




ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY
Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 15/02/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:







«VZV ELITe MGB® Kit» Ref. RTS035PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius» instrument (REF INT040) and CSF matrix.*
- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*
- *“Performance Characteristics ELITe InGenius and ELITe BeGenius” paragraph updated as per:*
 - *confirmed LoD value calculated on CSF matrix*
 - *typos.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBILE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS035PLD

CE IVD

-20 °C

INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	Seite 2
TESTPRINZIPIEN	Seite 2
PRODUKTBESCHREIBUNG	Seite 3
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	Seite 3
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	Seite 3
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	Seite 3
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	Seite 5
ELITE INGENIUS	Seite 6
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 6
VERFAHREN BEI ELITE INGENIUS	Seite 8
ELITe BEGENIUS	Seite 15
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 15
VERFAHREN BEI ELITe BEGENIUS	Seite 17
LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITE INGENIUS und ELITe BEGENIUS	Seite 23
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	Seite 33
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 33
VERFAHREN	Seite 36
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 44
Roche cobas z 480 analyzer	Seite 50
PROBEN UND KONTROLLEN	Seite 50
VERFAHREN	Seite 51
LEISTUNGSMERKMALE	Seite 56
QUELLENANGABEN	Seite 59
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 59
FEHLERBEHEBUNG	Seite 60
SYMBOLE	Seite 62
HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	Seite 63

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt **VZV ELITe MGB® Kit** ist Teil eines qualitativen und quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen herpetischen Herpes-Varicella-Zoster-Virus (VZV)** 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 VZV-Infektionen, sowie klinischen Daten des Patienten und weiteren Laborbefunden bestimmt.

TESTPRINZIPIEN

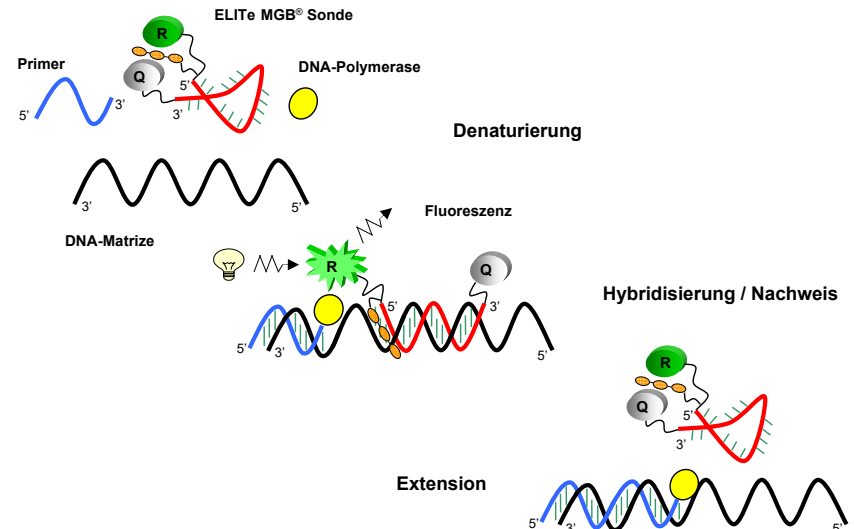
Der Assay besteht aus einer Echtzeit-Amplifikationsreaktion mit einem programmierbaren Thermostat, der mit einem optischen System zum Fluoreszenznachweis (Thermocycler für die Echtzeit-Amplifikation) ausgestattet ist.

In jeder Vertiefung werden zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei zunächst aus den Proben extrahierte DNA getestet wird: eine spezifische Reaktion des **DNA-bindenden Hauptprotein (ORF29)**-Gens von VZV und eine spezifische Reaktion für eine Region des humanen **beta-Globin**-Gens (Internal Control der Hemmung). Die mit einem FAM-Fluorophor markierte, VZV-spezifische Sonde mit ELITe MGB®-Technologie wird aktiviert, wenn sie mit dem spezifischen Produkt der VZV-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 der 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 VZV-DNA in der Ausgangsprobe nachweisen.

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

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

Die folgende Abbildung zeigt den Mechanismus der Aktivierung und Fluoreszenzemission der ELITe MGB®-Technologie-Sonde. Bitte beachten Sie, dass die Sonde während des Amplifikationszyklus nicht hydrolysiert wird, damit sie für die Analyse der Dissoziationskurve verwendet werden kann.



PRODUKTBESCHREIBUNG

Das Produkt **VZV ELITe MGB Kit** enthält das **gebrauchsfertige** Komplettgemisch „VZV Q - PCR Mix“ zur Echtzeit-Amplifikation in einer stabilisierenden Lösung, die **in vier Einweg-Teströhrchen aliquotiert wird**. Jedes Röhrchen enthält **540 µl** Lösung, die für **24 Tests** mit **ELITe InGenius®** und **ELITe BeGenius®** und **25 Tests** mit anderen Systemen ausreicht.

Die Primer und die VZV-spezifische Sonde (stabilisiert mit einer MGB®-Gruppe, markiert mit FAM-Fluorophor und ausgelöscht mit einem nicht-fluoreszierenden Molekül) sind spezifisch für eine Region des **DNA-bindenden Hauptprotein** (ORF29)-Gens von VZV.

Die Primer und die spezifische 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 ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** einschließlich Standards und Kontrollen.

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

IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
VZV 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 (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 Positive Control der Extraktion, die Positive Control der Amplifikation, die bekannten DNA-Mengenstandards und die Verbrauchsmaterialien **sind nicht** in diesem Produkt enthalten.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät **ELITe InGenius** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT030) werden die folgenden generischen Produkte benötigt die Extraktionskartuschen **ELITe InGenius SP 200** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032SP200), die Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von Nukleinsäuren aus biologischen Proben **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT032CS), **ELITe InGenius Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. F2102-000), **ELITe InGenius PCR Cassette** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT035PCR) und **Filter tips 300** (Xygen BioScience Inc., CA, USA, Art.-Nr. TF-350-L-R-S).

Für die automatische DNA-Extraktion, Echtzeit-Amplifikation und Interpretation der Probenergebnisse werden das Gerät **ELITe InGenius** und die folgenden spezifischen Assay-Protokolle (ELITechGroup S.p.A.) benötigt:

- Parameter für die Kalibratoren **VZV ELITe_STD**,
- Parameter für die Positive Control der Amplifikation **VZV-ELITe_PC**,
- Parameter für die Negative Control der Amplifikation **VZV ELITe_NC**,
- Parameter für die Probenanalyse **VZV ELITe_WB_200_100**, **VZV ELITe_PL_200_100** und **VZV ELITe-CSF_200_100**.

Für die automatische Probenanalyse mit dem Gerät **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. INT040) 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 **1000 µl Filter Tips Tecan** (Tecan, Schweiz, Art.-Nr. 30180118).

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

- Parameter für die Kalibratoren **VZV ELITe_Be_STD**,
- Parameter für die Positive Control der Amplifikation **VZV-ELITe_Be_PC**,
- Parameter für die Negative Control der Amplifikation **VZV ELITe_Be_NC**,
- Parameter für die Probenanalyse **VZV ELITe_Be_WB_200_100**, **VZV ELITe_Be_PL_200_100** und **VZV 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. 37055), Kits zur Extraktion von Nukleinsäure aus biologischen Proben, mit dem Gerät **QIASymphony® SP/IAS** (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 Positive Control 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.

Wenn für die DNA-Amplifikation das 7300 Real-Time PCR System verwendet wird, muss das generische Produkt **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** (Life Technologies, Art.-Nr. N8010560), Mikrotiterplatten mit 0,2-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

Beim Einsatz eines 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument für die DNA-Amplifikation muss das generische Produkt **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies., Art.-Nr. 43469062), Mikrotiterplatten mit 0,1-ml-Vertiefungen und selbsthaftenden Dichtungsfolien für die Echtzeit-Amplifikation, verwendet werden.

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

Wird ein Nachweis von VZV-DNA für die qualitative Analyse benötigt, muss das Produkt **VZV - ELITe Positive Control** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR035PLD) oder das speziell für die Verwendung mit cobas z 480 Analyzer vorgesehene Produkt **VZV - ELITe Positive Control RF** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. CTR035PLD-R), Positive Control von Plasmid-DNA, verwendet werden.

Werden der Nachweis und die Quantifizierung von VZV-DNA für die quantitative Analyse benötigt, muss das Produkt **VZV ELITe Standard** (ELITechGroup S.p.A., Art.-Nr. STD035PLD), vier Verdünnungen von Plasmid-DNA bekannter Menge zur Ermittlung der Standardkurve, verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

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

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

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

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

Übrig gebliebene Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

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

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

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

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

Reagenzien aus anderen Chargen nicht mischen.

Reagenzien von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für molekularbiologische Anwendungen

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

Für die Einrichtung des Arbeitslaufs werden dafür vorgesehene Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel benötigt.

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

Bei manueller Einrichtung des Amplifikationslaufs müssen Laborkittel, Schutzhandschuhe und Hilfsmittel vorhanden sein, die ausschließlich für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen

und für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten verwendet werden. Niemals Laborkittel, Schutzhandschuhe oder Hilfsmittel aus dem für die Amplifikation/den Nachweis von Amplifikationsprodukten vorbehaltenen Bereich in den für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen vorbehaltenen Bereich bringen.

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

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

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

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

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

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

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

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 vorzubereiten. 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 direkt 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 **VZV 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 Primärröhrchens 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 **VZV 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 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 RNA-Extraktion aus Liquor mit dem **ELITe InGenius** und der **ELITe InGenius Software**, Version 1.3 (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **VZV 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.

Vor der Analyse mit diesem Produkt müssen 0,2 ml resuspendierte Probe in ein im **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** enthaltenes **Extraktionsröhrchen** oder ein **2-ml-Röhrchen** (Sarstedt, Art-Nr. 72.694.005) überführt werden.

Hinweis: Das Pipettieren von Proben aus dem Primärrohrchen in das **Extraktionsröhrchen** kann **Kontamination verursachen**. Die geeigneten Pipetten verwenden und alle im Abschnitt **Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen** aufgeführten Empfehlungen befolgen.

Andere Proben:

Es liegen keine Daten zu Produktleistungen mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Abstriche von mukokutanen Läsionen, 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 immun supprimierende Medikamente vor.

Amplifikationskalibratoren und Amplifikationskontrollen

Für jede Charge des PCR-Reagenzes muss eine Reagenzvalidierung erstellt und genehmigt werden.

- Verwenden Sie für die Kalibration die vier Konzentrationen des **VZV ELITe Standard** mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_STD**.
- Verwenden Sie für die Positive Control die **VZV - ELITe Positive Control** mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_PC**.
- Verwenden Sie für die Negative Control hochreines Wasser (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_NC**.

Hinweis: **ELITe InGenius** ermöglicht die Erstellung und Speicherung der PCR-Kalibration und der Validierung der Kontrollen für jede PCR-Reagenziencharge. Die Ergebnisse der Kalibrationskurven laufen nach **60 Tagen** ab, danach müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen verfallen nach **15 Tagen**, danach müssen die Positive Control und die Negative Control zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

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

- eine neue Reagenziencharge verwendet wird,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) außerhalb der Spezifikation liegen,
- eine größere Wartungs- oder Instandhaltungsmaßnahme am 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 BEI ELITe InGenius

Die Verwendung des **VZV ELITe MGB® Kit** mit dem System **ELITe InGenius** besteht aus drei Schritten:

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

Prüfung der Systembereitschaft

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

- **ELITe InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen;
- prüfen, ob die Kalibratoren (**VZV Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **VZV Q - PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Amplifikationskalibratoren für die Charge **VZV Q - PCR Mix** verfügbar sind, die Amplifikationskalibratoren wie unten beschrieben durchführen,
- bestätigen, dass die Amplifikationskontrollen (**VZV - Positive Control**, **VZV Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **VZV Q - PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kontrollen für die Charge **VZV Q - PCR Mix** verfügbar sind, die Amplifikationskontrollen wie unten beschrieben durchführen.
- 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 Protocols verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits und dem Gerät ELITe InGenius sowie den genannten Matrices validiert.

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

Assay-Protokoll für VZV ELITe MGB Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
VZV ELITe_WB_200_100	Vollblut	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl
VZV ELITe_PL_200_100	Plasma	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

Assay-Protokoll für VZV ELITe MGB Kit			
Name	Matrix	Maßeinheit	Eigenschaften
VZV ELITe_CSF_200_100	Liquor	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Eluatvolumen: 100 µl Internal Control: 10 µl Sonifikation: KEINE Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 20 µl

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

Einrichtung des Laufs

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

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

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

Hinweis: ELITe InGenius kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, das das Laden der Laufinformationen ermöglicht. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

Die wichtigsten Schritte für die Einrichtung der vier Durchlaufstypen sind nachfolgend 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:

1. Die Proben bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen und gemäß den Laborrichtlinien und dem Abschnitt „Proben und Kontrollen“ handhaben.
2. Die benötigten VZV Q - PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

3. Die CPE-Röhrchen für den Lauf auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
6. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
7. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. VZV ELITe_PL_200_100).
8. Sicherstellen, dass unter „Protocol“ (Protokoll) Folgendes angezeigt wird: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
9. Die Proben-Ladepositionen in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) auswählen:
 - wird ein Primärröhrchen verwendet, „Primary Tube“ (Primärröhrchen) auswählen.
 - wird ein Sekundärröhrchen verwendet, „Extraction Tube“ (Extraktionsröhrchen) auswählen.
 Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
10. CPE und VZV Q-PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladefliste) auf den „Inventory Block“ (Bestandsblock) laden und die Chargennummer, das Ablaufdatum und die Anzahl der Reaktionen

für jedes Röhrchen eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

11. Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
12. Die „**PCR Cassettes**“ (PCR-Kassetten), 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.
13. Die Gerätetür schließen.
14. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: 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 beginnend mit den eluierten Proben die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

1. Falls erforderlich die extrahierten Nukleinsäureproben auf Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen.
2. Die benötigten VZV Q - PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Für jede relevante Spur unter „SampleID“ (SID) die Proben-ID eingeben oder den Proben-Barcode einscannen.
6. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. VZV ELITe_PL_200_100).
7. In der Spalte „Protocol“ (Protokoll) „PCR Only“ (nur PCR) auswählen.
8. Sicherstellen, dass die Ladeposition der eluierten Probe in der Spalte „Sample Position“ (Probenposition) „ExtraTube (bottom row)“ (Zusatzröhrchen (untere Reihe)) lautet. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
9. VZV Q-PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladefliste) auf den „Inventory Block“ (Bestandsblock) laden und die Chargennummer, das Ablaufdatum und die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
10. Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11. Die „**PCR Cassettes**“ (PCR-Kassetten) und die extrahierten Nukleinsäureproben gemäß den Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche laden. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Gerätetür schließen.
13. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

Hinweis: 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 Amplifikation die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

1. Die benötigten VZV Q - PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für die Vorbereitung von 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

2. VZV Q - PCR Standard-Röhrchen auftauen (Cal1: VZV Q - PCR Standards 10², Cal2: VZV Q - PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q - PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q - PCR Standards 10⁵) 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Eluatvolumen 100 µl beträgt.
5. Die Spur zuweisen, das Assay-Protokoll „VZV ELITe_STD“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Reagenzien-Chargennummer und das Ablaufdatum eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
6. Den VZV Q-PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladefliste) auf den „Inventory Block“ (Bestandsblock) laden und die Chargennummer, das Ablaufdatum und die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
7. Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8. Die **Kalibratorröhrchen** und die PCR-Kassetten („PCR Cassettes“) auf das Gerät laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren. Darauf achten, dass die PCR Standard-Röhrchen in die richtigen Spuren eingesetzt werden, wie auf der grafischen Benutzeroberfläche angegeben.
9. Die Gerätetür schließen.
10. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Wenn das System im Leerlauf ist, kann die Tür geöffnet (Laufende) und das Verbrauchsmaterial aus dem Gerät entfernt werden.

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

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

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

Hinweis: 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. Die benötigten VZV Q - PCR Mix-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

2. Das Produkt „VZV - 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. Die VZV Negative Control vorbereiten: dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen überführen, das im Lieferumfang des **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** enthalten ist.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Für die Positive Control die Spur zuweisen, das Assay-Protokoll „HPV PLUS ELITe_PC“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Reagenzien-Chargennummer und das Verfallsdatum eingeben.
6. Für die Negative Control die Spur zuweisen, das Assay-Protokoll „VZV ELITe_NC“ in der Spalte „Assay“ auswählen und die Reagenzien-Chargennummer und das Ablaufdatum eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
7. VZV Q-PCR Mix gemäß der „Load List“ (Ladefliste) auf den ausgewählten „Inventory Block“ (Bestandsblock) laden und die Chargennummer, das Ablaufdatum und die Anzahl der Reaktionen für jedes Röhrchen eingeben. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8. Die Spitzen in den „Tip Racks“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
9. Die **PCR Cassette** (PCR-Kassette), das **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.
10. Die Gerätetür schließen.
11. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

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

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

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

Hinweis: Der PCR Mix kann 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

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

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

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

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

ELITe InGenius generiert die Ergebnisse mithilfe des **VZV ELITe MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

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

A. Validierung der Kalibrationskurve

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

Die für die PCR-Reagenziencharge spezifische Kalibrationskurve wird in der Datenbank („Controls“) gespeichert. Sie können vom „Administrator“ oder „Analyst“ unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche angezeigt und genehmigt werden.

Die Ergebnisse der Kalibrationskurve laufen **nach 60 Tagen** ab.

Vor der Analyse einer Probe ist es unbedingt erforderlich zu prüfen, dass die Kalibrationskurve für die PCR-Reagenziencharge genehmigt und gültig ist. Der Status der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control für jede PCR-Reagenziencharge wird im Modul „Controls“ angezeigt. Wenn die Ergebnisse der Positive Control und/oder Negative Control fehlen oder abgelaufen sind, führen Sie die Kontrolle(n) wie oben beschrieben aus.

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

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

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

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

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

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

Vor der Analyse einer Probe ist es unbedingt erforderlich zu prüfen, dass die Ergebnisse der Positive Control und Negative Control für die PCR-Reagenziencharge genehmigt und gültig sind. Der Status der Ergebnisse der Positive Control und Negative Control für jede PCR-Reagenziencharge wird im Modul „Controls“ angezeigt. Wenn die Ergebnisse der Positive Control und/oder Negative Control fehlen oder abgelaufen sind, so sind sie wie oben beschrieben zu generieren.

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

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

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

C. Validierung der Probenergebnisse

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

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

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

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

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

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

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

Als „VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ“ (VZV: DNA nachgewiesen, Menge über ULoQ)

ausgegebene Proben sind für die Quantifizierung nicht geeignet. Die Konzentration der in der Probe nachgewiesenen VZV-DNA liegt über dem Niveau, bei dem sie präzise quantifizierbar ist. Die Probe kann vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt und erneut getestet werden, um Ergebnisse innerhalb des linearen Assay-Bereichs zu erzielen.

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

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

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

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

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

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

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

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

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

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

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

ELITe BeGenius

PROBEN UND KONTROLLEN

Proben

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

In EDTA entnommenes Vollblut

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

Es wird empfohlen, die einzufrierenden Proben in Aliquote aufzuteilen, um wiederholten Gefrier- und Auftauzyklen vorzubeugen. Bei Verwendung von gefrorenen Proben müssen die Proben direkt 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 **VZV ELITe_Be_WB_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen 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 Vollblut mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **VZV ELITe_Be_PL_200_100** zu verwenden. Dieses Protokoll verarbeitet 200 µl Probe, fügt die **CPE Internal Control** bei 10 µl/Extraktion hinzu und eluiert die Nukleinsäuren in 100 µl.

Bei Verwendung des Primärröhrchens variiert das Probenvolumen je nach Typ des geladenen Röhrchens. Weitere Informationen 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 RNA-Extraktion aus Liquor mit dem **ELITe BeGenius** und der **ELITe BeGenius Software**, Version **2.0.0** (oder entsprechende spätere Versionen) durchgeführt, ist das Extraktionsprotokoll **VZV 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.

Andere Proben:

Momentan liegen keine Daten zur Produktleistung mit anderen klinischen Proben, wie z. B. Abstriche von mukokutanen Läsionen und Fruchtwasser, vor.

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

Für jede Charge des PCR-Reagenzes muss eine Reagenzvalidierung erstellt und genehmigt werden.

- Verwenden Sie für das Kalibratorset die vier Konzentrationen des **VZV ELITe Standard** mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_Be_STD** für **ELITe BeGenius**,
- Verwenden Sie für die Positive Control die **VZV - ELITe Positive Control** mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_Be_PC** für **ELITe BeGenius**,
- Verwenden Sie für die Negative Control hochreines Wasser (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **VZV ELITe_Be_NC** für **ELITe BeGenius**,

Hinweis: **ELITe BeGenius** ermöglicht die Erstellung und Speicherung der PCR-Kalibration und der Validierung der Kontrollen für jede PCR-Reagenziencharge.

Die Ergebnisse der Kalibrationskurven laufen nach **60 Tagen** ab, danach müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

Die Ergebnisse der Amplifikationskontrollen laufen nach **15 Tagen** ab, danach müssen die Q-PCR Standards zusammen mit der Amplifikationsreagenziencharge erneut verarbeitet werden.

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

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTS035PLD

- eine neue Reagenziencharge verwendet wird,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) außerhalb der Spezifikation liegen,
- eine größere Wartung wird am Gerät durchgeführt.

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN BEI ELITe BeGenius

Der Gebrauch des **VZV ELITe MGB Kit** mit **ELITe BeGenius** 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 BeGenius** einschalten und den Modus „CLOSED“ (geschlossen) auswählen;
- Prüfen, ob die Amplifikationskalibratoren (**VZV Q-PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **VZV Q-PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **VZV Q-PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie unten beschrieben durchführen,
- Bestätigen, dass die Amplifikationskontrollen (**VZV Positive Control**, **VZV Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **VZV Q-PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Amplifikationskontrollen für die Charge **VZV Q-PCR Mix** verfügbar sind, die Kontrollen wie unten beschrieben durchführen,
- Den Typ des Laufs auswählen, die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von ELITechGroup S.p.A. bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden. Diese IVD-Protokolle wurden speziell mit ELITe MGB Kits, dem Gerät **ELITe BeGenius** sowie den genannten Matrices validiert.

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

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

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTS035PLD

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

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

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

Hinweis: **ELITe BeGenius** kann mit dem Laborinformationssystem (LIS, Laboratory Information System) verbunden werden, das das Laden der Laufinformationen ermöglicht. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.

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

A. Integrierter Lauf (Extraktion + PCR)

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

1. Die benötigten Proben bestimmen und gemäß den Laborrichtlinien und dem Abschnitt „Proben und Kontrollen“ handhaben.
2. Die benötigten **VZV Q-PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, dann den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

3. Die benötigten CPE-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 12 Extraktionen. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
4. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
5. Die Racks aus der „Kühleinheit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
6. Den Laufmodus wählen: „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR).
7. Die Proben in das „**Sample Rack**“ (Probenrack) laden.

Hinweis: Wenn als Sekundärröhrchen „**2 mL Tube**“ (2-ml-Röhrchen) geladen werden, verwenden Sie die blauen Adapter für das „**Sample Rack**“.

8. Das „**Sample Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) einsetzen, beginnend mit „Lane 5“ (L5) (Spur 5); dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
9. Falls erforderlich unter „Sample ID“ (SID) die Proben-ID für jede verwendete „Position“ eingeben.

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

10. Sicherstellen, dass das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“) 200 µl und das extrahierte Elutionsvolumen („Extraction Elution Volume“) 100 µl beträgt.
11. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (d. h. **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
12. Die Elutionsröhrchen („**Elution tubes**“) in das Elutionsrack („**Elution Rack**“) laden.

Hinweis: Elutionsröhrchen können zur Verbesserung der Rückverfolgbarkeit mit einem Barcode etikettiert werden.

13. Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3); dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
14. **CPE** und **VZV Q-PCR Mix** in das „**Reagent/Elution Rack**“ (Reagenz-/Elutionsrack) laden.

15. Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) einsetzen; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
16. Falls erforderlich für jedes PCR-Mix-Reagenz unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
17. Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
18. Den PCR-Korb („**PCR Basket**“) mit PCR-Kassette („**PCR Cassette**“) in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
19. Den Korb mit den **ELITe InGenius SP 200** Extraktionskartuschen („**Extraction Basket**“) und den für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
20. Die Gerätetür schließen.
21. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die **PCR-Kassette** und die Verbrauchsmaterialien gemäß den gesetzlichen Umweltbestimmungen 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 in der Kühleinheit des Geräts verbleiben. Vor Beginn eines neuen Laufs den Inhalt vorsichtig mischen und 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

B. Amplifikationslauf (nur PCR)

Gehen Sie zum Einrichten des Amplifikationslaufs mit eluierten Proben wie folgt vor und führen Sie unter Befolgung der Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche die folgenden Schritte durch:

1. Falls erforderlich die Proben auf Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Vorsichtig mischen, dann den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Die benötigten **VZV Q - PCR Mix-Röhrchen** 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

3. Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
4. Die „**Racks**“ aus Spur 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ (Kühleinheit) entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
5. Den Laufmodus „Run mode: PCR Only“ (nur PCR) wählen.
6. Die Proben in das Elutionsrack („**Elution Rack**“) laden.
7. Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3); dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen.
8. Falls erforderlich, für jede „Position“ die Proben-ID („Sample ID“), die Probenmatrix („Sample Matrix“), das Extraktionskit („Extraction Kit“) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted eluate vol.“) eingeben.
9. Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 200 µl und das „Extraction Elution Volume“ (extrahierte Elutionsvolumen) 100 µl betragen, auch wenn keine Extraktion durchgeführt wird.
10. Das zu verwendende Assay-Protokoll in der Spalte „Assay“ auswählen (z. B. **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11. **VZV Q-PCR Mix** in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) laden.
12. Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) einsetzen; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

13. Falls erforderlich für jedes PCR-Mix-Reagenz unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
14. Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
15. Den PCR-Korb („**PCR Basket**“) mit PCR-Kassette („**PCR Cassette**“) in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
16. Die Gerätetür schließen.
17. Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

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

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die **PCR-Kassetten** und Verbrauchsmaterialien gemäß den gesetzlichen Umweltbestimmungen 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 in der Kühleinheit des Geräts verbleiben. Vor Beginn eines neuen Laufs den Inhalt vorsichtig mischen und 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

C. Kalibrationslauf (nur PCR)

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

1. Die **VZV Q - PCR Standards** auftauen (Cal1: VZV Q-PCR Standards 10², Cal2: VZV Q-PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q-PCR Standards 10⁵) 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C). Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Läufe. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
2. Die benötigten **VZV Q-PCR Mix-Röhrchen** 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, dann den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

1. Die „**Racks**“ aus Spur 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ (Kühleinheit) entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
2. Den Laufmodus „Run mode: PCR Only“ (nur PCR) wählen.
3. Die Kalibratorstandards in das Elutionsrack („**Elution Rack**“) laden.
4. Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3); dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
5. Falls erforderlich für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
6. Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
7. Das zu verwendende Assay-Protokoll der Spalte „Assay“ auswählen (**VZV ELITe_Be_STD**). Auf die Schaltfläche „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.
8. **VZV Q-PCR Mix** in das „**Reagent/Elution Rack**“ (Reagenz-/Elutionsrack) laden.
9. Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) einsetzen; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
10. Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11. Den PCR-Korb („**PCR Basket**“) mit PCR-Kassette („**PCR Cassette**“) in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

- Die Gerätetür schließen.
- Auf „Start“ drücken, um den Lauf zu starten.

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

Hinweis: Am Ende des Laufs 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 Q-PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden in der Kühleinheit des Geräts verbleiben. Vor Beginn eines neuen Laufs den Inhalt vorsichtig mischen und 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

D. Amplifikationslauf für die Positive Control und Negative Control [PCR Only (nur PCR)]

Zum Einrichten des Amplifikationslaufs für die Positive Control und Negative Control die folgenden Schritte unter Beachtung der grafischen Benutzeroberfläche ausführen:

- Das **VZV - ELITe Positive Control**-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 4 Reaktionen. Vorsichtig mischen, dann den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.
- Für den Lauf mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (wie Negative Control) in ein Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** enthalten) überführen.
- Die benötigten **VZV Q-PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur (~+25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für 24 Reaktionen unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, dann den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

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

- Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
- Die „**Racks**“ aus Spur 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ (Kühleinheit) entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
- Den Laufmodus „Run mode: PCR Only“ (nur PCR) wählen.
- Die Röhrchen für die Positive Control und Negative Control in das Elutionsrack („**Elution Rack**“) laden.
- Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ einsetzen, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3); dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
- Falls erforderlich für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
- Selbst wenn keine Extraktion durchgeführt wird, das Extraktionseingangsvolumen („Extraction Input Volume“, 200 µl) und das extrahierte Eluatvolumen („Extracted Eluate Volume“, 100 µl) kontrollieren.
- Das zu verwendende Assay-Protokoll **VZV ELITe_Be_PC** und **VZV ELITe_Be_NC** in der Spalte „Assay“ auswählen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
- VZV Q-PCR Mix** in das „**Reagent/Elution Rack**“ (Reagenz-/Elutionsrack) laden.
- Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ (Kühleinheit) in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) einsetzen; dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
- Die Spitzen in den „**Tip Racks**“ (Spitzenständer) im „Inventory Area“ (Bestandsbereich) überprüfen und Spitzenständer ggf. austauschen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.

- Den PCR-Korb („**PCR Basket**“) mit PCR-Kassette („**PCR Cassette**“) in den Bestandsbereich laden; hierzu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche befolgen. Auf „Next“ (Weiter) klicken, um mit der Einrichtung fortzufahren.

- Die Gerätetür schließen.

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

Nach Beendigung des Laufs ermöglicht **ELITe BeGenius** es den Benutzern, 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. Die übrige Negative Control muss entsorgt werden.

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

Hinweis: Der Q-PCR Mix kann für 5 unabhängige Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden oder für bis zu 3 aufeinander folgende Arbeitsläufe von jeweils 3 Stunden in der Kühleinheit des Geräts verbleiben. Vor Beginn eines neuen Laufs den Inhalt vorsichtig mischen und 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren.

Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

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

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

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

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

**LEISTUNGSMERKMALE
ELITe InGenius und ELITe BeGenius**

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze (LoD)

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

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von zirka 10 Kopien/20 µl bei Vorhandensein von Plasmid-DNA verdünnt. Diese enthielt die Internal Control mit einem Titer von 150.000 Kopien /20 µl. 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.

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

Die Nachweisgrenze (LoD) des VZV ELITe MGB Kit wurde in Kombination mit in EDTA entnommenen **Plasma-** und **Vollblutproben** 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 117 Kopien/ml dotierten Vollblutproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben wurden mit dem zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Art.-Nr. 954530)) dotiert.

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

Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	100 Kopien/ml	20	20	20	0

Nachweisgrenze bei Vollblutproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Vollblut	100 Kopien/ml	20	20	20	0

Der LoD-Wert der VZV-Zielsequenz wurde für in EDTA entnommenes Vollblut bei 100 Kopien/ml bestätigt.

Bei Plasma:

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 69 Kopien/ml dotierten Plasmaproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben wurden mit dem zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Art.-Nr. 954530)) dotiert.

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

Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Plasma	69 Kopien/ml	20	20	20	0

Nachweisgrenze bei Plasmaproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
In EDTA entnommenes Plasma	69 Kopien/ml	20	20	20	0

Der LoD-Wert der VZV-Zielsequenz wurde für in EDTA entnommenes Plasma bei 69 Kopien/ml bestätigt.

Bei Liquor:

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde durch Testen von 20 Wiederholungen bei auf 69 Kopien/ml dotierten Liquorproben auf den Systemen **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** im Modus „Extract + PCR“ (Extraktion + PCR) verifiziert. Die Proben wurden mit dem zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Zeptomatrix for Varicella Zoster Virus DNA (Art.-Nr. 954530)) dotiert.

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

Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITe InGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
Liquor	69 Kopien/ml	20	20	19	1

Nachweisgrenze bei Liquorproben und ELITe BeGenius					
Probe	LoD	Anzahl	Gültig	Positiv	Negativ
Liquor	69 Kopien/ml	20	20	20	0

Der LoD-Wert der VZV-Zielsequenz wurde für Liquor bei 69 Kopien/ml bestätigt.

Linearer Messbereich und Bestimmungsgrenzen

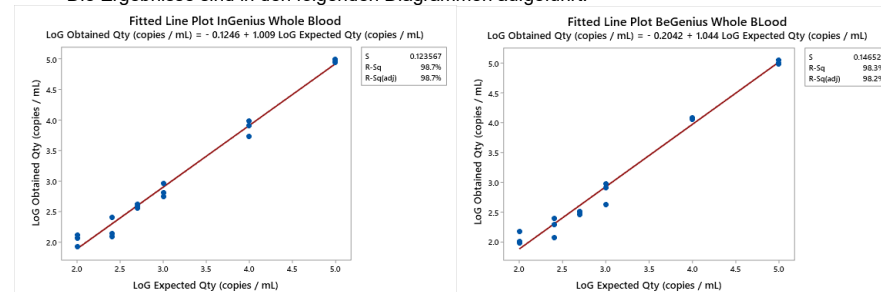
Der lineare Messbereich des VZV ELITe MGB Kits, das zusammen mit in EDTA entnommenem **Vollblut** und **Plasma** und **Liquor** und **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** mit einer Reihe von VZV-Verdünnungen verifiziert. Die Reihe wurde unter Verwendung von zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Acrometrix and Zeptomatrix for Varicella Zoster Virus DNA) in VZV-DNA-negativen Matrices vorbereitet.

Bei Vollblut:

Die Reihe bestand aus sechs Verdünnungspunkten von 1 x 10⁵ Kopien/ml bis zirka 1 x 10² Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde eine mit Referenzmaterial vorbereitete Reihe (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) verwendet.

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 0,987 bei **ELITe InGenius** und 0,983 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.

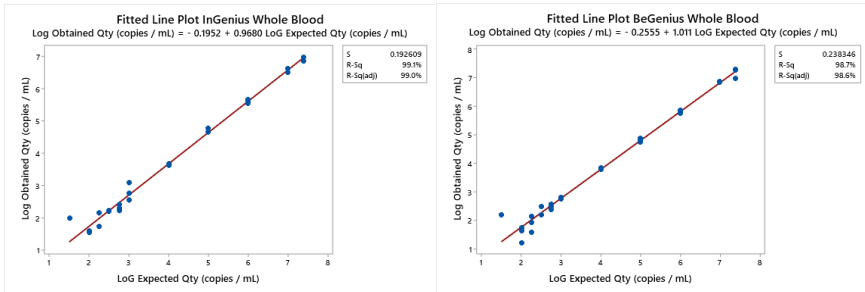


Der lineare Messbereich des VZV ELITe MGB Kits, der in Verbindung mit Vollblut sowie ELITe InGenius und ELITe BeGenius verwendet wird, wurde über einen breiteren Konzentrationsbereich getestet. Hierfür wurde eine durch Verdünnen einer das VZV-Amplifikationsprodukt enthaltenden Plasmid-DNA eine Reihe in VZV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten (1 log-Verdünnungsschritt) von 2,5 x 10⁷ bis 100 Kopien/ml bei Vollblut. 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 0,991 bei **ELITe InGenius** und 0,987 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTS035PLD



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2215 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,3219 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,1038 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2149 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 100 Kopien/ml.

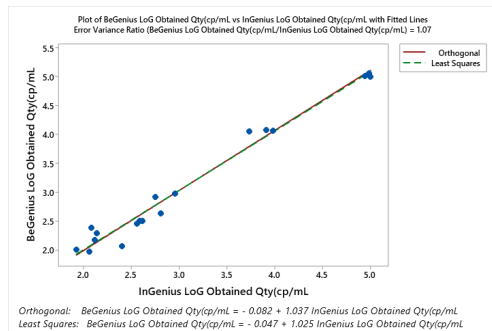
Die obere Nachweisgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0626 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,1790 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,4509 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2062 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Vollblutproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
Kopien/ml	100	25.000.000

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



In diesem Test wurde die orthogonale Regressionsanalyse durchgeführt und ergab einen Achsenabschnitt von -0,082 (95%-KI: -0,3286 bis 0,1652) und eine Steigung von 1,037 (95%-KI: 0,9608 bis 1,1126). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,978.

Bei Plasma:

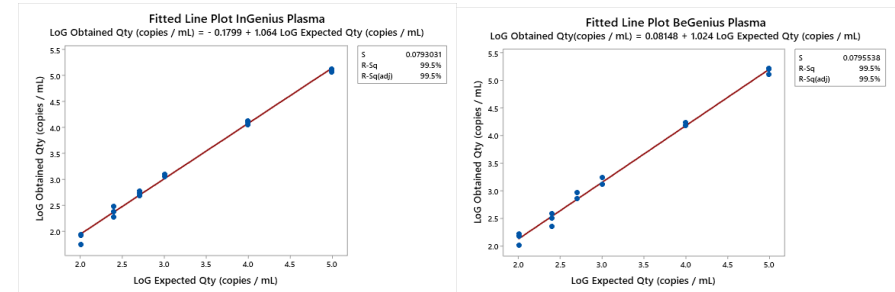
Die Reihe bestand aus sechs Verdünnungspunkten von 1×10^5 Kopien/ml bis zirka 1×10^2 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde eine mit Referenzmaterial vorbereitete Reihe (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) verwendet.

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in
Echtzeit

REF RTS035PLD

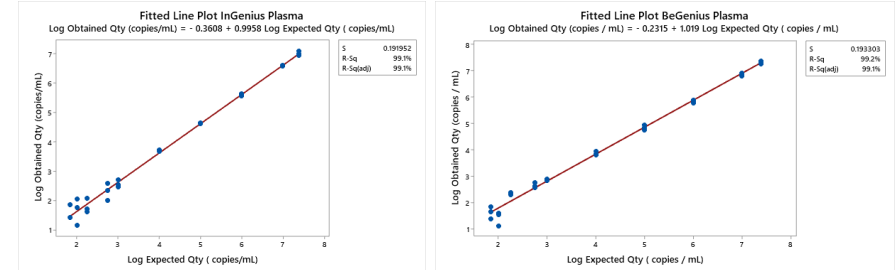
Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regressionsanalyse ergab, dass der Assay zusammen mit Plasmaproben bei allen Verdünnungen mit einem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R2) eine lineare Reaktion von 0,995 bei **ELITe InGenius** und 0,995 bei **ELITe BeGenius** aufweist.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen aufgeführt.



Der lineare Messbereich des VZV ELITe MGB Kits, der in Verbindung mit Plasma sowie ELITe InGenius und ELITe BeGenius verwendet wird, wurde über einen breiteren Konzentrationsbereich getestet. Hierfür wurde eine durch Verdünnen einer das VZV-Amplifikationsprodukt enthaltenden Plasmid-DNA eine Reihe in VZV-DNA-negativer Matrix angesetzt. Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten (1 log-Verdünnungsschritt) von $2,5 \times 10^7$ bis 69 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 3 Wiederholungen getestet.

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



Die untere Quantifizierungsgrenze (LLoQ) wurde festgesetzt auf die LoD-Konzentration, bei der präzise (Standardabweichung = 0,2005 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2048 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,1384 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2513 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 69 Kopien/ml.

Die obere Nachweisgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,0831 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0444 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,3828 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0775 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 25.000.000 Kopien/ml.

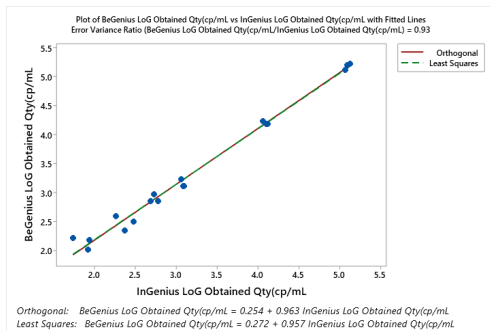
Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Linearer Messbereich für Plasmaproben und ELITe InGenius und ELITe BeGenius		
Maßeinheit	Untere Grenze	Obere Grenze
Kopien/ml	69	25.000.000

Zur Berechnung der Korrelation zwischen den Methoden wurden die mit **ELITe InGenius** und **ELITe**

BeGenius erhaltenen Ergebnisse mittels orthogonaler und linearer Regression analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



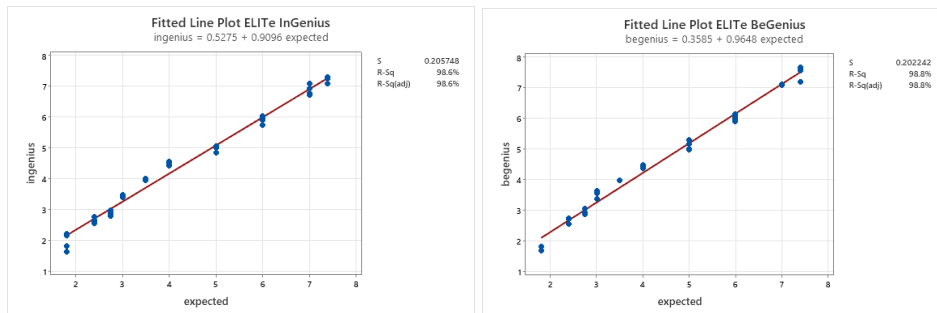
In diesem Test wurde die orthogonale Regressionsanalyse durchgeführt und ergab einen Achsenabschnitt von 0,254 (95%-KI: 0,082 bis 0,425) und eine Steigung von 0,963 (95%-KI: 0,912 bis 1,013). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,989.

Bei Liquor:

Die Reihe bestand aus zehn Verdünnungspunkten von $2,5 \times 10^7$ bis 69 Kopien/ml. Jede Probe der Reihe wurde in 4 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde eine mit Referenzmaterial (Zeptomatrix, Varicella Zooster Varicella Zoster Virus (VZV) Strain: Ellen Culture Fluid (1 mL), (0810171CF))vorbereitete Reihe verwendet.

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 0,986 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 = 0,2816 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0787 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung = 0,1127 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0902 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) quantitative Ergebnisse ausgegeben werden: 69 Kopien/ml.

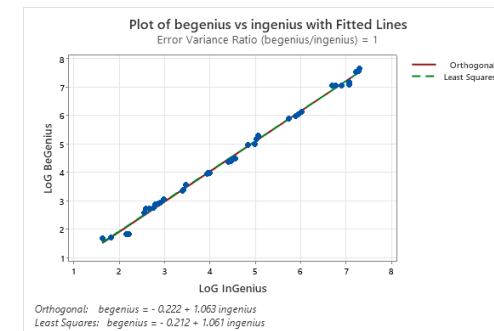
Die obere Nachweisgrenze (ULOQ) wurde auf die höchste getestete Konzentration festgesetzt, bei der präzise (Standardabweichung = 0,1005 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,2102 log Kopien/ml bei **ELITe BeGenius**) und genaue (systematische Messabweichung bis 0,1803 log Kopien/ml bei **ELITe InGenius** und 0,0936 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
Kopien/ml	69	25.000.000

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



In diesem Test wurde die orthogonale Regressionsanalyse durchgeführt und ergab einen Achsenabschnitt von -0,222 (95%-KI: -0,3241 bis -0,1196) und eine Steigung von 1,063 (1,0847 bis 1,0847). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,996.

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der mit dem Produkt VZV 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 300 Kopien/ml) und von 10 x LoD (zirka 1000 Kopien/ml) mit zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Acromatrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) 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	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	n. a.:	-	24/24	23,76	0,38	1,58
3 x LoD	8/8	36,53	0,21	0,57				
10 x LoD	8/8	34,78	0,21	0,61				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe InGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-	48/48	23,85	0,48	2,01
3 x LoD	16/16	36,67	0,43	1,17				
10 x LoD	16/16	34,77	0,32	0,91				

Beim Test der Wiederholpräzision auf **ELITe InGenius** erkannte der Assay die VZV-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei VZV 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	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	27,33	0,60	2,21
3 x LoD	8/8	37,49	0,74	1,97				
10 x LoD	8/8	35,38	0,35	0,98				

Laufübergreifende Wiederholpräzision, ELITe BeGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/16	-	-	-	48/48	26,67	0,60	2,25
3 x LoD	16/16	37,32	0,69	1,84				
10 x LoD	16/16	35,39	0,31	0,87				

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

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision der mit dem Produkt VZV 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 300 Kopien/ml) und von 10 x LoD (zirka 1000 Kopien/ml) mit zertifiziertem VZV-Referenzmaterial (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) dotiert waren.

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

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

Die Ct-Werte der Zielsequenz und der Internal Control wurden zur Berechnung des VK % herangezogen, um die Vergleichspräzision als Ungenauigkeit zu bewerten.
Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision, ELITe InGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	22,76	0,61	2,69
3 x LoD	8/8	36,47	0,32	0,86				
10 x LoD	8/8	34,87	0,34	0,99				

Chargenübergreifende Wiederholpräzision, ELITe InGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	23,07	0,58	2,54
3 x LoD	8/8	36,78	0,27	0,75				
10 x LoD	8/8	35,06	0,31	0,88				

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

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

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

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

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Geräteübergreifende Wiederholpräzision, ELITe BeGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	26,22	0,67	2,55
3 x LoD	8/8	37,05	0,47	1,26				
10 x LoD	8/8	35,18	0,43	1,21				

Chargenübergreifende Wiederholpräzision, ELITe BeGenius								
Probe	VZV				Internal Control			
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %
Negativ	0/8	-	-	-	24/24	26,43	0,99	3,73
3 x LoD	8/8	37,11	0,45	1,21				
10 x LoD	8/8	35,05	0,36	1,03				

Beim Test der Vergleichspräzision auf **ELITe BeGenius** erkannte der Assay die VZV-Zielsequenz wie erwartet und wies Ct-Werte mit einem VK % unter 5 % bei VZV 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 VZV Molecular "Q" Panel (Qnostics, Ltd) 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	Nennititer Kopien/ml	Nennititer log ₁₀ Kopien/ml	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/ml
VZVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,138
VZVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	4,312
VZVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,340
VZVMQP01-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 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich), eine Reihe von VZV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration, 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 Konz. log ₁₀ Kopien/ml	Standardabweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ Kopien/ml
VZVDNA14-01	3,267	0,438	2/2	3,674
VZVDNA14-02	3,339	0,520	2/2	3,713
VZVDNA14-03	2,465	0,491	2/2	2,768
VZVDNA14-04	Negativ	-	0/2	nicht erkannt
VZVDNA14-05	2,716	0,377	2/2	3,317
VZVDNA14-06	1,980	0,411	½	1,994
VZVDNA14-07	Negativ	-	0/2	nicht erkannt
VZVDNA14-08	3,475	0,678	2/2	3,870
VZVDNA14-09	3,918	0,653	2/2	4,306
VZVDNA14-10	2,071	0,428	2/2	1,949

In Übereinstimmung mit den vom EQA-Konsensus definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben richtig als negativ und alle positiven Proben richtig als positiv erkannt. Die Probe VZV DNA14-06 ergab bei 2 Wiederholungen nur ein positives Ergebnis. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Proben-titer unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Sieben Proben wurden innerhalb des vom Studienkonsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung (SD) quantifiziert, eine Probe wurde innerhalb des vom Studienkonsensus definierten Bereichs ± 2 SD quantifiziert.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Vollblut und Plasma

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 28 in EDTA entnommene, VZV-DNA-negative Vollblutproben verwendet, die durch Hinzufügen einer VZV07-04-Probe aus dem „QCMD 2007 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, UK) mit einem Titer von 750 Kopien/ml mit VZV-DNA dotiert waren, sowie 30 in EDTA entnommene, VZV-DNA-negative Plasmaproben, die durch Hinzufügen von „VZV ELITe-IQC High Run Control“ (ELITech Group S.p.A.) mit einem Titer von 750 Kopien/ml mit VZV-DNA dotiert waren, verwendet.

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, VZV-DNA-dotiertes Vollblut	28	27	1
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

Alle Plasmaproben waren gültig und positiv.

Bei diesem Test betrug die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Plasmaproben 100 %.

Alle Vollblutproben waren gültig und 27 von 28 Proben wurden als positiv bestätigt. Eine Vollblutprobe fiel negativ aus; diese abweichende Probe stand nicht mehr für Diskrepanzanalysen zur Verfügung.

Bei diesem Test betrug die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Vollblutproben 96,4 %.

Liquor

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

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet mithilfe von 20 VZV-DNA-negativen Liquorproben, die durch Hinzufügen von „VZV ELITe-IQC High Run Control“ (ELITech Group S.p.A.) mit einem Titer von 750 Kopien/ml mit VZV-DNA dotiert waren.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
VZV-DNA-dotierter Liquor	20	20	0

Alle Liquorproben waren gültig und positiv.

Bei diesem Test betrug die diagnostische Sensitivität des Assays 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Vollblut und Plasma

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 34 in EDTA entnommene Vollblutproben von gesunden, vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern und 30 in EDTA entnommene Plasmaproben von gesunden, vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern bewertet.

Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion, Amplifikation,

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS035PLD

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, VZV-DNA-negatives Vollblut	34	0	34
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-negatives Plasma	30	0	30

Alle Vollblut- und Plasmaproben waren gültig und negativ.

Bei diesem Test betrug die diagnostische Spezifität des Assays für beide Matrices 100 %.

Liquor

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 22 Liquorproben von gesunden, vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern verwendet.

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
VZV-DNA-negativer Liquor	22	0	22

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

Der Ct-Grenzwert für die Internal Control (IC Ct) wurde für jede validierte Matrix auf 35 festgelegt. T

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 und in EDTA entnommenes Plasma.

Liquor

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

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Liquor mit **ELITe STAR** und der **Softwareversion 3.4.13** (oder entsprechende spätere Versionen) durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **UUNI_E100S200_ELI**, das 200 µl Probenvolumen verwendet und den Extrakt in 100 µl eluiert (tatsächlich erfolgt die Elution in 115 µl, wovon 100 µl aufgefangen werden). Proben in Primärrohrchen 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

VZV ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Amplifikation in Echtzeit

REF RTS035PLD

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 Primärrohrchen 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, den Streifen auf das Gerät laden und die Extraktion ausführen. Nach der 10-minütigen Inkubation **5 µl CPE** als Internal Control hinzufügen, anschließend mithilfe der Mehrkanalpipette das **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** unter Anwendung des Programms Nr. 3 zum Streifeninhalt hinzufügen und mit der Extraktion fortfahren. Die DNA in **100 µl** Elutionspuffer eluieren.

In EDTA entnommenes Vollblut

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

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut (zelluläre Probe) mit dem Kit **EXTRAblood** durchführen, befolgen Sie bitte die Gebrauchsanweisung: Beginnen Sie ab **200 µl** Probenvolumen (nicht mehr als 2 Millionen Zellen) und fangen Sie die DNA mit **100 µl** Elutionspuffer auf.

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 Primärrohrchen 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 Primärrohrchen können direkt auf **ELITe GALAXY** geladen werden. Für jede Probe ist immer ein Mindestvolumen von 400–650 µl, je nach Röhrchentyp, erforderlich. **10 µl/Probe von CPE** hinzufügen. Der CPE muss wie in der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits angegeben zur **IC + Trägerlösung** gegeben werden. Informationen zum Extraktionsverfahren sind der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits zu entnehmen.

In EDTA entnommenes Plasma

Die Plasmaproben für die Nukleinsäureextraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen werden. Außerdem dürfen sie maximal 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 Primärrohrchen 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 Primärrohrröhrchen 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 befolgen Sie diese Anweisungen: **500 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, **5 µl CPE** für die interne Kontrolle hinzufügen, anschließend das **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** hinzufügen. Die DNA in **100 µl** Elutionspuffer eluieren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Plasma mit dem Gerät **QIASymphony® SP/AS** und dem Kit **QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit** mit der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll „**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**“ und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärrohrröhrchen 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 zu Produktleistungen mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Abstriche von mukokutanen Läsionen, 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, jeden Amplifikationslauf mit einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle zu validieren.

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

Für die Positive Control das Produkt **VZV - ELITe Positive Control** oder das Produkt **VZV ELITe Standard** verwenden.

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

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

- Vor Beginn des Laufs gemäß der Gerätedokumentation muss Folgendes durchgeführt werden:
- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen und einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen;
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die VZV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „VZV“ nennen.
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die Internal Control so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung 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.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	102	103	104	105							

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 (45 Zyklen)	94 °C	10 s
	60 °C (Fluoreszenzerfassung)	30 s
	72 °C	20 s
Dissoziation (optional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

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

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

- Echtzeit-Thermocycler einschalten, Computer einschalten, dedizierte Software ausführen, einen Lauf für die „absolute Quantifizierung“ öffnen und „Run mode: Fast 7500“ (Laufmodus: Fast 7500) einstellen;
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die VZV-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „VZV“ 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 (45 Zyklen)	94 °C	10 s
	60 °C (Datenerfassung)	30 s
	72 °C	20 s
Dissoziation (optional)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min
	80 °C	15 s
Dissoziation (optional)	60 °C	15 s

Einrichten der Amplifikation

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

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

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

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

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

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

- Wenn ein **qualitatives** Analyseergebnis benötigt wird (Nachweis von VZV-DNA): **20 µl VZV - 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 **VZV - Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

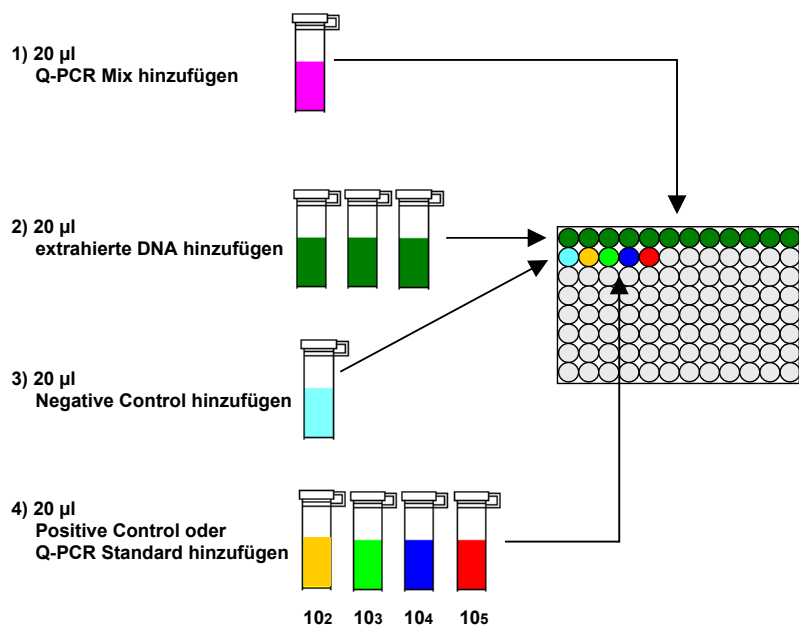
- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis der Analyse benötigt wird (Quantifizierung von VZV-DNA): **20 µl VZV Q - PCR Standard 102** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-**

Mikrotiterplatte mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **VZV Q - PCR Standard 102** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den **VZV Q - PCR Standards 103, 104, 105** auf die gleiche Weise verfahren.

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

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

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



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

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

Qualitative Analyse der Ergebnisse

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

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

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

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei VZV **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 VZV-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 105 (Ct ≤ 25)** beachten.

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

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negativkontrolle** bei VZV **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 VZV 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 DNA-bindenden Hauptprotein (ORF29)-Gens von VZV in der Amplifikationsreaktion nachzuweisen, die den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (Nachweisgrenze für das Produkt, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“).

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

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion einer Probe **Ct Undetermined** (Ct unbestimmt) bei VZV und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass die VZV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der VZV-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 VZV-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der internen Kontrolle „Ct > 35“ oder „Ct Undetermined“ (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der Internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei VZV-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 VZV die Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) für den Amplifikationslauf sowie die Validierung der Amplifikation und Detektion, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

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

Dieses Produkt ist in der Lage, zwischen 1.000.000 und 10 Kopien der DNA des DNA-bindenden Hauptprotein-Gens (ORF29) von VZV in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich des Produkts, siehe „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

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

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

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

Dabei ist:

Vc die Menge der bei der Extraktion verwendeten Probe, ausgedrückt in der 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 **EXTRAblood** zusammen mit in EDTA entnommenen Vollblutproben verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml ausgegeben** werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und EXTRAblood
Nc (gEq/ml) = 25 x 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:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma, Liquor und ELITe STAR
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 28 \times \text{Menge}$

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:

Vereinfachte Formel für Vollblut, Plasma, Liquor und ELITe GALAXY
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 35 \times \text{Menge}$

Wird das Extraktionssystem **NucliSENS® easyMAG®** zusammen mit in EDTA entnommenen Liquor- oder Plasmabproben verwendet und muss das Ergebnis in **gEq/ml** ausgedrückt werden, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Liquor oder Plasma und NucliSENS® easyMAG®
$Nc \text{ (gEq/ml)} = 10 \times \text{Menge}$

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

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

Berechnung der Grenzen des linearen Messbereichs

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

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

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

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

Grenzen des linearen Messbereichs (gEq/ml) bei EXTRAblood
Untere Grenze (gEq/ml) = 25 x 10 gEq
Obere Grenze (gEq/ml) = 25 x 1.000.000 gEq
von 250 bis 25.000.000 gEq/ml

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

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei ELITe STAR
Untere Grenze (gEq/ml) = 28 x 10 gEq
Obere Grenze (gEq/ml) = 28 x 1.000.000 gEq
von 280 bis 28.000.000 gEq/ml

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

Messbereichsgrenzen (gEq/ml) bei ELITe GALAXY
Untere Grenze (gEq/ml) = 35 x 10 gEq
Obere Grenze (gEq/ml) = 35 x 1.000.000 gEq
von 350 bis 35.000.000 gEq/ml

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

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

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

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

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

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

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

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Vollblutproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von VZV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen von VZV07-12 aus dem „QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in VZV-DNA-negativem EDTA-Vollblut zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 gEq/ml und 562 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:

Nachweisgrenze für Vollblutproben und ELITe GALAXY (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	100 gEq/ml	64 gEq/ml	241 gEq/ml

Die analytische Sensitivität dieses Assays, der in Verbindung mit Plasmaproben und **ELITe GALAXY** verwendet wurde, wurde mit einer Reihe von VZV-Verdünnungen innerhalb der Grenzkonzentration verifiziert. Die Reihe wurde durch Verdünnen von VZV07-12 aus dem „QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel“, (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) in VZV-DNA-negativem EDTA-Plasma zubereitet. Die Viruskonzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 gEq/ml und 562 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:

Nachweisgrenze für Plasmaproben und ELITe GALAXY (gEq/ml)			
		95 %-Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
95 %-Positivität	69 gEq/ml	46 gEq/ml	164 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 des Assays als linearer Messbereich wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthält das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit den Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

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

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

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

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

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

Die linearen Messbereichsgrenzen 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 einer innerhalb ein und desselben Amplifikationslaufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 21,0 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit des Assays als die Differenz zwischen dem mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Amplifikationslaufs getesteten Probe erhaltenen Mittelwert der Ergebnisse und der theoretischen Konzentrationswert der Probe ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit (% Ungenauigkeit) von zirka 9,7 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

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

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit Reihe von zertifiziertem Referenzmaterial

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

Für die Durchführung der Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen von VZV, 98/4- und Ellen-Stämmen innerhalb der Grenzkonzentration als zertifiziertes und kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in EDTA-Vollblut resuspendiert und in Doppelbestimmungen verwendet, um die gesamte Analyse, Extraktion mit **EXTRAblood** und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchzuführen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit zertifiziertem Referenzmaterial und EXTRAblood				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standard-abweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
VZV10-01	2,047	0,593	2/2	1,748
VZV10-02	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
VZV10-03	1,844	1,140	2/2	1,569
VZV10-04	1,489	0,378	1/2	1,439
VZV10-05	HSV1	n. z.	0/2	nicht erkannt
VZV10-06	2,428	0,471	2/2	2,274
VZV10-07	2,149	0,648	2/2	2,070
VZV10-08	3,410	0,454	2/2	3,618
VZV10-09	0,964	0,729	1/2	1,687
VZV10-10	3,174	0,454	2/2	3,136

Alle Proben wurden richtig erkannt. Die Proben VZV10-04 (31 Kopien/ml) und VZV10-09 (9 Kopien/ml) ergaben in 2 Wiederholungen nur ein positives Ergebnis, ihre Konzentrationen liegen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des Produkts. Alle erhaltenen quantitativen Ergebnisse liegen innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung.

Für die Durchführung weiterer Tests wurde eine Reihe von Verdünnungen der VZV-Stämme 98/4 und Ellen innerhalb der Grenzkonzentration als kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in Doppelbestimmungen verwendet; dabei wurde das gesamte Verfahren 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 zertifiziertem Referenzmaterial und ELITe STAR				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standard-abweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
VZV12-01	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,535
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,564
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,267
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,854
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,349
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,129
VZV12-08	1,926	0,418	2/2	1,697
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	2,531
VZV12-10	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt

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

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und ELITe GALAXY				
Probe	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Standard-abweichung	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
VZV12-01	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,061
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,275
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,435
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,686
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,359
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,027
VZV12-08	1,926	0,418	1/2	1,860
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	1,957
VZV12-10	negativ	n. z.	0/2	nicht erkannt

In Übereinstimmung mit den vom Konsensus für kommerziell verfügbare Assays definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben richtig als negativ und alle positiven Proben als positiv erkannt. Die VZV12-08-Probe ergab bei 2 Wiederholungen nur ein positives Ergebnis; dies kann dadurch erklärt werden, dass der Proben-titer sehr nahe an der Nachweisgrenze lag. Alle erhaltenen quantitativen Ergebnisse liegen innerhalb des vom Konsensus definierten Bereichs ± 1 Standardabweichung.

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 DNA-bindende Hauptprotein-Gen (ORF29) von VZV verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Nachweis- und Quantifizierungseffizienz bei verschiedenen Genotypen/Subtypen wurde durch Testen einer Reihe zertifizierter Referenzmaterialien überprüft.

Für die Überprüfung der diagnostischen Sensitivität wurde eine Reihe aus VZV-DNA-positiven Proben von 98/4- und Ellen-Stämmen („QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich) als zertifiziertes und kalibriertes Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Abschnitt „Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit Reihe von zertifiziertem Referenzmaterial“ aufgeführt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 24 in EDTA entnommene Vollblutproben verwendet, die von vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern stammten („Biological Sample Library Europe S.A.S.“, Lyon, Frankreich) und durch Hinzufügen einer VZV03-10-Probe aus dem „QCMD 2010 Human Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) auf einen bekannten Titer

dotiert wurden. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **EXTRAblood** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Vollblut	24	24	0

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

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

Die diagnostische Sensitivität wurde bewertet anhand von 22 VZV-DNA-negativen Liquorproben, die durch Hinzufügen von VZV12-03 -Probe aus dem „QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren, 30 VZV-DNA-negativen, in EDTA entnommenen Vollblutproben und 30 VZV-DNA-negativen, in EDTA entnommenen Plasmaproben, die durch Hinzufügen von VZV07-06-Probe aus dem „QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren. 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
VZV-DNA-dotierter Liquor	22	22	0
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

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

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 20 VZV-DNA-negative Liquorproben, die durch Hinzufügen von VZV12-03 -Probe aus dem „QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren, 30 VZV-DNA-negative Proben von in EDTA entnommenem Plasma, die durch Hinzufügen von VZV07-06-Probe aus dem „QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren, und 30 VZV-DNA-negativen Proben von in EDTA entnommenem Vollblut, die durch Hinzufügen von VZV07-06-Probe aus dem „QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel“ (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren, verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
VZV-DNA-dotierter Liquor	20	20	0
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Plasma	30	29	0
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Vollblut	30	29	0

Eine Plasmaprobe und eine Vollblutprobe ergaben aufgrund eines Fehlers im Extraktionsschritt ein ungültiges Ergebnis und wurden nicht zur Berechnung der Sensitivität verwendet.

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 VZV, darunter die kompletten HSV1- und VZV-Genome, verfügbaren Sequenzen ergab, dass die humanen Herpesviren, die VZV am meisten ähneln, 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 Reihe zertifizierter Referenzmaterialien überprüft.

Für die Überprüfung der analytischen Spezifität wurde eine Reihe von Verdünnungen von HSV1 und VZV innerhalb der Grenzkonzentration als zertifiziertes und kalibriertes Referenzmaterial verwendet („QCMD 2009 Herpes Simplex virus DNA EQA Panel“, Qnostics Ltd., Vereinigtes Königreich). Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurden das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion mit **EXTRABlood** und die Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit zertifiziertem Referenzmaterial und EXTRABlood				
Probe	Inhalt	Konsensus für kommerziell verfügbare Assays Viruskonz. log ₁₀	Positiv / Wiederholungen	Mittlere Ergebnisse log ₁₀ gEq/ml
HSV09-01	HSV1	2,215	0/2	nicht erkannt
HSV09-02	HSV2	2,236	0/2	nicht erkannt
HSV09-03	HSV2	3,293	0/2	nicht erkannt
HSV09-04	HSV2	2,314	0/2	nicht erkannt
HSV09-05	VZV	-	2/2	4,939
HSV09-06	HSV1	2,402	0/2	nicht erkannt
HSV09-07	HSV1	4,189	0/2	nicht erkannt
HSV09-08	HSV2	2,389	0/2	nicht erkannt
HSV09-09	negativ	-	0/2	nicht erkannt
HSV09-10	HSV1	3,205	0/2	nicht erkannt

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

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer klinischer Proben wurde mithilfe einiger klinischer Proben von in EDTA entnommenem Vollblut von vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern getestet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 24 in EDTA entnommene Vollblutproben von vermutlich VZV-DNA-negativen Spendern als Referenzmaterial („Biological Sample Library Europe S.A.S.“, Lyon, Frankreich) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit **EXTRABlood** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	Positiv	negativ
In EDTA entnommenes, vermutlich VZV-DNA-negatives Vollblut	24	1	23

Eine Vollblutprobe von einem Spender ergab ein positives Ergebnis für VZV-DNA mit sehr niedrigem Titer (etwa 17 gEq/ml) mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. Dieselbe Probe ergab in einem zweiten Amplifikationslauf ein negatives, gültiges Ergebnis. Diese Abweichung ist möglicherweise durch eine Reaktivierung von VZV zu erklären, da VZV ein latent in der Bevölkerung weit verbreitetes Virus ist. Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 95,8 %.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 24 VZV-DNA-negative Liquorproben, 30 VZV-DNA-negative (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation), in EDTA entnommene Vollblutproben und 30 VZV-DNA-negative (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation), in EDTA entnommene Plasmaproben 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
VZV-DNA-negativer Liquor	24	0	24
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-negatives Vollblut	30	0	29
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-negatives Plasma	30	0	30

Eine Vollblutprobe ergab ein ungültiges Ergebnis, möglicherweise wegen des Vorhandenseins eines Inhibitors, und wurde nicht zur Berechnung der Spezifität herangezogen.

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 22 VZV-DNA-negative Liquorproben, 34 in EDTA entnommene, VZV-DNA-negative Plasmaproben sowie 35 in EDTA entnommene, VZV-DNA-negative Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt zur Echtzeit-Amplifikation) verwendet. Mit jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion und PCR-Einstellung mit **ELITe GALAXY** und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
VZV-DNA-negativer Liquor	22	0	22
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-negatives Plasma	34	0	34
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-negatives Vollblut	35	0	35

Alle negativen Proben wurden richtig als VZV-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 zu Produktleistungen mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Liquor, Abstriche von mukokutanen Läsionen 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 Positive Control **VZV - ELITe Positive Control** oder alternativ das Produkt **VZV - ELITe Positive Control RF** oder das Produkt **VZV ELITe Standard** verwenden.

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN

Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs

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

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

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

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

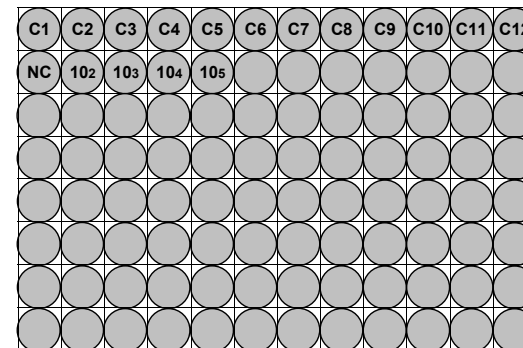
Hinweis: Die Fluoreszenzermessung erfolgt einzeln; die Heizrate (°C/s) auf 4,4°C/s einstellen.

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

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

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

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



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

Einrichten der Amplifikation

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

Vor Beginn des Laufs muss Folgendes durchgeführt werden:

- die Teströhrchen mit den zu analysierenden Proben auftauen. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- die für den Lauf benötigten Teströhrchen mit dem **VZV Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass der Inhalt jedes Röhrchen für **25 Reaktionen** ausreicht. Die Röhrchen vorsichtig schütteln, danach 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und auf Eis lagern;
- das Teströhrchen mit **VZV - Positive Control** oder alternativ **VZV - ELITe Positive Control RF** oder die Teströhrchen mit **VZV 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 **VZV 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 VZV-DNA): **20 µl VZV - ELITe Positive Control** oder alternativ **VZV - ELITe Positive Control RF** präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu die **VZV - ELITe Positive Control** dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

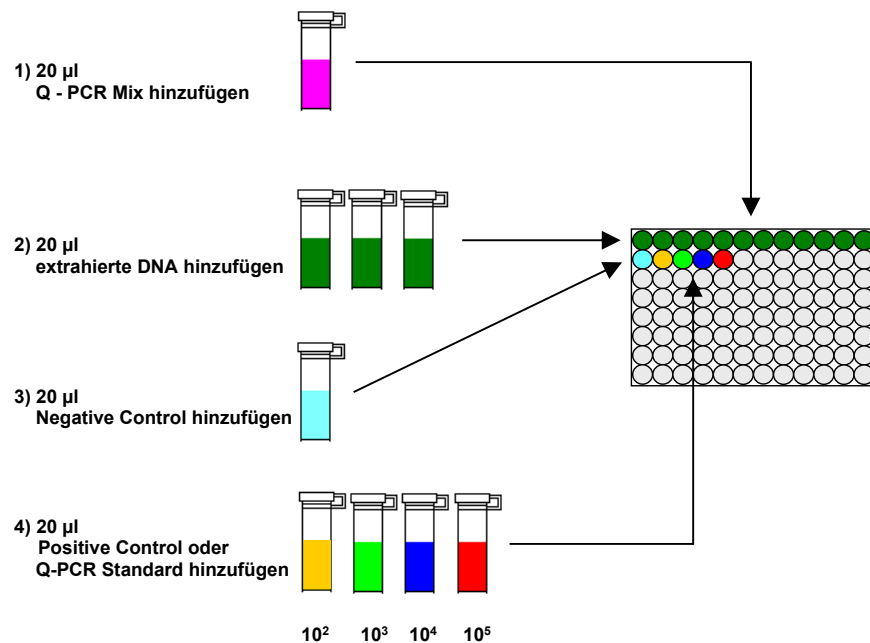
- Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von VZV-DNA): **20 µl VZV Q - PCR Standard 102** präzise in die entsprechende Vertiefung der **AD-Platte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu den **VZV Q -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

5. Die **AD-Platte** vorsichtig mit der **Dichtungsfolie** dicht verschließen.

6. Die **AD-Platte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellungen mit einer eindeutigen und wiedererkennbaren ID (z. B. „Jahr-Monat-Tag-VZV-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 dargestellt.



Analyse der qualitativen Ergebnisse

Die Werte der ausgesendeten Fluoreszenz, die vom VZV-Detektor (Detektor „VZV“) und dem Detektor für die Internal Control (IC) (Detektor „IC“) 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 „VZV“ 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 „VZV“ auf **0,80** einstellen;

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

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

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

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

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control 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 VZV-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 105 (Ct ≤ 25)** beachten.

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

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

Ist das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** für VZV 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 VZV 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	VZV-DNA
Detektor „VZV“	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 VZV 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 VZV und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, wurde die VZV-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die VZV-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 VZV-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 VZV-Reaktion verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe geeignet und das positive Assay-Ergebnis gültig.

Analyse der quantitativen Ergebnisse

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

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

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

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

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

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** (Fenster „Analysis“ (Analyse)) dienen zur Berechnung der in der Ausgangsprobe vorhandenen Kopien von VZV (**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 Vollblut- und Plasmaproben und das Extraktionssystem **MagNA Pure 24** verwendet und muss das Ergebnis in **Kopien/ml ausgegeben** werden, so ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Vollblut und Plasma und MagNA Pure 24
$Nc \text{ (Kopien/ml)} = 25 \times \text{Menge}$

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

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

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

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

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 log₁₀ zwischen einer Verdünnung und der nächsten) von Plasmid-DNA bewertet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Punkte der Reihe von 10⁷ Molekülen pro Reaktion bis 10¹ Molekülen pro Reaktion wurden in 9 Wiederholungen zur Durchführung

der Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. verwendet. Die Analyse der erhaltenen Daten mittels linearer Regression ergab, dass der Assay bei allen Punkten der Reihe eine lineare Reaktion aufweist (linearer Korrelationskoeffizient über 0,99).

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

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Linearer Messbereich mit MagNA Pure 24		
	Untere Grenze	Obere Grenze
Kopien/ml	25	25.000.000
Kopien/Reaktion	10	1.000.000

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

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision dieses Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) der Ct-Werte unter 1 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit 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 7 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit dieses Assays als die Differenz zwischen dem Mittelwert der Ergebnisse, die mit verschiedenen Replikaten einer Probe in ein und demselben Amplifikationslauf erhalten wurden und dem theoretischen Konzentrationswert der Probe, ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit der gemessenen Größe von zirka 12 % im Bereich von 10⁶ Molekülen bis 10¹ Molekülen in den 20 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

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

Analytische Sensitivität: Reproduzierbarkeit mit zertifiziertem Referenzmaterial

Für die Bewertung der analytischen Sensitivität des Assays als die Reproduzierbarkeit des Werts eines kalibrierten Referenzmaterials wurde die kalibrierte Reihe „QCMD 2017 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel“ (Qnostics, Ltd, Vereinigtes Königreich) als Referenzmaterial verwendet. Jede Probe der Reihe wurde in 2 Wiederholungen getestet. Hierfür wurde die Extraktion mit dem automatischen Extraktionssystem **MagNA Pure 24** und die Amplifikation mit den Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „MagNA Pure 24“		
Probe	Ziel	Positiv / Wiederholungen
VZVDNA17S-01	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-02	Negativ	0/2
VZVDNA17S-03	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-04	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-05	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-06	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-07	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-08	VZV Ellen	2/2

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „MagNA Pure 24“		
Probe	Ziel	Positiv / Wiederholungen
VZVDNA17S-09	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-10	VZV Ellen	2/2

In Übereinstimmung mit den vom EQA-Konsensus definierten quantitativen Ergebnissen wurden alle negativen Proben richtig als negativ und alle positiven Proben richtig als positiv erkannt.

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

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tests mit kalibrierten Referenzmaterialien und „MagNA Pure 24“	
Probe	Positiv / Wiederholungen
VZVMQP01-High	2/2
VZVMQP01-Medium	2/2
VZVMQP01-Low	2/2
VZVMQP01-Negative	0/2

Alle positiven Proben wurden richtig erkannt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 30 VZV-DNA-negative, in EDTA entnommene Vollblutproben, die durch Hinzufügen von VZVMQP01-High (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-DNA dotiert waren, und 30 VZV-DNA-negative, in EDTA entnommene Plasmaproben, die durch Hinzufügen von VZVMQP01-High (Qnostics Ltd, Vereinigtes Königreich) mit VZV-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, VZV-DNA-dotiertes Vollblut	30	30	0
In EDTA entnommenes, VZV-DNA-dotiertes Plasma	30	30	0

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

Die diagnostische Sensitivität des Assays in Verbindung mit Vollblut- und Plasmaproben betrug 100 %.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden 36 in EDTA entnommene, vermutlich VZV-DNA-negative Vollblutproben und 34 in EDTA entnommene, vermutlich VZV-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 VZV-DNA-negatives Vollblut	36	0	36
In EDTA entnommenes, vermutlich VZV-DNA-negatives Plasma	34	1	34

Alle Vollblutproben waren beim ersten Test gültig und wurden als VZV-DNA-negativ bestätigt.

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

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des

Produkts mit Matrices und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Dokumentation „VZV ELITe MGB® Kit“, FTP RTS035PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

A. J. Wakefield et al. (1992) *J Med Virology* 38: 183 - 190
 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 und 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, Ficol®[®], Ethanol oder 2-Propanol kontaminierte extrahierte DNA zusammen mit diesem Produkt verwenden: Diese Stoffe hemmen die Amplifikationsreaktion von Nukleinsäuren und können zu ungültigen Ergebnissen führen.

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

Es liegen keine Daten zu Produktleistungen mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Abstriche von mukokutanen Läsionen, Fruchtwasser.

Dieses Produkt nur mit den validierten Instrumenten und den in Abschnitt „Proben und Kontrollen“ angegebenen zugehörigen klinischen Proben verwenden.

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

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse hängen von der 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 VZV-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.

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 VZV-DNA nicht in der DNA, die aus der Probe extrahiert wurde, nachgewiesen wird. 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 VZV-DNA beeinträchtigen.

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

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

FEHLERBEHEBUNG

Ziel-DNA nicht in der Positive Control oder den Q - PCR Standard Reaktionen erkannt oder ungültiger Korrelationskoeffizient der Standardkurve	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reagenzien in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle oder des dispensierten Standards kontrollieren.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Positivkontrolle oder Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Positionseinstellungen für die Positivkontrolle oder Standardreaktionen des Geräts überprüfen. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen und Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Lauf wurde auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius falsch eingerichtet.	Position von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren. Volumina von Reaktionsgemisch, Positivkontrolle oder Standards kontrollieren.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt	
Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahmen
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen und Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot Wasser verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

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

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

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

SYMBOLE

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

**HINWEIS AN DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE
LIZENZ**

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

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

VZV ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

D. Kit content

VZV 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
- › **VZV - ELITe Standard:** STD035PLD
- › **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
- › **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
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result Copies/mL
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	100 cp / mL	100 – 25,000,000	96% 27/28*	100% 34/34*
Plasma	69 cp / mL	69 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 30/30*
CSF	69 cp / reaction	69 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

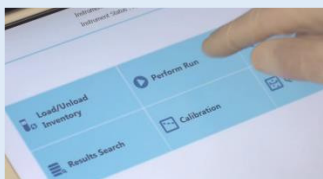
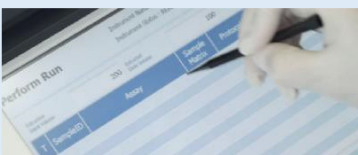

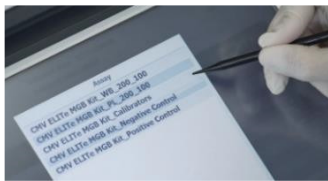
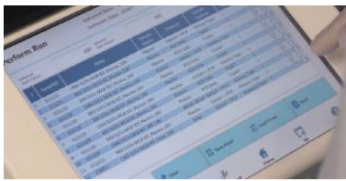



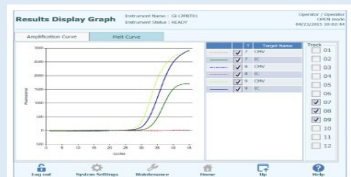
H. Procedures ELITE InGenius®

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: VZV Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: VZV positive and negative controls in the "Control menu" <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 Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volume: Input: "200 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or 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 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 Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

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


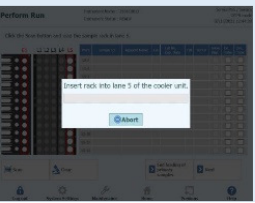
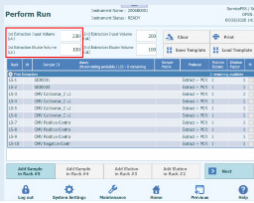
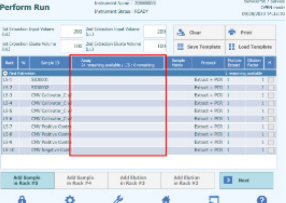
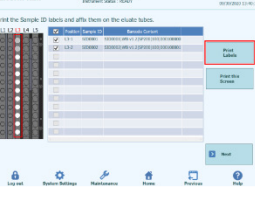


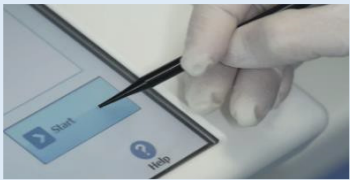
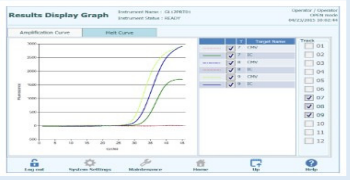
L. Procedures ELITE BeGenius®

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

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

4. Select the "Assay protocol" of interest

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

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

VZV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

VZV 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
- ›

- › VZV ELITe Standard: STD035PLD
- › VZV - ELITe Positive Control: CTR035PLD
- › CPE - Internal Control: CTCPE
- › 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	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (29/29)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole blood	100 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (35/35)*
	Plasma	69 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (20/20)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe STAR	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITe GALAXY	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

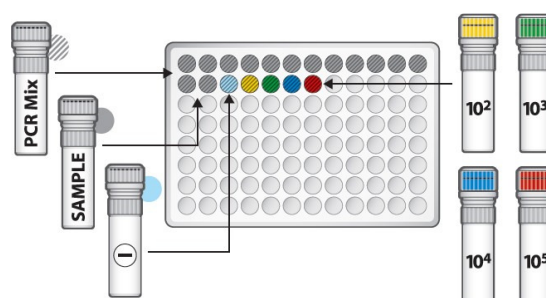
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw VZV 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	VZV 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

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

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

Ref.: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «**VZV ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

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

D. Kit content

VZV 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
- › **VZV - ELITE Positive Control**: CTR035PLD
- › **VZV ELITE Standard**: STD035PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (36/36)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

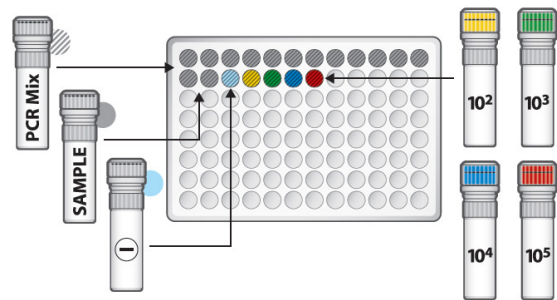
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM channel 465 -510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC channel 540 - 580"

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 VZV 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	VZV 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

VZV 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 VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.