

***Gebrauchsanweisung***

**PoET WNV**

***Zur Verwendung auf dem PoET Instrument***

***In-vitro-Diagnostikum***

**REF** P2H-28-30

**IVD** CE

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Verwendungszweck</b> .....	<b>3</b>
1.1. Kurzbeschreibung .....	3
1.2. Verwendungszweck .....	3
<b>2. Erklärung des Tests</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Informationen zum Erreger WNV</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Testprinzip</b> .....	<b>5</b>
<b>5. Reagenzien und Materialien</b> .....	<b>7</b>
5.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien.....	7
5.2. Entsorgung .....	8
<b>6. Erforderliche Ausrüstung</b> .....	<b>8</b>
6.1. Geräte und Software .....	8
6.2. Erforderliche Verbrauchsartikel für <i>PoET WNV</i> .....	8
6.3. Zubehör- und Kontroll-Kits zur Verwendung mit <i>PoET Instrument</i> .....	8
6.4. Zusätzlich benötigte Ausrüstung .....	9
<b>7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b> .....	<b>9</b>
<b>8. Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Plasmaproben</b> .....	<b>10</b>
8.1. Probenmaterial .....	10
8.2. Probengewinnung & -vorbehandlung.....	10
8.3. Probentransport.....	11
8.4. Probenlagerung.....	11
8.5. Proben für das <i>PoET Instrument</i> bereitstellen .....	11
<b>9. Bearbeitung von Proben mit <i>PoET Instrument</i></b> .....	<b>12</b>
<b>10. Kontrollverfahren</b> .....	<b>12</b>
10.1. Maßnahmen zur Qualitätskontrolle .....	12
<b>11. Auswertung und Gültigkeit der Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
<b>12. Verfahrenseinschränkungen</b> .....	<b>13</b>
<b>13. Leistungsmerkmale</b> .....	<b>14</b>
13.1. Analytische Leistungsmerkmale.....	14
13.2. Diagnostische Spezifität .....	15
13.3. Gesamtausfallrate .....	15
13.4. Genotypen.....	15
13.5. Testung von Proben aus der Serokonversionsphase .....	15
13.6. Untersuchungen zu Einschränkungen des Nachweisverfahrens .....	15
13.6.1. Störsubstanzen.....	15
13.6.2. Kreuzreaktivität.....	17
<b>14. Änderungen im Analysenverfahren und in der Analysenleistung</b> .....	<b>17</b>
<b>15. Erklärung der Symbole</b> .....	<b>18</b>
<b>16. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>19</b>
<b>17. Technischer Service</b> .....	<b>19</b>
<b>18. Literaturangaben</b> .....	<b>20</b>
<b>19. Haftungsausschluss und Markenschutz</b> .....	<b>21</b>
<b>20. Änderungshistorie</b> .....	<b>21</b>

## 1. Verwendungszweck

### 1.1. Kurzbeschreibung

Das PCR-Kit *PoET WNV* 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 West-Nil-Virus (WNV) RNA.

### 1.2. Verwendungszweck

Das PCR-Kit *PoET WNV* 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 West-Nil-Virus RNA (WNV RNA).

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

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

Die Prozessierung des PCR-Kits *PoET WNV* erfolgt mit dem *PoET Instrument* von 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 WNV-spezifischer RNA in humanem Blutplasma mit dem gebrauchsfertigen PCR-Kit *PoET WNV* erfolgt durch eine *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (Real-Time PCR) mit dem *PoET Instrument*.

Bei der PCR werden spezifische Target-Bereiche mit dem PCR-Kit *PoET WNV* amplifiziert. Diese Bereiche liegen in konservierten Regionen des WNV-Genoms. Bei *PoET WNV* handelt es sich um einen sogenannten Dual-Target-Test. Entsprechend werden bei der PCR zwei Target-Bereiche amplifiziert. Zum einen verbessert dies die Robustheit des Tests gegenüber möglichen Mutationen in den Target-Bereichen des Virus-Genoms und zum anderen steigert das Dual-Target-Design die Sensitivität des Tests.

Auf dem *PoET Instrument* wird das PCR-Kit *PoET WNV* zusammen mit der Internen Kontrolle *PoET Internal Control* prozessiert, die den gesamten Prozess von der Probenvorbereitung bis zur Ergebnisauswertung überwacht. *PoET Internal Control* 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 WNV

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein Arbovirus (*Arthropod-borne virus*) mit einem etwa 11 kb großen ss(+)RNA Genom mit einer 5' Cap-Struktur. Das Virion ist ein ikosaedrisches Capsid umgeben von einer Membranhülle [2].

Das WNV gehört innerhalb der großen Familie der Flaviviridae zur Gattung Flavivirus [3]. Innerhalb der Gattung Flavivirus wird aufgrund phylogenetischer und serologischer Untersuchungen das WNV der Japanische-Enzephalitis-Virus-Gruppe (JEV-Gruppe) zugeordnet. Innerhalb der JEV-Gruppe bildet das WNV zusammen mit dem nahe verwandten Yaounde-Virus eine Untergruppe, der eine Schwestergruppe mit dem Usutu-, JEV und dem Murray-Valley-Enzephalitis-Virus gegenübersteht. An der Basis der JEV-Gruppe befindet sich das amerikanische St. Louis-Enzephalitis-Virus (SLEV) [4].

Die Genotypen werden bei WNV *Lineages* genannt, von denen bisher die inzwischen weit verbreiteten Lineages 1 und 2 als human-pathogen beschrieben wurden und beim Menschen eine schwere Enzephalitis verursachen können, die schlimmstenfalls zum Tod führen kann [5]. Mittlerweile sind auch Lineage 3 und 4 beschrieben [6][7] und eine Erweiterung der Lineages steht gerade zur Diskussion [8][9][10][11][12].

Das WNV der Lineages 1 und 2 wird vorwiegend von Stechmücken der Gattungen *Culex* und auch *Aedes* übertragen, die Blut vor allem von Vögeln, aber auch anderen Säugetieren saugen und dabei das Virus übertragen. Eine Übertragung von WNV durch Zecken scheint auch möglich, z.B. wurde Lineage 4 auch schon aus Zecken isoliert [5].

Bei einer Infektion mit den human-pathogenen Lineages 1 und 2 entwickeln sich nach einer Inkubationszeit von 3-14 Tage bei etwa 10-20% der Infizierten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen, teilweise auch Übelkeit und Durchfall. Vor allem bei älteren Patienten kann die Krankheit einen schweren Verlauf nehmen und es kann zu Herzmuskelentzündungen und Enzephalitiden kommen, wobei etwa 5-10% der Patienten mit neurologischen Symptomen sterben. Gegen das WNV gibt es weder eine Therapie noch eine Impfung, es kann nur symptomatisch behandelt werden [2].

In Deutschland wurden 2019 die ersten autochthonen WNV-Infektionen bei Menschen in Ostdeutschland nachgewiesen [13]. Vermutlich ist das WNV etwa 2016 über Österreich und Tschechien nach Ostdeutschland eingewandert und hat sich in den lokalen Vogelpopulationen etablieren können [14]. Alle seither in Deutschland bei Menschen, Pferden und Vögeln isolierten WNV konnten Lineage 2 zugeordnet werden [13][14].

Neben WNV konnte sich in Europa seit etwa 1996 auch das nahe verwandte Usutu-Virus (USUV) etablieren, das sich nachweislich für mehrere Vogelsterben (z.B. Amselsterben 2016 in Deutschland) verantwortlich zeigt und auch Menschen infizieren kann, wobei sich jedoch solche Infektionen meist völlig symptomlos zeigen [15]. Bei Blutspendern z.B. in Österreich und Deutschland konnte bereits mehrfach USUV nachgewiesen werden [15][16].

#### 4. Testprinzip

Das PCR-Kit *PoET WNV* 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 WNV* 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) zu den Proben hinzugegeben.

Bei der Probenvorbereitung kommen die Extraktionskits *PoET Extraction* und *PoET Prep Reagent* (beide separat erhältlich) zum Einsatz. In der Probe befindliche Viruspartikel werden lysiert, die enthaltenen Nukleinsäuren freigesetzt und an magnetische Partikel gebunden. Durch Waschschrte 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 Internen Kontrolle (IC) und gegebenenfalls die nachzuweisenden viralen Nukleinsäuren.

##### PCR-Setup:

Bei der Verwendung von *PoET WNV* wird durch das *PoET Instrument* ein PCR-Mastermix angesetzt, der sich aus einem universellen *enzyme mix* und einem spezifischen *oligo mix* zusammensetzt. Der *oligo mix* enthält virusspezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden), die bei Vorhandensein von WNV 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 (IC). Zusammen mit *PoET Internal Control* bildet das PCR-Kit *PoET WNV* also ein zweites heterologes, nicht kompetitives Amplifikationssystem als Interne Kontrolle in jeder Probe.

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Amplifikaten vorausgegangener WNV-PCR-Reaktionen enthält der *enzyme mix* eine hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) und dUTP im Gemisch der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Die UNG degradiert mögliche verschleppte Amplifikate 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 Amplifikate nicht abgebaut werden.

##### Reverse Transkription:

Die RNA-Moleküle von WNV und der Internen Kontrolle 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 von WNV und der Internen Kontrolle hergestellt.

### Amplifikation:

Die Amplifikation erfolgt auf Basis der mittels reverser Transkription hergestellten cDNA. 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  $Mg^{2+}$ -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 Amplifikat, 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 Amplifikaten verdoppelt.

Das PCR-Kit *PoET WNV* enthält eine Dual-Target-PCR, bei der sich der eine Target-Bereich im gut konservierten 5'-UTR- und der andere im ebenfalls gut konservierten 3'-UTR-Bereich des WNV-Genoms befindet.

### 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 Sonden 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, sind *Reporter* und *Quencher* in räumlicher Nähe zueinander angeordnet. Wird der *Reporter* in diesem Zustand durch eine Lichtquelle angeregt, wird das Fluoreszenz-Signal des *Reporters* unterdrückt, da sich die Energie mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) auf den *Quencher* überträgt. 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 Amplifikats 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 WNV 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 sind im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* beschrieben.

## 5. Reagenzien und Materialien

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





<b>PoET WNV</b>			
GFE Artikelnummer	P2H-28-30		
Anzahl Reaktionen pro Test (rxn)	28		
Anzahl Tests pro Kit	30		
Anzahl Reaktionen gesamt	840		
<b>Kit-Bestandteil:</b>	<b>Volumen [µL]</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Deckelfarbe</b>
enzyme mix	1500	EM v1	weiß
oligo mix WNV	204	O_W v5	blau

### 5.1. Lagerung und Handhabung der Reagenzien

*PoET WNV* 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

*PoET WNV* 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 WNV* enthalten keine Gefahrstoffe oder biogefährliche Substanzen. Die Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage beim Kundenservice von GFE erhältlich.
- Inhalt und Behälter der Reagenzien sind gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften zu entsorgen.
- PCR-Platten (*PCR Plates*) und PCR-Reagenzienreste sowie damit in Kontakt gekommene Verbrauchsmaterialien sind gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften zu entsorgen.

## 6. Erforderliche Ausrüstung

### 6.1. Geräte und Software

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

### 6.2. Erforderliche Verbrauchsartikel für *PoET WNV*

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

Bezeichnung	Beschreibung	Artikelnummer
<i>PCR Plate</i>	PCR Plates "FrameStar® 96 Well Semi-Skirted PCR Plate Cut Corner A12" von Azenta Life Sciences (4titude by Brooks)	SP-0362
<i>Film roll</i>	Heat Sealing film roll (Folienrolle) "Clear Weld Heat Seal Mark 2" von Azenta Life Sciences (4titude by Brooks)	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 mit *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 WNV Positive Control* [Artikelnummer P3H-180-30]



---

#### 6.4. Zusätzlich benötigte Ausrüstung

- Temperierbare Zentrifuge für die Gewinnung von Plasma aus Primärröhrchen (EDTA-K2 Blutentnahmesysteme mit Gelbarriere). Die Spezifikationen für die Zentrifuge sind den Herstellerangaben der Primärröhrchen 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*“ [17] und dem CLSI-Dokument M29-A4 [18] 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 WNV* 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 von *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 WNV* im Bereich 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 WNV* ist für den einmaligen Gebrauch konzipiert. Reagenzienreste nicht weiterverwenden.
- Reagenzien verschiedener Chargennummern des PCR-Kits *PoET WNV* 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 WNV* wurde humanes EDTA-Plasma als Probenmaterial verwendet. Alle leistungsbezogenen Angaben basieren auf diesem Material, das infolgedessen zur Verwendung mit dem *PoET Instrument* empfohlen ist.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen, dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann [19].



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).

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



Die Primärrohre 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 bruch sicheren Transportbehältern verschickt werden, um das Risiko des Auslaufens von Probenmaterial und infolgedessen das Infektionsrisiko zu reduzieren. Probenmaterial ist entsprechend den regionalen und überregionalen 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 Blutentnahmerohrchen 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 12 Tage haltbar, ohne dass sich die WNV-Viruslast messbar ändert.



Die Testleistung kann durch Einfrieren und Auftauen oder längere Lagerung der Proben beeinträchtigt werden.

### 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 mit *PoET Instrument*

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

Der Testablauf ist im Benutzerhandbuch *PoET Instrument* ausführlich beschrieben. Im Folgenden ist der Testablauf für *PoET WNV* mit *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 nicht-reaktive Probe valide war.
PCR-Positivkontrolle (PC WNV)	<i>PoET WNV Positive Control</i>	Die PC WNV enthält synthetische WNV-RNA und zeigt durch eine erfolgreiche Amplifikation an, dass die PCR-Reagenzien funktional sind und 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 NC 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 WNV und für jede einzelne Probe valide ist.

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	WNV-Kanal	IC-Kanal	Bewertung	Im Report
1	nicht-reaktiv	invalide*	Ergebnis ist invalide	Invalid
2	nicht-reaktiv	valide**	Ergebnis ist valide und für WNV nicht-reaktiv	Not Reactive
3	reaktiv	valide**	Ergebnis ist valide und für WNV reaktiv	Reactive
4	reaktiv	invalide*	Ergebnis ist valide und für WNV reaktiv	Reactive

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

\*\*\*) reaktiv und innerhalb der IC-Grenzwerte

## 12. Verfahrenseinschränkungen

- Das PCR-Kit *PoET WNV* ist ausschließlich für den Gebrauch mit den Reagenzien *PoET Extraction*, *PoET Prep Reagent*, *PoET Internal Control*, *PoET Negative Control* und *PoET WNV Positive Control* am *PoET Instrument* vorgesehen.
- Die Detektion der WNV-RNA 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 WNV* 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.
- Ein hoher Albumin-Gehalt in der Probe kann sich unter Umständen negativ auf die Zuverlässigkeit des Testergebnisses auswirken.
- Mutationen innerhalb der beiden hochkonservierten Target-Bereiche des viralen Genoms können unter Umständen die Bindung der Oligonukleotide beeinträchtigen und sich auf die Test-Sensitivität der WNV-PCR auswirken. Durch das Dual-Target-Design der PCR ist jedoch die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass es zu einem erheblichen Sensitivitätsverlust oder Ausfall der PCR kommt, da das gleichzeitige Auftreten von Mutationen in beiden Target-Bereichen unwahrscheinlich ist.
- Neu auftretende WNV-Lineages können in Abhängigkeit von deren Charakteristika gegebenenfalls durch die WNV-PCR nur schlecht oder gar nicht detektierbar sein.

- Aufgrund einer gewissen Kreuzreaktivität der WNV-PCR in *PoET WNV* mit verwandten Flaviviren der Japanischen-Enzephalitis-Gruppe kann das Vorhandensein der Nukleinsäuren von z.B. Usutu-Virus, Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) oder St. Louis-Enzephalitis-Virus (SLEV) zu WNV-Signalen führen und der Test auch in Abwesenheit von WNV-RNA das Ergebnis „reaktiv“ erhalten. JEV und SLEV sind jedoch in Deutschland nicht endemisch.
- 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 wurden als Standards „*WHO International Standard – 1<sup>st</sup> WHO IS for West Nile Virus (WNV) RNA Nucleic acid Amplification Techniques – NIBSC code: 18/206*“ und „*PEI Reference Preparation WNV Lineage 2 RNA (#13300/19)*“ eingesetzt.

#### 13.1. Analytische Leistungsmerkmale

##### Analytische Sensitivität WNV

Die Bestimmung der 95%igen Nachweisgrenze (95% NWG) für WNV des PCR-Kits *PoET WNV* wurde mit einem Probenvolumen von 1,3 mL anhand der Extraktion und dem Nachweis von verdünnten Virusstandards in Plasma durchgeführt. Die Sensitivität für Lineage 1 wurde anhand der Hit-Raten der seriellen Verdünnungen der Virusstandards und Durchführen einer Probit-Analyse ( $\log_{10}$ ) mit der Software *IBM SPSS Statistics* bestimmt. Nach der Berechnung der 95%igen Nachweisgrenze wurde die ermittelte Viruskonzentration der analytischen Sensitivität für Lineage 1 nochmals in Hit-Rate-Bestimmungen bestätigt. Die Sensitivität für Lineage 2 wurde ausgehend von der Sensitivität von Lineage 1 anhand von Hit-Rate-Bestimmungen ohne Probit-Analyse ermittelt.

Lineage	WNV Lineage 1	WNV Lineage 2
Standard	WHO 18/206	PEI 13300/19
95% NWG	1,9 IU/ml	1,7 IU/ml
Konfidenzintervall	1,6 – 2,5 IU/ml	n/a
Hit-Rate bei Bestätigung	96%	99%

##### 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 Probenvolumen zu 1,3 mL Gesamtvolumen ergänzt. Hierfür kommt die Komponente *sample diluent* (SD) des Kits *PoET Extraction* zum Einsatz. Im Rahmen der Validierung des PCR-Kits *PoET WNV* wurde bestätigt, dass das Ergänzen mit SD keinen Einfluss auf die analytische Sensitivität von *PoET WNV* 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 WNV* wurden 770 WNV-negative Proben anhand von Einzel-Plasma-Spenden aus EDTA-K2 Gel-Barrier-Blutentnahmeröhrchen untersucht.

Getestete Probenzahl	Inhibierte/ Invalide Proben	Valide nicht-reaktive Proben	Falsch-reaktive Proben	Spezifität
770	4	766	0	100%

Bei den 766 valide getesteten Proben konnte keine falsch-reaktive Probe beobachtet werden. Somit ist bisher von einer annähernd 100%igen Spezifität des PCR-Kits *PoET WNV* 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 WNV* erfolgte an 288 Proben für WNV Lineage 1 und 287 Proben für WNV Lineage 2. Bei den Proben handelte es sich um negatives Humanplasma, das mit WNV versetzt wurde. Die Konzentration an WNV entsprach dem Dreifachen der 95% NWG.

Bei keiner der Analysen für WNV Lineage 1 und WNV Lineage 2 wurde ein Ausfall beobachtet. Daraus ergibt sich eine Gesamtausfallrate von 0%.

### 13.4. Genotypen

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

Die Bestimmung der Genotypen/Lineages erfolgte mit nativem Positivmaterial für Lineage 1 und 2. Die Bestimmung der analytischen Sensitivität (Kap 13.1) zeigt, dass sich beide Genotypen/Lineages mit dem PCR-Kit *PoET WNV* gleichermaßen detektieren lassen.

Dieses Ergebnis wurde durch die Testung von sechs verschiedenen Proben-Panels bestätigt.

### 13.5. Testung von Proben aus der Serokonversionsphase

Für die Testung von Proben aus der Serokonversionsphase wurden Proben aus einem Serokonversionspanels für WNV untersucht. Die Proben des Panels wurden in drei verschiedenen Probentypen eingesetzt: a) 1:6, b) 1:48 und c) 1:96 mit Plasma verdünnt. Zusätzlich kamen ausgewählte Proben auch unverdünnt zum Einsatz. Im Anschluss an die Testung mit dem PCR-Kit *PoET WNV* erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse mit den in den Begleitunterlagen des Panels gemachten Angaben. Als erwartetes Ergebnis sollen mit dem PCR-Kit *PoET WNV*, bezogen auf den zeitlichen Verlauf der Probennahme, Proben früher als reaktiv ermittelt werden, als mit dem in den Unterlagen benannten serologischen Testverfahren.

Das PCR-Kit *PoET WNV* erkennt eine WNV-Infektion früher als der jeweilige Antikörper-Referenz-Test, im Mittel um 14 Tage (1:6), 12 Tage (1:48) bzw. 7 Tage (1:96). Die Testung des Serokonversionspanels unterstreicht somit die höhere Sensitivität von NAT-Techniken gegenüber den serologischen Testverfahren.

### 13.6. Untersuchungen zu Einschränkungen des Nachweisverfahrens

#### 13.6.1. Störsubstanzen

Der Einfluss von Störstoffen auf das PCR-Kit *PoET WNV* wurde mittels der Extraktion von unterschiedlichen Proben und WNV-Nachweis untersucht. Bei einem Teil der Proben wurde

WNV-negatives Plasma nur mit dem jeweiligen Störstoff versetzt und ein anderer Teil der Proben wurde zusätzlich mit Virus-Standard bei ca. fünffach 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 WNV-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 sichergestellt

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“ [20] 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 WNV* untersucht. Dazu wurde negatives Humanplasma (NHP) mit Standards für die zu testenden Viren versetzt, extrahiert und amplifiziert. Zusätzlich wurde WNV-haltiges Plasma mit Standards für die zu testenden Viren versetzt und untersucht. Bei den WNV-haltigen Proben wurde bei der Testung WNV mit ca. dem Fünffachen der 95% NWG eingesetzt.

Ergebnisse der Testung der Kreuzreaktivität:

Virus	Nukleinsäure	Beobachtung
Cytomegalie-Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-A-Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-B-Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-C-Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-E-Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus-1	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus-2	RNA	Keine Beeinflussung
Parvovirus B19	DNA	Keine Beeinflussung
Chikungunya-Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Zika-Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Yellow Fever Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Usutu-Virus*	RNA	Kreuzreaktivität möglich
Japanische-Enzephalitis-Virus*	RNA	Kreuzreaktivität möglich
St. Louis Enzephalitis-Virus*	RNA	Kreuzreaktivität möglich

\* Vertreter der Japanische-Enzephalitis-Gruppe














Bei den eingesetzten Viren der Japanische-Enzephalitis-Gruppe kann aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe zu WNV eine gewisse Kreuzreaktivität des PCR-Kits *PoET WNV* beobachtet werden. Alle übrigen Ansätze zeigten bei WNV-negativem Plasma und bei Plasma, das mit WNV versetzt wurde, keine Kreuzreaktivität oder Beeinflussung der Internen Kontrolle.

Die Japanischen-Enzephalitis-Gruppe umfasst u.a. das Usutu-Virus, das Japanische-Enzephalitis-Virus und das St. Louis-Enzephalitis-Virus.

## 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
cDNA	<i>Complementary</i> oder „Copy“ DNA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (DNS, Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EM	<i>enzyme mix</i>
IC	<i>Internal Control</i> (Interne Kontrolle)
IFU	<i>Instructions for use</i> (Gebrauchsanweisung)
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 WNV	<i>PCR Positive Control</i> (PCR-Positivkontrolle) für WNV; <i>PoET WNV Positive Control</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
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)
SLEV	St. Louis Enzephalitis-Virus
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
USUV	Usutu-Virus
UTR	Untranslatierte Region
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WNV	West-Nil-Virus

## 17. Technischer Service

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

E-Mail: [service@gfeblut.de](mailto: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] The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature, Genus: Flavivirus. *Virus Taxonomy: 2019 Release EC 51*, Berlin, Germany, July 2019, [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)
- [4] Moureau, G., Cook, S., Lemey, P., Nougaiere, A., Forrester, N. L., Khasnatinov, M., Charrel, R. N., Firth, A. E., Gould, E. A., & de Lamballerie, X. "New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences." *PloS one* 2015, 10(2), e0117849.
- [5] Pesko KN, Ebel GD. "West Nile virus population genetics and evolution." *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):181-90.
- [6] Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N.: "Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe." *Emerg Infect Dis* 2005, 11:225–231.
- [7] Lvov, D.K., Butenko, A.M., Gromashevsky, V.L., Kovtunov, A.I., Prilipov, A.G., Kinney, R., Aristova, V.A., Dzharkenov, A.F., Samokhvalov, E.I., Savage, H.M., Shchelkanov, M.Y., Galkina, I.V., Deryabin, P.G., Gubler, D.J., Kulikova, L.N., Alkhovsky, S.K., Moskvina, T.M., Zlobina, L.V., Sadykova, G.K., Shatalov, A.G., Lvov, D.N., Usachev, V.E. and Voronina, A.G. "West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations." *Arch. Virol. Suppl.* 2004, 18:85-96.
- [8] Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, Magallanes A, Tejedor CG, Tenorio A. "Putative new lineage of west nile virus, Spain." *Emerg Infect Dis*. 2010, 16:549-52.
- [9] Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. "Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013." *Emerg Infect Dis*. 2014, 20:2119-22.
- [10] Vazquez, A., Santiago, R., Herrero, L., Moreno, J., Molero, F., Magallanes, A., Sanchez-Seco, P., Figuerola, J. and Tenorio, A. "Kunjin virus isolate KUN MP502-66." (2016) Unveröffentlicht.
- [11] Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, Sall AA. "Vector competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus." *Am J Trop Med Hyg*. 2014, 90:747-54.
- [12] Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CCdM, Loucoubar C, Paolo Marinho de Andrade Zannotto, Faye O, Amadou Alpha Sall AA. (2017) "Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus." *PLoS Negl Trop Dis* 2017, 11(11): e0006078.
- [13] Ziegler U, Santos PD, Groschup MH, Hattendorf C, Eiden M, Höper D, Eisermann P, Keller M, Michel F, Klopffleisch R, Müller K, Werner D, Kampen H, Beer M, Frank C, Lachmann R, Tews BA, Wylezich C, Rinder M, Lachmann L, Grünewald T, Szentiks CA, Sieg M, Schmidt-Chanasit J, Cadar D, Lühken R. "West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019." *Viruses*. 2020, 12(4):448.
- [14] Ziegler U, Lühken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Höper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. "West Nile virus epizootic in Germany, 2018." *Antiviral Res*. 2019 Feb;162:39-43.
- [15] Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y. "Usutu virus: A new threat?" *Epidemiology and Infection* 2019, 147, e232, 1-11.
- [16] Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, Schlaphof A, Jansen S, Jöst H, Tannich E, Runkel S, Hitzler WE, Hutschenreuter G, Wessiepe M, Schmidt-Chanasit J. "Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016." *Euro Surveill*. 2017; 22(14):pii=30501.
- [17] Lewis & Wilson, Deborah. (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th Edition. HHS Publication No. (CDC) [21-1112 Revised December 2009](#)
- [18] *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections*, 4th Edition; Clinical and Laboratory Standards Institute; May 2014; ISBN Number: 1-56238-962-9

- [19] 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
- [20] 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 WNV* 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 WNV* kommen die PCR-Platten (*PCR Plates*) „FrameStar® 96 (cut corner A12)“ bzw. „FrameStar® 96 Well Semi-Skirted PCR Plate 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“. Die PCR-Platten werden vertrieben von Azenta Life Sciences.
- 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 [YYYY-MM-DD]	Bemerkungen
1	2022-05-11	Neuerstellung

© 2022 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