ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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 23/01/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HHV7 ELITe MGB® Kit»
Ref. RTS037PLD

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

- *Extension of the use of the product in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040) and whole blood and plasma matrices.*

- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*

  - *LoD, LLoD and ULoD values confirmed on matrix*
  - *Repeatability and Reproducibility calculated on matrix*
  - *Internal Cut-off value changed from 36 to 35*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

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

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIEN
Hauptniederlassung: Tel. +39-011 976 191
Fax +39-011 936 76 11
E-Mail: emd.support@elitechgroup.com

HHV7 ELITe MGB® Kit

Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD **CE IVD** **-20 °C**

INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDUNGSZWECK	**Seite 1**
TESTPRINZIP	**Seite 2**
PRODUKTBESCHREIBUNG	**Seite 2**
IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN	**Seite 2**
BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)	**Seite 3**
SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE	**Seite 3**
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	**Seite 4**
PROBEN UND KONTROLLEN BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius	**Seite 5**
VERFAHREN BEI ELITe InGenius	**Seite 8**
VERFAHREN BEI ELITe BeGenius	**Seite 13**
LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius	**Seite 17**
PROBEN UND KONTROLLEN BEI ANDEREN SYSTEMEN	**Seite 23**
VERFAHREN BEI ANDEREN SYSTEMEN	**Seite 24**
LEISTUNGSMERKMALE BEI ANDEREN SYSTEMEN	**Seite 32**
QUELLENANGABEN	**Seite 34**
GRENZEN DES VERFAHRENS	**Seite 35**
FEHLERBEHEBUNG	**Seite 36**
SYMBOLE	**Seite 39**
HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ	**Seite 40**
ANHANG: KURZANLEITUNG	**Seite A**

VERWENDUNGSZWECK

Das Produkt **HHV7 ELITe MGB® Kit** ist ein qualitativer und quantitativer Nukleinsäure-Amplifikationstests zum **Nachweis und zur Quantifizierung der DNA des humanen Herpesvirus 7 (HHV7)** in DNA-Proben, die aus in EDTA entnommenem Vollblut, aus in EDTA entnommenem Plasma und aus Liquor extrahiert wurden.

Dieser Assay ist in Verbindung mit den Geräten **ELITe InGenius®** und **ELITe BeGenius®**, automatisierten und integrierten Systemen zur Extraktion, Real-Time-PCR und Ergebnisinterpretation mit humanen, in EDTA entnommenen Vollblut- und Plasmaproben validiert.

Dieser Assay ist in Verbindung mit dem **7300 Real-Time PCR System und dem 7500 Real-Time PCR System**, mit humanen, in EDTA entnommenen Vollblut- und Plasmaproben sowie Liquorproben validiert.

Das Produkt ist zur Verwendung bei der Diagnose und Überwachung von HHV7-Infektionen, sowie für klinische Patientendaten und weitere Laborbefunde bestimmt.

TESTPRINZIP

Der Assay ist eine quantitative Real-Time-PCR für den Nachweis der DNA von HHV7, die aus Proben isoliert und mit dem Testreagenz **HHV7 Q PCR Mix**, das Primer und ELITe MGB- und TaqMan™ MGB®-Technologie-Sonden enthält, amplifiziert wurde.

Die ELITe MGB- und TaqManMGB-Sonden werden aktiviert, wenn sie mit den jeweiligen PCR-Produkten hybridisieren. **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius** überwachen den Fluoreszenzanstieg und berechnen den Schwellenwertzyklus (Ct) sowie die Schmelztemperaturen (Tm). Die Berechnung der HHV7-DNA-Menge erfolgt auf der Grundlage einer gespeicherten Kalibrationskurve.

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

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das **HHV7 ELITe MGB Kit** enthält das Assay-Reagenz **HHV7 Q - PCR Mix**, ein optimiertes und stabilisiertes PCR-Gemisch, das die spezifischen Primer und Sonden enthält für:

- HHV7, Region des **Kapsidproteingens (U57),** nachgewiesen in Kanal **HHV7;** die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher® gequencht und mit einem FAM-Farbstoff markiert.
- die Internal Control (IC), die für die künstliche DNA-Sequenz IC2 spezifisch ist, nachgewiesen in Kanal **IC**; die Sonde ist durch den MGB stabilisiert, mit dem Eclipse Dark Quencher® gequencht und mit dem Farbstoff AquaPhluor® 525 (AP525) markiert.

Der **HHV7 Q - PCR Mix** enthält außerdem Puffer, Magnesiumchlorid, Nulkeotidtriphosphate, AP593-Fluorophor (analog zu ROX oder Cy5) als Passivreferenz für die Fluoreszenz-Normalisierung, das Enzym Uracil-N-Glycosidase (UNG) zur Inaktivierung der Kontamination durch das Amplifikationsprodukt sowie die „Warmstart"-DNA-Polymerase.

Das Produkt **HHV7 ELITe MGB Kit** enthält ausreichend Reagenz für **96 Tests** mit **ELITe InGenius** und **ELITe BeGenius, wobei 20 µl** pro Reaktion verwendet werden.

Das Produkt **HHV7 ELITe MGB Kit** enthält ausreichend Reagenz für **100 Tests mit anderen Systemen**, **wobei 20 µl** pro Reaktion verwendet werden.

Der **HHV7 ELITe MGB Kit** kann auch in Verbindung mit anderen gleichwertigen Geräten verwendet werden.

IM LIEFERUMFANG DES PRODUKTS ENTHALTENE MATERIALIEN

Komponente	Beschreibung	Menge	Gefahrenklasse
HHV7 Q - PCR Mix **Art.-Nr. RTS037PLD**	Gemisch aus Reagenzien für die Real-Time-PCR in Röhrchen mit **durchsichtigem Verschluss**	**4 x 540 µl**	-

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Sicherheitswerkbank.
- Puderfreie Einweghandschuhe aus Nitril oder einem ähnlichen Material.
- Vortex-Mixer.
- Tischzentrifuge (~3.000 U/min).
- Tisch-Mikrozentrifuge (~13.000 U/min).
- Thermomixer.
- Mikropipetten und sterile Spitzen mit Aerosolfilter oder sterile Direktverdrängerspitzen (0,5–10 µl, 2–20 µl, 5–50 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl).
- sterile 2,0-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Deutschland, Art.-Nr. 72.694.005).
- Hochreines Wasser für die Molekularbiologie.
- Programmierbarer Thermostat mit optischem Fluoreszenznachweissystem 7300 Real-Time PCR System oder 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, das gemäß den Herstelleranweisungen kalibriert ist.

SONSTIGE BENÖTIGTE PRODUKTE

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

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

Geräte und Software	Produkte und Reagenzien
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, Art.-Nr. INT030) **ELITe InGenius Software**, Version 1.3.0.17 (oder später) **HHV7 ELITe_STD**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse **HHV7 ELITe_PC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Positive Control-Analyse **HHV7 ELITe_NC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Negative Control-Analyse **HHV7 ELITe_WB_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Vollblutproben-Analyse **HHV7 ELITe_PL_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Plasmaproben-Analyse	**ELITe InGenius SP200** (EG SpA., Art.-Nr. INT032SP200) **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (EG SpA, Art.-Nr. INT032CS) **ELITe InGenius PCR Cassette** (EG SpA, Art.-Nr. INT035PCR), **ELITe InGenius Waste Box** (EG SpA, Art.-Nr. F2102-000) **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Sciences Inc., Art.-Nr. TF-350-L-R-S), nur mit ELITe InGenius
ELITe BeGenius (EG SpA Art.-Nr. INT040) **ELITe BeGenius Software**, Version 2.1.0. (oder später) **HHV7 ELITe_Be_STD**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Kalibratorenanalyse **HHV7 ELITe_Be_PC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Positive Control-Analyse **HHV7 ELITe_Be_NC**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Negative Control-Analyse **HHV7 ELITe_Be_WB_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Vollblutproben-Analyse **HHV7 ELITe_Be_PL_200_100**, Assay-Protokoll (Assay Protocol) mit Parametern für die Plasmaproben-Analyse	**1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Schweiz, Art.-Nr. 30180118) nur mit ELITe BeGenius **CPE – Internal Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTRCPE) **HHV7 ELITe Standard** (EG SpA, Art.-Nr. STD037PLD) **HHV7 – ELITe Positive Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTR037PLD)

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

Geräte und Software	Produkte und Reagenzien
7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Art.-Nr. 4351101) **QIAsymphony® SP/AS** (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 9001297, 9001301) **NucliSENS® easyMAG®** (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111)	**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** (Life Technologies, Art.-Nr. N8010560) **CPE – Internal Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTRCPE) **HHV7 ELITe Standard** (EG SpA, Art.-Nr. STD037PLD) **HHV7 – ELITe Positive Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTR037PLD) **QIAsymphony® Midi kit** (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 931236) **NucliSENS® easyMAG® Reagents** (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, Art.-Nr. 4406985) **QIAsymphony SP/AS** (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 9001297, 9001301) **NucliSENS easyMAGe** (bioMérieux SA, Art.-Nr. 200111)	**MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, Art.-Nr. 4346906) **CPE – Internal Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTRCPE) **HHV7 ELITe Standard** (EG SpA, Art.-Nr. STD037PLD) **HHV7 – ELITe Positive Control** (EG SpA, Art.-Nr. CTR037PLD) **QIAsymphony Midi kit** (QIAGEN GmbH, Art.-Nr. 931236) **NucliSENS easyMAG Reagents** (bioMérieux SA, Art.-Nr. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Dieses Produkt ist nur für den *In-vitro*-Gebrauch bestimmt.

Allgemeine Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

Geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe sowie Augen-/Gesichtsschutz tragen.

Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.

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

Nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.

Restliche Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Vor der Durchführung des Assays alle bereitgestellten Anweisungen aufmerksam lesen.

Bei der Durchführung des Tests die bereitgestellten Produktanweisungen befolgen.

Das Produkt nicht nach dem angegebenen Ablaufdatum verwenden.

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

Keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen verwenden.

Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

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

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

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

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

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

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

Die Extraktionsprodukte müssen so verwendet werden, dass eine Freisetzung in die Umgebung minimiert wird, um die Möglichkeit einer Kontamination zu vermeiden. Die PCR-Kassette (PCR Cassette) muss vorsichtig behandelt werden und darf niemals geöffnet werden, um die Diffusion von PCR-Produkten in die Umgebung und die Kontamination der Proben und Reagenzien zu vermeiden.

Komponentenspezifische Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Komponente	Umgebungstemperatur bei Lagerung	Haltbarkeit nach Anbruch	Gefrier- und Auftauzyklen	On-Board-Stabilität (ELITe InGenius und ELITe BeGenius)
HHV7 Q - PCR Mix	-20°C oder darunter (lichtgeschützt)	einen Monat	bis zu fünf	bis zu fünf separate* Läufe von je drei Stunden oder bis zu 7 aufeinanderfolgende Stunden (2 Läufe von je 3 Stunden und die Zeit, die für den Beginn eines dritten Laufs benötigt wird)

* mit zwischenzeitlichem Gefrierzyklus

PROBEN UND KONTROLLEN BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Proben

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

Probe	Anforderungen an die Entnahme	Transport-/Lagerbedingungen			
		+16 / +26 °C (Raumtemperatur)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Vollblut	EDTA	≤ 24 Stunden	≤ 72 Stunden	≤ 1 Monat	> 1 Monat
Plasma	EDTA	≤ 24 Stunden	≤ 72 Stunden	≤ 1 Monat	> 1 Monat

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 vor der Extraktion aufgetaut werden, um einen möglichen Nukleinsäureabbau zu vermeiden.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

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

Assay-Protokolle für HHV7 ELITe MGB Kit				
Probe	**Instrument**	**Name des Assay-Protokolls**	**Melden Sie**	**Eigenschaften**
Vollblut	**ELITe InGenius**	**HHV7 ELITe_WB_200_100**	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl
	ELITe BeGenius	**HHV7 ELITe_Be_WB_200_100**	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl
Plasma	**ELITe InGenius**	**HHV7 ELITe_PL_200_100**	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl
	ELITe BeGenius	**HHV7 ELITe_Be_PL_200_100**	Kopien/ml	Extraktionseingangsvolumen: 200 µl Extrahiertes Elutionsvolumen: 100 µl Interne Kontrolle: 10 µl Beschallung: KEINE Verdünnungsfaktor: 1 Volumen PCR-Mix: 20 µl Eingangsvolumen Proben-PCR: 10 µl

Bei allen Protokollen ist die Überführung der Probe in das Extraktionsröhrchen (bei ELITe InGenius) bzw. ein 2-ml-Sarstedt-Röhrchen (bei ELITe BeGenius) optional.

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

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

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

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

Verwenden Sie kein Plasma, das in Heparin entnommen wurde, da dieses bekanntlich die reverse Transkription und PCR hemmt.

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.

PCR-Kalibratoren und -Kontrollen

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

- Für die Kalibrationskurve die vier Konzentrationen des Produkts **HHV7 ELITe Standard** (nicht im Lieferumfang dieses Kits enthalten) mit dem Assay-Protokoll **HHV7 ELITe_STD** oder **HHV7 ELITe_Be_STD** verwenden.

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

- Für die Positive Control das Produkt **HHV7 - ELITe Positive Control** (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **HHV7 ELITe_PC** oder **HHV7 ELITe_Be_PC** verwenden,
- Für die Negative Control hochreines Wasser (nicht in diesem Kit enthalten) mit dem Assay-Protokoll **HHV7 ELITe_NC** oder **HHV7 ELITe_Be_NC** verwenden.

Bitte beachten: ELITe InGenius und **ELITe BeGenius** ermöglichen die Erstellung und Speicherung der Kalibrationskurve und die Validierung der PCR-Kontrollen für jede PCR-Reagenziencharge.
Kalibrierungskurven verfallen nach **60 Tagen**, danach muss die Kalibration erneut durchgeführt werden.
Die Ergebnisse der PCR-Kontrollen verfallen nach **15 Tagen**, danach müssen die Positive Control und die Negative Control erneut durchgeführt werden.
Die Kalibratoren und PCR-Kontrollen müssen erneut generiert werden, wenn eines der folgenden Ereignisse eintritt:

- es wird eine neue Reagenziencharge verwendet,
- die Ergebnisse der Qualitätskontrollanalyse (siehe nächster Abschnitt) liegen außerhalb der Spezifikation,
- es werden größere Wartungs- oder Instandhaltungsarbeiten am Gerät **ELITe InGenius** oder **ELITe BeGenius** durchgeführt.

Qualitätskontrollen

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR
REF RTS037PLD

VERFAHREN BEI ELITe InGenius

Das beim Gebrauch des **HHV7 - ELITe MGB Kit** mit dem **ELITe InGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:
- **ELITe InGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,
- auf der Startseite im Menü „Calibration“ (Kalibration) bestätigen, dass die Kalibratoren (**HHV7 Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des PCR Mix genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**HHV7 - Positive Control**, **HHV7 Negative Control**) für die zu verwendende Charge des PCR Mix genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,
- den Typ des Laufs auswählen, dazu die Anweisungen auf der grafischen Benutzeroberfläche zur Einrichtung des Laufs befolgen und die von EG SpA bereitgestellten Assay-Protokolle verwenden (siehe „Proben und Kontrollen“).

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **HHV7 ELITe MGB Kit** kann mit **ELITe InGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

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

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

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

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **HHV7 Q PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

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

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

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

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

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

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

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

Bitte beachten: Der **HHV7 Q-PCR Standard** kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.

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

Bitte beachten: Die **HHV7 Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

Hinweis Am Ende des Laufs müssen die **PCR-Kassette** und die Verbrauchsmaterialien gemäß den gesetzlichen Umweltbestimmungen entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

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

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

ELITe InGenius generiert Ergebnisse mithilfe des **HHV7 ELITe MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

A. Validierung der Kalibrationskurve,

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

C. Validierung der Probenergebnisse,

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts.

A. Validierung der Kalibrationskurve

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Kalibratorreaktionen mit den **HHV7 ELITe_STD** Assay-Protokoll-Parametern. Die Kalibrationskurve ergibt sich aus dem resultierenden Ct-Wert bei der jeweiligen Konzentration.

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

Die Kalibrationskurve läuft **nach 60 Tagen** ab.

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

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

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenzen der Reaktionen der Positive Control und der Negative Control mit den Parametern der Assay-Protokolle (Assay Protocols) **HHV7 ELITe_PC** und **HHV7 ELITe_NC**. Die resultierenden Ct-Werte werden in Konzentrationswerte umgerechnet und zur Überprüfung des Systems (Reagenziencharge und Gerät) herangezogen.

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

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.

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

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

C. Validierung der Probenergebnisse

Die **ELITe InGenius Software** interpretiert die PCR-Ergebnisse für die Zielsequenz (Kanal **HHV7**) und die Internal Control (Kanal **IC**) mit den Assay-Protokoll-Parametern **HHV7 ELITe_WB_200_100** und **HHV7 ELITe_PL_200_100**. Die resultierenden Ct-Zielwerte werden in Konzentrationswerte umgerechnet.

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

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

1) Kalibrationskurve	**„Status“**
HHV7 Q-PCR Standard	APPROVED (Genehmigt)
2) Positivkontrolle	**„Status“**
HHV7 Positive Control	APPROVED (Genehmigt)
3) Negativkontrolle	**„Status“**
HHV7 Negative Control	APPROVED (Genehmigt)

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

Die möglichen Ergebnismeldungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

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

Ergebnis des Probenlaufs	**Interpretation**
HHV7:DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL (HHV7: DNA erkannt, Menge gleich XXX Kopien/ml)	In der Probe wurde **HHV7-DNA** innerhalb des Messbereichs des Assays **nachgewiesen**, ihre Konzentration wird angezeigt.
HHV7:DNA Detected, quantity below “LLoQ” copies/mL (HHV7: DNA erkannt, Menge unter „LLoQ“ Kopien/ml)	In der Probe wurde **HHV7-DNA nachgewiesen**, ihre Konzentration liegt unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des Assays.
HHV7:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL (HHV7: DNA erkannt, Menge über „ULoQ“ Kopien/ml)	In der Probe wurde **HHV7-DNA nachgewiesen**, ihre Konzentration liegt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze des Assays.
HHV7:DNA Not detected or below the “LoD” copies/mL (HHV7: DNA nicht nachgewiesen oder unter „LoD“ Kopien/ml)	In der Probe wurde **keine HHV7-DNA nachgewiesen**. Die Probe wurde negativ auf die Ziel-DNA getestet oder die Konzentration liegt unter der **Nachweisgrenze** des Assays.
Invalid-Retest Sample (Ungültig – Probe erneut testen)	**Ungültiges Testergebnis** durch fehlerhafte Internal Control (z. B. aufgrund von falscher Extraktion oder Verschleppung von Inhibitoren). Der Test sollte wiederholt werden.

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

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

Als „HHV7:DNA Not detected or below “LoD” copies/mL“ (HHV7: DNA nicht nachgewiesen oder unter Nachweisgrenze in Kopien/ml) ausgegebene Proben sind für die Analyse geeignet, HHV7 wurde jedoch nicht nachgewiesen. In diesem Fall kann entweder die Probe für HHV7-DNA negativ sein oder die HHV7-DNA ist bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests vorhanden (siehe „Leistungsmerkmale“).

HHV7-DNA-positive Proben mit einer Konzentration unter der Nachweisgrenze (und der unteren Bestimmungsgrenze) des Assays werden, falls nachgewiesen, als „HHV7:DNA Detected, quantity below “LLoQ” copies/mL“ (HHV7: DNA erkannt, Menge unter der unteren Bestimmungsgrenze in Kopien/ml) ausgegeben (siehe „Leistungsmerkmale“).

HHV7-DNA-positive Proben innerhalb des linearen Messbereichs (siehe „Leistungsmerkmale“) werden erkannt und als „HHV7: DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies / mL“ (HHV7: DNA erkannt, Menge gleich „XXX“ Kopien/ml) ausgegeben.

HHV7-DNA-positive Proben, die oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze liegen, werden als „HHV7: DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL“ (HHV7: DNA erkannt, Menge über „ULoQ“ Kopien/ml) ausgegeben und sind nicht zur Quantifizierung geeignet. Falls erforderlich muss die Probe vor der Extraktion oder dem PCR-Test verdünnt und erneut getestet werden, um Ergebnisse innerhalb des linearen Messbereichs des Assays zu erzielen.

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

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

D. Ausgabe des Probenergebnisberichts

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

Der „Sample Report“ zeigt die Ergebnisdetails sortiert nach ausgewählter Probe (SID, „Sample ID“) an.

Der „Track Report“ zeigt die Ergebnisdetails nach ausgewählter Spur an.

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

VERFAHREN BEI ELITe BeGenius

Das beim Gebrauch des **HHV7 ELITe MGB Kit** mit dem **ELITe BeGenius** anzuwendende Verfahren besteht aus drei Schritten:

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

SCHRITT 1 – Prüfung der Systembereitschaft

Vor Beginn des Laufs:

- **ELITe BeGenius** einschalten und den Modus „**CLOSED**“ (geschlossen) auswählen,

- auf der Startseite im Menü „Calibrations“ (Kalibrationen) bestätigen, dass die Kalibratoren (**HHV7 Q - PCR Standard**) für die zu verwendende Charge des **HHV7 PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen Kalibratoren für die Charge **HHV7 PCR Mix** verfügbar sind, Kalibration wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

- auf der Startseite im Menü „Controls“ (Kontrollen) bestätigen, dass die PCR-Kontrollen (**HHV7 Positive Control, HHV7 Negative Control**) für die zu verwendende Charge des **HHV7 PCR Mix** genehmigt und gültig (Status) sind. Wenn keine gültigen PCR-Kontrollen für die Charge **HHV7 PCR Mix** verfügbar sind, die PCR-Kontrollen wie in den folgenden Abschnitten beschrieben durchführen,

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

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

Protokolle für die qualitative Analyse sind auf Anfrage erhältlich.

SCHRITT 2 – Einrichtung des Laufs

Das **HHV7 ELITe MGB Kit** kann mit **ELITe BeGenius** für die Durchführung der folgenden Läufe verwendet werden:

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

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

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

Vor dem Einrichten eines Laufs:

Die benötigten **HHV7 PCR Mix**-Röhrchen 30 Minuten auf Raumtemperatur auftauen. Jedes Röhrchen reicht aus für **24 Tests** unter optimalen Bedingungen (mindestens 2 Tests pro Lauf). Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.

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

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

	A. Probenlauf (Extract + PCR [Extraktion + PCR])	B. Lauf mit eluierter Probe (PCR Only [nur PCR])
	Spitzenständer ggf. ersetzen.	Spitzenständer ggf. ersetzen.
20	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
21	Den „PCR Rack“ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Bestandsbereich laden.	Den „PCR Rack“ mit „PCR Cassette“ (PCR-Kassette) in den Bestandsbereich laden.
22	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
23	Den „Extraction Rack“ (Extraktionsrack) mit den „ELITe InGenius SP 200“ Extraktionskartuschen und die für die Extraktion erforderlichen Verbrauchsmaterialien laden.	nicht anwendbar
24	Schließen Sie die Gerätetür.	Schließen Sie die Gerätetür.
25	„Start“ (Starten) drücken.	„Start“ (Starten) drücken.

	C. Kalibrationslauf (PCR Only [nur PCR])	D. Lauf für die Positive Control und Negative Control (PCR Only [nur PCR])
1	Die benötigten **Q-PCR Standard-Röhrchen** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern.	**Die Positive Control-Röhrchen** 30 Minuten auf Raumtemperatur **auftauen**. Vorsichtig mischen, danach den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis oder in einem Kühlblock lagern. Die **Negative Control vorbereiten**: dazu mindestens 50 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie in ein Elutionsröhrchen überführen, das im Lieferumfang des ELITe InGenius SP 200 Consumable Set enthalten ist.
2	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.	Auf der Startseite „Perform Run“ (Lauf durchführen) auswählen.
3	Die „Racks“ aus Spur 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.	Die „Racks“ aus Spur 1, 2 und 3 (L1, L2 und L3) der „Cooler Unit“ entnehmen und auf den Zubereitungstisch stellen.
4	Den Laufmodus „Run mode: PCR Only“ (nur PCR) wählen.	Den Laufmodus „Run mode: PCR Only“ (nur PCR) wählen.
5	Die **Q-PCR** Standard-Röhrchen in das „Elution Rack“ (Elutionsrack) **laden**.	Die **Röhrchen für die Positive Control und Negative Control** in das „Elution Rack“ (Elutionsrack) **laden**.
6	Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3). Falls erforderlich für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das „**Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ **einsetzen**, beginnend mit „Lane 3“ (L3) (Spur 3). Falls erforderlich für jede „Position“ unter „Reagent name“ den Reagenznamen, unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.
7	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
8	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 600 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 50 µl beträgt.	Sicherstellen, dass das „Extraction Input Volume“ (Extraktionseingangsvolumen) 600 µl und das extrahierte „Extracted Elute Volume“ (Extrahiertes Eluatvolumen) 50 µl beträgt.
9	Das **Assay-Protokoll** in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).	Das **Assay-Protokoll** in der Spalte „Assay“ (Prüfung) auswählen (siehe „Proben und Kontrollen“).
10	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.	Auf „Next“ (Weiter) klicken, um fortzufahren.
11	Den **PCR Mix** in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) **laden**.	Den **PCR Mix** in das „Reagent/Elution Rack“ (Reagenz-/Elutionsrack) **laden**.
12	Das „**Reagent/Elution Rack**“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) **einsetzen**. Falls erforderlich für jeden PCR-Mix unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.	Das „Reagent/Elution Rack“ in die „Cooler Unit“ in „Lane 2“ (L2) (Spur 2) einsetzen. Falls erforderlich für jeden PCR-Mix unter „S/N“ die Seriennummer, unter „Lot No.“ die Chargennummer, unter „Exp. Date“ das Verfallsdatum und unter „T/R“ die Anzahl der Reaktionen eingeben.

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

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

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

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

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

Hinweis: Der **HHV7 Q-PCR Standard** kann für 4 separate Läufe von jeweils 2 Stunden verwendet werden.

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

Hinweis: Die **HHV7 Positive Control** kann für 4 separate Läufe von jeweils 3 Stunden verwendet werden.

Hinweis: Am Ende des Laufs müssen die **PCR-Kassette** und die Verbrauchsmaterialien gemäß den gesetzlichen Umweltbestimmungen entsorgt werden. Ein Verschütten der Reaktionsprodukte vermeiden.

SCHRITT 3 – Überprüfung und Genehmigung der Ergebnisse

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

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

Bitte beachten: ELITe BeGenius kann mit dem “Laboratory Information System” (Laborinformationssystem - LIS) verbunden werden, worüber die Laufinformationen heruntergeladen werden können. Weitere Informationen finden Sie im Gerätehandbuch.

ELITe BeGenius generiert Ergebnisse mithilfe des **HHV7 ELITe MGB Kit** und geht dabei folgendermaßen vor:

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

Bitte beachten: Einzelheiten sind dem entsprechenden Abschnitt unter Verfahren bei **ELITe InGenius** zu entnehmen.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

LEISTUNGSMERKMALE BEI ELITe InGenius und ELITe BeGenius

Analytische Sensitivität: Erfassungsgrenze bei Vollblut

Aufgrund der hohen Prävalenz von HHV7 in der Bevölkerung (ca. 80 %), über die in der Literatur berichtet wird (Michael Kidd et al.), ist bei der Analyse von Vollblutproben ein gewisser Prozentsatz niedrig positiver, klinisch nicht signifikanter Ergebnisse zu erwarten. Um die Negativität des Assays mit diesen Proben zu erhalten, musste **auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius** ein HHV7-Ct-Grenzwert von 35 bestimmt werden.

Die Ergebnisse auf ELITe InGenius sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Erfassungsgrenze bei in EDTA entnommenem Vollblut und ELITe InGenius			
Proben	**Anzahl**	**positiv**	**negativ**
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-negatives Vollblut	35	0	35

Die Ergebnisse auf ELITe BeGenius sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Erfassungsgrenze bei in EDTA entnommenem Vollblut und ELITe BeGenius			
Proben	**Anzahl**	**positiv**	**negativ**
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-negatives Vollblut	20	0	20

Beim Test der Erfassungsgrenze weist das HHV7 ELITe MGB Kit alle getesteten Proben erwartungsgemäß innerhalb des für die Zielsequenz festgelegten Ct-Grenzwerts korrekt nach.

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze (LoD)

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

Die Nachweisgrenze dieses Assays wurde auf ELITe InGenius mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/10 µl bei Vorhandensein von Plasmid-DNA verdünnt. Diese enthielt die Internal Control bei einem Titer von 20.000 Kopien/10 µl.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Proben	**Anzahl**	**positiv**	**negativ**
10 Kopien HHV7-Plasmid-DNA + 20.000 Kopien Internal Control	18	18	0

Der theoretische LoD-Wert wurde verifiziert, indem auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius ein Pool aus EDTA-Plasma und EDTA-Vollblut getestet wurde, die mit HHV7-Referenzmaterial (ZeptoMetrix, Art.-Nr. PINATHHV7-ST) in der angegebenen Konzentration dotiert waren.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die behauptete Konzentration für das Zielgen des HHV7 ELITe MGB Kit sowohl bei ELITe BeGenius als auch bei ELITe InGenius.

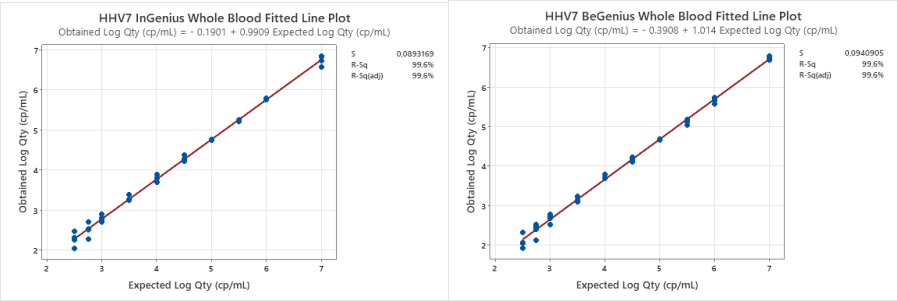
Linearer Messbereich

Der lineare Messbereich des HHV7 ELITe MGB Kit wurde mit Vollblut- und Plasmaproben auf ELITe InGenius und ELITe BeGenius bestimmt.

Bei Vollblut:

Der lineare Messbereich wurde anhand einer Reihe von Verdünnungen des Plasmids mit der HHV7-Zielsequenz in negativen EDTA-Vollblutproben bestimmt.

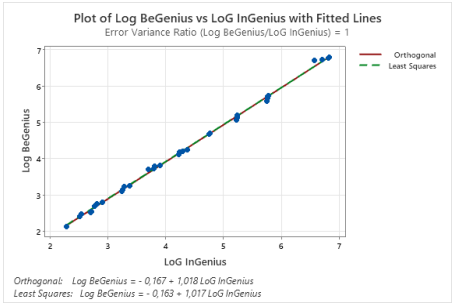
Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung aufgeführt.



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

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.

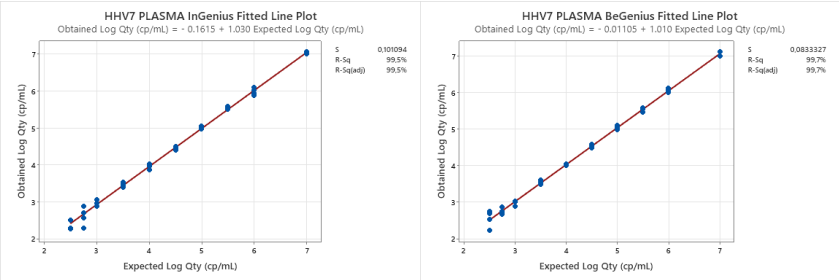


Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von -0,167 (95%-KI: -0,2256 bis -0,1075) und eine Steigung von 1,018 (95%-KI: 1,0048 bis 1,0307). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,999.

<u>Bei in EDTA entnommenem Plasma:</u>

Der lineare Messbereich wurde anhand einer Reihe von Verdünnungen des Plasmids mit der HHV7-Zielsequenz in negativen EDTA-Plasmaproben bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung aufgeführt.

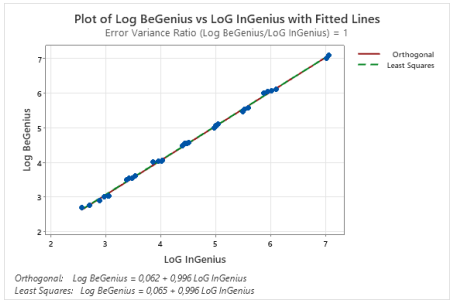


HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

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.



Die orthogonale Regressionsanalyse ergab einen Achsenabschnitt von 0,062 (95%-KI: 0,0053 bis 0,1194) und eine Steigung von 0,996 (95%-KI: 0,9845 bis 1,0082). Die Analyse der linearen Regression ergab einen R2-Wert von 0,999.

Der lineare Messbereich bei **Vollblut und Plasma** in EDTA-Proben deckt einen Konzentrationsbereich ab, der in der folgenden Tabelle aufgeführt ist:

Linearer Messbereich für HHV7 ELITe MGB Kit und ELITe InGenius und ELITe BeGenius		
Matrix	**Untere Grenze**	**Obere Grenze**
Vollblut	500 Kopien/ml	10.000.000 Kopien/ml
Plasma	500 Kopien/ml	10.000.000 Kopien/ml

Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision des Assays mit ELITe BeGenius und ELITe InGenius wurde ein Panel von in EDTA entnommenen Vollblutproben, die negativ oder mit HHV7 (ZeptoMetrix, Art.-Nr. PINATHHV7-ST) dotiert waren, analysiert.

Ein Beispiel für die Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs (an einem Tag) mit ELITe InGenius ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs auf ELITe InGenius					
Probe	**HHV7**				**% Übereinstimmung**
	Pos. / Neg.	**Mittlerer Ct-Wert**	**SD**	**VK %**	
Negativ	0/8	n. z.	n. z.	n. z.	100 %
3 x LoD	8/8	32.97	0.38	1.14	100 %
10 x LoD	8/8	31.18	0.29	0.92	100 %

Ein Beispiel für die Wiederholpräzision innerhalb eines Laufs (an einem Tag) mit ELITe BeGenius ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Wiederholpräzision innerhalb des Laufs auf ELITe BeGenius					
Probe	**HHV7**				**% Übereinstimmung**
	Pos. / Neg.	**Mittlerer Ct-Wert**	**SD**	**VK %**	
Negativ	0/8	n. z.	n. z.	n. z.	100 %
3 x LoD	8/8	34.52	0.30	0.88	100 %
10 x LoD	8/8	32.36	0.22	0.69	100 %

Die Ergebnisse für die laufübergreifende Wiederholpräzision (an zwei Tagen) mit ELITe InGenius sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Laufübergreifende Wiederholpräzision auf ELITe InGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Neg.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/16	n. z.	n. z.	n. z.	100 %
3 x LoD	16/16	33.07	0.36	1.09	100 %
10 x LoD	16/16	31.17	0.24	0.77	100 %

Die Ergebnisse für die laufübergreifende Wiederholpräzision (an zwei Tagen) mit ELITe BeGenius sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Laufübergreifende Wiederholpräzision auf ELITe BeGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Neg.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/16	n. z.	n. z.	n. z.	100 %
3 x LoD	16/16	34.41	0.49	1.42	100 %
10 x LoD	16/16	32.34	0.30	0.92	100 %

Beim Test der Wiederholpräzision erkannte der HHV7 ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% gleich 1,42 % aus.

Vergleichspräzision

Zur Bewertung der Vergleichspräzision des Assays mit ELITe BeGenius und ELITe InGenius wurden in EDTA entnommene HHV7-DNA-negative oder mit HHV7 (Zeptometrix, Art.-Nr. PINATHHV7-ST) dotierte Vollblutproben analysiert.

Die Ergebnisse der chargenübergreifenden Vergleichspräzision (zwei Chargen) mit ELITe InGenius sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Chargenübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe InGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/8	-	-	-	100 %
3 x LoD	8/8	33.39	0.20	0.59	100 %
10 x LoD	8/8	31.39	0.18	0.57	100 %

Die Ergebnisse der chargenübergreifenden Vergleichspräzision (zwei Chargen) mit ELITe BeGenius sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Chargenübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe BeGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/8	-	-	-	100 %
3 x LoD	8/8	34.58	0.14	0.42	100 %
10 x LoD	8/8	32.66	0.24	0.75	100 %

Die Ergebnisse der geräteübergreifenden Vergleichspräzision (an zwei Tagen, mit zwei Chargen und zwei Geräten) mit ELITe InGenius sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Geräteübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe InGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/8	-	-	-	100 %
3 x LoD	8/8	34.50	0.31	0.90	100 %
10 x LoD	8/8	32.61	0.23	0.69	100 %

Die Ergebnisse der geräteübergreifenden Vergleichspräzision (an zwei Tagen, mit zwei Chargen und zwei Geräten) mit ELITe BeGenius sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

Geräteübergreifende Vergleichspräzision auf ELITe BeGenius					
Probe	HHV7				% Übereinstimmung
	Pos. / Wiederh.	Mittlerer Ct-Wert	SD	VK %	
Negativ	0/8	-	-	-	100 %
3 x LoD	8/8	33.25	0.26	0.79	100 %
10 x LoD	8/8	31.26	0.21	0.66	100 %

Beim Test der Vergleichspräzision erkannte der HHV7 ELITe MGB Kit alle Proben wie erwartet und wies eine maximale Variabilität der Ct-Zielwerte als VK% gleich 0,90 % aus.

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Spezifität des Assays als Bestätigung negativer Proben in Verbindung mit **ELITe InGenius** wurden klinische, in EDTA entnommene Vollblut- und Plasmaproben analysiert.

Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit **ELITe InGenius** erhaltene diagnostische Spezifität des Assays auch für **ELITe BeGenius**.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ	Diagnostische Spezifität in %
In EDTA entnommene Vollblutproben	38	0	38	100 %
In EDTA entnommene Plasmaproben	33	0	33	100 %

Alle Vollblut- und Plasmaproben waren für die Analyse gültig. Der Ct-Grenzwert für die HHV7-Zielsequenz wurde nur für Vollblutproben angewendet.

Die diagnostische Spezifität des HHV7 ELITe MGB Kit in Verbindung mit in EDTA entnommenem Vollblut und Plasma betrug 100 %.

Bei InGenius und BeGenius ist der Ct-Grenzwert für die IC bei in EDTA entnommenen Vollblut- und Plasmaproben auf 35 festgelegt.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität des Assays als Bestätigung positiver klinischer Proben in Verbindung mit **ELITe InGenius** wurden klinische, in EDTA entnommene Vollblut- und Plasmaproben analysiert.

Da **ELITe BeGenius** gleichwertige analytische Leistungen wie **ELITe InGenius** aufweist, ist die diagnostische Güte der auf den beiden Instrumenten durchgeführten Tests ebenfalls als gleichwertig anzusehen. Daher gilt die mit **ELITe InGenius** erhaltene diagnostische Sensitivität des Assays auch für **ELITe BeGenius**.

Die diagnostische Sensitivität wurde anhand von HHV7-negativen Vollblut- und Plasmaproben bewertet, die in EDTA entnommen und mit „Human Herpes Virus Type 7 Stock -(NATHHV7-ST)“ (ZeptoMetrix Corporation) in einer Konzentration von 1000 Kopien/ml dotiert waren.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ	Diagnostische Sensitivität in %
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-dotiertes Vollblut	34	34	0	100 %
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-dotiertes Plasma	33	33	0	100 %

Alle Proben wurden korrekt als positiv erkannt.

Die diagnostische Sensitivität des HHV7 ELITe MGB Kit in Verbindung mit in EDTA entnommenem Vollblut und Plasma betrug 100 %.

Bitte beachten: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Produktdokumentation „HHV7 ELITe MGB Kit“, FTP037PLD, aufgeführt.

PROBEN UND KONTROLLEN BEI ANDEREN SYSTEMEN

Proben

Dieses Produkt darf ausschließlich mit aus folgenden klinischen Proben **extrahierter DNA** verwendet werden: in EDTA entnommenes Vollblut und Liquor.

In EDTA entnommenes Vollblut

Die Vollblutproben für die DNA-Extraktion müssen gemäß den Laborrichtlinien in EDTA entnommen und identifiziert werden. Außerdem dürfen sie maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur (+16 bis +26 °C) bzw. maximal drei Tage bei +2 bis +8° C transportiert und aufbewahrt werden; anderenfalls müssen sie tiefgefroren bei -20 °C für maximal dreißig Tage oder bei -70 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

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

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Gerät **NucliSENS® easyMAG®** durchführen, befolgen Sie bitte das Extraktionsprotokoll **Generic 2.0.1** und die folgenden Anweisungen: **100 µl** Probe in den 8-Well-Streifen überführen, den Streifen auf das Gerät laden und die Extraktion ohne Lyseinkubation ausführen. Nachdem das Gerät **NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer** hinzugefügt hat, den Streifen nicht herausnehmen und den Streifeninhalt dreimal mit der mitgelieferten Mehrkanalpipette unter Anwendung des Programms Nr. 3 mischen. 10 Minuten inkubieren, dann **5 µl CPE** für die interne Kontrolle 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 Nukleinsäuren in **50 µl** Elutionspuffer eluieren.

Hinweis: Wenn Sie die DNA-Extraktion aus Vollblut mit dem Gerät **QIAsymphony® SP/AS** und dem Kit **QIAsymphony® DNA Mini Kit** und der **Softwareversion 3.5** durchführen, verwenden Sie das Extraktionsprotokoll **Virus Blood_200_V4_default IC** und befolgen Sie diese Anweisungen: Das Gerät kann ein Primärröhrchen verwenden; für die Extraktion werden **200 µl** Probenvolumen benötigt; das stets erforderliche Totvolumen beträgt 100 µl. Für jede angeforderte Probe **5 µl CPE** zum ATE-Puffer hinzufügen. Die Röhrchen mit der Lösung wie im Benutzerhandbuch des Kits angegeben in das Fach „Internal Control“ (interne Kontrolle) auf dem Gerät laden; die Position, an der Eluate dispensiert werden, sowie das Elutionsvolumen von **60 µl** angeben. Nähere Einzelheiten zum Extraktionsverfahren sind den Angaben im Benutzerhandbuch des Kits zu entnehmen.

Liquor

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

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

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

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.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

Für die Negative Control muss statt der aus der Probe extrahierten DNA hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang dieses Kits enthalten) zur Reaktion hinzugefügt werden.

Für die Positivkontrolle das Produkt **HHV7 - ELITe Positive Control** oder das Produkt **HHV7 ELITe Standard** verwenden.

Qualitätskontrollen

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

VERFAHREN BEI ANDEREN SYSTEMEN

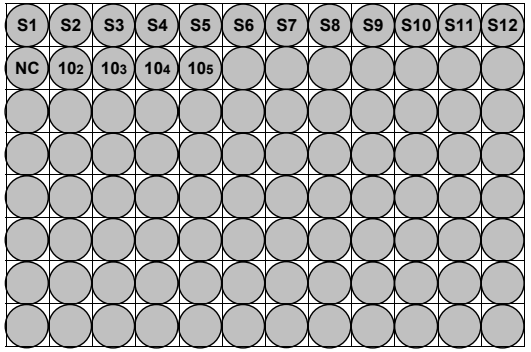
Einrichten des Echtzeit-Amplifikationslaufs
(Im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten durchzuführen)

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 HHV7-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszierend) ist, und „HHV7“ nennen.
- im Detector Manager den Detektor („detector“) für die Sonde für die interne Kontrolle so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „VIC“ (AP525 ist analog zu VIC) und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszenzierend) ist, und „IC“ nennen.
- für jede in der Mikrotiterplatte verwendete Vertiefung im Well Inspector den Detektor („detector“) (zu messender Fluoreszenztyp) so einrichten, dass „passive reference“ (passive Referenz) = „ROX“ (AP593 wird statt ROX verwendet, Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz) ist, und Reaktionstyp festlegen (Probe, negative Amplifikationskontrolle, positive Amplifikationskontrolle oder Standard bei bekannter Menge). Diese Informationen zum **Arbeitsblatt** am Ende dieser Gebrauchsanweisung hinzufügen oder die Mikrotiterplatten-Einrichtung ausdrucken. Das **Arbeitsblatt** muss bei der Überführung des Reaktionsgemischs und der Proben in die Vertiefungen sorgfältig befolgt werden.

Hinweis: Zum Bestimmen des DNA-Titers in der Ausgangsprobe eine Reaktionsreihe mit den **Q - PCR Standards** (10^5 Kopien, 10^4 Kopien, 10^3 Kopien, 10^2 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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



Legende: S1 - S12: Zu analysierende Proben; **NC**: Negative Control der Amplifikation;
10^2: 10^2-Standardkopien; **10^3**: 10^3-Standardkopien; **10^4**: 10^4-Standardkopien; **10^5**: 10^5-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 HHV7-Sonde so einrichten, dass „reporter“ (Reporter) = „FAM“ und „quencher“ (Quencher) = „none“ (nicht fluoreszierend) ist, und „HHV7“ 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 fluoreszierend) 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** (10^5 Kopien, 10^4 Kopien, 10^3 Kopien, 10^2 Kopien) ausführen, um die **Standardkurve** zu erhalten.

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

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	1 min
	80 °C	15 s
	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 Röhrchen **HHV7 Q - PCR Mix** auftauen und daran denken, dass jedes Röhrchen für die Vorbereitung von **25 Reaktionen** ausreicht. Vorsichtig mischen, den Inhalt 5 Sekunden lang herunterzentrifugieren und Röhrchen auf Eis lagern;
- die **HHV7 - Positive Control** oder die **HHV7 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.
- die während des Laufs verwendete **Amplifikations-Dichtungsfolie** zur Hand nehmen; dabei puderfreie Handschuhe tragen und die Folie nicht beschädigen.

1. **20 µl HHV7 Q - PCR Mix** präzise auf den Boden der Vertiefungen in der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Bläschenbildung vermeiden.

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

2. **10 µl DNA-Extrakt** 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. 10 µl hochreines Wasser für die Molekularbiologie (nicht im Lieferumfang dieses Produkts enthalten) präzise in die Vertiefung der Amplifikations-Mikrotiterplatte der Negativkontrolle der Amplifikation mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im Arbeitsblatt festgelegt. Die Negativkontrolle gut mischen, dazu das hochreine Wasser für die Molekularbiologie dreimal in das Reaktionsgemisch

pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

4. Je nach benötigtem Ergebnis (qualitativ oder quantitativ) muss eine dieser beiden Optionen befolgt werden:

   - Wenn ein **qualitatives** Ergebnis benötigt wird (Nachweis von HHV6-DNA): **10 µl HHV7 - Positive Control** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Die Positivkontrolle gut mischen, dazu das Volumen von 10 µl dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden.

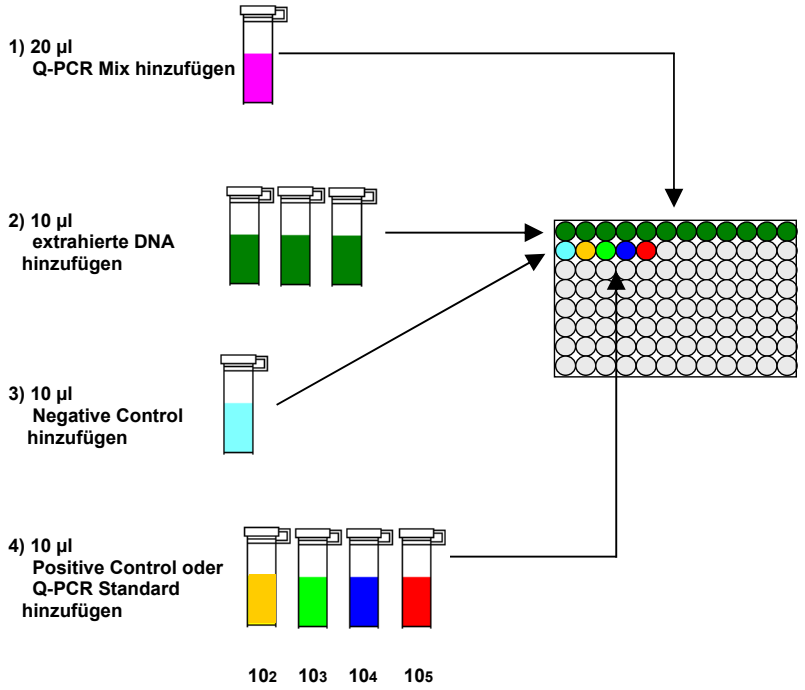
   - Wenn ein **quantitatives** Ergebnis benötigt wird (Quantifizierung von HHV8-DNA): **10 µl HHV7 Q - PCR Standard 10^2** präzise in die entsprechende Vertiefung der **Amplifikations-Mikrotiterplatte** mit dem Reaktionsgemisch pipettieren, wie zuvor im **Arbeitsblatt** festgelegt. Den Standard gut mischen, dazu das Volumen von 10 µl dreimal in das Reaktionsgemisch pipettieren. Bläschenbildung vermeiden. Mit den **HHV7 Q - PCR Standards 10^3, 10^4, 10^5** auf die gleiche Weise verfahren.

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

6. Die **Amplifikations-Mikrotiterplatte** in den Echtzeit-Thermocycler im Bereich für die Amplifikation/Detektion von Amplifikationsprodukten transferieren und den Temperaturzyklus für die Amplifikation starten; dabei die Laufeinstellung mit einem eindeutigen und wiedererkennbaren Dateinamen (z. B. „Jahr-Monat-Tag-HHV7-ELITECHGROUP“) 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.

Qualitative Analyse der Ergebnisse

Die aufgezeichneten Werte der von der spezifischen HHV7-Sonde (FAM-Detektor „HHV7“) und der spezifischen Sonde für die Internal Control (VIC-Detektor „IC“) in den Amplifikationsreaktionen ausgesendeten Fluoreszenz müssen von der Gerätesoftware analysiert werden.

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

Hinweis: Bei einer positiven Probe mit einem hohen HHV7-DNA-Titer kann die FAM-Fluoreszenz der HHV7-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 „HHV7“ 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 „HHV7“ 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 HHV7 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Positive Control FAM-Detektor „HHV7“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct ≤ 25	POSITIV	KORREKT

Wenn das Ergebnis der Amplifikationsreaktion der **Positive Control** bei HHV7 **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 HHV7-DNA verwendet wird, wurden statt der Reaktionen der **Positive Control** die **Q - PCR Standard** Reaktionen ausgeführt. In diesem Fall die Amplifikation und den Nachweis validieren, hierzu die Amplifikationsreaktion von **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**) beachten.

In der Amplifikationsreaktion der **Negative Control** dient der **Ct**-Wert von HHV7 („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) der Validierung der Amplifikation und des Nachweises, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

Reaktion der Negativkontrolle FAM-Detektor „HHV7“	Assayergebnis	Amplifikation/Detektion
Ct Undetermined (Ct unbestimmt)	NEGATIV	KORREKT

Weicht das Ergebnis der Amplifikationsreaktion für die **Negative Control** von **„Ct Undetermined“ (CT unbestimmt)** für HHV7 ab, wurde die Ziel-DNA nachgewiesen. Das heißt, dass während des Amplifikationsschritts Probleme aufgetreten sind (Kontamination), die zu falschen und falsch-positiven Ergebnissen führen können. Der Lauf ist ungültig und muss ab dem Amplifikationsschritt wiederholt werden.

In der Amplifikationsreaktion jeder **Probe** dient der **Ct**-Wert von HHV7 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 für die Region eines Kapsidproteingens (U57) von HHV7 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	HHV7-DNA
FAM-Detektor „HHV7“	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 HHV7 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 Internal Control-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 HHV7 und **Ct ≤ 35** bei der Internal Control, bedeutet dies, dass die HHV7-DNA in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachgewiesen wurde; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Titer der HHV7-DNA unter der Nachweisgrenze des Produkts (siehe „Leistungsmerkmale“) liegt. In diesem Fall kann das Ergebnis falsch-negativ sein.

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

Hinweis: Wird in der Amplifikationsreaktion einer Probe die HHV7-DNA nachgewiesen, kann das Ergebnis der Internal Control „Ct > 35“ oder „Ct Undetermined“ (Ct unbestimmt) sein. So kann die wenig effiziente Amplifikationsreaktion bei der Internal Control durch den Wettbewerb mit der hocheffizienten Amplifikationsreaktion bei HHV7-DNA verdrängt werden. In diesem Fall ist die Probe dennoch geeignet und das positive Ergebnis des Assays gültig.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

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.

Die HHV7-**Ct**-Werte dienen bei den Amplifikationsreaktionen der vier **Q - PCR Standards** zur Berechnung der **Standardkurve** („Results > Standard Curve“ (Ergebnisse > Standardkurve)) für den Amplifikationslauf, um die Amplifikation und Detektion wie in der folgenden Tabelle dargestellt validieren zu können:

Standardkurve FAM-Detektor „HHV7“	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 HHV7-**Ct**-Werte in der Amplifikationsreaktion der einzelnen **Proben** und die **Standardkurve** des Amplifikationslaufs dienen dazu, die **Menge** der in den Amplifikationsreaktionen der Proben vorhandenen Ziel-DNA zu berechnen.

Dieses Produkt ist in der Lage, zwischen 1.000.000 und 10 Kopien von DNA für die Region eines Kapsidproteingens (U57) von HHV7 in der Amplifikationsreaktion zu quantifizieren, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht (linearer Messbereich, siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“), wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Probenergebnis FAM-Detektor „HHV7“	HHV7-Genomäquivalente pro Reaktion
Menge > 1 x 106	MEHR ALS 1.000.000
1 x 101 ≤ Menge ≤ 1 x 106	= Menge
Menge < 1 x 101	WENIGER ALS 10

Die Ergebnisse (**Menge**) jeder **Probe** („Results > Report“ (Ergebnisse > Bericht)) dienen zur Berechnung der Genomäquivalente (**gEq**) von HHV7, die in der bei der Extraktion verwendeten Probe vorhanden sind (**Nc**), gemäß dieser Formel:

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

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

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

Vereinfachte Formel für Vollblut und NucliSENS® easyMAG®
Nc (gEq/ml) = 100 x Menge

Wird das Extraktionssystem **NucliSENS® easyMAG®** mit Liquorproben verwendet und das Ergebnis **in gEq/ml** benötigt, ändert sich die Formel wie folgt:

Vereinfachte Formel für Liquor und NucliSENS® easyMAG®
Nc (gEq/ml) = 20 x Menge

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

Vereinfachte Formel für Vollblut und QIAsymphony® SP/AS
Nc (gEq/ml) = 45 x Menge

Berechnung der Grenzen des linearen Messbereichs

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

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

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

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

Grenzen des linearen Messbereichs (gEq/ml) bei NucliSENS® easyMAG®
Untere Grenze (gEq/ml) = 100 x 10 gEq **Obere Grenze (gEq/ml) = 100 x 1.000.000 gEq**
von 1000 bis 100.000.000 gEq/ml

Wird das Extraktionssystem **NucliSENS® easyMAG®** zusammen mit Liquor verwendet, ändert sich die Formel wie folgt:

Grenzen des linearen Messbereichs (gEq/ml) bei NucliSENS® easyMAG®
Untere Grenze (gEq/ml) = 20 x 10 gEq **Obere Grenze (gEq/ml) = 20 x 1.000.000 gEq**
von 200 bis 20.000.000 gEq/ml

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

Grenzen des linearen Messbereichs (gEq/ml) bei QIAsymphony® SP/AS
Untere Grenze (gEq/ml) = 45 x 10 gEq **Obere Grenze (gEq/ml) = 45 x 1.000.000 gEq**
von 450 bis 45.000.000 gEq/ml

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

LEISTUNGSMERKMALE BEI ANDEREN SYSTEMEN

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays als dessen Nachweisgrenze wurde mithilfe von Plasmid-DNA getestet. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/10 µl mit IC-DNA, verdünnt auf einen Titer von 20.000 Kopien/10 µl, in einer humanen genomischen DNA mit einem Titer von 500 ng/10 µl verdünnt. Diese Probe wurde in 50 Wiederholungen getestet. Dabei wurde die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anz.	positiv	negativ
10 Kopien Plasmid-DNA + 20.000 Kopien IC-DNA + 500 ng humane genomische DNA	50	50	0

Analytische Sensitivität: linearer Messbereich

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

Die analytische Sensitivität dieses Assays wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe (1 $\log_{10}$-Verdünnungsschritte) einer Plasmid-DNA ermittelt. Diese enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Ausgangskonzentration mit einem Spektrophotometer gemessen wurde. Die Verdünnungen von 10^7 Molekülen pro Reaktion bis 10^1 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 10^6 Molekülen pro Reaktion, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb von 1 Logarithmus ab der höchsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10^5 Moleküle/10 µl).

Die untere Grenze des linearen Messbereichs wurde auf 10 Moleküle pro Reaktion festgelegt, was den Genomäquivalenten pro Reaktion entspricht, innerhalb 1 Logarithmus ab der niedrigsten Konzentration des Q - PCR Standard Amplifikationsstandards (10^2 Moleküle/10 µl).

Die endgültigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

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

Die linearen Messbereichsgrenzen in **gEq/ml** in Bezug auf das verwendete Extraktionskit sind auf Seite 26 berechnet.

Analytische Sensitivität: Präzision und Genauigkeit

Die Präzision des Assays als die Variabilität der Ergebnisse, die mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhalten wurde, ergab einen mittleren prozentualen Variationskoeffizienten (VK %) von zirka 25,9 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10^6 Molekülen bis 10^1 Molekülen in den 10 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

Die Genauigkeit des Assays als die Differenz zwischen dem mit mehreren Replikaten einer innerhalb ein und desselben Laufs getesteten Probe erhaltenen Mittelwert der Ergebnisse und der theoretischen Konzentration der Probe ergab eine mittlere prozentuale Ungenauigkeit (% Ungenauigkeit) von zirka 9,0 % der gemessenen Mengen innerhalb des Bereichs von 10^6 Molekülen bis 10 Molekülen in den 10 µl DNA, die der Amplifikationsreaktion hinzugefügt wurden.

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

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

Die analytische 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 **U57**-Gen von HHV7 verfügbaren Sequenzen ergab eine Erhaltung und ein Nichtvorhandensein von signifikanten Mutationen.

Diagnostische Sensitivität: Bestätigung positiver Proben

Die diagnostische Sensitivität des Assays als die Bestätigung positiver klinischer Proben wurde durch Analyse einiger HHV7-DNA-positiver Proben bewertet.

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 23 negative, in EDTA entnommene Vollblutproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt für die verschachtelte [„nested“] Amplifikation) bewertet, die mit der zertifizierten Referenzprobe „HHV7 Culture Fluid“ (Art.-Nr. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA) auf das Dreifache der Nachweisgrenze für HHV7-DNA dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-dotiertes Vollblut	23	23	0

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

Für die Bewertung der diagnostischen Sensitivität wurden 25 HHV7-DNA-negative Liquorproben (getestet mit einem CE-IVD-Produkt für die verschachtelte [„nested“] Amplifikation) bewertet, die mit der zertifizierten Referenzprobe „HHV7 Culture Fluid“ (Art.-Nr. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA) auf das Dreifache der Nachweisgrenze für HHV7-DNA dotiert waren. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen System NucliSENS® easyMAG® und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
Mit HHV7-DNA dotierter Liquor	25	25	0

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 HHV7, darunter das komplette CMV-, EBV- und HHV6-Genom, verfügbaren Sequenzen ergab, dass die humanen Viren, die HHV7 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 anhand einiger negativ auf HHV7-DNA, jedoch positiv auf andere Pathogene getesteter klinischer Proben verifiziert.

Für die Verifizierung der analytischen Spezifität wurden als Referenzmaterial 12 in EDTA entnommene Vollblutproben, die negativ auf HHV7-DNA (getestet mit einem CE-IVD-Produkt für die verschachtelte [„nested“] Amplifikation), jedoch positiv auf die DNA anderer Erreger (CMV, EBV und HHV6) getestet worden waren, verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, CMV-positives Vollblut	4	0	4
In EDTA entnommenes, EBV-positives Vollblut	6	0	6
In EDTA entnommenes, HHV6-positives Vollblut	1	0	1
In EDTA entnommenes, HHV6- und EBV-positives Vollblut	1	0	1

Diagnostische Spezifität: Bestätigung negativer Proben

Die diagnostische Spezifität des Assays als die Bestätigung negativer Proben wurde durch Analyse einiger HHV7-DNA-negativer klinischer Proben bewertet.

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden als Referenzmaterial 23 in EDTA entnommene Vollblutproben, die HHV7-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt für die verschachtelte („nested“) Amplifikation), verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren, die Extraktion und Amplifikation, mit Produkten der ELITechGroup S.p.A. durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
In EDTA entnommenes, HHV7-DNA-negatives Vollblut	23	0	23

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

Für die Bewertung der diagnostischen Spezifität wurden als Referenzmaterial 26 Liquorproben, die HHV7-DNA-negativ waren (getestet mit einem CE-IVD-Produkt für die verschachtelte („nested“) Amplifikation), verwendet. Für die Testung jeder Probe wurde das gesamte Analyseverfahren durchgeführt: die Extraktion mit dem automatischen System NucliSENS® easyMAG® und die Amplifikation mit Produkten der ELITechGroup S.p.A.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl	positiv	negativ
HHV7-DNA-negativer Liquor	26	1	25

Eine Probe ergab ein abweichend positives Ergebnis für die HHV7-DNA, mit einem Titer von weniger als 1 Kopie/Reaktion. Diese Abweichung lässt sich dadurch erklären, dass Proben mit derart niedrigen Titern abwechselnd und zufällig positive und negative Ergebnisse liefern können.

Die diagnostische Spezifität des Assays betrug bei diesem Test 96,1 %.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Produkts mit Matrizes und Geräten durchgeführt wurden, sind in der technischen Dokumentation „HHV7 ELITe MGB® Kit“, FTP RTS037PLD, aufgeführt.

QUELLENANGABEN

F. Drago et al. (1997) *Lancet* 349: 1367 - 1368 (allegato n° 1, 2 pagine);
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30
Michael Kidd et al. (1996) *The Journal of Infectious Diseases* 174: 396-401

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Dieses Produkt darf nur mit den folgenden klinischen Proben verwendet werden: Vollblut, in EDTA entnommenes Plasma und Liquor.

Derzeit liegen keine Daten zur Produktleistung mit anderen klinischen Proben vor.

In EDTA entnommenes Plasma muss aus Vollblut gewonnen werden, das bei Raumtemperatur oder bei +2 bis +8 °C nicht länger als 24 Stunden gelagert wurde.

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

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

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

Es liegen keine Daten zu Produktleistungen mit DNA vor, die aus den folgenden klinischen Proben extrahiert wurde: Leukozytensuspension, Suspension von Granulozyten, Fruchtwasser.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Die mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse können manchmal aufgrund von Ausfällen der internen Kontrolle ungültig sein. In diesem Fall muss die Probe ab der Extraktion erneut getestet werden, was zu einer Verzögerung der endgültigen Testergebnisse führen kann.

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

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

Wie bei allen diagnostischen Produkten besteht auch bei diesem Produkt ein Restrisiko von ungültigen oder fehlerhaften Ergebnissen. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter minimiert werden. In manchen Fällen kann dieses Restrisiko zu falschen Entscheidungen mit potenziell gefährlichen

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

Auswirkungen auf den Patienten beitragen. Dieses Restrisiko im Zusammenhang mit dem Verwendungszweck des Produkts wurde jedoch gegen den potenziellen Nutzen für den Patienten abgewogen und als akzeptabel eingestuft.

FEHLERBEHEBUNG

ELITe InGenius und ELITe BeGenius

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

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

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

Ungültige Probenreaktion	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Abbau der Vorlage für die Internal Control.	Ein neues Aliquot der Internal Control verwenden.
Inhibition durch Störsubstanzen in der Probe.	Amplifikation der eluierten Probe mit einer 1:2-Verdünnung in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „PCR Only“-Lauf (nur PCR) wiederholen. Extraktion mit einer 1:2-Verdünnung der Probe in hochreinem Wasser für die Molekularbiologie in einem „Extract + PCR“-Lauf (Extraktion + PCR) wiederholen.
Gerätefehler.	Technischen Kundendienst der ELITechGroup kontaktieren.

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

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF **RTS037PLD**

Offene Plattform:

Ziel-DNA nicht in der Positive Control oder den Q - PCR Standard Reaktionen erkannt oder ungültiger Korrelationskoeffizient der Standardkurve	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Beim Dispensieren von Reaktionen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen. Volumina des dispensierten Reaktionsgemischs kontrollieren. Volumina der dispensierten Positivkontrolle oder des dispensierten Standards kontrollieren.
Abbau der Sonde.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Positivkontrolle oder Abbau des Standards.	Ein neues Aliquot der Positivkontrolle oder des Standards verwenden.
Einstellfehler des Geräts.	Positionseinstellungen für die Positivkontrolle oder Standardreaktionen des Geräts überprüfen. Temperaturzyklus-Einstellungen des Geräts überprüfen.

Ziel-DNA in der Reaktion der Negative Control erkannt	
Mögliche Ursachen	**Abhilfemaßnahmen**
Falsches Dispensieren in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	Verschütten des Inhalts des Proben-Teströhrchens vermeiden. Zwischen einer Probe und der nächsten immer die Spitzen wechseln. Beim Dispensieren von Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen oder Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorsichtig vorgehen und das Arbeitsblatt befolgen.
Fehler beim Einstellen des Geräts.	Positionseinstellungen für Proben, Negativkontrollen, Positivkontrollen oder Standards auf dem Gerät überprüfen.
Mikrotiterplatte schlecht versiegelt.	Beim Versiegeln der Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen.
Kontamination des hochreinen Wassers für die Molekularbiologie.	Ein neues Aliquot sterilen Wassers verwenden.
Kontamination des Reaktionsgemischs.	Ein neues Aliquot des Reaktionsgemischs verwenden.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Oberflächen und Geräte mit wässrigen Reinigungsmitteln reinigen, Laborkittel waschen, verwendete Teströhrchen und Spitzen austauschen.

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

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

SYMBOLE

REF Katalognummer.

Temperaturobergrenze.

LOT Chargenbezeichnung.

Verfallsdatum (letzter Tag des Monats).

IVD *In-vitro*-Diagnostikum.

CE Erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.

Σ Ausreichend für „N“ Tests

Vorsicht, Gebrauchsanweisung beachten.

FORT Inhalt

Vor Sonneneinstrahlung schützen.

Hersteller.

HHV7 ELITe MGB® Kit
Reagenzien für die DNA-Real-Time-PCR

REF RTS037PLD

HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

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

ELITe MGB® Nachweisreagenzien sind durch eines oder mehrere der US-Patente mit den Nummern 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 und der EP-Patente mit den Nummern 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 sowie durch anhängige Patentanmeldungen geschützt.

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

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

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

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

QIAsymphony® ist eine eingetragene Marke von QIAGEN.

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

HHV7 ELITe MGB® kit
used in association with Genius series® platforms

Ref: RTS037PLD

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

Intended use

The HHV7 ELITe MGB® Kit product is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and the quantification of the DNA of **Human Herpes Virus 7** (HHV7), extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood and plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HHV7 infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

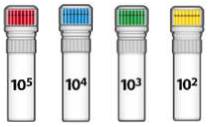
	Gene	Fluorophore	Channel
Target	capsid protein gene U57	FAM	HHV7
Internal Control	IC2	AP525 (VIC)	IC

Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

Kit content and related products

HHV7 ELITe MGB KIT RTS037PLD	HHV7 ELITe Standard STD037PLD	HHV7 - ELITe Positive Control CTR037PLD
X 4	 X 2	X 1
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles each set (4 separate sessions on board)	Ready-to-use PC 1 tube of 160 µL 4 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles (4 separate sessions on board)
Maximum shelf-life:	**24 months**	
Storage temperature	**≤ -20°C**	

Other products required not provided in the kit

› **ELITe InGenius instrument:** INT030
› **ELITe BeGenius instrument:** INT040
› **ELITe InGenius SP200 Extraction Cartridge:** INT032SP200
› **ELITe InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
› **ELITe InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
› **CPE - Internal Control:** CTRCPE
› **HHV7 ELITe Standard:** STD037PLD
› **HHV7 - ELITe Positive Control:** CTR037PLD
› **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
› **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
› **1000 µL Filter Tips Tecan:** 30180118

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Protocol

›	Sample volume	200 µL	
›	CPE Internal Control volume	10 µL	
›	Total eluate volume	100 µL	
›	PCR eluate input volume	10 µL	
›	HHV7 Q-PCR Mix volume	20 µL	
›	Unit of quantitative result	cp/mL	
›	Frequency of controls	15 days	
›	Frequency of calibration	60 days	

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	**500 cp/mL**	**100%** 34/34*	**100%** 38/38*
Plasma	**500 cp/mL**	**100%** 33/33*	**100%** 33/33*

**confirmed samples/ tested samples*

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

Sample type	Transport/Storage conditions			
	+16 / +26 °C (room temperature)	**+2 / +8 °C**	**-20 ±10 °C**	**-70 ±15 °C**
Whole Blood collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month
Plasma collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month

Do not use Plasma collected in heparin to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "**CLOSED**".	**2.** Verify calibrators: **HHV7 Q-PCR Standard** in the "Calibration menu" Verify controls: **HHV7 Positive Control** and **HHV7 Negative Control** in the "Control menu" *Note:* All must have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the **HHV7 PCR Mix** and the **CTRCPE** tubes Vortex gently Spin down 5 sec.

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	**2.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	**3.** Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITe_PL_200_100 or HHV7 ELITe_WB_200_100	**5.** Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Primary tube or Extraction Tube	**6.** Load the PCR Mix and Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tips, Extraction Tube racks and primary sample racks	**8.** Close the door Start the run	**9.** View, approve and store the results

Note: If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

1 Select "Perform Run" on the touch screen	**2.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elution: "100 µL"	**3.** Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITe_PC and HHV7 ELITe_NC or HHV7 ELITe_STD)	**5.** Select the method "PCR only" andset the sample position "Elution tube"	**6.** Load the PCR Mix in the inventory block
7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	**8.** Close the door Start the run	**9.** View, approve and store the results

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "**CLOSED**".	**2.** Verify calibrators: **HHV7 Q-PCR Standard** in the "Calibration" menu. Verify controls: **HHV7 Positive Control** and **HHV7 Negative Control** in the "Controls" menu. *Note:* All must have been run, approved and not expired.	**3.** Thaw the **HHV7 PCR Mix** and the **CTRCPE** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»	**2.** Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active	**3.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elution: "100 µL"
4. Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELITe_Be_PL_200_100 or HHV7 ELITe_Be_WB_200_100) **Note**: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4	**5.** Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**6.** Load the PCR-Mix and the Internal Control in Reagent Rack/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
7 Load "PCR Basket" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables	**8.** Close the door. Start the run	**9.** View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	**2.** Load the extracted nucleic acid or controls or standards barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**3.** Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"
4Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELITe_Be_PC and HHV7 ELITe_Be_NC or HHV7 ELITe_Be_STD)	**5. .** Load the PCR-Mix in Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit	**6.** Load "PCR Basket" with "PCR Cassette"
7. Close the door. Start the run	**8.** View, approve and store the results	