslauf für Positive Control und Negative Control

Zur Einrichtung des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control führen Sie die folgenden Schritte durch, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben:

1. Eine ausreichende Anzahl **HSV1 Q - PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Reagenzverbrauchsbedingungen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

**Hinweis:** HSV1 Q - PCR Mix im Dunkeln auftauen, da dieses Reagenz lichtempfindlich ist.

2. **HSV1 - Positive Control**-Röhrchen für die Amplifikation der Positive Control 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 50 µl beträgt.
6. In den relevanten Spur das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen.
7. Für die Positive Control das Assay-Protokoll „HSV1 ELITe\_PC“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für die HSV1 Positive Control eintragen.
8. Für die Negative Control das Assay-Protokoll „HSV1 ELITe\_NC“ auswählen und die Chargennummer und das Ablaufdatum für das hochreine Wasser für die Molekularbiologie eintragen.
9. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. HSV1 Q-PCR Mix auf den unter „Inventory Block“ (Bestandsblock) ausgewählten Bestandsblock laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen und die Chargennummer und das Verfallsdatum von HSV1 Q - PCR Mix eintragen. Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
11. 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.
12. Die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“), das HSV1 Positive Control-Röhrchen und das Negative Control-Röhrchen gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. 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 das System **ELITe InGenius** es dem Benutzer, die Ergebnisse anzuzeigen, zu genehmigen und zu speichern und den Bericht auszudrucken und zu speichern.

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

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

**Hinweis:** Am Ende des Laufs müssen die PCR-Kassetten mit den Reaktionsprodukten und anderen Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät entfernt und ohne Kontamination der Umwelt entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

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

**Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse**

Am Ende des Laufs wird der Bildschirm „Results Display“ (Ergebnisanzeige) automatisch angezeigt. Auf diesem Bildschirm werden die Proben-/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. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

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

**ELITe InGenius** generiert die Ergebnisse mithilfe des Produkts «**HSV1 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 HSV1-Sonde („HSV1“) in den Kalibrator-Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay-Protokoll „HSV1 ELITe\_STD“ enthaltenen Parametern interpretiert.

Die für die Amplifikationsreagenzcharge spezifische Kalibrationskurve wird in der Datenbank („Calibration“) gespeichert. Sie kann von Mitarbeitern mit der Qualifikation „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

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

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

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

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

Die von der spezifischen HSV1-Sonde („HSV1“) und der spezifischen Sonde für die Internal Control („IC“) in der Amplifikationsreaktion der Positive Control und Negative Control ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den in den Assay-Protokollen „HSV1 ELITe\_PC“ und „HSV1 ELITe\_NC“ enthaltenen Parametern interpretiert.

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

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

Vor der Analyse von Proben ist es unbedingt erforderlich zu prüfen, ob die Amplifikation der Positive Control und Negative Control mit der zu verwendenden Amplifikationsreagenzcharge durchgeführt wurde und genehmigte und gültige Ergebnisse vorliegen. Die Verfügbarkeit der Ergebnisse der Amplifikation der Positive Control und Negative Control mit dem Status „Approved“ (Genehmigt) wird im Fenster „Controls“ (Kontrollen) auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt. Fehlen die Ergebnisse des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

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

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

**Hinweis:** Wird die Positive Control bzw. Negative Control zusammen mit zu testenden Proben ausgeführt und ist ihr Ergebnis ungültig, so können die Proben genehmigt werden, die Ergebnisse werden jedoch nicht validiert. In diesem Fall muss die Amplifikation aller Proben ebenfalls wiederholt werden.

**C. Validierung der Probenergebnisse**

Die von der spezifischen HSV1-Sonde (Kanal „HSV1“) und der spezifischen Sonde für die Internal Control (Kanal „IC“) in der jeweiligen Proben-Amplifikationsreaktion ausgesendeten Fluoreszenzsignale werden automatisch analysiert und von der Gerätesoftware mit den im Assay-Protokoll enthaltenen Parametern interpretiert.

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               |
|-------------------------|----------------------|
| HSV1 Q - PCR Standard   | APPROVED (Genehmigt) |
| 2) Positive Control     | Status               |
| HSV1 - Positive Control | APPROVED (Genehmigt) |
| 3) Negative Control     | Status               |
| HSV1 - Negative Control | APPROVED (Genehmigt) |

Die **ELITe InGenius Software** berechnet die Viruslast für jede Probe automatisch gemäß dem Algorithmus der Software und den Parametern des Assay-Protokolls.

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

| Ergebnis des Probenlaufs   | Interpretation   |
|--|--|
| HSV1: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge gleich XXX Kopien/ml)    | <b>HSV1-DNA erkannt</b> innerhalb des Messbereichs des Tests, Menge wie angezeigt.   |
| HSV1: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge unter LLoQ Kopien/ml)      | <b>HSV1-DNA erkannt</b> unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Tests  |
| HSV1: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL (HSV1: DNA erkannt, Menge über ULoQ Kopien/ml)      | <b>HSV1-DNA erkannt</b> oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Tests  |
| HSV1: DNA Not Detected or below LoD copies / mL (HSV1: DNA nicht erkannt oder Menge unter LoD Kopien/ml) | <b>HSV1-DNA nicht erkannt oder unterhalb der Nachweisgrenze</b> des Tests.   |
| Invalid - Retest Sample (Ungültig - Probe erneut testen)   | <b>Ungültiges Testergebnis</b> aufgrund von fehlerhafter Internal Control (falsche Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren). |

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

Wenn das Eluatvolumen ausreicht, kann die extrahierte Probe verdünnt oder unverdünnt 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.

Als „HSV1: DNA Not Detected or below LoD“ (HSV1: DNA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, es war jedoch nicht möglich, HSV1-DNA nachzuweisen. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass die HSV1-DNA bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden ist (siehe „Leistungsmerkmale“).

HSV1-positive Proben, bei denen der Test eine Konzentration unter der Nachweisgrenze erkennt, werden als „HSV1: DNA Detected, quantity below LLoQ“ (HSV1: RNA erkannt, Menge unter LLoQ) ausgegeben (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“ (Spurbericht) exportiert werden.

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

Der „Track Report“ zeigt die Details eines Probenlaufs nach ausgewählter Spur an.

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

## ELITe BeGenius

## PROBEN UND KONTROLLEN

### Proben

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

#### In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem **ELITe BeGenius** und mit der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV1 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 sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

#### In EDTA entnommenes Plasma

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

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

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus 200 µl Plasma mit dem **ELITe BeGenius** und mit der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll

**HSV1 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 sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

### Liquor

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

**Hinweis:** Wird die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **HSV1 ELITe\_Be\_CSF\_200\_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

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

### Andere Proben:

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

### Störende Substanzen

Die Probe darf kein Heparin enthalten, um das Problem einer Inhibition und die Möglichkeit häufiger ungültiger Ergebnisse zu verhindern.

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

### Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

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

- als Kalibratorset sind die vier Konzentrationswerte des **HSV1 ELITe Standard** zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe\_Be\_STD**» zu verwenden,
- als Amplifikations-Positive Control ist **HSV1 - ELITe Positive Control** zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe\_Be\_PC**» zu verwenden,
- als Amplifikations-Negative Control ist hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht in diesem Kit enthalten) zusammen mit dem Protokoll «**HSV1 ELITe\_Be\_NC**» zu verwenden.

**Hinweis:** **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 **ELITe BeGenius**-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**

Das beim Gebrauch des «**HSV1 ELITe MGB Kit**» mit dem System **ELITe BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

**Prüfung der Systembereitschaft**

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

- **ELITe BeGenius®** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen.
- Prüfen, ob die Kalibratoren (**HSV1 Q-PCR Standard**) ausgeführt und genehmigt wurden und noch nicht abgelaufen sind (Status). Dies kann auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) überprüft werden;
- Prüfen, ob die Amplifikationskontrollen (**HSV1 - Positive Control, HSV1 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 «**HSV1 ELITe MGB® Kit**» verfügbaren Assay-Protokolle sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

| Assay-Protokolle für « <b>HSV1 ELITe MGB Kit</b> » und <b>ELITe BeGenius</b> |          |            |   |
|--|----------|------------|---|
| Name   | Matrix   | Maßeinheit | Eigenschaften   |
| <b>HSV1 ELITe_Be_WB_200_100</b>  | Vollblut | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl |
| <b>HSV1 ELITe_Be_PL_200_100</b>  | Plasma   | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl |
| <b>HSV1 ELITe_Be_CSF_200_100</b>   | Liquor   | Kopien/ml  | Extraktionseingangsvolumen: 200 µl<br>Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl<br>Internal Control: 10 µl<br>Verdünnungsfaktor: 1<br>Volumen PCR-Mix: 20 µl<br>Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl |

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

**Einrichtung des Laufs**

Das **HSV1 ELITe MGB Kit** kann zusammen mit **ELITe BeGenius** zur Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

- A. Probenlauf (Extraktion + PCR),
- B. Amplifikationslauf (nur PCR)
- C. Kalibrationslauf (nur PCR),
- D. Lauf für Positive und Negative Control (nur PCR).

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

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

Die 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:

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrrchen HSV1 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. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl CPE-Röhrrchen auftauen. Jedes neue Röhrrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Die Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
5. Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
6. Die Proben in die Racks 5 und 4 laden (immer mit Rack 5 beginnen).
7. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

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

8. Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und extrahiertes Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
9. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Schritt 7 bis 9 ggf. für Rack 4 wiederholen.
11. Die Elutionsröhrrchen in die Racks 3 und 2 laden (immer mit Rack 3 beginnen).

**Hinweis:** Elutionsröhrrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit etikettiert werden.

12. Das Rack in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
13. Schritt 12 ggf. für Rack 2 wiederholen.
14. CPE und HSV1 Q-PCR Mix in Rack 1 laden.
15. Das Rack 1 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
16. 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.
17. Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
18. Den Korb mit den Extraktionskartuschen „ELITe InGenius SP 200“ und den für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
19. Die Gerätetür schließen.
20. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

## B. Amplifikationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV1 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. 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.
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 Proben in die Racks 3 und 2 laden (immer mit Rack 3 beginnen).
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 in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. Schritt 7 bis 9 für Rack 2 wiederholen.
11. CPE und HSV1 Q-PCR Mix in Rack 1 laden.
12. Das Rack 1 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. Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
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 extrahierte Probe aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen, gekennzeichnet und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der extrahierten Probe vermeiden.

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

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

## C. Kalibrationslauf

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV1 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 HSV1 Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal3: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>). 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 die Racks 3 laden.
7. Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. HSV1 ELITe\_Be\_STD). Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. HSV1 Q-PCR Mix in Rack 2 laden.
9. Das Rack 2 in die „Kühleinheit“ einsetzen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. 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.
11. Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

**D. Lauf für die Positive Control und Negative Control**

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

1. Für den Lauf eine ausreichende Anzahl Röhrchen HSV1 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. Das Produkt HSV1 - ELITe Positive Control für die Amplifikation der Positive Control auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Für die Läufe mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (wie Negative Control) in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des ELITe InGenius SP Consumable Set enthalten) überführen.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Die Racks 1, 2 und 3 aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
6. Den Laufmodus wählen: „PCR Only“ (Nur PCR).
7. Die Röhrchen für die Positive und Negative Control in die Racks 3 laden.
8. Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (HSV1 ELITe\_Be\_PC und HSV1 ELITe\_Be\_NC). Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. HSV1 Q-PCR Mix in Rack 2 laden.
10. Das Rack 2 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. Den Korb mit der PCR-Kassette in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
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 Positive Control aus dem Gerät herausgenommen, verschlossen und bei -20 °C gelagert werden. Ein Verschütten der Positive Control vermeiden.

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

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

**Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse**

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

ELITe BeGenius generiert Ergebnisse mithilfe des HSV1 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.

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

**LEISTUNGSMERKMALE**  
**ELITe InGenius® und ELITe BeGenius®**

**Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze**

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

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/20 µl in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng/20 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 24 Wiederholungen (Modus „PCR only“ (nur PCR)) getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. auf zwei verschiedenen Geräten durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Probe  | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
|--|--------|--------|---------|---------|
| 10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA | 24     | 24     | 24      | 0       |

Die Nachweisgrenze (LoD) des HSV1 ELITe MGB Kit wurde in Kombination mit in EDTA entnommenen **Vollblutproben**, in EDTA entnommenen **Plasmaproben** sowie **Liquorproben** und den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** verifiziert (Modus „Extr + PCR“ (Extraktion + PCR)).

**Bei Vollblut:**

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 211 Kopien/ml dotierten Vollblutproben auf den Systemen ELITe InGenius® und ELITe BeGenius® im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit der hitzeinaktivierten Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), ZeptoMetrix, als Referenzmaterial dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten gemäß CLSI EP17-A-Richtlinie ein positives Ergebnis haben.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

| Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe InGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| In EDTA entnommenes Vollblut                         | 211 Kopien/ml | 20     | 20     | 19      | 1       |

| Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe BeGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| In EDTA entnommenes Vollblut                         | 211 Kopien/ml | 20     | 20     | 20      | 0       |

Der LoD-Wert der HSV1-Zielssequenz wurde für in EDTA entnommenes Vollblut bei 211 Kopien/ml bestätigt.

**Bei Plasma:**

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 250 Kopien/ml dotierten Plasmaproben auf den Systemen ELITe InGenius und ELITe BeGenius im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit der hitzeinaktivierten Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), ZeptoMetrix, als Referenzmaterial dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten gemäß CLSI EP17-A-Richtlinie ein positives Ergebnis haben.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

| Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe InGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| In EDTA entnommenes Plasma                         | 250 Kopien/ml | 20     | 20     | 20      | 0       |

| Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITE BeGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| In EDTA entnommenes Plasma                         | 250 Kopien/ml | 20     | 20     | 20      | 0       |

Der LoD-Wert der HSV1-Zielsequenz wurde für in EDTA entnommenes Plasma bei 250 Kopien/ml bestätigt.

**Bei Liquor:**

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 250 Kopien/ml dotierten Liquorproben auf den Systemen ELITE InGenius und ELITE BeGenius im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben waren mit der hitzeinaktivierten Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), ZeptoMetrix, als Referenzmaterial dotiert.

Die LoD wird bestätigt, wenn mindestens 18 von 20 Replikaten gemäß CLSI EP17-A-Richtlinie ein positives Ergebnis haben.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

| Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITE InGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| Liquor   | 250 Kopien/ml | 20     | 20     | 20      | 0       |

| Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITE BeGenius |               |        |        |         |         |
|--|---------------|--------|--------|---------|---------|
| Probe  | LoD           | Anzahl | Gültig | Positiv | Negativ |
| Liquor   | 250 Kopien/ml | 20     | 20     | 20      | 0       |

Der LoD-Wert der HSV1-Zielsequenz wurde für Liquor bei 250 Kopien/ml bestätigt.

**Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen**

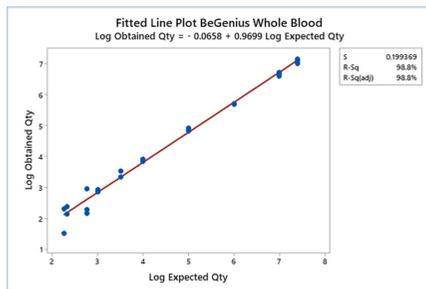
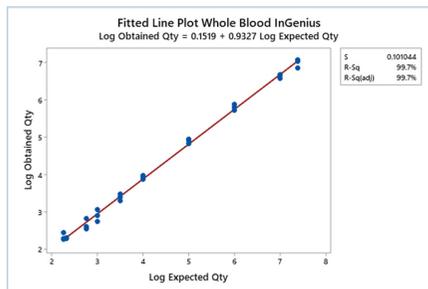
Der lineare Messbereich des HSV1 ELITE MGB® Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem **Vollblut**, in EDTA entnommenem **Plasma** und **Liquor** sowie **ELITE InGenius** und **EELITE BeGenius** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV1-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der hitzeinaktivierten Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) (ZeptoMetrix) in HSV1 DNA-negativen Matrices vorbereitet.

**Bei Vollblut:**

Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von zirka  $2,5 \times 10^7$  Kopien/ml bis zirka 178 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Vollblutproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,997 bei **ELITE InGenius** und 0,988 bei **ELITE BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOq) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,253 log Kopien/ml bei **ELITE InGenius** und 0,305 log Kopien/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,133 log Kopien/ml bei **ELITE InGenius** und 0,491 log Kopien/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 211 Kopien/ml.

Die obere Nachweisgrenze (ULOq) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,117 log Kopien/ml bei **ELITE InGenius** und 0,068 log Kopien/ml bei **ELITE BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,393 log Kopien/ml bei **ELITE InGenius** und

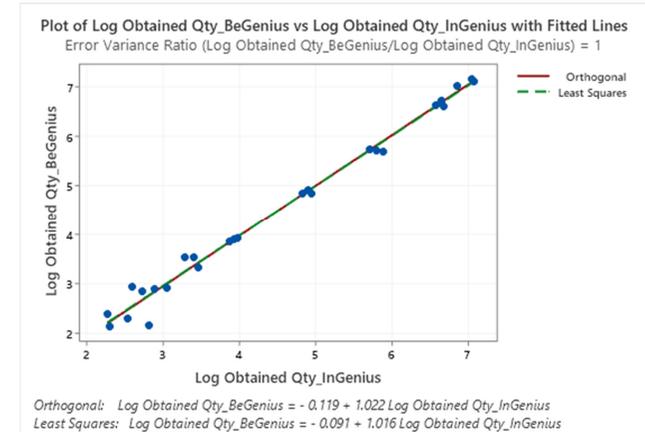
0,297 log Kopien/ml bei **ELITE BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Linearer Messbereich für Vollblutproben und ELITE InGenius und ELITE BeGenius |               |                   |
|---|---------------|-------------------|
| Maßeinheit  | Untere Grenze | Obere Grenze      |
| <b>Kopien/ml</b>  | <b>211</b>    | <b>25.000.000</b> |

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



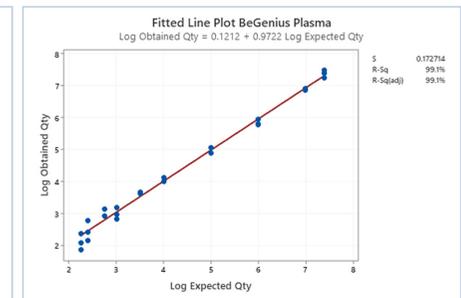
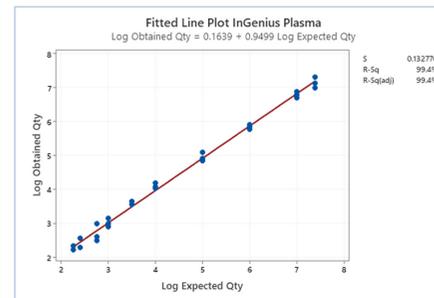
In diesem Test ergab die orthogonale Regressionsanalyse eine Steigung von 1,022 (95%-KI: 0,977; 1,067) und einen Achsenabschnitt von -0,119 (95%-KI: -0,333; 0,094). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,988.

**Bei Plasma:**

Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von zirka  $2,5 \times 10^7$  Kopien/ml bis zirka 178 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Vollblutproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,994 bei **ELITE InGenius** und 0,991 bei **ELITE BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.



**HSV1 ELITe MGB® Kit**  
**Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit**

**REF** RTS031PLD

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,192 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,270 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,197 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,163 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 250 Kopien/ml.

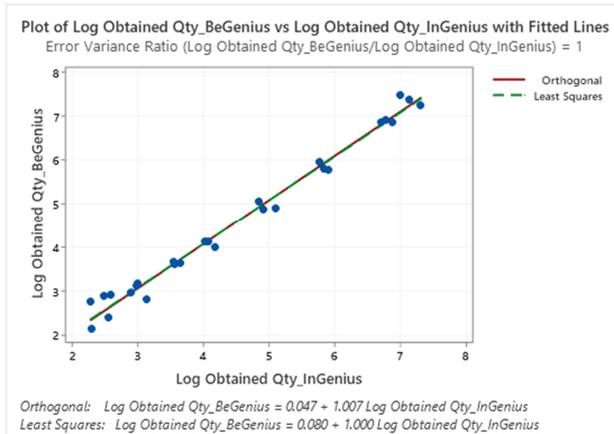
Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,117 log Kopie/ml bei **ELITe InGenius** und 0,068 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,393 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,297 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius |               |                   |
|---|---------------|-------------------|
| Maßeinheit  | Untere Grenze | Obere Grenze      |
| <b>Kopien/ml</b>  | <b>250</b>    | <b>25.000.000</b> |

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



In diesem Test ergab die orthogonale Regressionsanalyse eine Steigung von 1,007 (95%-KI: 0,960; 1,054) und einen Achsenabschnitt von 0,047 (95%-KI: -0,180; 0,274). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,986.

**Bei Liquor:**

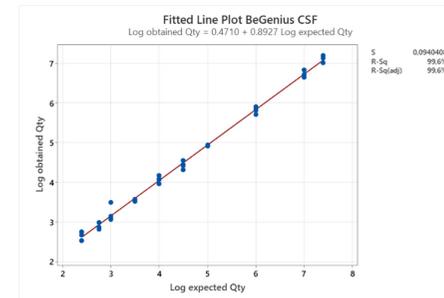
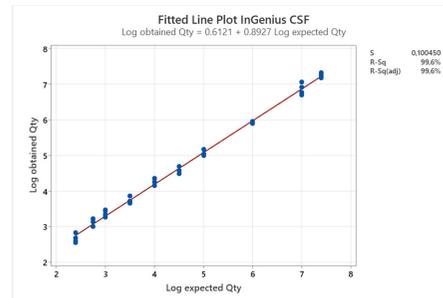
Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von zirka  $2,5 \times 10^7$  Kopien/ml bis zirka 250 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 4 Wiederholungen getestet.

Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Liquorproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,996 bei **ELITe InGenius** und 0,996 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**  
**Reagenz für die DNA-Amplifikation in Echtzeit**

**REF** RTS031PLD



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,1209 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0941 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,2680 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2527 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 250 Kopien/ml.

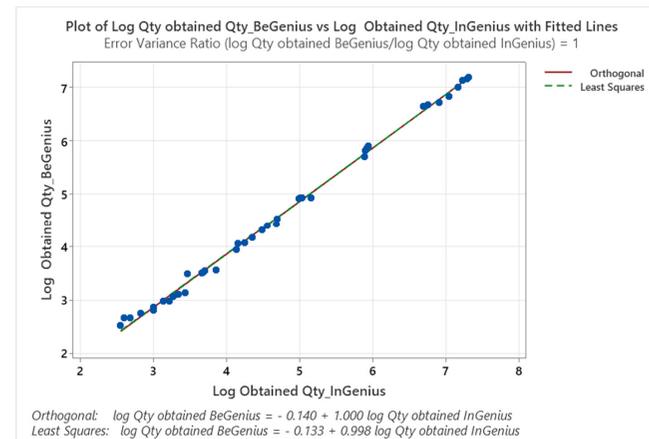
Die obere Nachweisgrenze (ULoQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0661 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0811 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,1434 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2804 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Linearer Messbereich für Liquorproben und ELITe InGenius® und ELITe BeGenius® |               |                   |
|---|---------------|-------------------|
| Maßeinheit  | Untere Grenze | Obere Grenze      |
| <b>Kopien/ml</b>  | <b>250</b>    | <b>25.000.000</b> |

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



In diesem Test ergab die orthogonale Regressionsanalyse eine Steigung von 1,000 (95%-KI: 0,982; 1,016) und einen Achsenabschnitt von 0,140 (95%-KI: -0,223; 0,056). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,997.

**Wiederholpräzision**

Die Wiederholpräzision der mit dem Produkt HSV1 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 633 Kopien/ml) und von 10 x LoD (zirka 2110 Kopien/ml) mit zertifiziertem HSV1-Referenzmaterial (hitzeinaktivierte Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV1)) 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 |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 23,59             | 0,41 | 1,72 |
| 3 x LoD  | 8/8             | 36,31             | 0,51 | 1,40 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 8/8             | 34,25             | 0,42 | 1,22 |                  |                   |      |      |

| Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe InGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/16            | -                 | -    | -    | 48/48            | 23,64             | 0,55 | 2,31 |
| 3 x LoD  | 16/16           | 36,15             | 0,52 | 1,44 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 16/16           | 34,24             | 0,42 | 1,21 |                  |                   |      |      |

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITe InGenius** erkannte der Assay die HSV1-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV1 und bei der Internal Control aus.

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

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

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

| Wiederholpräzision innerhalb des Laufs, ELITe BeGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 26,87             | 0,59 | 2,19 |
| 3 x LoD  | 8/8             | 37,82             | 0,65 | 1,73 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 8/8             | 35,82             | 0,47 | 1,32 |                  |                   |      |      |

| Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe BeGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/16            | -                 | -    | -    | 48/48            | 27,04             | 0,57 | 2,12 |
| 3 x LoD  | 16/16           | 37,53             | 0,64 | 1,71 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 16/16           | 35,55             | 0,53 | 1,50 |                  |                   |      |      |

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITe BeGenius** erkannte der Assay die HSV1-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV1 und bei der Internal Control aus.

**Vergleichspräzision**

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt HSV1 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 633 Kopien/ml) und von 10 x LoD (zirka 2110 Kopien/ml) mit zertifiziertem HSV1-Referenzmaterial (hitzeinaktivierte Kulturflüssigkeit des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV1)) 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   | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|   | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ   | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 23,55             | 0,57 | 2,40 |
| 3 x LoD   | 8/8             | 36,91             | 0,77 | 2,10 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD  | 8/8             | 35,15             | 0,48 | 1,37 |                  |                   |      |      |

| Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITe InGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 23,09             | 0,63 | 2,73 |
| 3 x LoD  | 8/8             | 36,99             | 0,61 | 1,64 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 8/8             | 34,71             | 0,53 | 1,51 |                  |                   |      |      |

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITe InGenius** erkannte der Assay die HSV1-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV1 und bei der Internal Control aus.

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

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

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

| Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITe BeGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|---|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe   | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|   | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ   | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 26,84             | 0,76 | 2,81 |
| 3 x LoD   | 8/8             | 37,26             | 0,59 | 1,58 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD  | 8/8             | 36,12             | 0,79 | 2,18 |                  |                   |      |      |

| Chargenübergreifende Vergleichspräzision, ELITe BeGenius |                 |                   |      |      |                  |                   |      |      |
|--|-----------------|-------------------|------|------|------------------|-------------------|------|------|
| Probe  | HSV1            |                   |      |      | Internal Control |                   |      |      |
|  | Pos. / Wiederh. | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % | Pos. / Wiederh.  | Mittlerer Ct-Wert | SD   | VK % |
| Negativ  | 0/8             | -                 | -    | -    | 24/24            | 26,55             | 0,85 | 3,21 |
| 3 x LoD  | 8/8             | 37,96             | 1,08 | 2,83 |                  |                   |      |      |
| 10 x LoD   | 8/8             | 36,40             | 0,69 | 1,91 |                  |                   |      |      |

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITe BeGenius** erkannte der Assay die HSV1-Zielssequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei HSV1 und bei der Internal Control aus.

**Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial**

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe «HSV1 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 «**ELITe InGenius**» und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe InGenius» |                     |                                       |                          |   |
|---|---------------------|---------------------------------------|--------------------------|---|
| Probe   | Nenntiter Kopien/ml | Nenntiter log <sub>10</sub> Kopien/ml | Positiv / Wiederholungen | Mittlere Ergebnisse log <sub>10</sub> Kopien/ml |
| HSV1MQP01-High  | 10 <sup>5</sup>     | 5,000                                 | 2/2                      | 4,890   |
| HSV1MQP01-Medium  | 10 <sup>4</sup>     | 4,000                                 | 2/2                      | 3,859   |
| HSV1MQP01-Low   | 10 <sup>3</sup>     | 3,000                                 | 2/2                      | 2,736   |
| HSV1MQP01-Negative  | negativ             | -                                     | 0/2                      | -   |

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 Herpes-simplex-Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Schottland, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von HSV1-Verdünnungen, verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation, Detektion und Ergebnisinterpretation, mit «**ELITe InGenius**» und Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe InGenius» |  |                    |                          |   |
|---|--|--------------------|--------------------------|---|
| Probe   | Konsensus log <sub>10</sub> Viruskonz. | Standardabweichung | Positiv / Wiederholungen | Mittlere Ergebnisse log <sub>10</sub> Kopien/ml |
| HSVDNA14-01   | HSV1, 3,657                            | 0,563              | 2/2                      | 3,716   |
| HSVDNA14-02   | Negativ, n. z.                         | -                  | 0/2                      | nicht erkannt                                   |
| HSVDNA14-03   | HSV1, 3,001                            | 0,578              | 2/2                      | 2,520   |
| HSVDNA14-04   | HSV1, 2,256                            | 0,512              | 1/2                      | 0,940   |
| HSVDNA14-05   | HSV1, 4,070                            | 0,481              | 2/2                      | 3,774   |
| HSVDNA14-06   | HSV2, 3,033                            | 0,906              | 0/2                      | nicht erkannt                                   |
| HSVDNA14-07   | HSV2, 2,394                            | 0,618              | 0/2                      | nicht erkannt                                   |
| HSVDNA14-08   | HSV2, 3,504                            | 0,899              | 0/2                      | nicht erkannt                                   |
| HSVDNA14-09   | HSV1, 2,481                            | 0,477              | 2/2                      | 1,976   |
| HSVDNA14-10   | VZV, n. z.                             | -                  | 0/2                      | nicht erkannt                                   |

In Übereinstimmung mit den vom EQA-Konsensus definierten qualitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt. Die Probe HSVDNA14-04 ergab bei 2 Wiederholungen nur ein positives Ergebnis. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Proben-titer unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Alle über der Nachweisgrenze der Methode liegenden Proben wurden innerhalb des vom Konsensus der handelsüblichen Real-Time-PCR-Systeme definierten Bereichs ± 2 Standardabweichung definiert.

**Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben**

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

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet mithilfe von 50 in EDTA entnommenen, HSV1-DNA-negativen Vollblutproben, die mit HSV1-DNA durch Hinzufügen von HSV12-04, einer Probe aus dem „QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) (N=30) und durch Hinzufügen von „HSV1 ELITe-IQC High“ (ELITech Group S.p.A.) (N=20) auf einen Titer von 750 Kopien/ml dotiert waren, 30 in EDTA entnommenen, HSV1-DNA-negativen Plasmaproben, die mit HSV1-DNA durch Hinzufügen von „HSV1 ELITe-IQC High“ (ELITech Group S.p.A.) auf einen Titer von 750 Kopien/ml dotiert waren und 20 HSV1-DNA-negativen Liquorproben, die mit HSV1-DNA durch Hinzufügen von „HSV1 ELITe-IQC High“ (ELITech Group S.p.A.) auf einen Titer von 750 Kopien/ml dotiert waren.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Vollblut | 50     | 49      | 1       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Plasma   | 30     | 30      | 0       |
| Mit HSV1-DNA dotierter Liquor                    | 20     | 20      | 0       |

49 von 50 Vollblutproben wurden als positiv bestätigt. Eine Probe wurde negativ getestet. Dies kann durch eine Ungenauigkeit des Titers des zum Dotieren verwendeten kalibrierten Materials erklärt werden (HSV12-04 SD = 0, 517 log). In den dotierten Proben kann dies eine unter der Nachweisgrenze liegende Viruslast ergeben und die Proben können stochastisch negativ ausfallen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Vollblut betrug bei diesem Test 98 %.

Alle Plasma- und Liquorproben waren gültig und positiv.

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Plasma und Liquor betrug bei diesem Test 100 %.

**Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben**

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger HSV1-DNA-negativer klinischer, in EDTA entnommener Vollblut- und Plasmaproben sowie HSV1-DNA-negativer klinischer Liquorproben in Verbindung mit **ELITe InGenius** bewertet. Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufwies, ist anzunehmen, dass die in Verbindung mit **ELITe InGenius** erhaltenen Ergebnisse für die diagnostische Spezifität auch für **ELITe BeGenius** gelten.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 34 in EDTA entnommene Vollblutproben von gesunden, vermutlich HSV1-DNA-negativen Spendern, 38 in EDTA entnommene Plasmaproben von gesunden, vermutlich HSV1-DNA-negativen Spendern und 22 Liquorproben von gesunden, vermutlich HSV1-DNA-negativen Spendern bewertet.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Vollblut | 34     | 0       | 34      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Plasma   | 38     | 0       | 38      |
| HSV1-DNA-negativer Liquor                        | 22     | 0       | 22      |

Alle Vollblut-, Plasma- und Liquorproben waren gültig und negativ.  
Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

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

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

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

Liquor

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

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

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

**Hinweis:** Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Liquor mit dem Kit «**EXTRAgen**» durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **300 µl** Probe und fügen Sie zu Beginn der Extraktion **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzu. Lösen Sie das Pellet der extrahierten Nukleinsäuren in **60 µl** hochreinem Wasser auf.

**Hinweis:** Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Liquor mit «**ELITe STAR**» und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI\_E100S200\_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 Liquor mit «**ELITe GALAXY**» und der **Softwareversion 1.3.1** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **xNA Extraction (Universal)**, das 300 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 200 µl eluiert (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 Liquor mit dem Gerät «**NucliSENS® easyMAG®**» durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und die folgenden Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen und die Extraktion ausführen. Nach der 10-minütigen Inkubation **5 µl CPE** für die interne Kontrolle und anschließend das **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen und mit der Extraktion fortfahren. Die Nukleinsäuren in **100 µl** Elutionspuffer eluieren.

In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

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

**Hinweis:** Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit «**ELITe STAR**» und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI\_E100S200\_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 Kit «**EXTRABlood**» durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probenvolumen (nicht mehr als 2 Millionen Leukozyten) und eluieren Sie die DNA in **100 µl** Elutionspuffer.

In EDTA entnommenes Plasma

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

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

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

**Hinweis:** Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit «**ELITe STAR**» und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI\_E100S200\_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert. Proben in Primärröhrchen können direkt auf «**ELITe STAR**» geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 700 µl erforderlich. **200 µl CPE** in ein Proteinase-Carrier-Röhrchen geben, wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

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

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

**Hinweis:** Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät «**QIAasymphony® SP/AS**» und dem Kit «**QIAasymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» mit der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „**Virus Cell free 500\_V3\_DSP\_default IC**“ und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **500 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Die Lösung mit dem **AVE-Puffer** und dem RNA-Träger gemäß der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits ansetzen. Für jede angeforderte Probe **6 µl/Probe CPE** zur Lösung hinzufügen. Die Röhrchen mit der Lösung wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angegeben in das Fach „internal control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **85 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben in der Gebrauchsanweisung des Kits zu entnehmen.

Andere Proben:

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

**Störende Substanzen**

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

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

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

**Amplifikationskontrollen**

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

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

Für die Positivkontrolle das Produkt «**HSV1 - ELITe Positive Control**» oder das Produkt «**HSV1 ELITe Standard**» verwenden.

**VERFAHREN**

**Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs**

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

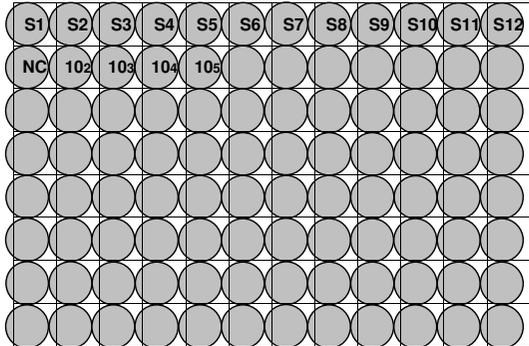
Bei Verwendung des Geräts **7300 Real-Time PCR System**.

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 HSV1-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „HSV1“ nennen.
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) „ROX“ (AP593 wird statt ROX verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

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

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



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

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

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

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

- die Zeitsteuerung wie in der 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<br>(45 Zyklen) | 94 °C                           | 10 s          |
|  | 60 °C<br>(Fluoreszenzerfassung) | 30 s          |
|  | 72 °C                           | 20 s          |
| Dissoziation<br>(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 HSV1-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „HSV1“ nennen.
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ähnelt VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen;
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „CY5“ (AP593 wird statt CY5 verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

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

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

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

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

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

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

| Temperaturzyklus                           |                           |               |
|--|---------------------------|---------------|
| Phase                                      | Temperaturen              | Zeitsteuerung |
| Dekontamination                            | 50 °C                     | 2 min         |
| Erste Denaturierung                        | 94 °C                     | 2 min         |
| Amplifikation und Detektion<br>(45 Zyklen) | 94 °C                     | 10 s          |
|  | 60 °C<br>(Datenerfassung) | 30 s          |
|  | 72 °C                     | 20 s          |
| Dissoziation<br>(optional)                 | 95 °C                     | 15 s          |
|  | 40 °C                     | 1 min         |
|  | 80 °C                     | 15 s          |
| Dissoziation<br>(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 Röhrrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrrchen auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Röhrrchen **HSV1 Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass jedes Röhrrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrrchen auf Eis lagern.
- die **HSV1 - ELITe Positive Control** oder die **HSV1 Q - PCR Standard**-Röhrrchen auftauen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrrchen 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 HSV1 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 anderen 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:

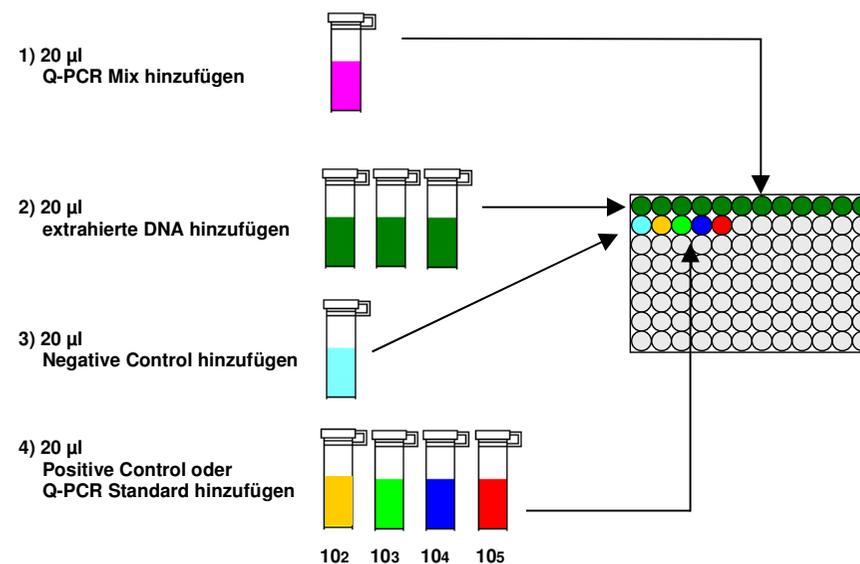
- Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von HSV1-DNA): **20 µl HSV1 - ELITe Positive Control** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **HSV1 - ELITe Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von HSV1-DNA): **20 µl HSV1 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 **HSV1 Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **HSV1 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-HSV1-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.



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

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

**Qualitative Analyse der Ergebnisse**

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen HSV1-Sonde (FAM-Detektor „HSV1“) 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 HSV1-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der HSV1-spezifischen Sonde bereits vor dem Zyklus 15 beginnen anzusteigen. In diesem Fall muss der Berechnungsbereich für die **Grundlinie** vom Zyklus 6 auf den von der Gerätesoftware („Results > Component“ (Ergebnisse > Komponente)) erkannten Zyklus, bei dem die FAM-Fluoreszenz der Probe anzusteigen beginnt, angepasst werden.

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

- manuell den **Schwellenwert** („Threshold“) für den FAM-Detektor „HSV1“ 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 „HSV1“ 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 HSV1 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Reaktion der Positive Control<br>FAM-Detektor „HSV1“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|--|---------------|-------------------------|
| Ct ≤ 25  | POSITIV       | KORREKT                 |

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei HSV1 **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 HSV1-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 HSV1 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Reaktion der Negativkontrolle<br>FAM-Detektor „HSV1“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|--|---------------|-------------------------|
| Ct Undetermined (Ct unbestimmt)                      | NEGATIV       | KORREKT                 |

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** bei HSV1 **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) ist, wurde die Ziel-DNA nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion jeder **Probe** dient der **Ct-Wert** von HSV1 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 gpD-Gens von HSV1 in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen, die 10 Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (Nachweisgrenze, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

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

| Probenreaktion                  |  | Eignung der Probe | Assayergebnis   | HSV1 DNA      |
|---------------------------------|--|-------------------|-----------------|---------------|
| FAM-Detektor „HSV1“             | 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 HSV1 und **Ct > 35** oder **Ct Undetermined** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass es nicht möglich war, die DNA für die Internal Control effizient nachzuweisen. In diesem Fall sind während des Amplifikationsschritts (ineffiziente oder nicht vorhandene Amplifikation) oder während des Extraktionsschritts (Verlust von DNA während der Extraktion oder Vorhandensein von Inhibitoren) Probleme aufgetreten, die zu falschen und falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist ungeeignet, der Assay ist ungültig und muss ab der Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei HSV1 und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass die HSV1-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der HSV1-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 HSV1-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 HSV1-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 HSV1 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<br>FAM-Detektor „HSV1“ | 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 HSV1-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 gpD-Gens von HSV1 in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

| Probenergebnis FAM-Detektor „HSV1“                | HSV1-Genomäquivalente pro Reaktion |
|---|------------------------------------|
| Menge > 1 x 10 <sup>6</sup>                       | MEHR ALS 1.000.000                 |
| 1 x 10 <sup>1</sup> ≤ Menge ≤ 1 x 10 <sup>6</sup> | = Menge                            |
| Menge < 1 x 10 <sup>1</sup>                       | WENIGER ALS 10                     |

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) dienen zur Berechnung der Genomäquivalente (**gEq**) von HSV1, die in der extrahierten Probe vorhanden sind (**Nc**), gemäß dieser Formel:

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

Dabei ist:

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

Wird das Extraktionskit «**EXTRAgen**» mit Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

$$Nc \text{ (gEq/ml)} = 12,5 \times \text{Menge}$$

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

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

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 das Extraktionssystem «**NucliSENS® easyMAG®**» mit in EDTA entnommenen Plasma- oder

Liquorproben verwendet und muss das Ergebnis **in gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

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

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:

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

**Berechnung der Grenzen des linearen Messbereichs**

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

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

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

Wird das Extraktionskit «**EXTRAgen**» zusammen mit Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 12,5 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 12,5 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{von 125 bis 12.500.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 25 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 25 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{von 250 bis 25.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird «**ELITE STAR**» zusammen mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Untere Grenze (gEq/ml)} &= 28 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Obere Grenze (gEq/ml)} &= 28 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{von 280 bis 28.000.000 gEq/ml} \end{aligned}$$

Wird das Extraktionssystem «**ELITE GALAXY**» mit Vollblut-, in EDTA entnommenen Plasma- oder Liquorproben verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

|  |
|--|
| <b>Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «ELITe GALAXY»</b> |
| <b>Untere Grenze (gEq/ml) = 35 x 10 gEq</b>            |
| <b>Obere Grenze (gEq/ml) = 35 x 1.000.000 gEq</b>      |
| <b>von 350 bis 35.000.000 gEq/ml</b>                   |

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

|   |
|---|
| <b>Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «NucliSENS® easyMAG®»</b> |
| <b>Untere Grenze (gEq/ml) = 10 x 10 gEq</b>                   |
| <b>Obere Grenze (gEq/ml) = 10 x 1.000.000 gEq</b>             |
| <b>von 100 bis 10.000.000 gEq/ml</b>                          |

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

|  |
|--|
| <b>Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei «QIASymphony® SP/AS»</b> |
| <b>Untere Grenze (gEq/ml) = 12 x 10 gEq</b>                  |
| <b>Obere Grenze (gEq/ml) = 12 x 1.000.000 gEq</b>            |
| <b>von 120 bis 12.000.000 gEq/ml</b>                         |

**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   | Anz. | positiv | negativ |
|--|------|---------|---------|
| 10 Kopien Plasmid-DNA + 500 ng humane genomische DNA | 50   | 50      | 0       |

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und «ELITe GALAXY» verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV1-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der HSV08-01-Probe aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in HSV1-DNA-negativem EDTA-Vollblut zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 gEq/ml und 560 gEq/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit «ELITe GALAXY» und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

| <b>Nachweisgrenze für Vollblutproben und «ELITe GALAXY» (gEq/ml)</b> |                   |                         |              |
|--|-------------------|-------------------------|--------------|
|  |                   | 95 %-Konfidenzintervall |              |
|  |                   | Untere Grenze           | Obere Grenze |
| <b>95 %-Positivität</b>  | <b>211 gEq/ml</b> | 135 gEq/ml              | 498 gEq/ml   |

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und «ELITe GALAXY» verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von HSV1-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen der HSV08-01-Probe aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA

Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in HSV1-DNA-negativem EDTA-Plasma zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 gEq/ml und 560 gEq/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 12 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und PCR-Einstellung mit «ELITe GALAXY» und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Probit-Regression. Die Nachweisgrenze wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 95 % liegt.

Die analytische Sensitivität in gEq/ml ist nachfolgend angegeben:

| <b>Nachweisgrenze für Plasmaproben und «ELITe GALAXY» (gEq/ml)</b> |                  |                         |              |
|--|------------------|-------------------------|--------------|
|  |                  | 95 %-Konfidenzintervall |              |
|  |                  | Untere Grenze           | Obere Grenze |
| <b>95 %-Positivität</b>  | <b>95 gEq/ml</b> | 55 gEq/ml               | 554 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 log<sub>10</sub> zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 10<sup>7</sup> Molekülen pro Reaktion bis 10<sup>1</sup> 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 10<sup>6</sup> Molekülen pro Reaktion, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10<sup>5</sup> Moleküle/20 µl).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf 10 Moleküle pro Reaktion festgelegt, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb eines Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10<sup>2</sup> Moleküle/20 µl).

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| <b>Linearer Messbereich (gEq/Reaktion)</b> |                        |
|--|------------------------|
| Obere Grenze                               | 1.000.000 gEq/Reaktion |
| Untere Grenze                              | 10 gEq/Reaktion        |

Die Grenzen des linearen Messbereichs in gEq/ml in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 25 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 22,7 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10<sup>6</sup> Molekülen bis 10<sup>1</sup> 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 10,1 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10<sup>6</sup> Molekülen bis 10<sup>1</sup> Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

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

**Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit kalibriertem Referenzmaterial**

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

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV1 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Jede Probe wurde in Doppelbestimmungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**EXTRAgen**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «EXTRAgen» |  |                    |                          |  |
|---|--|--------------------|--------------------------|--|
| Probe   | Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log <sub>10</sub> | Standardabweichung | Positiv / Wiederholungen | Mittlere Ergebnisse log <sub>10</sub> gEq/ml |
| HSV07-01  | HSV2, 4,243  | 0,730              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-02  | HSV1, 4,282  | 0,363              | 2/2                      | 4,292  |
| HSV07-03  | Negativ, n. z.   | n. z.              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-04  | HSV1, 2,593  | 0,536              | 2/2                      | 3,040  |
| HSV07-05  | HSV2, 2,695  | 1,301              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-06  | Negativ, n. z.   | n. z.              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-07  | HSV1, 7,292  | 0,387              | 2/2                      | 7,396  |
| HSV07-08  | HSV1, 4,204  | 0,339              | 2/2                      | 4,336  |
| HSV07-09  | HSV2, 1,890  | 0,313              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-10  | HSV1, 5,275  | 0,292              | 2/2                      | 5,351  |
| HSV07-11  | HSV2, 6,134  | 0,897              | 0/2                      | nicht erkannt                                |
| HSV07-12  | VZV, n. z.   | n. z.              | 0/2                      | nicht erkannt                                |

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

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV1 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe STAR**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe STAR» |  |                    |                          |  |
|---|--|--------------------|--------------------------|--|
| Probe   | Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log <sub>10</sub> | Standardabweichung | Positiv / Wiederholungen | Mittlere Ergebnisse log <sub>10</sub> gEq/ml |
| HSV12-01  | Negativ, n. z.   | -                  | 0/2                      | -  |
| HSV12-02  | HSV1, 3,910  | 0,582              | 2/2                      | 4,047  |
| HSV12-03  | HSV2, 1,948  | 0,305              | 0/2                      | -  |
| HSV12-04  | HSV1, 3,680  | 0,547              | 2/2                      | 4,070  |
| HSV12-05  | HSV2, 1,352  | 0,629              | 0/2                      | -  |
| HSV12-06  | HSV1, 2,318  | 0,441              | 2/2                      | 2,353  |
| HSV12-07  | HSV1, 2,014  | 0,296              | 0/2                      | -  |
| HSV12-08  | HSV2, 3,424  | 1,098              | 0/2                      | -  |
| HSV12-09  | Negativ, n. z.   | -                  | 0/2                      | -  |
| HSV12-10  | HSV2, 3,417  | 1,042              | 0/2                      | -  |

Alle negativen Proben wurden richtig angegeben. Die positiven Proben innerhalb der theoretischen Nachweisgrenze des Systems (280 Kopien/ml) wurden im Bereich des durchschnittlichen „Konsus“-Werts des kommerziellen Assays ± 1 Standardabweichung richtig erkannt. Eine Probe unterhalb der theoretischen Nachweisgrenze des Systems (103 Kopien/ml) ergab ein negatives Ergebnis. Proben mit Titer unter der Nachweisgrenze können stochastisch als positiv oder negativ angegeben werden.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV1 innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich). Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe GALAXY**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «ELITe GALAXY» |  |                    |                          |  |
|---|--|--------------------|--------------------------|--|
| Probe   | Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log <sub>10</sub> | Standardabweichung | Positiv / Wiederholungen | Mittlere Ergebnisse log <sub>10</sub> gEq/ml |
| HSV12-01  | Negativ, n. z.   | -                  | 0/2                      | -  |
| HSV12-02  | HSV1, 3,910  | 0,582              | 2/2                      | 3,895  |
| HSV12-03  | HSV2, 1,948  | 0,305              | 0/2                      | -  |
| HSV12-04  | HSV1, 3,680  | 0,547              | 2/2                      | 3,867  |
| HSV12-05  | HSV2, 1,352  | 0,629              | 0/2                      | -  |
| HSV12-06  | HSV1, 2,318  | 0,441              | 2/2                      | 2,215  |
| HSV12-07  | HSV1, 2,014  | 0,296              | 1/2                      | 1,962  |
| HSV12-08  | HSV2, 3,424  | 1,098              | 0/2                      | -  |
| HSV12-09  | Negativ, n. z.   | -                  | 0/2                      | -  |
| HSV12-10  | HSV2, 3,417  | 1,042              | 0/2                      | -  |

Alle negativen Proben wurden richtig angegeben. Die positiven Proben wurden richtig im Bereich des durchschnittlichen „Konsus“-Werts des kommerziellen Assays ± 1 Standardabweichung erkannt. Eine von zwei Wiederholungen der Probe HSV12-07 wurde nicht erkannt. Das abweichende Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass der niedrige Proben-titer (103,28 gEq/ml) um die Nachweisgrenze der Methode lag. Die Probe wurde dennoch als positiv angegeben.

**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 gpD-Gen von HSV1 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 HSV1-DNA getesteter klinischer Proben von Liquor und Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 21 negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von HSV07-02-, HSV07-08-, HSV07-10-Proben aus dem „QCMD 2007 Herpes simplex virus Proficiency Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen niedrigen Titer mit HSV1-DNA dotiert waren, und 20 in EDTA entnommene Vollblutproben von normalen, vermutlich HSV1-DNA-negativen Spendern (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Frankreich), die durch Hinzufügen von HSV08-03-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen niedrigen Titer mit HSV1-DNA dotiert waren, als Referenzmaterial verwendet. Mit jeder Liquorprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**EXTRAgen**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Mit jeder Vollblutprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**EXTRAblood**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| Mit HSV1-DNA dotierter Liquor                    | 21     | 21      | 0       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Vollblut | 20     | 20      | 0       |

Alle dotierten Proben wurden richtig als HSV1-DNA-positiv erkannt. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 100 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 22 HSV1-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von HSV08-07-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, 30 HSV1-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV08-03-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, und 30 HSV1-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV08-03 aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe STAR**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| Mit HSV1-DNA dotierter Liquor                    | 22     | 22      | 0       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Plasma   | 30     | 30      | 0       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Vollblut | 30     | 27      | 1       |

Das Ergebnis von zwei HSV1-positiven Proben war ungültig.

Eine Probe ergab ein negatives Ergebnis. Die diagnostische Sensitivität des Assays betrug bei diesem Test 98,7 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 20 HSV1-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von HSV08-07-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, 30 HSV1-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV08-07-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, und 30 HSV1-DNA-negativen Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV08-07-Proben aus dem „QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, UK) und HSV10-07-Proben aus dem „QCMD 2010 Herpes Simplex Human Virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe GALAXY**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| Mit HSV1-DNA dotierter Liquor                    | 20     | 20      | 0       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Plasma   | 30     | 30      | 0       |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Vollblut | 30     | 30      | 0       |

Alle dotierten Proben wurden richtig als HSV1-DNA-positiv erkannt.

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

**Analytische Spezifität: Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit potenziell interferierenden Markern**

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

Die Analyse der Anordnung der Sequenzen der Primer und des Fluoreszenzmarkers mit den in Datenbanken für andere Organismen als HSV1, darunter die kompletten HSV2- und VZV-Genome, verfügbaren Sequenzen ergab, dass das humane Herpesvirus, das HSV1 am meisten ähnelt, deren Spezifität und die Abwesenheit einer signifikanten Homologie aufzeigte.

Die analytische Spezifität des Assays als die Abwesenheit von Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch Testen einer Ringversuchsreihe überprüft.

Für die Bewertung der analytischen Spezifität wurde eine Reihe einschließlich HSV2-positiver und VZV-positiver Proben (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) als kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung getestet. Hierzu wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A., durchgeführt.

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

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit HSV2- und VZV-positiven Proben nachgewiesen.

**Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben**

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde mithilfe einiger negativ auf HSV1-DNA getesteter klinischer Proben von Liquor und Vollblut, das in EDTA entnommen wurde, getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 28 HSV1-DNA-negative Liquorproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) und 24 in EDTA entnommene Vollblutproben von vermutlich HSV1-DNA-negativen Spendern (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Frankreich) als Referenzmaterial verwendet. Mit jeder Liquorprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**EXTRAGEN**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Mit jeder Vollblutprobe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**EXTRABlood**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| HSV1-DNA-negativer Liquor                        | 28     | 0       | 27      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Vollblut | 24     | 1       | 23      |

Eine Liquorprobe ergab ein ungültiges Ergebnis, möglicherweise wegen des Vorhandenseins eines Inhibitors.

Eine Vollblutprobe ergab ein abweichendes Ergebnis mit einem sehr niedrigen Virustiter (niedriger als 1 gEq/Reaktion). Diese Probe, die bei einem unabhängigen Amplifikationslauf negativ, aber gültig war, liegt unter der Nachweisgrenze des Produkts, das bei unterschiedlichen Läufen zufällig entweder negative oder positive Ergebnisse ausgibt.

Dieses abweichende Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die Vollblutprobe nur vermutlich HSV1-DNA-negativ ist, da es sich um ein latentes in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus handelt. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 98,0 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 24 HSV1-DNA-negative Liquorproben, 30 in EDTA entnommene, HSV1-DNA-negative Plasmaproben sowie 30 in EDTA entnommene, HSV1-DNA-negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe STAR**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| HSV1-DNA-negativer Liquor                        | 24     | 0       | 24      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Plasma   | 30     | 0       | 30      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Vollblut | 30     | 1       | 28      |

Das Ergebnis von einer HSV1-negativen Proben war ungültig.

Eine Probe wies ein positives Ergebnis auf, mit einem Virustiter gleich 65 gEq/ml. Aufgrund des niedrigen Virustiters hätten die Proben bei der Analyse mit der Referenzmethode nicht erkannt werden können. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 98,8 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 22 HSV1-DNA-negative Liquorproben, 34 in EDTA entnommene, vermutlich HSV1-DNA-negative Plasmaproben sowie 36 in EDTA entnommene, vermutlich HSV1-DNA-negative Vollblutproben verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit «**ELITe GALAXY**» und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Proben   | Anzahl | positiv | negativ |
|--|--------|---------|---------|
| HSV1-DNA-negativer Liquor                        | 22     | 0       | 22      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Plasma   | 34     | 0       | 34      |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-negatives Vollblut | 36     | 0       | 36      |

Alle Proben wurden richtig als HSV1-DNA-negativ erkannt.

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

**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.

**Andere Proben:**

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

**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 «**HSV1 - ELITe Positive Control**» oder alternativ das Produkt «**HSV1 - ELITe Positive Control RF**» oder das Produkt «**HSV1 ELITe Standard**» verwenden.

**Qualitätskontrollen**

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

**VERFAHREN**

**Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs**

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

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

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

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

| Temperaturzyklus                           |                                 |        |
|--|---------------------------------|--------|
| Phase                                      | Temperaturen                    | Dauern |
| Dekontamination                            | 50 °C                           | 2 min  |
| Erste Denaturierung                        | 94 °C                           | 2 min  |
| Amplifikation und Detektion<br>(45 Zyklen) | 94 °C                           | 10 s   |
|  | 60 °C<br>(Fluoreszenzerfassung) | 30 s   |
|  | 72 °C                           | 20 s   |

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

- die Kanäle der Signalerfassung auswählen: „detector“ (Detektor) für den HSV1-Sensor mit „channel FAM 465-510“ und „detector“ für den IC-Sensor mit „channel VIC 540-580“;

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

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

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

|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| C1 | C2              | C3              | C4              | C5              | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 |
| NC | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |
|    |                 |                 |                 |                 |    |    |    |    |     |     |     |

**Legende:** C1 - C12: Zu analysierende Proben; NC: Negative Amplifikationskontrolle;  
10<sup>2</sup>: Standard 10<sup>2</sup> Kopien; 10<sup>3</sup>: Standard 10<sup>3</sup> Kopien; 10<sup>4</sup>: Standard 10<sup>4</sup> Kopien; 10<sup>5</sup>: Standard 10<sup>5</sup> Kopien.

#### Einrichten der Amplifikation

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

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Teströhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Teströhrchen mit dem **HSV1 Q – PCR Mix** auftauen und daran denken, dass der Inhalt jedes Röhrchens für **25 Reaktionen** ausreicht. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die Teströhrchen mit **HSV1 – Positive Control** oder alternativ **HSV1 – ELITE Positive Control RF** oder die Teströhrchen mit **HSV1 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 **HSV1 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.

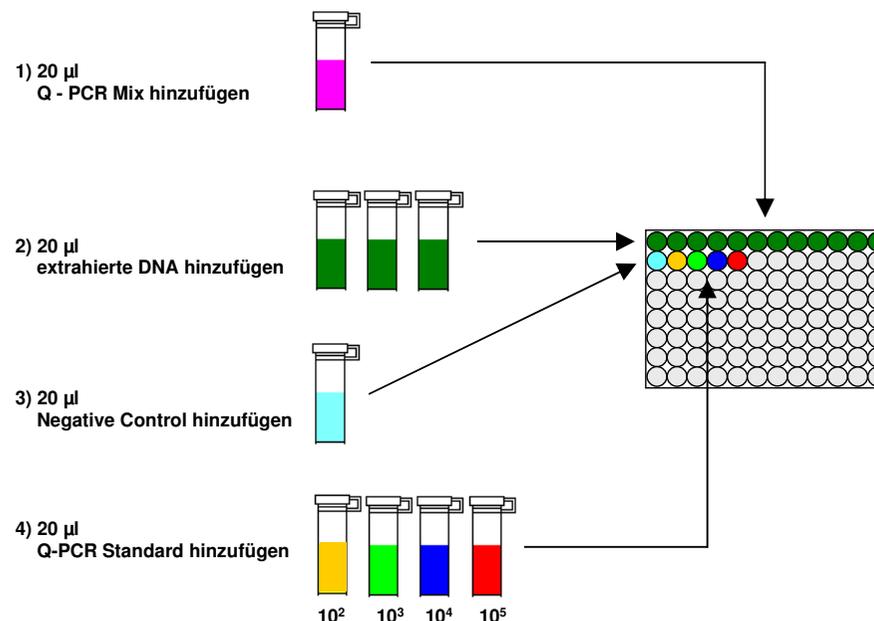
4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:
  - Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von HSV1-DNA): **20 µl HSV1 - Positive Control** oder alternativ «**HSV1 - ELITE Positive Control RF**» präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **HSV1 - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von HSV1-DNA): **20 µl HSV1 Q - PCR Standard 10<sup>2</sup>** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **HSV1 Q - PCR Standard 10<sup>2</sup>** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den übrigen **HSV1 Q - PCR Standards (10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>)** 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-HSV1-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 HSV1-Detektor und dem IC-Detektor während der Amplifikationsreaktionen aufgezeichnet wurden, müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

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

Die Gruppe der zu analysierenden Proben auswählen

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

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

#### Bei Plasmaproben

- manuell den Schwellenwert („**Threshold**“) und das Rauschband („**Noiseband**“) für den FAM-Detektor „HSV1“ 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 „HSV1“ 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 **Fluoreszenzschwelle** erreicht wird.

Bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** dienen die **Ct**-Werte für HSV1 zur Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) dieses Amplifikationslaufs sowie zur Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle gezeigt:

| Reaktion Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup><br>Detektor „HSV1“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|--|---------------|-------------------------|
| Ct ≤ 25  | POSITIV       | KORREKT                 |

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei HSV1 **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 HSV1-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 10<sup>5</sup> (Ct ≤ 25)** beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct-Wert** von HSV1 (Fenster „Analysis“ (Analyse)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Reaktion der Negative Control<br>Detektor „HSV1“ | Assayergebnis | Amplifikation/Detektion |
|--|---------------|-------------------------|
| Ct Undetermined (Ct unbestimmt)                  | NEGATIV       | KORREKT                 |

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** für HSV1 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 HSV1 zum Nachweis der Ziel-DNA, während der **Ct-Wert** für die Internal Control zur Validierung von Extraktion, Amplifikation und Detektion verwendet wird.

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

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

| Probenreaktion                  |  | Eignung der Probe | Assayergebnis   | HSV1 DNA      |
|---------------------------------|--|-------------------|-----------------|---------------|
| Detektor „HSV1“                 | 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 HSV1 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 HSV1 und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, wurde die HSV1-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht

nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die HSV1-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 HSV1-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 HSV1-Reaktion verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Assay-Ergebnis gültig.

#### Analyse der quantitativen Ergebnisse

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für den **Q - PCR Standard 10<sup>5</sup> 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 HSV1 in den Amplifikationsreaktionen der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** (Schaltfläche **Standard Curve**) aus dem Amplifikationslauf dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

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

| Probenergebnis<br>FAM-Detektor „HSV1“               | HSV1-Kopien pro Reaktion |
|---|--------------------------|
| Menge > 1 x 10 <sup>6</sup>                         | ÜBER 1.000.000           |
| 1,0 x 10 <sup>1</sup> ≤ Menge ≤ 1 x 10 <sup>6</sup> | = Menge                  |
| Menge < 1,0 x 10 <sup>1</sup>                       | WENIGER ALS 10           |

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** (Fenster „Analysis“ (Analyse)) dienen zur Berechnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen **Kopien** von HSV1 (**Nc**) gemäß dieser Formel:

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

Dabei ist:

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

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

|   |
|---|
| <b>Vereinfachte Formel für Vollblut und MagNA Pure 24</b> |
| <b>Nc (Kopien/ml) = 25 x Menge</b>                        |

**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 beta-Globin | 18     | 18       | 0        |

**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 log<sub>10</sub> 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 10<sup>7</sup> Molekülen pro Reaktion bis 10<sup>1</sup> 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 (10<sup>2</sup> Kopien/20 µl).

Die obere Grenze des linearen Messbereichs lag bei 10<sup>6</sup> Kopien/Reaktion innerhalb von einem Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10<sup>5</sup> Kopien/20 µl).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Linearer Messbereich mit MagNA Pure 24 |               |                   |
|--|---------------|-------------------|
|  | Untere Grenze | Obere Grenze      |
| <b>Kopien/ml</b>                       | <b>25</b>     | <b>25.000.000</b> |
| <b>Kopien/Reaktion</b>                 | <b>10</b>     | <b>10.000.000</b> |

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

**Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit**

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der Ct-Werte unter 2 % im Bereich von 10<sup>6</sup> Molekülen bis 10<sup>1</sup> 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 10<sup>6</sup> Molekülen bis 10<sup>1</sup> 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 3 % im Bereich von 10<sup>6</sup> Molekülen bis 10<sup>1</sup> Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Präzision und Genauigkeit wurden mithilfe der während der Experimente zur Untersuchung des

linearen Messbereichs erhaltenen Daten ermittelt.

**Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial**

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde «HSV1 Molecular 'Q' Panel» (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jeder Punkt der Reihe wurde in 4 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und «MagNA Pure 24» |                         |
|--|-------------------------|
| Probe  | Positive/Wiederholungen |
| HSV1MQP01-High   | 2/2                     |
| HSV1MQP01-Medium   | 2/2                     |
| HSV1MQP01-Low  | 2/2                     |
| HSV1MQP01-Negative   | 0/2                     |

Alle Proben wurden richtig erkannt.

**Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben**

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 30 in EDTA entnommene, HSV1-DNA-negative Vollblutproben, die durch Hinzufügen von HSV1MQP01-High-Proben (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, und 29 in EDTA entnommene, HSV1-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von HSV1MQP01-High-Proben (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit HSV1-DNA dotiert waren, als Referenzmaterial verwendet.

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

| Proben   | Anzahl | positive | negative |
|--|--------|----------|----------|
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Vollblut | 30     | 30       | 0        |
| In EDTA entnommenes, HSV1-DNA-dotiertes Plasma   | 29     | 29       | 0        |

Alle Proben waren beim ersten Test gültig und wurden als HSV1-DNA-positiv bestätigt.

Die diagnostische Gesamtsensitivität des Assays betrug 100 %.

**Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben**

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 40 in EDTA entnommene, vermutlich HSV1-DNA-negative Vollblutproben und 34 in EDTA entnommene, vermutlich HSV1-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 HSV1-DNA-negatives Vollblut | 40     | 1        | 39       |
| In EDTA entnommenes, vermutlich HSV1-DNA-negatives Plasma   | 34     | 0        | 34       |

Alle Vollblutproben waren beim ersten Test gültig und neununddreißig (39) von vierzig (40) Vollblutproben wurden als HSV1-DNA-negativ bestätigt, während eine Probe ein abweichend positives Ergebnis aufwies.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Vollblutproben betrug 98 %.

Alle Plasmaproben waren beim ersten Test gültig und wurden als HSV1-DNA-negativ bestätigt.

Die diagnostische Spezifität des Assays in Verbindung mit Plasmaproben betrug 100 %.

**Robustheit: ungültige Ergebnisse mit klinischen Proben**

Die Robustheit dieses Assays als die Bewertung von ungültigen Ergebnissen klinischer Proben bei der ersten Analyse, wurde durch die Analyse klinischer Proben verifiziert.

Die Anzahl der ungültigen Proben wurde anhand der Ergebnisse von klinischen Proben verifiziert, die negativ und positiv auf HSV1-DNA waren und mit dem automatischen Extraktionssystem **Magna Pure 24** und durch Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. analysiert worden waren. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

| Proben                       | Anzahl | Ungültig | % |
|------------------------------|--------|----------|---|
| In EDTA entnommenes Vollblut | 70     | 0        | 0 |
| In EDTA entnommenes Plasma   | 63     | 0        | 0 |

**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 „HSV1 ELITe MGB® Kit“, FTP RTS031PLD, aufgeführt.

**QUELLENANGABEN**

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

**GRENZEN DES VERFAHRENS**

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

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

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

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

Die verschiedenen Plattformen dürfen nur mit den im Abschnitt „Proben und Kontrollen“ angegebenen klinischen Proben verwendet werden.

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 HSV1-positive klinische Proben, die Positivkontrollen und die gleichen Amplifikationsprodukte. Kreuzkontaminationen führen zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch das Produktformat werden Kreuzkontaminationen begrenzt. Trotzdem können Kreuzkontaminationen nur durch Beachtung der guten Laborpraxis und der vorliegenden Gebrauchsanweisung vermieden werden.

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

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

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

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

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 HSV1-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 HSV1-DNA beeinträchtigen.

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

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

**FEHLERBEHEBUNG**

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

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

**Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt**

| Mögliche Ursachen   | Abhilfemaßnahmen  |
|---|---|
| Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. | Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden.<br>Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln.<br>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.<br>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 Amplifikationsreaktionen. | Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.        |

| <b>Ziel-DNA und Internal Control-DNA in den Probenreaktionen nicht erkannt</b> |   |
|--|---|
| <b>Mögliche Ursachen</b>   | <b>Abhilfemaßnahmen</b>   |
| Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.                | Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden.<br>Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln.<br>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.<br>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.<br>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.   |

| <b>Unregelmäßige oder hohe Hintergrundfluoreszenz in den Reaktionen</b> |   |
|---|---|
| <b>Mögliche Ursachen</b>  | <b>Abhilfemaßnahmen</b>   |
| Falsche Dispensierung der Probe.  | Beim Einmischen von Proben, Negativ- und Positivkontrollen oder Standards in das Reaktionsgemisch vorsichtig vorgehen und dabei dreimal pipettieren.<br>Bläschenbildung vermeiden.  |
| Einstellfehler der Grundlinie.  | Bereich für die Grundlinienberechnung innerhalb von Zyklen einstellen, in denen sich die Hintergrundfluoreszenz bereits stabilisiert hat (die Daten unter „Results“ (Ergebnisse), „Component“ (Komponente) überprüfen) und die Zunahme des Fluoreszenzsignals noch nicht begonnen hat, z. B. von Zyklus 6 auf Zyklus 15.<br>Die automatische Grundlinienberechnung durch Aktivieren der Option „Auto Baseline“ verwenden. |

| <b>Anomale Dissoziationskurve</b>  |   |
|--|---|
| <b>Mögliche Ursachen</b>   | <b>Abhilfemaßnahmen</b>   |
| Fehlen eines definierten Peaks.<br>Definierter Peak, der sich jedoch von dem der anderen Proben und der Standards oder Positivkontrolle unterscheidet. | Kontrollieren, ob der Ct-Wert des FAM-Detektors unter 30 liegt.<br>Große Menge an Amplifikationsprodukt am Ende der Reaktion kann die Schmelzkurvenanalyse beeinträchtigen.<br>Die Probenamplifikation wiederholen, um das Vorhandensein von Ziel-DNA mit einer möglichen Mutation zu bestätigen.<br>Die Ziel-DNA der Probe sollte sequenziert werden, um die Mutation zu bestätigen.   |
| <b>Mit ELITe InGenius® und ELITe BeGenius®: Fehler 30103</b>   |   |
| <b>Mögliche Ursachen</b>   | <b>Abhilfemaßnahmen</b>   |
| Zu hohe Konzentration von Ziel-DNA in der Probe.   | Wenn im PCR-Diagramm eine signifikante Amplifikation zu beobachten ist:<br>- Amplifikation der eluierten Probe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen oder<br>- die Extraktion mit einer Verdünnung der Primärprobe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen. |

SYMBOLE

HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE  
LIZENZ

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

Dieses Produkt enthält von LTC lizenzierte Reagenzien.

Dieses Produkt wird im Rahmen von Lizenzvereinbarungen zwischen ELITechGroup S.p.A. und deren Tochtergesellschaften und LTC vertrieben. 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, LTC Corporation, 5791 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA. Tel.: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-Mail: outlicensing@LTC.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, 9,169,256 und der EP-Patente mit den Nummern 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

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

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

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

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

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

Ficol® ist eine eingetragene Marke von GE Healthcare.

# HSV1 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

## B. Amplified sequence

| Target           | Gene                   | Fluorophore |
|------------------|------------------------|-------------|
| HSV1             | Glicoprotein D (gpD)   | FAM         |
| Internal Control | Human beta globin gene | AP525       |

## C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

## D. Kit content

**HSV1 Q-PCR Mix**

  
X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius®** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius®** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **HSV1 - ELITE Standard:** STD031PLD
- › **HSV1 - ELITE Positive Control:** CTR031PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

## F. Protocol

- |                               |        |                               |           |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|-----------|
| › Sample volume               | 200 µL | › Unit of quantitative result | Copies/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  |                               |           |
| › Q-PCR Mix volume            | 20 µL  |                               |           |

## G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

| Matrix      | Limit of Detection | Linearity Range  | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|-------------|--------------------|------------------|------------------------|------------------------|
| Whole Blood | 211 cp / mL        | 211 – 25,000,000 | 98%<br>49/50*          | 100%<br>34/34*         |
| Plasma      | 250 cp /mL         | 250 – 25,000,000 | 100%<br>30/30*         | 100%<br>38/38*         |
| CSF         | 250 cp / mL        | 250 – 25,000,000 | 100%<br>20/20*         | 100%<br>22/22*         |

\*confirmed samples/ tested samples

## H. Procedures ELITE InGenius®

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

### Before analysis

|   |   |  |
|---|---|--|
| <p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password<br/>Select the mode "Closed"</p> | <p>2. Verify calibrators: HSV1 Q-PCR Standard in the "Calibration menu"<br/>Verify controls: HSV1 positive and negative controls in the "Control menu"<br/><i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired</p> | <p>3. Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes<br/>Vortex gently<br/>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 volume:<br/>Input: "200 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:<br/>Primary tube or extraction tube</p>    | <p>6. Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block</p>          |
| <p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks</p>  | <p>8. Close the door<br/>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 Elution tubes rack</p> |
| <p>7. Load the PCR cassette rack<br/>Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p> | <p>8. Close the door<br/>Start the run</p>  | <p>9. View, approve and store the results</p>                             |

### Procedure 3 - Extraction only

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

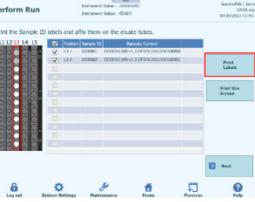
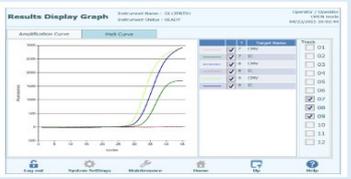
## L. Procedures ELITE BeGenius<sup>®</sup>

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

|  |   |   |
|--|---|---|
| <p><b>1.</b> Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password<br/>Select the mode “Closed”</p> | <p><b>2.</b> Verify calibrators: HSV1 Q-PCR standard in the “Calibration menu”<br/>Verify controls: HSV1 pos. and neg. controls in the “Control menu”<br/><i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p> | <p><b>3.</b> Thaw the HSV1 Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes<br/>Vortex gently<br/>Spin down 5 sec</p> |
|--|---|---|

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p><b>1.</b> Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»</p>  | <p><b>2.</b> Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active</p>                   | <p><b>3.</b> Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL”</p>                                   |
| <p><b>4.</b> Select the “Assay protocol” of interest</p>   | <p><b>5.</b> Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p>  | <p><b>6.</b> Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area</p>  |
| <p><b>7.</b> Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack</p>    | <p><b>8.</b> Close the door. Start the run</p>    | <p><b>9.</b> View, approve and store the results</p>    |

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

### Procedure 2 - PCR only

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

### Procedure 3 - Extraction only

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

# HSV1 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

## B. Amplified sequence

| Target                  | Gene                   | Fluorophore |
|-------------------------|------------------------|-------------|
| <b>HSV1</b>             | Glicoprotein D (gpD)   | FAM         |
| <b>Internal Control</b> | Human beta globin gene | AP525       |

## C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

## D. Kit content

### HSV1 Q-PCR Mix



X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

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

- › HSV1 ELITE Standard: STD031PLD
- › HSV1 - ELITE Positive Control: CTR031PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › 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 | <b>10 gEq/reaction</b> | <b>96%</b> (27/28)*    | <b>97%</b> (28/29)*    |
|                    | Plasma      | <b>10 gEq/reaction</b> | <b>100%</b> (30/30)*   | <b>100%</b> (30/30)    |
|                    | CSF         | <b>10 gEq/reaction</b> | <b>100%</b> (22/22)*   | <b>100%</b> (24/24)*   |
| ELITE GALAXY - ABI | Whole blood | <b>211 gEq/mL</b>      | <b>100%</b> (30/30)*   | <b>100%</b> (36/36)*   |
|                    | Plasma      | <b>95 gEq/mL</b>       | <b>100%</b> (30/30)*   | <b>100%</b> (34/34)*   |
|                    | CSF         | <b>10 gEq/reaction</b> | <b>100%</b> (20/20)*   | <b>100%</b> (22/22)*   |

\*confirmed samples/tested samples

## G. Procedure

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

### Extraction - Validated systems

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

### Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

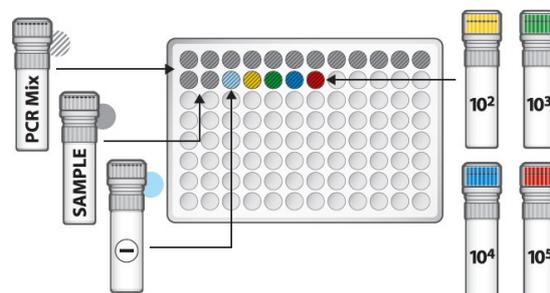
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

| Stage                                    | Temperature | Timing |
|--|-------------|--------|
| Decontamination                          | 50°C        | 2 min  |
| Denaturation                             | 94°C        | 2 min  |
| Amplification and detection<br>45 cycles | 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 HSV1 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



### Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

| Instrument                 | Baseline | HSV1 FAM | Internal Control VIC |
|----------------------------|----------|----------|----------------------|
| 7500 Fast Dx Real Time PCR | 6 - 15   | 0.2      | 0.1                  |
| 7300 Real Time PCR         | 6 - 15   | 0.1      | 0.05                 |

### Interpretation - Qualitative results

| HSV1 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 HSV1 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 10<sup>6</sup> cp/reaction or approximately from 100 to 10<sup>7</sup> cp/mL.

# HSV-1 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

## B. Amplified sequence

| Target           | Gene                   | Fluorophore |
|------------------|------------------------|-------------|
| HSV1             | Glicoprotein D (gpD)   | FAM         |
| Internal Control | human beta globin gene | AP525       |

## C. Validated matrix

- › Whole blood EDTA
- › Plasma EDTA

## D. Kit content

**HSV1 Q-PCR Mix**



X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System, software 1.0
- › HSV1 - ELITE Positive Control: CTR031PLD
- › HSV1 ELITE Standard: STD031PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE

## F. Performance

| System        | Matrix      | Limit of Detection    | Diagnostic Sensitivity | Diagnostic Specificity |
|---------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| MagNA Pure 24 | Whole blood | <b>10 cp/reaction</b> | <b>100%</b> (29/29)*   | <b>97.5%</b> (39/40)*  |
|               | Plasma      | <b>10 cp/reaction</b> | <b>100%</b> (30/30)*   | <b>100%</b> (34/34)*   |

\*confirmed samples/tested samples

## G. Procedure

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

### Extraction - Validated systems

| Extraction    | Validated matrix | Sample volume processed | Min. sample volume | Total eluate volume | CPE Internal Control volume |
|---------------|------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| MagNA Pure 24 | WB, Plasma       | 200 µL                  | 350 µL             | 100 µL              | 20 µL                       |

### Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

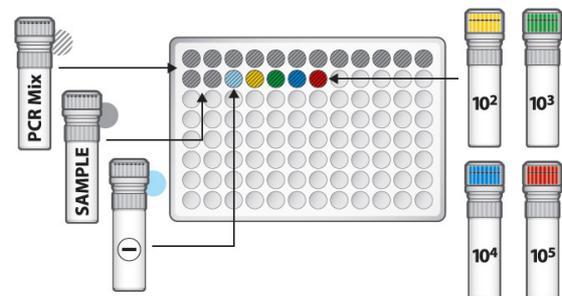
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

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

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

### Amplification - PCR Set-up

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



### Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis\*

| Instrument                  | Matrix | Background | HSV1 FAM | Internal Control VIC |
|-----------------------------|--------|------------|----------|----------------------|
| Cobas-Z 480 PCR instruments | Plasma | 2 - 6      | 0.55     | 1.2                  |
| Cobas-Z 480 PCR instruments | WB     | 2 - 6      | 0.8      | 1.5                  |

*\*manually set the Threshold and Noiseband*

### Interpretation - Qualitative results

| HSV-1 Ct value | Internal Control Ct value | Interpretation |
|----------------|---------------------------|----------------|
| Determined     | -                         | Positive       |
| Undetermined   | Ct ≤ 35                   | Negative       |
|                | Ct >35 or Undetermined    | Invalid*       |

*\*Repeat the assay starting from the extraction*

### Interpretation - Quantitative results

The HSV1 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 10<sup>6</sup> copies/reaction or approximately from 100 to 10<sup>7</sup> copies/mL.

