

Gebrauchsanweisung

PoET B19V

Zur Verwendung auf dem PoET Instrument

In-vitro-Diagnostikum

REF P2E-28-30

IVD CE

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendungszweck	3
1.1. Kurzbeschreibung	3
1.2. Verwendungszweck	3
2. Erklärung des Tests	3
3. Informationen zum Erreger B19V	4
4. Testprinzip	4
5. Reagenzien und Materialien	6
5.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien	6
5.2. Entsorgung	7
6. Erforderliche Ausrüstung	7
6.1. Geräte und Software	7
6.2. Erforderliche Verbrauchsartikel für <i>PoET B19V</i> auf dem <i>PoET Instrument</i>	7
6.3. Zubehör- und Kontroll-Kits zur Verwendung auf dem <i>PoET Instrument</i>	7
6.4. Zusätzlich benötigte Ausrüstung	8
7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	8
8. Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Plasmaproben	9
8.1. Probenmaterial	9
8.2. Probengewinnung & -vorbehandlung.....	9
8.3. Probentransport.....	10
8.4. Probenlagerung.....	10
8.5. Proben für das <i>PoET Instrument</i> bereitstellen	10
9. Bearbeitung von Proben auf dem <i>PoET Instrument</i>	11
10. Kontrollverfahren	11
10.1. Maßnahmen zur Qualitätskontrolle	11
11. Auswertung und Gültigkeit der Ergebnisse	11
12. Verfahrenseinschränkungen	12
13. Leistungsmerkmale	13
13.1. Analytische Leistungsmerkmale.....	13
13.2. Diagnostische Spezifität	14
13.3. Gesamtausfallrate	14
13.4. Genotypen.....	14
13.5. Testung von Proben aus der Serokonversionsphase	14
13.6. Untersuchungen zu Einschränkungen des Nachweisverfahrens	14
13.6.1. Störsubstanzen.....	14
13.6.2. Kreuzreaktivität.....	16
14. Änderungen im Analysenverfahren und in der Analysenleistung	16
15. Erklärung der Symbole	17
16. Abkürzungsverzeichnis	18
17. Technischer Service	18
18. Literaturangaben	19
19. Haftungsausschluss und Markenschutz	19
20. Änderungshistorie	19

1. Verwendungszweck

1.1. Kurzbeschreibung

Das PCR-Kit *PoET B19V* der Gesellschaft zur Forschung, Entwicklung und Distribution von Diagnostika im Blutspendewesen mbH (im Folgenden als GFE bezeichnet) ist ein Real-Time PCR-Kit zum qualitativen Nachweis von Parvovirus B19 DNA (B19V DNA).

1.2. Verwendungszweck

Das PCR-Kit *PoET B19V* ist ein gemäß IVD-Richtlinie 98/79/EG CE-markiertes *In-vitro*-Diagnostik-Testkit für die qualitative Untersuchung von humanen Plasmaproben, die im Rahmen von Blutspenden entnommen wurden, zum Nachweis von Parvovirus B19 DNA (B19V DNA).

Das PCR-Kit *PoET B19V* ist für das Screening individueller Proben und Proben-Pools bestehend aus Aliquots individueller Proben gedacht.

In Kombination mit dem *PoET Master Positive Control* Reagenz kann mit dem PCR-Kit *PoET B19V* eine semi-quantitative Aussage über die B19V-Konzentration der Probe getroffen werden.

Darüber hinaus ist das PCR-Kit *PoET B19V* für den qualitativen Nachweis von B19V in individuellen humanen Plasmaproben geeignet.

Die Prozessierung des PCR-Kits *PoET B19V* erfolgt mit dem *PoET Instrument* der GFE.

2. Erklärung des Tests

Die Sicherheit von Blut und Blutprodukten erfordert die Feststellung der Eignung der Spender und die Testung der gegebenen Spenden, um das Risiko einer möglichen Übertragung viraler Erreger bei der Transfusion von Blut und Blutbestandteilen zu minimieren. Aber auch durch serologisches Screening kann die Gefahr einer Übertragung viraler Infektionen durch Transfusion nicht ausgeschlossen werden. Bei Blutspenden, die im Zeitraum der Serokonversion gewonnen werden, besteht ein Restrisiko der Übertragung [1]. Durch das Testen auf virale Nukleinsäuren mittels NAT (Nukleinsäure-Amplifikationstechnik) lässt sich das diagnostische Zeitfenster frischer Infektionen verkürzen und das Risiko einer Übertragung minimieren.

Der Nachweis von B19V-spezifischer DNA in humanem Blutplasma mit dem gebrauchsfertigen PCR-Kit *PoET B19V* erfolgt durch eine *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Real-Time PCR) mit dem *PoET Instrument*.

Bei der PCR wird ein spezifischer Target-Bereich des B19V-Genoms mit dem PCR-Kit *PoET B19V* amplifiziert. Dieser Bereich liegt in einer konservierten Region des B19V-Genoms.

Auf dem *PoET Instrument* wird das PCR-Kit *PoET B19V* zusammen mit der *PoET Internal Control* prozessiert, die den gesamten Prozess von der Probenvorbereitung bis zur Ergebnisauswertung überwacht. Diese Interne Kontrolle (IC) ist als separates Zubehör-Kit erhältlich.

Die Auswertung der mittels PCR erhobenen Daten findet auf dem *PoET Instrument* vollautomatisiert mit der *Calliope* Software statt.

3. Informationen zum Erreger B19V

Das humane Parvovirus B19 (B19V) ist ein ssDNA Virus mit einem 5,6 kb großen Genom in einem ikosaedrischen, unbehüllten Virion. B19V wird korrekt als *Primate Erythroparvovirus 1* bezeichnet und gehört zur Gattung der Erythroparvoviren innerhalb der Familie der Parvoviridae. Man kennt derzeit 3 Genotypen (1a-c; 2; 3a,b), von denen in Deutschland vorwiegend nur der Genotyp 1 vorkommt [2].

B19V wird meist via Tröpfcheninfektion und den Kontakt mit Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel und Urin) übertragen. Die Inkubationszeit beträgt etwa 1-2 Wochen. B19V infiziert bevorzugt Erythroblasten und führt so meist zu einer kurzzeitigen Anämie, während der die Viruslast im Blut auf Werte um 10^{12} Viruspartikel/mL steigt [2].

B19V ist u.a. der Erreger der Ringelröteln, einer typischen Kinderkrankheit, was nach überstandener Erkrankung zu einer lebenslangen Immunität führt. Etwa 30% der Infektionen im Kindesalter verlaufen symptomfrei, ansonsten kommt es nach einem unspezifischen Stadium mit Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Durchfall zu einem charakteristischen Exanthem („Ringelröteln“). Bei Erwachsenen kann es häufiger zu Komplikationen wie einer Gelenkentzündung (*Arthritis*) oder einem schwereren Krankheitsverlauf kommen [4]. Erfolgt eine Infektion mit B19V während einer Schwangerschaft, kann sich das ungeborene Kind infizieren, was sehr häufig zu Komplikationen bis hin zu Fehl- bzw. Totgeburten führen kann [2][3].

Derzeit existiert noch kein Impfstoff gegen Ringelröteln. Zur Behandlung werden symptomatische Therapiemaßnahmen eingesetzt.

4. Testprinzip

Das PCR-Kit kommt auf dem vollautomatisierten *PoET Instrument* nach der Probenvorbereitung bei der anschließenden PCR-Amplifikation und Detektion zum Einsatz. Der Nachweis der viralen Nukleinsäuren mit *PoET B19V* basiert auf der Real-Time RT-PCR-Technologie. Die Daten- und Ergebnisverwaltung erfolgt über die *Calliope* Software.

Das Verfahren untergliedert sich in folgende Teilschritte:

- Probenvorbereitung
- PCR-Setup
- Amplifikation und Detektion
- Auswertung und Bericht

Probenvorbereitung

Als Probenmaterial kommt humanes EDTA-Plasma zum Einsatz. Zu Prozessbeginn wird die als Prozesskontrolle für die Extraktion und die PCR-Amplifikation dienende *PoET Internal Control* (separat erhältlich) zum Probenmaterial zugegeben.

In der Probe befindliche Viruspartikel werden lysiert, die enthaltenen Nukleinsäuren freigesetzt und an magnetische Partikel gebunden. Durch Waschschriffe werden andere Moleküle wie Proteine und weitere Verunreinigungen abgetrennt. Die gebundenen Nukleinsäuren werden dann mittels eines Elutionspuffers von den magnetischen Partikeln gelöst. Der Elutionspuffer enthält die RNA der IC und gegebenenfalls die nachzuweisenden viralen Nukleinsäuren.

PCR-Setup:

Der durch das *PoET Instrument* angesetzte PCR-Mastermix setzt sich aus einem universellen *enzyme mix* und einem spezifischen *oligo mix* zusammen. Der *oligo mix* enthält virusspezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden), die bei Vorhandensein von B19V in der Probe an hochkonservierte Regionen der viralen Nukleinsäuren binden. Zusätzlich zu den

virusspezifischen Oligonukleotiden enthält der *oligo mix* Primer und Sonden für die Amplifikation der Sequenz der Internen Kontrolle. Zusammen mit der *PoET Internal Control* bildet das PCR-Kit *PoET B19V* also ein zweites heterologes, nicht kompetitives Amplifikationssystem als Interne Kontrolle in jeder Probe.

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Amplifikaten vorausgegangener B19V PCR-Reaktionen enthält der *enzyme mix* eine hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) und dUTP im Gemisch der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Die UNG degradiert mögliche verschleppte Amplikate im Reaktionsansatz bei Raumtemperatur vor dem Start der RT-PCR. Während des RT-Schritts wird die UNG durch die erhöhte Reaktionstemperatur von 55°C inaktiviert, so dass neu in der PCR gebildete Amplikate nicht abgebaut werden.

Reverse Transkription:

Die RNA-Moleküle der IC unterliegen der reversen Transkription durch eine rekombinante Variante des Enzyms M-MLV Reverse Transkriptase. Während der reversen Transkription wird eine sequenzspezifische cDNA-Kopie der RNA der IC hergestellt.

Amplifikation:

Die Amplifikation erfolgt auf Basis der DNA von B19V und der mittels reverser Transkription hergestellten cDNA der Internen Kontrolle. Bei der nachfolgenden PCR wird das Reaktionsgemisch erhitzt, um die enthaltene doppelsträngige DNA aufzutrennen und als einzelsträngige DNA-Matrizen bereitzustellen („Denaturierung“). Beim Abkühlen des Gemisches lagern sich Sonden und Primer an die DNA-Einzelstränge an („Annealing“). In Gegenwart von Mg²⁺-Ionen und überschüssigen dNTPs werden die Primer vom Enzym „*Thermus aquaticus* (Taq) DNA Polymerase“ entlang der Zielmatrizen verlängert („Extension“). In jedem Zyklus werden auf diese Weise neue doppelsträngige DNA-Moleküle, das so genannte Amplikat, erzeugt.

Dieser Prozess wird bis zum Erreichen einer festgelegten Anzahl von Zyklen wiederholt, wobei unter idealen Reaktionsbedingungen jeder Zyklus die Menge an Ziel-DNA in Form von Amplikaten verdoppelt.

Detektion:

Die Detektion erfolgt über im Reaktionsgemisch enthaltene Oligonukleotid-Sonden, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff („*Reporter*“) und am 3'-Ende mit einem *Quencher* gekoppelt sind. Während der Amplifikation kommt es in jedem PCR-Zyklus zu einer Hybridisierung der sequenzspezifischen Sonde an das Template im Sequenzbereich zwischen den Forward- und Reverse-Primer-Bindungsstellen. Während der Extension des Forward-Primers wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion der Taq-DNA-Polymerase gespalten, wodurch der *Reporter*-Farbstoff freigesetzt wird. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung durch eine externe Lichtquelle die Fluoreszenz des an der Sonde gebundenen *Reporter*-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum *Quencher* mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Bei der Hydrolyse der Sonde wird durch die räumliche Trennung der Energietransfer zwischen *Reporter* und *Quencher* unterbrochen und damit das Fluoreszenz-Signal des *Reporter*-Farbstoffs verstärkt.

Mit jedem weiteren Zyklus werden zusätzliche Sondenmoleküle gespalten und damit bei weiteren *Reporter-Quencher*-Paaren der Energietransfer unterbrochen, wodurch sich die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Menge des erzeugten Amplikats erhöht.

Die entstehenden Signale sind sequenzspezifisch, da Sondenmoleküle, deren Sequenzen nicht komplementär zur Zielregion sind, nicht mit den Templates hybridisieren und nicht durch die Taq-DNA-Polymerase gespalten werden können.

Für das nachzuweisende Virus und die IC kommen verschiedene *Reporter*-Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren an den jeweiligen Sonden zum Einsatz. Eine erfolgreiche

Amplifikation beider Templates kann daher durch den Signalanstieg in zwei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen detektiert werden.

Auswertung und Bericht:

Nach dem PCR-Lauf auf dem *PoET Instrument* erfolgt die Auswertung vollautomatisch durch die *Calliope* Software. Nähere Details zur Auswertung werden im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* beschrieben.

5. Reagenzien und Materialien

Der Inhalt eines PCR-Kits *PoET B19V* umfasst jeweils 30 Reagenzien-Röhrchen *enzyme mix* und *oligo mix*.





PoET B19V			
GFE Artikelnummer	P2E-28-30		
Anzahl Reaktionen pro Test (rxn)	28		
Anzahl Tests pro Kit	30		
Anzahl Reaktionen gesamt	840		
Kit-Bestandteil:	Volumen [µL]	Bezeichnung	Deckelfarbe
enzyme mix	1130	EM v1	weiß
oligo mix B19V	148	O_B19 v3	blau

5.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das PCR-Kit wird auf Trockeneis versendet. Das Produkt sollte nach Erhalt auf folgende Punkte überprüft werden:

- den gefrorenen Zustand der Reagenzien
- die Integrität der Umverpackung sowie der einzelnen Reagenz-Röhrchen
- die Vollständigkeit hinsichtlich der Anzahl, Art und Befüllung der Reagenz-Röhrchen

Das PCR-Kit *PoET B19V* wird bei $\leq -18^{\circ}\text{C}$ gelagert und ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Nach Ablauf der deklarierten Haltbarkeit dürfen die Reagenzien nicht mehr verwendet werden.

	Abgelaufene Reagenzien werden vom <i>PoET Instrument</i> anhand der Reagenzien-Barcodes erkannt und ausgeschlossen.
	Die Reagenzien sind für den einmaligen Gebrauch und nicht für ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen vorgesehen. Eventuell verbliebene Reagenzien müssen nach der Anwendung verworfen werden.
	Der <i>oligo mix</i> ist lichtempfindlich und sollte während der Testvorbereitung vor Licht geschützt gelagert werden.
	Zwischen Entnahme aus dem Gefrierschrank und Start des Analysenlaufs am <i>PoET Instrument</i> dürfen maximal 5 Stunden vergehen. Falls die Röhrchen für mehrere Stunden geöffnet gelagert wurden, ist je nach Dauer und Verdunstungsgrad die Funktionalität nicht mehr gewährleistet.

5.2. Entsorgung

- Die Komponenten *enzyme mix* und *oligo mix* des PCR-Kits *PoET B19V* enthalten keine Gefahrstoffe oder biogefährliche Substanzen. Die Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage beim Kundenservice von GFE erhältlich.
- PCR-Platten (*PCR Plates*) und PCR-Reagenzienreste sowie damit in Kontakt gekommene Verbrauchsmaterialien sind gemäß den geltenden Vorschriften zu entsorgen.
- Die Entsorgung der Nukleinsäure-Extraktionsreagenzien und deren Reste ist der Gebrauchsanweisung der Extraktion-Kits *PoET Extraction* und *PoET Prep Reagent* zu entnehmen.

6. Erforderliche Ausrüstung

6.1. Geräte und Software

Vollautomatisiertes *PoET Instrument* inklusive *Calliope* Software und Benutzerhandbuch *PoET Instrument*.

6.2. Erforderliche Verbrauchsartikel für *PoET B19V* auf dem *PoET Instrument*

Diese Verbrauchsmaterialien für das PCR-Kit *PoET B19V* auf dem *PoET Instrument* sind separat von GFE erhältlich:

Bezeichnung	Beschreibung	Artikelnummer
PCR Plates Frame Star® 96 (cut corner A12)	4titude from Brooks Life Sciences FrameStar® 96 (cut corner A12): 96-well semi-skirted PCR plate, black wells, clear frame, bar-coded	SP-0362
Film roll	4titude from Brooks Life Sciences Heat Sealing film roll: "Clear Weld Heat Seal Mark 2"	①

①: Die *Film roll* (Folienrolle) wird im Rahmen der *PoET Instrument* Wartung durch den GFE Kundenservice gewechselt

Die für die Verwendung der Zubehör- und Kontroll-Kits (Kap. 6.3) erforderlichen Verbrauchsmaterialien sind den zugehörigen Gebrauchsanweisungen und dem Benutzerhandbuch *PoET Instrument* zu entnehmen.



Die Verwendung anderer Verbrauchsartikel auf dem *PoET Instrument* ist nicht zulässig.

6.3. Zubehör- und Kontroll-Kits zur Verwendung auf dem *PoET Instrument*

- *PoET Extraction* [Artikelnummer P1A-24-04]
- *PoET Prep Reagent* [Artikelnummer P1B-24-20]
- *PoET Internal Control* [Artikelnummer P1C-1440-60]
- *PoET Negative Control* [Artikelnummer P3A-500-30]
- *PoET Master Positive Control* [Artikelnummer P3B-360-30]

6.4. Zusätzlich benötigte Ausrüstung

- Temperierbare Zentrifuge für die Gewinnung von Plasma aus Primärröhrchen (EDTA-K2 Blutentnahmesysteme mit Gelbarriere). Nähere Angaben sind dem Benutzerhandbuch *PoET Instrument* zu entnehmen.

7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Gute Laborpraxis

- Auf das Tragen einer persönlichen Schutzausrüstung (Kittel, Schutzbrille, Laborhandschuhe) achten.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Die Proben als potentiell infektiös behandeln, wie in „*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*“ [5] und dem CLSI-Dokument M29-A4 [6] beschrieben.
- Wenn Probenmaterial verschüttet wird, sofort mit einem geeigneten Mittel desinfizieren. Kontaminierte Materialien als biologisch gefährlich behandeln.
- Nach Handhabung der Proben und Reagenzien die Hände desinfizieren und gründlich waschen.
- Alle Arbeitsflächen mit vom Robert-Koch-Institut (RKI) gelisteten Desinfektionsmitteln reinigen und desinfizieren.
- Potentielle Nukleinsäurekontaminationen mit DNA-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH) oder einem vergleichbar wirksamen Mittel nach Angaben des Herstellers beseitigen.

Allgemeine Hinweise zum Gebrauch

- Das PCR-Kit *PoET B19V* nur in Kombination mit dem *PoET Instrument* und den beschriebenen Zubehör- und Kontroll-Kits sowie Verbrauchsartikeln einsetzen.
- Alle Reagenzien ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwenden.
- Die Bedienung des *PoET Instrument* darf nur durch qualifiziertes und von GFE geschultes Personal erfolgen.
- Zur Verhütung der Kreuzkontamination von Proben oder Kontrollen sind alle Materialien, die Proben oder Kontrollen enthalten, entsprechend den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor handzuhaben.
- Proben, Kontrollen und PCR-Kits getrennt voneinander aufbewahren.
- Für den sicheren Umgang mit den benutzten und verschweißten *Extraction Plates* und *PCR Plates* die Hinweise im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* beachten.
- Bei der Entsorgung aller Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Kontakt gekommen sind, die einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften einhalten (siehe insbesondere auch Gebrauchsanweisung der *PoET* Zubehör-Kits).
- Das PCR-Kit *PoET B19V* im Temperaturbereich von +15°C bis +30°C anwenden.

Umgang mit Reagenzien

- Die Deckel der Reagenzien vor Positionierung auf den Trägersystemen des *PoET Instrument* abnehmen. Das *PoET Instrument* verfügt über keine Vorrichtung zum automatisierten Entfernen von Deckeln („Decapper“).
- Das Beladen und Entladen der *PoET Instrument* Reagenzträger mit PCR-Reagenzien entsprechend den Vorgaben im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* durchführen. Dies gilt auch für die korrekte Vorbereitung der Proben und Kontrollen. Jede Abweichung von den angegebenen Verfahren kann die Testleistung beeinträchtigen.
- Das Vertauschen von Röhrchendeckeln vermeiden, da dies zu Kontaminationen führen kann.
- Das PCR-Kit *PoET B19V* ist für den einmaligen Gebrauch konzipiert. Reagenzienreste nicht weiterverwenden.
- Reagenzien verschiedener Chargennummern des PCR-Kits *PoET B19V* nicht austauschen oder kombinieren.
- Reagenzien nach Ablauf ihrer Haltbarkeit nicht benutzen.

8. Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Plasmaproben

8.1. Probenmaterial

- Bei der Validierung des PCR-Kits *PoET B19V* wurde ausschließlich humanes EDTA-Plasma als Probenmaterial verwendet. Alle leistungsbezogenen Angaben basieren auf diesem Material, das infolgedessen zur Verwendung mit dem *PoET Instrument* empfohlen ist.
- Citratplasma-Proben sind für den Einsatz mit dem PCR-Kit *PoET B19V* nicht validiert.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen, dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann [7].



Alle Proben sind als potentiell infektiös zu behandeln.

8.2. Probengewinnung & -vorbehandlung

- Die Blutentnahme soll mit handelsüblichen EDTA-K2 Blutentnahmesystemen mit Gelbarriere erfolgen (z.B. Sarstedt oder Becton Dickinson). Diese Röhrchen werden als Primärröhrchen bezeichnet.
- EDTA-Blutröhrchen müssen in der Regel unmittelbar nach der Blutentnahme, das heißt vor dem Abstellen des Röhrchens, 6- bis 8-mal invertiert werden. Das korrekte Vorgehen ist den Gebrauchsanweisungen der Röhrchen-Hersteller zu entnehmen.
- Das Plasma wird durch Zentrifugation der Röhrchen gemäß den Herstellerangaben gewonnen. Dabei wandert die Gel-Barriere in die Mitte des Röhrchens und trennt die Blutbestandteile der Vollblutprobe in Plasma (oben) und zelluläre Bestandteile (unten). Abweichende Bedingungen (z.B. für die Zentrifugation) sind durch den Anwender zu validieren.

- Das *PoET Instrument* benötigt ein Plasma-Volumen von bis zu 1,5 mL. In Abhängigkeit von der Testmethode können auch deutlich geringere Volumina verwendet werden. Nähere Informationen sind dem Benutzerhandbuch *PoET Instrument* zu entnehmen.



Die Primärröhrchen müssen ausreichend gefüllt sein und es ist darauf zu achten, dass keine Gelbestandteile oder Blutzellen das Plasma verunreinigen. Dies kann zu einer Beeinträchtigung der Leistung des Testverfahrens führen.

8.3. Probentransport

Probenmaterial soll ausschließlich in bruchsicheren Transportbehältern verschickt werden, um das Risiko des Auslaufens von Probenmaterial und infolgedessen das Infektionsrisiko zu reduzieren. Probenmaterial ist entsprechend den nationalen bzw. internationalen Bestimmungen zum Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial zu verpacken und zu versenden.

Die für die Proben zulässige Transportzeit und -temperatur orientiert sich an den Lagerungsbedingungen (siehe Kapitel 8.4).

8.4. Probenlagerung

Die Vollblutproben in den EDTA-K2 Gel-Barriere Blutentnahmeröhrchen müssen innerhalb von 48 Stunden in die zellulären und Plasma-Bestandteile getrennt werden. Bis dahin können die Proben bei einer Temperatur von 0°C bis +35°C transportiert und gelagert werden.

Das EDTA-Plasma ist bei +2°C bis +8°C für bis zu 7 Tage haltbar, ohne dass sich die B19V-Viruslast messbar ändert.



Die Testleistung kann durch Einfrieren und Auftauen oder längere Lagerung der Proben beeinträchtigt werden. Abweichende Aufbewahrungsbedingungen sind durch den Anwender zu validieren.

8.5. Proben für das *PoET Instrument* bereitstellen

Im Kühlschrank gelagertes Probenmaterial kann direkt eingesetzt und analysiert werden. Der Umgang mit gefrorenem und nochmals aufgetautem Probenmaterial wurde nicht validiert. Daher liegen für gefrorenes und wieder aufgetautes Probenmaterial keine Informationen vor. Falls gefrorenes Plasma verwendet werden soll, wird empfohlen, das Plasma bei +37°C im Wasserbad aufzutauen, um die Bildung von Präzipitaten zu verhindern, welche die Testleistung beeinflussen könnten.

9. Bearbeitung von Proben auf dem *PoET Instrument*

Allgemeine Hinweise für das Arbeiten mit dem *PoET Instrument*:

Der Testablauf ist im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* ausführlich beschrieben. Im Folgenden ist der Testablauf für *PoET B19V* mit dem *PoET Instrument* zusammenfassend dargestellt:

- Vor dem Lauf: Gerät und PC anschalten und Wartung gemäß Anweisungen am Bildschirm durchführen
- Laufdurchführung:
 - Analysenmodus anwählen
 - Proben laden
 - Testanforderungen zuweisen (Testtyp und Testparameter)
 - *PoET Instrument* mit Reagenzien und Verbrauchsmaterialien beladen
 - Lauf starten
 - Ergebnisse prüfen
 - Verbrauchsmaterialien entladen und Abfall entsorgen

In Abhängigkeit vom Testplan eines Laufes am *PoET Instrument* liegen die PCR-Ergebnisse etwa 3,5 Stunden nach Laufstart vor.

10. Kontrollverfahren

10.1. Maßnahmen zur Qualitätskontrolle

Der automatisierte Gesamtprozess bestehend aus Probenvorbereitung und PCR-Analyse wird durch mehrere Kontrollen überwacht:

Kontrolltyp	Produkt	Funktion
Interne Kontrolle (IC)	<i>PoET Internal Control</i>	Die IC zeigt an, ob die Prozessierung von der Extraktion bis zum Ergebnis für jede Probe valide war.
PCR-Positivkontrolle (PC)	<i>PoET Master Positive Control</i>	Die PCR-Positivkontrolle enthält virale Nukleinsäuren von HCV, HBV, HIV, HAV und B19V und zeigt durch eine erfolgreiche B19V-Amplifikation an, dass die korrekten Bedingungen für die PCR vom Ansatz der PCR-Reaktion, über die Versiegelung der <i>PCR Plates</i> bis hin zur Durchführung der PCR auf dem <i>PoET Instrument</i> eingehalten wurden.
PCR-Negativkontrolle (NC)	<i>PoET Negative Control</i>	Die <i>PoET Negative Control</i> zeigt an, dass die PCR-Reagenzien kontaminationsfrei angesetzt wurden. Die NC entspricht einer „ <i>No Template Control</i> “ (NTC).

11. Auswertung und Gültigkeit der Ergebnisse

Die Auswertung wird von der *Calliope* Software vorgenommen. Die Software analysiert die Fluoreszenz-Signale aller PCR-Reaktionen inklusive der Kontrollen und bewertet, ob das Ergebnis insgesamt für den Parameter B19V und für jede einzelne Probe valide ist. Einem Fluoreszenz-Signal, das von der Software als reaktiv ermittelt wird, wird ein Zahlenwert, der sogenannte *Positive Point* (PP, PP-Wert), zugeordnet. Der *Positive Point* entspricht dem PCR-Zyklus, in dem die Software das erste Überschreiten der Signale von vordefinierten Schwellenwerten feststellt.

Bei der Verwendung der *PoET Master Positive Control* zusammen mit *PoET B19V* wird über die Software anhand der Signale der PCR-Positivkontrollen ein Vergleichswert (im Report: Ref. PP) berechnet, mit dessen Hilfe eine semiquantitative Aussage über die B19V-Konzentrationen gemacht werden kann.

Sollte eines der Kriterien der Validitätsprüfung nicht erfüllt sein, wird der PoET-Lauf als ungültig bewertet.

Wenn anhand der Ergebnisse der PCR-Kontrollen der Lauf als valide bewertet wird, werden die einzelnen Probenergebnisse nach folgendem Schema bewertet:

Fall	B19V-Kanal	IC-Kanal	Ref. PP	Bewertung	Im Report
1	nicht reaktiv	invalide*	---	Ergebnis ist invalide	Invalid
2	reaktiv	invalide*	PP Probe > Ref. PP	Ergebnis ist invalide	Invalid
3	nicht reaktiv	valide**	---	Ergebnis ist valide und für B19V nicht reaktiv	Not Reactive
4	reaktiv	valide**	PP Probe > Ref. PP	Ergebnis ist valide und für B19V reaktiv, Probe enthält weniger als 1041 IU/mL	BelowCutOff
5	reaktiv	valide**	PP Probe ≤ Ref. PP	Ergebnis ist valide und für B19V reaktiv, Probe enthält 1041 IU/mL oder mehr	AboveCutOff
6	reaktiv	invalide*	PP Probe ≤ Ref. PP	Ergebnis ist valide und für B19V reaktiv, Probe enthält 1041 IU/mL oder mehr	AboveCutOff

*) nicht-reaktiv oder reaktiv, aber außerhalb der IC-Grenzwerte

***) reaktiv und innerhalb der IC-Grenzwerte

12. Verfahrenseinschränkungen

- Das PCR-Kit *PoET B19V* ist ausschließlich für den Gebrauch mit den Reagenzien *PoET Extraction*, *PoET Prep Reagent*, *PoET Internal Control*, *PoET Negative Control* und *PoET Master Positive Control* am *PoET Instrument* vorgesehen.
- Die Detektion der B19V-DNA ist abhängig von der in der Probe enthaltenen Menge an viruspezifischen Nukleinsäuren. Im Falle einer sehr geringen Viruslast (unterhalb der Nachweisgrenze des Tests), kann diese durch das PCR-Kit *PoET B19V* nicht zuverlässig detektiert werden.
- Falsche Probenabnahme, nicht-getestete Störsubstanzen und unsachgemäße Probenlagerung und -vorbereitung können die Stabilität des Virus und der Nukleinsäuren negativ beeinflussen und das Ergebnis der PCR beeinträchtigen. Darüber hinaus kann das Plasma inhibierende Substanzen enthalten, die die Extraktion stören oder in die PCR gelangen können.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen, dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann.
- Bei Proben mit einem sehr hohen Albumin-Gehalt (> 100 g/L) ist ein zuverlässiges Testergebnis nicht sichergestellt.
- Mutationen innerhalb der hochkonservierten Regionen des viralen Genoms können unter Umständen die Bindung der Oligonukleotide beeinträchtigen und die Detektion des Virus verhindern.

- Trotz Sequenzabgleich und Überprüfung der Primer zur Erfassung der für das Blutspendewesen im D-A-CH-Raum (Deutschland, Österreich und die Schweiz) relevanten Genotypen des Parvovirus B19 lässt sich unter Umständen ein neu beschriebener Genotyp mit dem PCR-Kit *PoET B19V* nicht erfassen.
- In seltenen Fällen kann es bei Proben mit einer sehr hohen Viruslast zu einer Verschleppung durch das *PoET Instrument* kommen. Bei Detektion eines PCR-Ergebnisses mit frühem Amplifikationssignal kann es somit bei weiteren Proben im selben Lauf zu schwach-reaktiven Ergebnissen kommen.

13. Leistungsmerkmale

Zur Bestimmung der Leistungsmerkmale wurde als Standard der „3rd WHO International Standard for B19V NAT“ (NIBSC Code 12/208) eingesetzt.

13.1. Analytische Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität B19V

Die Bestimmung der 95%igen Nachweisgrenze (95% NWG) für B19V des PCR-Kits *PoET B19V* wurde mit einem Probenvolumen von 1,3 mL anhand der Extraktion und dem Nachweis von verdünnten Virusstandards in Plasma durchgeführt. Die Sensitivität wurde anhand der Hit-Raten der seriellen Verdünnungen der Virusstandards und Durchführen einer Probit-Analyse (log10) mit der Software *IBM SPSS Statistics* bestimmt.

Standard	B19V WHO 12/208
95% NWG	8,6 IU/mL
Konfidenzintervall	7,2 – 11 IU/mL

Analytische Sensitivität bei kleineren Probeneinsatzvolumina

Werden Proben mit einem Plasmavolumen im Bereich von $\geq 40,5 \mu\text{L}$ und $< 1300 \mu\text{L}$ in die Analyse eingesetzt (z.B. im Falle von Probenpool-Aliquots oder Einzelproben mit geringerem Ausgangsvolumen), wird auf dem *PoET Instrument* nach dem Transfer des Plasmas in die *Extraction Plates* automatisch das Volumen zu 1,3 mL ergänzt. Hierfür kommt die Komponente *sample diluent* (SD) des Kits *PoET Extraction* zum Einsatz. Im Rahmen der Validierung des PCR-Kits *PoET B19V* wurde bestätigt, dass das Ergänzen mit SD keinen Einfluss auf die analytische Sensitivität von *PoET B19V* hat.

Auf eine korrekte Konfiguration der benötigten Probenformate ist zu achten. Nähere Angaben befinden sich im Benutzerhandbuch *PoET Instrument*. Sollten andere Einstellungen gewünscht werden, so ist der Kundenservice von GFE zu kontaktieren.

13.2. Diagnostische Spezifität

Im Rahmen der Bestimmung der diagnostischen Spezifität des PCR-Kits *PoET B19V* wurden 576 B19V-negative Proben anhand von Einzel-Plasma-Spenden aus Gel-Barriere-Blutabnahme-Röhrchen untersucht.

Getestete Probenzahl	Invalide Proben	Valide nicht-reaktive Proben	Falsch-reaktive Proben	Spezifität
576	31	545	0	100%

Bei den 545 valide getesteten Proben wurden keine falsch-reaktiven Proben beobachtet. Somit ist bisher von einer annähernd 100%igen Spezifität des PCR-Kits *PoET B19V* auszugehen.

13.3. Gesamtausfallrate

Die Bestimmung der zu falsch negativen Ergebnissen führenden Fehlerrate (hier in Prozent nicht-reaktive Proben) des Gesamtsystems (kurz „Gesamtausfallrate“) des PCR-Kits *PoET B19V* erfolgte mit negativen Humanplasma Proben, die mit B19V versetzt wurden. Die Konzentration an B19V entsprach weniger als dem Dreifachen der 95% NWG.

Es wurde bei 288 Analysen kein Ausfall beobachtet. Daraus ergibt sich eine Ausfallrate von 0%.

13.4. Genotypen

Die Detektierbarkeit aller relevanten Genotypen für B19V wurde durch Alignments der verfügbaren Sequenzen und darauf beruhender Primer-Selektion sichergestellt.

Darüber hinaus wurde die analytische Erfassung relevanter humanpathogener Geno- und Subtypen, soweit verfügbar, an Proben mit bekannten Genotypen für B19V untersucht. Diese untersuchten Proben repräsentieren einen großen Teil der bislang bekannten Geno- und Subtypen.

Die Genotyp-Proben wurden (soweit spezifiziert) mit ca. dem Fünffachen der 95% NWG eingesetzt und getestet. Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Genotyp	Anzahl Proben	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
1	2	4 / 4
2	2	4 / 4
3a	1	2 / 2

Die humanpathogenen Genotypen 1, 2 und 3a sind mit dem PCR-Kit *PoET B19V* detektierbar.

13.5. Testung von Proben aus der Serokonversionsphase

Es sind für B19V keine geeigneten Serokonversionspanels verfügbar.

13.6. Untersuchungen zu Einschränkungen des Nachweisverfahrens

13.6.1. Störsubstanzen

Der Einfluss von Störstoffen auf das PCR-Kit *PoET B19V* wurde mittels der Extraktion von unterschiedlichen Proben und B19V-Nachweis untersucht. Bei einem Teil der Proben wurde B19V-negatives Plasma nur mit dem jeweiligen Störstoff versetzt und ein anderer Teil der Proben wurde zusätzlich mit Virus-Standard bei der 2,5-fachen 95% NWG versetzt. Dabei wurden endogene und exogene Störstoffe getestet.

Endogene Störstoffe

Zur Beurteilung des Einflusses von Hämolyse sowie erhöhtem Bilirubin-, Albumin- und Triglyceridgehalt auf die B19V-PCR wurden Plasmaproben mit dem jeweiligen potentiellen Störstoff in mehreren Konzentrationen bis weit über die Normalwerte versetzt.

Ergebnisse der Testung endogener Störstoffe:

Endogener Störstoff	Konzentration	Beobachtung
Bilirubin	20 – 50 mg/L	keine Beeinflussung
Hämoglobin	250 – 2000 mg/L	keine Beeinflussung
Triglyceride	2,5 – 40 g/L	keine Beeinflussung
Albumin	60 – 100 g/L	keine Beeinflussung
	> 100 g/L	Zuverlässiges Testergebnis nicht sicher gestellt

Die getesteten endogenen potenziellen Störstoffe (Albumin, Bilirubin, Hämoglobin, Triglyceride) haben in der Testkonzentration keine falsch-nicht-reaktiven oder falsch-reaktiven Ergebnisse gezeigt. Für Albumin-Konzentrationen in Proben bis zu 100 g/L ist keine Beeinflussung der Testergebnisse aufgetreten. Bei noch höheren Konzentrationen von > 100 g/L kann ein zuverlässiges Testergebnis nicht sichergestellt werden.

Exogene Störstoffe

Die Versuche zur Beurteilung des Einflusses von exogenen Störstoffen (Medikamente, die vor der Blutspende genommen wurden) wurden in Anlehnung an die Angaben der Richtlinie „EP7-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry“ [8] durchgeführt. Die Auswahl der Medikamente sowie deren eingesetzte Konzentration sind davon abgeleitet.

Ergebnisse der Testung exogener Störstoffe:

Exogener Störstoff	Wirkung	Konzentration	Beobachtung
Ascorbinsäure	Antioxidans	60 µg/mL	keine Beeinflussung
Acetaminophen / Paracetamol	Schmerzmittel	200 µg/mL	keine Beeinflussung
Acetylsalicylsäure	Schmerzmittel	652 µg/mL	keine Beeinflussung
Ibuprofen	Schmerzmittel	500 µg/mL	keine Beeinflussung
Naproxen	Schmerzmittel	500 µg/mL	keine Beeinflussung
Phenylephrin-HCl	Schnupfenmittel	82 µg/mL	keine Beeinflussung
Atrovastatin	Cholesterin-Senker	335 µg/mL	keine Beeinflussung
Loratadin	Antihistaminikum	0,3 µg/mL	keine Beeinflussung
Fluoxetin	Antidepressivum	3,5 µg/mL	keine Beeinflussung
Paroxetin	Antidepressivum	1,0 µg/mL	keine Beeinflussung
Sertralin	Antidepressivum	0,6 µg/mL	keine Beeinflussung

Die getesteten exogenen potenziellen Störstoffe haben in der jeweiligen Testkonzentration keine falsch-nicht-reaktiven oder falsch-reaktiven Ergebnisse gezeigt.

13.6.2. Kreuzreaktivität

Die Gefahr unerwünschter Nebenprodukte wurde durch Sequenzvergleiche der verwendeten Primer und Sonden mit humanpathogenen potenziell kreuzreaktiven Virussequenzen und durch ein darauf beruhendes Testdesign minimiert.

Im Rahmen der Validierung wurde der Einfluss genomischer Nukleinsäuren von ausgewählten Viren auf das PCR-Kit *PoET B19V* untersucht. Dazu wurde negatives Humanplasma (NHP) mit Standards für die zu testenden Viren versetzt, extrahiert und amplifiziert. Zusätzlich wurde B19V-haltiges Plasma mit Standards für die zu testenden Viren versetzt und untersucht. Bei den B19V-haltigen Proben wurde bei der Testung B19V mit ca. dem 2,5-fachen der 95% NWG eingesetzt.

Ergebnisse der Testung der Kreuzreaktivität:





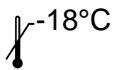








Virus	Nukleinsäure	Beobachtung
Cytomegalie-Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-C Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-B Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus-1	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus-2	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-E Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-A Virus	RNA	Keine Beeinflussung
West-Nil Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-D Virus	RNA	Keine Beeinflussung

Bei den eingesetzten Viren wurde keine Beeinflussung auf das PCR-Kit *PoET B19V* gemessen. Alle Ansätze zeigten reaktive Ergebnisse für die IC und keine falsch-reaktiven oder falsch-nicht-reaktiven Ergebnisse für B19V.

14. Änderungen im Analysenverfahren und in der Analysenleistung

Im Falle von wesentlichen Änderungen im Analysenverfahren und / oder in der Analysenleistung der Reagenzien werden entsprechende Informationen vom Hersteller umgehend an die Anwender weitergegeben. Dies gilt auch für die Maßnahmen, die aus diesen Änderungen resultieren. Gegebenenfalls kann dies auch den Rückruf des *In-vitro*-Diagnostikums bedeuten.

15. Erklärung der Symbole

	Symbol für „Charge“
	Symbol für „Artikelnummer“
 JJJJ-MM	Symbol für „Verwendbar bis...“ (Jahr-Monat)
 840	Symbol für „Ausreichend für <n> Prüfungen“ (n = Gesamtzahl an IVD-Prüfungen)
 -18°C	Symbol für „Oberer Temperaturgrenzwert“
	Symbol für „Gebrauchsanweisung beachten“
	Symbol für „Achtung“ Hinweis auf Sicherheitsbezogene Angabe wie Warnhinweis oder Vorsichtsmaßnahme
	Symbol für „Nicht wiederverwenden“
	Symbol für „Vor Sonnenlicht schützen“
	Symbol für „In-vitro-Diagnostikum“
	Symbol für Konformität zur Europäischen Richtlinie 98/79/EG über in- vitro-Diagnostika
	Symbol für „Hersteller“
	GFE-Herstellerlogo

16. Abkürzungsverzeichnis

95% NWG	Nachweisgrenze bei 95% Wahrscheinlichkeit
B19V	Parvovirus B19
cDNA	<i>Complementary</i> oder „Copy“ DNA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (DNS, Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethyldiamintetraessigsäure)
EM	<i>enzyme mix</i>
IC	<i>Internal Control</i> (Interne Kontrolle)
IU	<i>International units</i> (Internationale Einheiten)
NAT	Nukleinsäure-Amplifikationstechnik
NC	<i>PoET Negative Control</i> (PCR-Negativkontrolle)
NTC	<i>No Template Control</i>
OM	<i>oligo mix</i>
PC	<i>PCR Positive Control</i> (PCR-Positivkontrolle); <i>PoET Master Positive Control</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PP	<i>Positive Point</i> (Zahlenwert für reaktiv bewertete Fluoreszenz-Signale)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (RNS, Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
rxn	<i>Reactions</i> (Reaktionen)
SD	<i>sample diluent</i> (Auffüllmedium für Proben)
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

17. Technischer Service

Fragen bezüglich des PCR-Kits *PoET B19V* können an den Kundenservice von GFE adressiert werden:

E-Mail: service@gfeblut.de

Web: <https://www.gfeblut.de/contact-us/>

18. Literaturangaben

- [1] Kleinman SH, Lelie N, Busch MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion*. 2009;49:2454-2489.
- [2] Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H.: "Molekulare Virologie." 3. Auflage 2010
- [3] Arbeitskreis Blut. "Parvovirus B19 – Revised." *Transfus Med Hemother* 2010;37:339–350.
- [4] Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik; Stöcker, 2019
- [5] Lewis & Wilson, Deborah. (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th Edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112 Revised December 2009
- [6] *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections*, 4th Edition; Clinical and Laboratory Standards Institute; May 2014; ISBN Number: 1-56238-962-9
- [7] Ding M, Bullotta A, Caruso L, Gupta P, Rinaldo CR, Chen Y. An optimized sensitive method for quantitation of DNA/RNA viruses in heparinized and cryopreserved plasma. *J Virol Methods*. 2011;176 (1-2):1-8. doi:10.1016/j.jviromet.2011.05.012
- [8] EP7-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline-Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute™, Vol. 25, No. 27, ISBN 1-56238-584-4, 2005

19. Haftungsausschluss und Markenschutz

- Die im PCR-Kit *PoET B19V* enthaltene SuperScript® III Reverse Transcriptase ist ein Produkt hergestellt und lizenziert durch Life Technologies by Thermo Fisher Scientific.
- Während der Anwendung des PCR-Kits *PoET B19V* kommen die PCR-Platten (*PCR Plates*) „FrameStar® 96 (cut corner A12)“ mit Barcode [Artikelnummer SP-0362] zum Einsatz. Diese unterliegen folgender Lizenzlimitierung: „FrameStar® is covered by one or more of the following US patents or their foreign counterparts, owned by Eppendorf AG: US Patent Nos. 7,347,977 and 6,340,589. FrameStar® is a registered trademark owned by 4titude® Ltd“.
- Weitere, in diesem Dokument verwendete registrierte Namen, Marken, etc. sind nicht als rechtlich ungeschützt zu betrachten, auch wenn sie nicht speziell gekennzeichnet sind.

20. Änderungshistorie

Version	Datum [JJJJ-MM-TT]	Bemerkungen
Version 1	2021-03-24	Neuerstellung

© 2021 GFE, Alle Rechte vorbehalten



Gesellschaft zur Forschung, Entwicklung und Distribution von Diagnostika im Blutspendewesen mbH

Altenhöferallee 3, D-60438 Frankfurt/Main, Germany

Tel: +49 (0) 69 / 400 5513 - 0

Fax: +49 (0) 69 / 400 5513 - 21