



GFE

Gesellschaft zur Forschung, Entwicklung und Distribu-
tion von Diagnostika im Blutspendewesen mbH

PoET

PoET Multiscreen

Qualitativer Nukleinsäure Test
zur Verwendung mit *PoET Instrument*

***In-vitro*-Diagnostikum**

REF P2M-28-30

IVD C€0123

Inhaltsverzeichnis

1	Zweckbestimmung.....	3
1.1	Verwendungszweck.....	3
1.2	Vorgesehene Anwender	3
2	Hintergrund	3
2.1	Erregerinformation	3
2.2	Nutzen von NAT-Tests	5
2.3	Testprinzip	6
3	PoET-System Überblick.....	6
4	Reagenzien.....	7
4.1	Lagerung und Handhabung der Reagenzien.....	7
4.2	Zusätzlich benötigte Reagenzien und Verbrauchsartikel	8
4.3	Benötigte Geräte und Software.....	8
5	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	8
5.1	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	8
5.2	Umgang mit Reagenzien.....	9
6	Prozessablauf.....	9
6.1	Probenvorbereitung	9
6.2	PCR-Setup	10
6.3	Amplifikation und Detektion	10
6.4	Auswertung und Bericht.....	11
7	Testdurchführung	11
7.1	Voraussetzungen	11
7.2	Probenmaterial	11
7.3	Probennahme und Präanalytik	12
7.3.1	EDTA-Plasma.....	12
7.3.2	CPD-Plasma.....	12
7.4	Probentransport	12
7.5	Probenlagerung	13
7.5.1	EDTA-Plasma.....	13
7.5.2	CPD-Plasma.....	13
7.6	Durchführung der Testung mit <i>PoET Instrument</i>	14
7.7	Proben für einen <i>PoET Instrument</i> Lauf vorbereiten	14
7.8	Weitere Vorbereitungen für den Laufstart.....	14
7.9	Berechnung der Ergebnisse	15
7.10	Kontrollmaßnahmen und Validität der Ergebnisse	16
7.10.1	Validierung der PCR-Negativkontrollen (NC)	16
7.10.2	Validierung der PCR-Positivkontrollen (PC).....	17
7.10.3	Validierung der Internen Kontrolle (IC)	17
7.11	Interpretation der Ergebnisse.....	17
7.12	Verfahrenseinschränkungen.....	18
7.13	Entsorgung.....	18
8	Leistungsmerkmale.....	19
8.1	Wichtigste Testmerkmale.....	19
8.2	Analytische Sensitivität.....	20
8.2.1	Nachweisgrenze (NWG)	20
8.2.2	NWG für kleinere Probenvolumina	20
8.2.3	Genotypenpanel	20
8.3	Analytische Spezifität.....	23
8.3.1	Experimentelles Design Kreuzreaktivität und Einfluss von Störsubstanzen	23
8.3.2	Kreuzreagierende Substanzen und klinische Zustände	23

8.3.3	Endogene Interferenzen.....	24
8.3.4	Exogene Interferenzen	25
8.4	Fehlerrate des Gesamtsystems	25
8.5	Klinische Leistungsparameter.....	25
8.5.1	Serokonversionspanels.....	25
8.5.2	Diagnostische Sensitivität.....	26
8.5.3	Diagnostische Spezifität	26
9	Überblick Reagenzien und Material	27
10	Hersteller und Kundenservice	27
10.1	Meldungen.....	27
11	Marken und Patente.....	28
12	Referenzen.....	28
13	Symbole	31
14	Änderungshistorie	31

1 Zweckbestimmung

1.1 Verwendungszweck

PoET Multiscreen ist ein PCR-Kit für den professionellen Gebrauch zur automatisierten *In-vitro*-Untersuchung von humanen Plasmaproben von Blutspendern.

Mit *PoET Multiscreen* erfolgt der qualitative Nachweis der RNA von Hepatitis-C-Virus (HCV), der DNA von Hepatitis-B-Virus (HBV) und der RNA von Humanes Immundefizienz-Virus 1 oder 2 (HIV-1, HIV-2) mittels Real-Time PCR zum Screening von individuellen Proben oder Pools aus Aliquots individueller Proben.

Darüber hinaus ist *PoET Multiscreen* für die Bestätigung der Ergebnisse von im Blutspende-Screening getesteten Proben vorgesehen.

Die Prozessierung von *PoET Multiscreen* erfolgt mit dem *PoET Instrument*.

1.2 Vorgesehene Anwender

Die Anwendung muss durch qualifiziertes Laborpersonal erfolgen, das in *In-vitro*-Diagnostik-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde, sowie die Benutzereinweisung am *PoET Instrument* erfolgreich abgeschlossen hat.

2 Hintergrund

2.1 Erregerinformation

2.1.1 HCV

Das Hepatitis-C-Virus (HCV; *Hepacivirus hominis*) ist ein behülltes (+)ssRNA-Virus mit einem etwa 9,6 kb großen Genom und der Erreger von Hepatitis C. HCV wird taxonomisch auch als *Hepacivirus hominis* (vormals *Hepacivirus C*) bezeichnet und ist derzeit der einzige humanpathogene Vertreter des Genus *Hepacivirus* in der Familie der *Flaviviridae* (1) (2).

Derzeit sind bei HCV acht Genotypen mit diversen Subgenotypen und rekombinanten Formen bekannt (3) (4) (5). Die genetische Diversität der einzelnen Genotypen zueinander liegt z.T. bei über 30 %. Als RNA-Virus ist das Genom von HCV sehr variabel und nach Infektion des Wirts kann man das Virus als Quasispezies betrachten. Diese Variabilität kann als wichtiger Grund angesehen werden, dass bisher kein Impfstoff gegen HCV entwickelt werden konnte.

HCV wird vorwiegend parenteral durch blutinfizierte Nadeln z.B. bei Drogenkonsum und Tätowierungen übertragen, seltener auch durch sexuelle Übertragungswege (1). Durch die Einführung der serologischen HCV-Blutspendetestung in 1991 in Deutschland ist die vorher vergleichsweise häufige Übertragung von HCV durch Bluttransfusionen und Blutprodukte sehr unwahrscheinlich geworden. Das bei HCV mit durchschnittlich 60 Tagen ungewöhnlich weite diagnostische Fenster konnte durch die Einführung der HCV-Testung mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT) deutlich verkürzt werden (6). Die Einführung der NAT-Testung auf HCV erfolgte in Deutschland in 1997.

Die akute Hepatitis, die sich 6-8 Wochen nach Infektion mit HCV entwickeln kann, zeigt meist nur einen milden Krankheitsverlauf. Etwa 75 % der akut HCV-infizierten Personen entwickeln unbehandelt eine chronische HCV-Infektion, die sich im weiteren Krankheitsverlauf häufig zu einer Leberzirrhose und darauffolgend zu einem primären Leberzellkarzinom weiterentwickeln kann. Es existiert derzeit kein Impfstoff gegen HCV, jedoch steht zur Behandlung eine effektive, antivirale Therapie zur Verfügung, die in den meisten Fällen zu einer Heilung führt (1).

2.1.2 HBV

HBV, das Hepatitis-B-Virus, heißt nach aktueller ICTV-Nomenklatur jetzt offiziell *Orthohepadnavirus hominoidei*. HBV ist ein behülltes DNA-Virus mit einem zirkulären, partiell doppelsträngigen, etwa 3,2 kb großen Genom, das vorwiegend die Leber infiziert und eine Leberentzündung verursacht. Neben den infektiösen Viren werden sphärische oder filamentöse Viruspartikel gefunden, die keine DNA enthalten und nicht infektiös sind (1). HBV gehört zum Genus *Orthohepadnavirus* innerhalb der Familie der *Hepadnaviridae* (7) (8) (9). Da HBV für seinen Replikationszyklus eine Reverse Transkriptase benutzt, ist das HBV-Genom sehr variabel und das Virus entwickelt sich im infizierten Wirt zu einer Quasispezies (10). Eine weitere Besonderheit bei HBV ist das Auftreten von Viruspartikeln mit defekten Virusgenomen (11).

Bei HBV kennt man die humanen Genotypen A-H und viele daraus entstandene rekombinante Formen, wie z.B. den Genotypen „I“ (A/C/G-Rekombinante) oder viele B/C-Rekombinationen, sowie verschiedene Genotypen von Gibbon und Menschenaffen, die nicht humanpathogen sind (9) (12) (13) (14). Ein weiterer vermeintlich humanpathogener Genotyp „J“ stellt einen Einzelfall dar, ist am nächsten mit einer Gibbon-Sequenz verwandt und ist vermutlich durch eine Übertragung vom Affen auf den Menschen entstanden (12) (15). In Europa sind vorwiegend die Genotypen A und D verbreitet (16).

HBV wird durch Virus-infizierte Körperflüssigkeiten wie Blut oder Blutprodukte, Speichel, Muttermilch oder Schleimhäute, z.B. bei der Geburt, oder durch Sexualverkehr übertragen. Die Inkubationszeit kann zwischen zwei und sechs Monaten betragen, da diese von der Erregerdosis, dem Infektionsweg sowie dem Immunstatus der Exponierten abhängig ist. Bei etwa 65 % der Infizierten verläuft die Infektion asymptomatisch. Eine akute Hepatitis dauert etwa 2-4 Wochen an. Bei etwa 5-10 % aller Infizierten entwickelt sich eine chronische Hepatitis, die im weiteren Verlauf zu einer Leberzirrhose und einem primären Leberzellkarzinom führen kann.

Bei einer akuten Hepatitis ist aufgrund der hohen Spontanheilungsrate keine Therapieindikation gegeben. Patienten mit einer chronischen Hepatitis B werden mit antiviralen Medikamenten behandelt.

Durch die aktive Immunisierung durch eine Schutzimpfung ist eine gezielte Prophylaxe der Hepatitis-B-Infektion effektiv möglich. Trotz der verfügbaren Schutzimpfung stellt die Hepatitis-B-Infektion weiterhin eine berufsbedingt vorkommende Infektionskrankheit im Gesundheitswesen dar (17).

2.1.3 HIV

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist der Erreger der Immunschwächekrankheit AIDS. HIV bildet ein komplexes, umhülltes Virion bestückt mit zwei linearen (+)ssRNA-Strängen. HIV gehört zur Gattung der Lentiviren in der Familie der *Retroviridae* und man kennt derzeit die beiden humanen Arten HIV-1 und HIV-2, die aktuell gemäß der offiziellen ICTV-Nomenklatur auch als *Lentivirus humimdef1* bzw. *L. humimdef2* bezeichnet werden. Der Ursprung beider Arten sind jeweils Übertragungen des Simian Immundefizienz-Virus (SIV) von Affen auf den Menschen (1) (18).

Bei HIV-1 sind derzeit vier solcher unabhängiger Übertragungen vom Schimpansen bzw. Gorilla auf den Menschen bekannt, die auch als Genotyp-Gruppen (im Englischen als *groups* bezeichnet) M, N, O und P bekannt sind (19). Vor allem die Genotyp-Gruppe M mit einer Vielzahl von Subtypen und daraus abgeleiteten rekombinanten Formen hat Verbreitung gefunden und ist für über 90 % aller HIV-Infektionen weltweit verantwortlich. Die häufigsten Subtypen der Gruppe M sind der Subtyp C in Asien und Afrika sowie der Subtyp B in Europa und den Vereinigten Staaten. Die Gruppe O ist hingegen vor allem in Westafrika verbreitet und von den Gruppen N und P sind insgesamt nur wenige Fälle bekannt. Wie bei HBV und HCV entwickelt sich auch HIV im fortschreitenden Krankheitsverlauf zu einer Quasispezies.

Bei Mehrfachinfektion mit unterschiedlichen Subtypen kommt es zu Rekombinationsereignissen, aus denen neue rekombinante Genotypen (=CRF = *circulating recombinant forms*) hervorgehen können. HIV-2 ist vorwiegend endemisch in Westafrika und man kennt derzeit neun Genotyp-Gruppen, die jeweils unabhängige Übertragungen von den oft als Haustier gehaltenen Mangaben, einer Affenart der „Meerkatzenverwandten“ (*Cercopithecidae*), auf den Menschen darstellen (19). Eine gewisse Relevanz für das Blutspendewesen haben allerdings nur die Gruppen A und B und eine davon abgeleitete rekombinante Form CRF01_AB. Die anderen Gruppen stellen bisher nur lokale Einzelfälle dar.

HIV wird vor allem bei sexuellen Kontakten mit infektiösen Körperflüssigkeiten, im wesentlichen Sperma, Vaginalsekret und dem Flüssigkeitsfilm auf der Darmschleimhaut, übertragen, wobei der direkte Blutkontakt mit Abstand das größte Übertragungsrisiko darstellt. Das Infektionsrisiko nach einer Transfusion von HIV-positivem Blut liegt bei über 90 %. Jedoch wurde durch die Einführung der Blutspendetestung (in Deutschland serologisch ab 1985, NAT ab 1997, ab 2004 verpflichtend) die Wahrscheinlichkeit der Transfusion einer HIV-positiven Spende auf ein Minimum reduziert (1:5.000.000 laut RKI). Die Inzidenz von HIV-2 in Deutschland ist niedrig, im Jahr 2024 gab es in Deutschland 3.259 HIV-Neudiagnosen, darunter waren zwei Infektionen mit HIV-2 und keine Doppelinfektionen mit HIV-1 und HIV-2 (20). Der Krankheitsverlauf bei einer Infektion mit HIV-2 ist beim Menschen meist milder und langsamer als bei HIV-1 und oftmals sogar ohne erkennbare Symptome (21).

Der Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion wird meist in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase wird auch Primärinfektion genannt und verläuft häufig inapparent. Die sich anschließende zweite Phase ist meist eine mehrjährige symptomfreie Latenzphase, die unbehandelt in der dritten Phase zu dem typischen AIDS-Krankheitsbild führt, was letztlich zum Zusammenbruch der Immunabwehr und somit zum Tod führt (18). Es gibt keine HIV-Schutzimpfung, jedoch ist es heutzutage möglich durch eine antiretrovirale Kombinationstherapie (cART, *combined antiretroviral therapy*) das Ausbrechen von AIDS fast vollständig zu verhindern (22).

2.2 Nutzen von NAT-Tests

Die Sicherheit von Blut und Blutprodukten erfordert die Feststellung der Spendereignung und die Testung der Spenden, um das Risiko einer möglichen Übertragung viraler Erreger bei der Transfusion von Blut und Blutbestandteilen zu minimieren. Durch serologisches Screening kann die Gefahr einer Übertragung viraler Infektionen durch Transfusion zwar stark reduziert, aber nicht ausgeschlossen werden. Bei Blutspenden, die im Zeitraum der Serokonversion gewonnen werden, besteht ein Restrisiko, dass die Infektion nicht durch die serologischen Tests erfasst wird (23). Durch das Testen auf virale Nukleinsäuren mittels NAT lässt sich das diagnostische Zeitfenster verkürzen und das Risiko einer Übertragung weiter minimieren.

Die Studie von Faddy *et al.* (24) konnte durch die Erhebung der derzeitigen weltweiten Nutzung von Blutspende-NAT zeigen, dass der Einsatz von NAT in den letzten Jahren zugenommen hat. Der prozentuale Anteil an NAT-positiven Spenden, bemessen an der Gesamtanzahl an Spenden in 2019, betrug 0,0099 % für HIV, 0,0063 % für HCV und 0,0247 % für HBV. Es zeigt sich dabei deutlich, dass NAT dazu beiträgt, die Sicherheit von Bluttransfusionen weltweit zu verbessern.

2.3 Testprinzip

Das Multiplex PCR-Kit *PoET Multiscreen* besteht aus einer Real-Time PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von HCV/HIV-spezifischer RNA und HBV-spezifischer DNA in humanen Blutplasma-proben. Bei der PCR werden bei HCV zwei Target-Bereiche (X-Tail und 5' UTR) amplifiziert. Bei HBV ist ebenfalls ein *Dual-Target Design* (Sequenzüberlappungsbereich des P/X und C/P-Gens) etabliert. Der Nachweis von HIV-1 ist durch ein *Triple-Target Design* (GAG, LTR und Pol3) sichergestellt. Bei HIV-2 wird ein konservierter Bereich des LTR-Gens amplifiziert.

Mit *PoET Multiscreen* können die Nukleinsäuren von HCV, HBV und HIV gleichzeitig in einer Reaktion amplifiziert und anhand unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe voneinander unterschieden werden. *PoET Multiscreen* differenziert jedoch nicht zwischen HIV-1 und HIV-2.

Bei sehr hohen Konzentrationen eines Virus kann es dazu kommen, dass die Amplifikation der anderen Viren nicht mehr ungestört ablaufen kann. In der Software *Calliope* von *PoET Instrument* sind Grenzwerte hinterlegt, um Fälle dieser Art entsprechend zu berücksichtigen.

Alle PoET PCR-Kits enthalten zusätzlich zu den virusspezifischen Oligonukleotiden ein weiteres heterologes, nicht-kompetitives Amplifikationssystem zum Nachweis der Internen Kontrolle (*PoET Internal Control*, „IC“, separat erhältlich). Die IC wird jeder Probe zu Beginn der Probenvorbereitung zugesetzt und dient als Extraktions- und Amplifikationskontrolle.

3 PoET-System Überblick

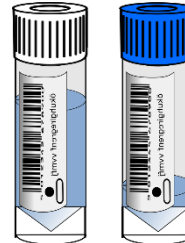
Das PoET-System bietet eine vollautomatisierte Lösung für die Extraktion, Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren von Infektionserregern in humanen Plasmaproben für Anwendungen im NAT-Hochdurchsatzscreening oder den Nachweis aus einzelnen Proben. Das PoET-System besteht aus einer Reihe an unterschiedlichen Produkten, die einzeln erhältlich sind.

PoET-System		
	PoET-Reagenzien	Verbrauchsartikel
<i>PoET Instrument</i>	- PoET PCR-Kits - PoET Kontrollen - PoET Extraktionsreagenzien	- PCR-Platten - Extraktionsplatten - Probenröhrchen - Pipettenspitzen

4 Reagenzien

Das PCR-Kit *PoET Multiscreen* besteht aus zwei Komponenten, einem Röhrchen mit *enzyme mix v2* (EM v2) und einem Röhrchen mit *oligo mix MSN* (O_M v1). Es werden beide Röhrchen für den Test mit *PoET Multiscreen* benötigt.

<i>PoET Multiscreen</i>	
GFE-Katalognummer	P2M-28-30
Basis-UDI-DI	42623533728MH
Anzahl Reaktionen pro Kit	840 (30 x 28 Reaktionen)



Kit Komponente	Name	Primärverpackung	Inhaltsstoffe	Volumen inkl. Totvolumen pro Kit
<i>enzyme mix v2</i>	EM v2	Röhrchen mit Schraubdeckel (weiß)	H ₂ O, Master Mix mit < 1 % dUTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP und < 1 % Taq Polymerase, < 0,001 % Uracil-N-glycosylase, < 0,002 % MMLV Reverse Transcriptase, < 0,001 % RNase Inhibitor	30 × 1210 µL
<i>oligo mix MSN</i>	O_M v1	Röhrchen mit Schraubdeckel (blau)	Tris Puffer, < 0,03 % forward und reverse HCV, HBV und HIV-1/2 und IC Primer, < 0,004 % HCV, HBV und HIV-1/2 und IC Sonden mit Fluoreszenzfarbstoff	30 × 250 µL

4.1 Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Material	Lagerung	Transport	Anwendung
<i>PoET Multiscreen</i>	≤ -18 °C	≤ -18 °C	+15 °C bis +30 °C



Die Reagenzien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt.
Nach Gebrauch in den Röhrchen verbleibende Reagenzien müssen entsorgt werden.



Der *oligo mix* ist lichtempfindlich und sollte während der Testvorbereitung vor Licht geschützt aufbewahrt werden.



Spätestens 5 Stunden nach Entnahme der Reagenzien aus den Lagerorten die Analyse auf dem *PoET Instrument* starten. Die Reagenzien erst kurz vor Laufstart öffnen.



Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden. *PoET Instrument* überprüft die Reagenz-Barcodes und lässt keinen Lauf-Start mit abgelaufenen Reagenzien zu.

4.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Verbrauchsartikel

Material	Katalognummer
<i>PoET Extraction</i>	P1A-24-04
<i>PoET Prep Reagent</i>	P1B-24-20
<i>PoET Internal Control</i>	P1C-1440-60
<i>PoET Universal Positive Control</i>	P3M-360-60
<i>PoET Negative Control</i>	P3A-500-30
<i>1000 µL-CO-RE II Tips</i>	235905
<i>300 µL-CO-RE II Tips</i>	235903
<i>Extraction Plate Set</i>	43001-0730
<i>PCR Plate</i>	SP-0362
<i>13 mL Tube & Cap*</i>	60.541.004 & 65.714

*Optional. *PoET Instrument* Benutzerhandbuch für weitere Informationen über Primär- und Sekundärröhrchen beachten.



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

4.3 Benötigte Geräte und Software

Gerät	Katalognummer
<i>PoET Instrument</i> inkl. der Software <i>Calliope</i> v2.0 oder höher	P9A

5 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

5.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die *In-vitro*-Diagnostik verwenden.
- Nur in Verbindung mit *PoET Instrument* und den dazugehörigen Reagenzienkits und Verbrauchsartikeln verwenden.
- Alle Arbeitsflächen gemäß der „Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities“ (25) oder vergleichbaren Methoden reinigen und desinfizieren.
- Mögliche Nukleinsäurekontaminationen mit DNA-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH) oder einem vergleichbar wirksamen Mittel nach Angaben des Herstellers beseitigen.
- Proben als potenziell infektiös behandeln, wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (26) und im CLSI-Dokument M29A4 (27) beschrieben. Wenn Probenmaterial verschüttet wird, sofort mit einem geeigneten Mittel desinfizieren. Kontaminierte Materialien sind als biologisch gefährlich zu behandeln.
- Wenn Proben oder Reagenzien auf dem *PoET Instrument* verschüttet werden, Anweisungen im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zur Reinigung und Dekontaminierung der Oberfläche befolgen.
- Alle Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben und/ oder Reagenzien in Kontakt gekommen sind, gemäß den einschlägigen regionalen und nationalen Vorschriften entsorgen.
- Sicherheitsdatenblätter (MSDS) werden von GFE zur Verfügung gestellt.

- Persönliche Schutzausrüstung (Laborkittel, Augenschutz, Laborhandschuhe) tragen. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach der Handhabung der Proben und Reagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe die Hände desinfizieren und gründlich waschen. Die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben, Kontrollen und Reagenzien wechseln. Beim Umgang mit Proben und Kontrollen eine Kontamination der Handschuhe vermeiden.

5.2 Umgang mit Reagenzien

- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben gemäß der guten Laborpraxis handhaben, um eine Verschleppung von Proben oder Reagenzien zu verhindern.
- Proben, Kontrollen und PCR-Kits getrennt lagern.
- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben aufrecht und bei den angegebenen Temperaturen lagern.
- PoET PCR-Kits werden auf Trockeneis versandt. Für die sichere Handhabung und Entsorgung von Trockeneis sind die lokalen Anweisungen und Richtlinien zu beachten.
- Das Produkt nach Erhalt auf gefrorenen Zustand, Unversehrtheit der Verpackung und Vollständigkeit überprüfen. Wenn es Anzeichen für aufgetaute Reagenzien oder Beschädigungen gibt, dürfen diese Produkte nicht verwendet werden.
- PCR-Reagenzien sind lichtempfindlich. Darauf achten, sie vor Lichtquellen geschützt zu lagern und zu handhaben.
- Den Austausch von Röhrchendeckeln vermeiden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Die Reagenzien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Reagenzienreste in den Röhrchen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Verschiedene Chargen der gleichen Reagenzien dürfen nicht kombiniert werden.
- Reagenzien nicht mehr verwenden, nachdem ihre Haltbarkeit abgelaufen ist.

6 Prozessablauf

Der Prozess mit *PoET Instrument* besteht aus den folgenden Schritten:

1. Probenvorbereitung
2. PCR-Setup
3. Amplifikation und Detektion
4. Auswertung und Bericht

6.1 Probenvorbereitung

Als Probenmaterial ist Humanplasma mit EDTA¹ oder CPD² als Antikoagulanzen zu verwenden.

Die Proben können als Einzelspenderproben oder als gepoolte Proben, bestehend aus Aliquots von Einzelspenden, bereitgestellt werden. *PoET Instrument* bietet die Möglichkeit, Pools aus sechs Einzelspenden zu erstellen. Weitere Informationen zu den möglichen Probenformaten und Pooling-Optionen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Probenprozessierung) zu finden.

¹ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

² Citrate-phosphate-dextrose (CPD)

Die Probenvorbereitung setzt sich aus vier Schritten zusammen:

Schritt	Beschreibung
IC-Zugabe	Zu Beginn des Prozesses wird jeder einzelnen Probe <i>PoET Internal Control</i> (IC, separat erhältlich) als Prozesskontrolle für die Extraktion und PCR-Amplifikation zugesetzt.
Lyse und Bindung	Die Viruspartikel werden lysiert, um die Nukleinsäuren freizusetzen. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden dann an magnetische Partikel adsorbiert.
Waschen	Proteine und andere Verunreinigungen werden in zwei Waschschritten entfernt.
Elution	Die Nukleinsäuren werden mit Elutionspuffer von den Magnetpartikeln abgelöst. Der Elutionspuffer enthält dann die RNA der IC und, wenn vorhanden, die viralen Nukleinsäuren.

6.2 PCR-Setup

Während des PCR-Setups werden der PCR-Mastermix, die Eluate und die PCR-Kontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) in die PCR-Platte(n) pipettiert.

Der PCR-Mastermix besteht aus *enzyme mix v2* (EM v2, nachfolgend EM genannt) und *oligo mix MSN* (O_M v1, nachfolgend OM genannt). Der OM enthält virusspezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden), die an hoch konservierte Regionen der viralen Nukleinsäuren binden. Darüber hinaus enthält der OM ein weiteres heterologes, nicht-kompetitives Amplifikationssystem mit Primern und Sonden zur Amplifikation der Sequenz der Internen Kontrolle (IC). In Abwesenheit des Zielvirus zeigt eine erfolgreiche IC-PCR-Reaktion die korrekten PCR-Bedingungen an und validiert nicht-reaktive Zielvirus-Ergebnisse.

Um eine Kontamination mit PCR-Produkten aus vorausgegangenen PCR-Reaktionen zu vermeiden, enthält der EM eine hitzelabile *Uracil-DNA-Glykosylase* (UNG) und *Desoxyuridintriphosphat* (dUTP) im Gemisch der *Desoxynukleotidtriphosphate* (dNTPs). Etwaige verschleppte PCR-Produkte aus früheren PCR-Reaktionen werden vor Beginn der aktuellen RT-PCR bei Raumtemperatur durch die UNG abgebaut. Anschließend wird die UNG während der reversen Transkription bei erhöhter Temperatur inaktiviert.

6.3 Amplifikation und Detektion

Bevor die PCR-Amplifikation beginnt, wird die RNA der IC sowie die RNA von HCV und HIV-1/2 einer reversen Transkription unterzogen, um cDNA-Kopien der RNA-Vorlagen herzustellen. Die reverse Transkription erfolgt durch eine rekombinante Variante des Enzyms *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) *reverse Transkriptase*, die im EM enthalten ist. In der PCR-Reaktion werden dann die cDNA-Kopien der IC sowie von HCV und HIV-1/2 parallel mit der DNA von HBV amplifiziert.

Die Amplifikationsreaktion wird über mehrere Zyklen hinweg wiederholt, wobei jeder Zyklus aus mehreren Schritten besteht. Zuerst wird das Reaktionsgemisch erhitzt, um die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA aufzuspalten („Denaturierung“). Beim Abkühlen der Mischung lagern sich die Sonden und Primer an die komplementären DNA-Stränge an („Annealing“). In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und überschüssigen dNTPs werden die Primer durch das Enzym *Thermus aquaticus* (Taq) *DNA-Polymerase* entlang der Zielsequenzen verlängert („Elongation“). Die hybridisierten Sonden werden während der Elongation durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase in ihre Nukleotide gespalten. In jedem Zyklus entstehen neue doppelsträngige DNA-Moleküle („Amplifikate“). Die PCR-Reaktion

wird für 50 Zyklen durchgeführt. Ab dem sechsten PCR-Zyklus wird bei jedem Zyklus eine Fluoreszenzlichtmessung durchgeführt.

Sonden fügen zusätzliche Spezifität bei der Detektion hinzu, da Sondenmoleküle nur an komplementäre DNA-Stränge der Zielregion hybridisieren können und Sonden nur dann von der Taq-DNA-Polymerase gespalten werden, wenn sie an den komplementären DNA-Strang hybridisiert sind.

Um die Anzahl der produzierten Amplifikate nachweisen zu können, sind die Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff („Reporter“) am 5'-Ende und mit einem Quencher am 3'-Ende gekoppelt. Bei intakten Sondenmolekülen wird aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zum Quencher das Fluoreszenzsignal durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) stark gedämpft.

Während der Elongation werden durch die 5'-3'-Exonukleolyseaktivität der Taq-Polymerase die hybridisierten Sonden abgebaut und der Reporterfarbstoff wird freigesetzt. Der FRET wird unterbrochen und somit das Fluoreszenzsignal emittiert. Das Fluoreszenzsignal steigt im Verhältnis zur Anzahl der produzierten Amplifikate.

Für die Zielviren und die IC werden unterschiedliche Reporterfarbstoffe mit spezifischen Fluoreszenzspektren verwendet. Die erfolgreiche Amplifikation der Zielviren und der IC kann daher anhand des Signalanstiegs in verschiedenen Fluoreszenzkanälen nachgewiesen werden.

6.4 Auswertung und Bericht

Nach dem PCR-Lauf auf dem *PoET Instrument* erfolgt die Analyse und Auswertung vollautomatisch durch die Software *Calliope*. Weitere Details zur Auswertung sind in Kapitel 7.10 beschrieben.

7 Testdurchführung

7.1 Voraussetzungen

- Nur Personal, das in der Verwendung von PoET-Produkten und im Umgang mit infektiösem Material geschult und qualifiziert ist, sollte dieses Verfahren durchführen.
- Die angegebenen Verfahren und Vorgaben genau befolgen, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorgaben kann die Testleistung beeinträchtigen.
- Dieses Produkt nur für den vorgesehenen Zweck verwenden.
- Nur die angegebenen Reagenzien und Verbrauchsartikel verwenden.
- Das Produkt in einem Temperaturbereich von +15 °C bis +30 °C verwenden.

7.2 Probenmaterial

- In den Validierungsstudien für *PoET Multiscreen* wurde menschliches EDTA- und CPD-Plasma von lebenden Spendern verwendet. Alle leistungsbezogenen Informationen basieren auf diesen Materialien, die daher für die Verwendung von *PoET Multiscreen* mit dem *PoET Instrument* empfohlen werden.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden sowie Proben von heparinisierten Personen, dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann (28).



Alle Proben sind als potentiell infektiös zu behandeln.

7.3 Probennahme und Präanalytik

7.3.1 EDTA-Plasma

- Die Blutabnahme ist mit handelsüblichen EDTA-Blutentnahmeröhrchen mit oder ohne Gel-Barriere (z.B. Sarstedt oder Becton Dickinson) entsprechend den Herstellerangaben durchzuführen.
- Die Vollblutproben in den Primärröhrchen müssen innerhalb von 48 Stunden nach Herstellerangaben in die Zell- und Plasmabestandteile getrennt werden.
- Je nach Testmethode benötigt *PoET Instrument* ein Volumen von bis zu 1,5 mL pro Probe. Weitere Informationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Präanalytik) zu finden.



Die Primärröhrchen müssen ausreichend gefüllt sein. Es ist darauf zu achten, dass das Plasma frei von sichtbaren Verunreinigungen, wie Gelkomponenten oder Blutzellen, ist. Andernfalls kann dies zu einer Beeinträchtigung der Testleistung führen.

7.3.2 CPD-Plasma

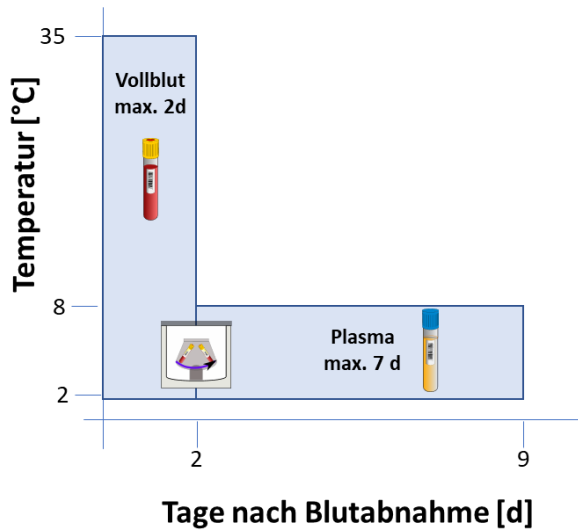
- Die Probenentnahme und die Herstellung von CPD-Plasma erfolgen mit Blutbeutelssystemen (z.B. Fresenius-Kabi oder Maco Pharma) gemäß den Anweisungen des Herstellers des Beutelsystems.
- Je nach Testmethode benötigt *PoET Instrument* ein Volumen von bis zu 1,5 mL pro Probe. Weitere Informationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Präanalytik) zu finden.

7.4 Probentransport

Die Transportdauer und -temperaturen müssen den in Kapitel 7.5 beschriebenen Bedingungen entsprechen.

7.5 Probenlagerung

7.5.1 EDTA-Plasma



- Bis zur Trennung können die Vollblutproben für 48 Stunden bei +2 °C bis +35 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach der Trennung von den Zellen kann EDTA-Plasma in Primär- oder Sekundärröhrchen bei +2 °C bis +8 °C bis zu 7 Tage aufbewahrt werden, ohne dass sich die Viruslast von HCV, HBV und HIV-1/2 messbar verändert.



Abweichungen von den angegebenen Lagerungsbedingungen für EDTA-Plasma können die Testleistung beeinträchtigen.

7.5.2 CPD-Plasma

- CPD-Plasmabeutel können in gefrorenem Zustand bei ≤ -18 °C transportiert werden.
- Die gefrorenen CPD-Plasmabeutel können bei ≤ -20 °C bis zu 3 Jahre gelagert werden, ohne dass sich die Viruslast von HCV, HBV und HIV-1/2 messbar verändert.



Abweichungen von den angegebenen Lagerungsbedingungen für CPD-Plasma können die Testleistung beeinträchtigen.

7.6 Durchführung der Testung mit *PoET Instrument*

Die Bedienung von *PoET Instrument* ist detailliert im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Betrieb, Laufauswertung und Datentransfer) beschrieben.

Im Folgenden ist der Testablauf zusammenfassend dargestellt:

Schritt	Aktion(en)
1	<i>PoET Instrument</i> für den Betrieb vorbereiten: - Falls erforderlich: <i>PoET Instrument</i> einschalten - Falls erforderlich: Proben, Reagenzien und Verbrauchsartikel eines vorausgegangenen Laufs entladen. Reagenzien und Verbrauchsartikel sachgerecht entsorgen. Proben je nach Bedarf entweder sachgerecht entsorgen oder entsprechend einlagern. - Falls erforderlich: Wartungen gemäß Anweisungen auf dem Bildschirm durchführen
2	Lauf vorbereiten: - Prozess-Modus auswählen - Proben in das Gerät laden - Testanforderungen zuweisen (Testtypen und Test-Parameter) - Reagenzien und Verbrauchsartikel laden
3	Lauf durchführen
4	<i>PoET Instrument</i> entladen: - Proben, Reagenzien und Verbrauchsartikel entladen. - Reagenzien und Verbrauchsartikel sachgerecht entsorgen. - Proben je nach Bedarf entweder sachgerecht entsorgen oder entsprechend einlagern.

Je nach den gewählten Test-Parametern und der Anzahl der Proben liegen die PCR-Ergebnisse einer Probenserie etwa 3,5 Stunden nach Beginn des Laufs vor.

7.7 Proben für einen *PoET Instrument* Lauf vorbereiten

Im Kühlschrank gelagerte EDTA-Proben können direkt verwendet und analysiert werden. Gefrorene CPD-Plasmabeutel müssen vor der Testung aufgetaut werden und das Probenmaterial muss in Sekundärröhrchen überführt werden. Informationen über Primär- und Sekundärröhrchen, die auf dem Gerät verwendet werden können, sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden.

7.8 Weitere Vorbereitungen für den Laufstart

- Zusätzlich zu den hier beschriebenen Punkten die Gebrauchsanweisungen (IFU) der anderen benötigten *PoET*-Produkte beachten.
- Die benötigte Anzahl an Röhrchen von *PoET Internal Control* vor der Verwendung bei +15 °C bis +30 °C vollständig auftauen.
- PCR-Kits und PCR-Kontrollen können gefroren oder aufgetaut auf das *PoET Instrument* geladen werden, solange die in Kapitel 4.1 genannten Standzeiten eingehalten werden.
- PoET Extraction* und *PoET Prep Reagent* können direkt verwendet werden.
- Vor der Verwendung jeden Reagenzbehälter visuell überprüfen, um sicherzustellen, dass keine Undichtigkeit vorliegt. Bei Anzeichen von Undichtigkeit nicht für den Test verwenden.
- Die Deckel der Reagenzröhrchen und die *Peel-Seal-Folien* der Rechteckbecher der Extraktionsreagenzien entfernen, bevor sie auf die Träger des *PoET Instrument* gestellt werden. *PoET Instrument* verfügt über keine Vorrichtung zum automatischen Entfernen der Deckel („Decapper“) oder zum Durchstechen der Folien.

- Um eine Verdunstung der Reagenzien zu vermeiden, die Deckel und *Peel-Seal-Folien* erst kurz vor dem Gebrauch entfernen. Die *Peel-Seal-Folien* der Rechteckbecher vorsichtig entfernen, um ein Verschütten von Reagenzien zu vermeiden.
- Darauf achten, dass keine Flüssigkeitsreste in den Deckeln oder an den Röhrchenwänden anhaften.
- Beim Einsetzen der Proben- und Reagenzröhrchen in die Träger darauf achten, dass die Barcode-Etiketten durch die Öffnungen an der Seite der Träger sichtbar sind. Die Barcode-Spezifikationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden.
- Das Be- und Entladen der Reagenzienträger von *PoET Instrument* gemäß den Angaben im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Betrieb) durchführen.
- Verbrauchsartikel sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Sie dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Für die ordnungsgemäße Wartung des Geräts das *PoET Instrument* Benutzerhandbuch lesen.

Nach Sicherstellung der obigen Punkte kann der Lauf gestartet werden.

7.9 Berechnung der Ergebnisse

Die Auswertung der PCR-Rohdaten erfolgt mit der Software *Calliope*. Jede Amplifikationskurve wird einzeln mit dem Auswerte-Algorithmus analysiert. Den Amplifikationskurven von reaktiven Proben werden hierbei „Positive Points“ (PP) zugeordnet. Als zweiten Wert für die Ergebnisbewertung berechnet der Algorithmus den „Quotienten“ (Q) für jede einzelne Kurve. Dieser Wert ergibt sich aus dem höchsten Fluoreszenzwert der letzten drei Zyklen geteilt durch den niedrigsten Fluoreszenzwert der ersten drei Zyklen. Er stellt die Signalstärke der einzelnen Kurve dar.

Bei der Durchführung und Auswertung der PCR werden verschiedene Fluoreszenzkanäle des Real-Time PCR-Cyclers benutzt, so dass die drei Virus-Parameter von *PoET Multiscreen* sowie die IC differenziert werden können:

Virus-Parameter	Test-Parameter in <i>Calliope</i>	Fluoreszenzkanal
HCV	HCVm	FAM
HBV	HBVm	ROX
HIV	HIVm	VIC
IC	IC	CY5

7.10 Kontrollmaßnahmen und Validität der Ergebnisse

Der gesamte Prozess von der Probenvorbereitung bis zur PCR-Analyse wird von verschiedenen Kontrollen überwacht:

Kontroll-Typ	Produkt	Funktion
Interne Kontrolle (IC)	<i>PoET Internal Control</i>	IC wird jeder Probe vor Beginn der Prozessierung zugegeben. Für jede nicht reaktive Probe gibt die IC an, ob die Bearbeitung von der Extraktion bis zum Ergebnis valide ist.
PCR-Positivkontrolle (PC)	<i>PoET Universal Positive Control</i>	PC werden als separate Reaktionen angesetzt. Die PCR-Positivkontrolle enthält synthetische Nukleinsäuren der Amplikons von <i>PoET Multiscreen</i> . Sie dient dem Beleg, dass die an der Amplifikationsreaktion von HCV, HBV und HIV beteiligten Reagenzien funktional sind.
PCR-Negativkontrolle (NC)	<i>PoET Negative Control</i>	NC werden als separate Reaktionen angesetzt. Die PCR-Negativkontrolle dient dem Beleg, dass die an der Amplifikationsreaktion beteiligten Reagenzien nicht mit den jeweils nachzuweisenden Nukleinsäuren kontaminiert sind.

Basierend auf den PP- und Q-Werten der Kontrollen ermittelt *Calliope*, ob das Gesamtergebnis für die Probenserie und jede einzelne Probe valide ist.

7.10.1 Validierung der PCR-Negativkontrollen (NC)

Die PCR-Negativkontrolle, *PoET Negative Control*, wird als separate Reaktion angesetzt. Die individuelle Reaktion wird bei *PoET Multiscreen* als valide bewertet, wenn weder der IC noch einem der drei zu detektierenden Virus-Parameter ein PP-Wert zugewiesen wird.

Je nach Probenserie werden auf einer PCR-Platte mehrere PCR-Negativkontrollen angesetzt. Ob das NC-Gesamtergebnis als valide zu bewerten ist, hängt von der Ergebniskonstellation der individuellen Reaktionen ab.

Bewertung	Anzahl NC auf einer PCR-Platte	Definition
NC-Gesamtergebnis valide	1	Dieser NC wird <u>kein</u> PP-Wert zugewiesen.
NC-Gesamtergebnis valide	≥ 2	Allen NC werden <u>keine</u> PP-Werte zugewiesen.
		Höchstens einer NC wird ein PP-Wert zugewiesen.
NC-Gesamtergebnis invalide	1	Dieser NC wird ein PP-Wert zugewiesen.
NC-Gesamtergebnis invalide	≥ 2	Mehr als einer NC auf einer PCR-Platte wird ein PP-Wert zugewiesen.

Im Falle eines invaliden NC-Gesamtergebnisses werden automatisch alle Ergebnisse der zugehörigen Probenserie als invalide bewertet.

7.10.2 Validierung der PCR-Positivkontrollen (PC)

Die PCR-Positivkontrolle, *PoET Universal Positive Control*, wird als separate Reaktion angesetzt. Die individuelle Reaktion wird bei *PoET Multiscreen* als valide bewertet, wenn für alle drei zu detektierenden Virus-Parameter die PP- und Q-Werte innerhalb der Grenzwerte liegen. Die Grenzwerte sind in der Software *Calliope* hinterlegt.

Je nach Probenserie werden auf einer PCR-Platte mehrere PCR-Positivkontrollen angesetzt. Ob das PC-Gesamtergebnis als valide zu bewerten ist, hängt von der Ergebniskonstellation der individuellen Reaktionen ab.

Bewertung	Anzahl PC auf einer PCR-Platte	Definition
PC-Gesamtergebnis valide	1	PP- und Q-Werte dieser PC liegen innerhalb der Grenzwerte.
PC-Gesamtergebnis valide	≥ 2	PP- und Q-Werte aller PC liegen innerhalb der Grenzwerte.
		PP- oder Q-Werte von höchstens einer PC liegen außerhalb der Grenzwerte.
PC-Gesamtergebnis invalide	1	PP- oder Q-Werte dieser PC liegen außerhalb der Grenzwerte.
PC-Gesamtergebnis invalide	≥ 2	PP- oder Q-Werte von mehr als einer PC liegen außerhalb der Grenzwerte.

Im Falle eines invaliden PC-Gesamtergebnisses werden automatisch alle Ergebnisse der zugehörigen Probenserie als invalide bewertet.

7.10.3 Validierung der Internen Kontrolle (IC)

PoET Internal Control wird jeder Probe vor Beginn der Prozessierung zugegeben. Die Proben enthalten somit einen zusätzlichen Analyten, der zusammen mit den Infektionserregern die gesamte Probenprozessierung durchläuft. *PoET Internal Control* dient der Bewertung der Validität der Ergebnisse der getesteten Proben.

Da die IC den gesamten Prozess durchläuft, dient sie der funktionellen Überwachung der verwendeten Reagenzien und des zum Einsatz kommenden *PoET Instrument*. Die Analyse der IC-Validität wird nur durchgeführt, wenn die Gesamtergebnisse der PCR-Kontrollen (PC, NC) für die entsprechende Probenserie valide sind.

Die Bewertung der IC wird für jede Probenposition auf der PCR-Platte individuell durchgeführt. Ein IC-Ergebnis wird als valide bewertet, wenn die IC sich innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte befindet. Nur wenn das IC-Ergebnis als valide bewertet wird, können *nicht reaktiv (not reactive)*-Ergebnisse für die Virus-Parameter HCV, HBV oder HIV ebenfalls als valide bewertet werden.

Bei Virus-Parametern, die das Ergebnis *reaktiv (reactive)* erhalten, wird das IC-Ergebnis ignoriert und das Ergebnis *reaktiv (reactive)* bleibt für diese Virus-Parameter bestehen.

7.11 Interpretation der Ergebnisse

Generell sind Probenergebnisse nur valide, wenn die entsprechenden PCR-Kontrollen (PC, NC) der zugehörigen Probenserie valide sind und wenn keine Bearbeitungsfehler oder sonstigen Störungen aufgetreten sind. Eine gültige Probenserie in einem Lauf mit *PoET Instrument* kann sowohl valide als auch

invalide Probenergebnisse enthalten. Invalide Probenergebnisse erfordern eine Testwiederholung. Valide Probenergebnisse können entweder *reaktiv* (*reactive*) oder *nicht reaktiv* (*not reactive*) sein.

Je nach Konfiguration liefert *Calliope* die Ergebnisse entweder automatisch an ein Laborinformationssystem (LIS, LIMS) oder die Ergebnisse müssen manuell überprüft und an ein LIS übertragen werden. Weitere Einzelheiten können dem *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Software *Calliope*, Laufauswertung und Datentransfer) entnommen werden.

7.12 Verfahrenseinschränkungen

- Der Nachweis von viralen Nukleinsäuren ist konzentrationsabhängig. Virusnukleinsäuren in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Tests können mit dem PCR-Kit nicht zuverlässig nachgewiesen werden.
- Falsche Probenentnahme, unsachgemäße Probenlagerung und -vorbereitung können die Stabilität der Viren und Nukleinsäuren negativ beeinflussen und die PCR-Ergebnisse beeinträchtigen.
- Wenn bei EDTA-Röhrchen ohne Gel-Barriere Teile des zellulären Sediments im Plasma sichtbar sind oder Grund zu der Annahme besteht, dass das Sediment aufgewirbelt wurde, können die PCR-Ergebnisse beeinträchtigt werden. In diesem Fall sollten die Röhrchen vor der Verwendung nachzentrifugiert werden.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann.
- Bei nicht getesteten Störsubstanzen und Störsubstanzen jenseits der in den Leistungsdaten angegebenen Konzentrationen ist ein zuverlässiges Testergebnis nicht sichergestellt (siehe Kapitel 8.3.3 und 8.3.4).
- Präexpositionsprophylaxe-Präparate oder andere virostatika Medikamente, die von Blutspendern eingenommen werden, können zu niedrigen Konzentrationen viraler Nukleinsäuren führen, die dementsprechend nicht zuverlässig nachgewiesen werden können (siehe oben).
- Trotz Sequenzabgleich und Verifizierung der Primer zum Nachweis der für die Blutspende relevanten Varianten können Mutationen innerhalb der hochkonservierten Regionen des viralen Genoms die Oligonukleotidbindung und damit den Virusnachweis beeinträchtigen.
- Bei Proben mit sehr hoher Viruslast kann eine Verschleppung während der Probenhandhabung und -verarbeitung nicht ausgeschlossen werden. Beim Nachweis eines PCR-Ergebnisses mit sehr niedrigem PP-Wert können daher Proben desselben Laufs schwach-reaktive Ergebnisse zeigen.

7.13 Entsorgung

- Um ein Auslaufen von Reagenzienresten aus benutzten Extraktions- und PCR-Platten zu verhindern, werden die relevanten Platten im Prozess automatisch versiegelt.
- Alle Materialien, die mit Reagenzien in Berührung gekommen sind, gemäß den einschlägigen regionalen und nationalen Vorschriften entsorgen.
- Reagenzienreste gemäß den einschlägigen regionalen und nationalen Vorschriften entsorgen.
- Alle Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung gekommen sind, gemäß den einschlägigen regionalen und nationalen Vorschriften entsorgen.
- Hinweise zur Entsorgung der in Kombination mit dem PCR-Kit verwendeten Kits und Verbrauchsmaterialien den entsprechenden Gebrauchsanweisungen und Sicherheitsdatenblättern entnehmen.

8 Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale von *PoET Multiscreen* wurden unter Verwendung der folgenden Standards erhoben:

- 6th WHO International Standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (NIBSC code: 18/184)
- 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT (NIBSC code: 10/266)
- 4th WHO HIV-1 International Standard (NIBSC code: 16/194)
- 2nd WHO International Standard for Human Immunodeficiency Virus type 2 RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 16/296)

8.1 Wichtigste Testmerkmale

Probentyp	EDTA- oder CPD-Plasma
Benötigtes Probenvolumen	200 – 1500 µL*
Prozessiertes Probenvolumen	40,5 – 1300 µL*
Nachweisgrenze	
HCV	5,5 IU/mL
HBV	1,5 IU/mL
HIV-1	13,2 IU/mL
HIV-2	5,7 IU/mL
Spezifität	100 %
Testdauer	Je nach Testplan des PoET-Laufs liegen die Ergebnisse etwa 3,5 Stunden nach Beginn des Laufs vor.

* Abhängig vom verwendeten Testtyp. Weitere Informationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden.

8.2 Analytische Sensitivität

8.2.1 Nachweisgrenze (NWG)

Die Bestimmung der 95 %igen Nachweisgrenze (95 % NWG) für HCV, HBV und HIV-1/2 mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* wurde mit einem Probenvolumen von 1,3 mL unter Verwendung von verdünnten Virusstandards in EDTA-Plasma, welches aus Primärröhrchen mit Gel-Barriere stammte, durchgeführt. Die NWG wurde durch eine PROBIT-Analyse (log10) mit der Software *IBM SPSS Statistics* auf der Grundlage der Trefferquoten der seriellen Verdünnungen der Virusstandards bestimmt.

	HCV	HBV	HIV-1	HIV-2
WHO International Standard: Version, NIBSC-Code	6 th , 18/184	4 th , 10/266	4 th , 16/194	2 nd , 16/296
95 % NWG	5,5 IU/mL	1,5 IU/mL	13,2 IU/mL	5,7 IU/mL
Konfidenzintervall	4,5-7,1 IU/mL	1,2-1,9 IU/mL	10,4-20,2 IU/mL	3,4-22,5 IU/mL

Für CPD-Plasma und EDTA-Plasma aus Primärröhrchen ohne Gel-Barriere wurde die 95 % NWG anhand einer Hit-Ratenbestimmung für die entsprechende Viruskonzentration bestätigt. CPD-Plasma sowie EDTA-Plasma ohne Gelbarriere haben keinen negativen Einfluss auf die Sensitivität von HCV, HBV und HIV-1/2.

8.2.2 NWG für kleinere Probenvolumina

Werden Proben mit einem Plasmavolumen < 1,3 mL im Test verwendet, füllt *PoET Instrument* das Volumen automatisch mit *sample diluent* (SD), einem Bestandteil von *PoET Extraction*, auf 1,3 mL Gesamtvolumen auf. Die NWG von *PoET Multiscreen* wird entsprechend dem Verdünnungsfaktor reduziert.

Im Rahmen der Validierung des PCR-Kits *PoET Multiscreen* wurde bestätigt, dass das Auffüllen mit SD anstelle von Plasma keinen Einfluss auf die Leistungsdaten von HCV, HBV und HIV-1/2 hat. Weitere Informationen zum Probenauffüllvolumen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Präanalytik) zu finden.

8.2.3 Genotypenpanel

Die Detektierbarkeit aller relevanten Geno- und Subtypen für HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2 wurde in der Entwicklung durch Alignments der verfügbaren Sequenzen und darauf beruhender Primer-Selektion sichergestellt. Für die Genotypen-Abdeckung wurden zusätzlich für alle mit Sequenzinformation verfügbaren Geno- und Subgenotypen synthetische DNA-Fragmente getestet.

Darüber hinaus wurde die analytische Erfassung relevanter humanpathogener Geno- und Subtypen, soweit verfügbar, an Proben mit bekannten Genotypen für HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2 untersucht. Diese untersuchten Proben repräsentieren einen großen Teil der bislang bekannten Geno- und Subtypen.

Die Geno- und Subtyp-Proben wurden (soweit die Konzentration spezifiziert war) mit der 5-fachen 95% NWG eingesetzt und getestet.

HCV

HCV - Plasmaproben		
Genotyp	Anzahl Proben*	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
1	22	21 / 22
2	26	26 / 26
3	19	19 / 19
4	20	20 / 20
5	19	19 / 19
6	12	12 / 12

*Anzahl inklusive der Subtypen

Die bei HCV mit Plasmaproben getesteten Genotypen 1–6 werden mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* umfänglich detektiert. Für die Genotypen 7 und 8 sind keine Proben verfügbar und wurden entsprechend nicht getestet. Die vorliegenden Sequenzen sind in den Ziel-Bereichen der HCV-PCR hoch konserviert. Der Nachweis der Genotypen 7 und 8 ist somit auf Basis der Sequenzanalysen und der Testungen mit entsprechenden synthetischen DNA-Fragmenten im Rahmen der Entwicklung gewährleistet.

Mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* können somit für den Parameter HCV die Genotypen 1–8 nachgewiesen werden.

HBV

HBV - Plasmaproben		
Genotyp	Anzahl Proben*	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
A	18	18 / 18
B	11	11 / 11
C	12	12 / 12
D	12	12 / 12
E	7	7 / 7
F	6	6 / 6
G	3	3 / 3
H	1	1 / 1

*Anzahl inklusive der Sub-Genotypen

Alle humanen HBV-Genotypen A–H werden mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* detektiert.

HIV-1

HIV-1 Plasmaproben			
Genotyp	Subtyp	Anzahl Proben	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
M	A	16	15 / 16
M	B	9	9 / 9
M	C	9	9 / 9
M	D	10	10 / 10
M	F	9	9 / 9
M	G	9	9 / 9

HIV-1 Plasmaproben			
Genotyp	Subtyp	Anzahl Proben	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
M	H	5	5 / 5
M	J	2	2 / 2
M	K	1	1 / 1
M	CRF01_AE *	13	13 / 13
M	CRF02_AG	11	11 / 11
M	Weitere CRF**	26	25 / 26
N	n.a.	4	4 / 4
O	n.a.	10	10 / 10

* Die Rekombinante CRF01_AE wurde ursprünglich als Subtyp E klassifiziert (29).

** Neben den häufigen Rekombinanten CRF01_AE und CRF02_AG (CRF steht für *circulating recombinant forms*) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit alle weiteren CRFs hier zusammengefasst.

Die HIV-1 Gruppen M (Subtypen A–D, F–H, J, K), N und O sowie die weiteren getesteten Gruppe M-Rekombinanten werden mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* detektiert. Für die sehr seltenen Gruppe P und den M Subtypen L war kein Material verfügbar. Diese Genotypen wurde deshalb nicht mit Plasmaproben getestet. Jedoch kann durch Sequenzanalysen und Testung mit synthetischen DNA-Fragmenten gezeigt werden, dass sowohl der gut konservierte Subtyp L als auch der weniger gut konservierte Genotyp P sicher nachgewiesen werden können.

Mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* können somit für den Parameter HIV-1 die Genotyp-Gruppen M (Subtypen A–D, F–H, J–L und rekombinante Formen), N, O und P nachgewiesen werden.

HIV-2

HIV-2 Plasmaproben		
Genotyp	Anzahl Proben	Hit-Rate [reaktiv / gesamt]
A	9	9 / 9
B	3	3 / 3
CRF01_AB	2	2 / 2

Die HIV-2 Genotyp-Gruppen A und B, sowie die rekombinante Form CRF01_AB werden mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* detektiert. Die Genotypen C–I sind beschriebene Einzelfälle, für die keine Patientenproben und in einigen Fällen auch keine vollständige Sequenzinformationen verfügbar sind.

Gesamtübersicht

PoET Multiscreen	
Parameter	Genotypen
HCV	1–8
HBV	A–H
HIV-1	M [#] , N, O, P
HIV-2	A, B, AB

[#] alle annotierten Subtypen und rekombinanten Formen

8.3 Analytische Spezifität

8.3.1 Experimentelles Design Kreuzreaktivität und Einfluss von Störsubstanzen

Die Kreuzreaktivität und der Einfluss von Störsubstanzen auf das PCR-Kit *PoET Multiscreen* wurde anhand der Extraktion verschiedener Proben und des Nachweises von HCV, HBV und HIV untersucht. In einem Teil der Proben wurde HCV, HBV und HIV-negatives Plasma nur mit der jeweiligen Substanz versetzt. Ein anderer Teil der Proben wurde zusätzlich mit HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2-Virusstandard versetzt. An Störfaktoren wurden potentielle kreuzregierende Pathogene und endogene und exogene Störsubstanzen getestet.

8.3.2 Kreuzreagierende Substanzen und klinische Zustände

Sequenzvergleiche der Primer und Sonden mit potentiell kreuzreaktiven humanpathogenen Virussequenzen und ein optimiertes PCR-Design minimieren das Risiko unerwünschter PCR-Nebenprodukte. Im Rahmen der Validierung wurde der Einfluss von genomischen Nukleinsäuren ausgewählter Viren und Bakterien auf das PCR-Kit *PoET Multiscreen* untersucht. Zu diesem Zweck wurde negatives humanes EDTA-Plasma (NHP) mit Standards für die zu testenden Viren oder Bakterien versetzt, extrahiert und amplifiziert. Zusätzlich wurde HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2 positives Plasma mit Standards für die zu testenden Viren/Bakterien versetzt, extrahiert und amplifiziert. Die HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2-positiven Proben wurden mit HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2 in der 5-fachen 95 % NWG versetzt.

Testergebnisse für Kreuzreaktivität:

Spezies	Domäne	Nukleinsäure	Beobachtung
Japanisches-Enzephalitis-Virus (JEV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
St.-Louis-Enzephalitis-Virus (SLEV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
West-Nil-Virus (WNV Lineage 1)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Zika-Virus (ZIKV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Gelbfieber-Virus (YFV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Dengue-Virus (DENV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes T-lymphotropes Virus 1 (HTLV-1)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes T-lymphotropes Virus 2 (HTLV-2)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Chikungunya-Virus (ChikV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-E-Virus (HEV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Parvovirus B19 (B19V)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-A-Virus (HAV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis-D-Virus (HDV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Adenovirus	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
BK-Virus (BKV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Humanes Herpesvirus Typ 6b (HHV-6b)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Varicella-Zoster-Virus (VZV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Cytomegalievirus (CMV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung

Spezies	Domäne	Nukleinsäure	Beobachtung
Epstein-Barr-Virus (EBV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
<i>Serratia marcescens</i>	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung

Bei den eingesetzten Viren/Bakterien konnte kein Einfluss auf die PCR-Leistung von *PoET Multiscreen* festgestellt werden. Alle PCR-Reaktionen zeigten reaktive Ergebnisse für IC und keine falsch-reaktiven oder falsch-nicht-reaktiven Ergebnisse für HCV, HBV oder HIV.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass keine Kreuzreaktivität zwischen HCV, HBV und HIV vorliegt.

8.3.3 Endogene Interferenzen

Um den Einfluss von Hämolyse und erhöhtem Bilirubin-, Albumin- und Triglyceridgehalt auf *PoET Multiscreen* zu beurteilen, wurden Plasmaproben mit der jeweiligen endogenen Substanz in verschiedenen Konzentrationen bis hin zu abnorm hohen Werten versetzt. Die Testung erfolgte mit CPD-Plasma.

Endogene Substanz	Konzentration	Beobachtung
Bilirubin	≤ 50 mg/L	Keine Beeinflussung
Hämoglobin	≤ 2000 mg/L	Keine Beeinflussung
Triglyceride	≤ 40 g/L	Keine Beeinflussung
Albumin	≤ 60 g/L	Keine Beeinflussung
	> 60 g/L	Zuverlässiges Testergebnis nicht sicher gestellt

Die getesteten endogenen potenziellen Störstoffe (Bilirubin, Hämoglobin, Triglyceride) haben in der Testkonzentration keine falsch-nicht-reaktiven oder falsch-reaktiven Ergebnisse in CPD-Plasma gezeigt. Eine Beeinflussung der Testergebnisse wurde nicht beobachtet. Albumin in hohen Konzentrationen > 60 g/L in CPD-Plasma kann störend wirken. Der Referenzbereich liegt bei gesunden Personen der Altersgruppe von 20 bis 60 Jahren zwischen 30-50 g/L (30). Derartig hohe Albumin-Konzentrationen können zu invaliden bzw. vereinzelt zu falsch-nicht-reaktiven Ergebnissen führen.

Zusätzlich wurde Albumin als endogener potenzieller Störstoff in EDTA-Plasma getestet, da Albumin in den zu testenden Blutspendeproben den größten Einfluss auf die Ergebnisse ausüben kann.

Endogene Substanz	Konzentration	Beobachtung
Albumin	≤ 120 g/L	Keine Beeinflussung

Albumin hat in EDTA-Plasma keine falsch-nicht-reaktiven oder falsch-reaktiven Ergebnisse mit *PoET Multiscreen* gezeigt. Es ist keine Beeinflussung der Testergebnisse aufgetreten.

8.3.4 Exogene Interferenzen

Die Tests zur Beurteilung des Einflusses exogener Substanzen (vor der Blutspende eingenommene Medikamente) wurden auf der Grundlage der Angaben in der Richtlinie „EP7A2 Interference Testing in Clinical Chemistry“ durchgeführt (31). Die Auswahl der Medikamente und deren Konzentrationen wurden aus dieser Richtlinie abgeleitet. Diese Validierungstests wurden mit CPD-Plasma durchgeführt.

Exogene Substanz	Wirkung	Konzentration	Beobachtung
Ascorbinsäure	Antioxidans	60 µg/mL	Keine Beeinflussung
Acetaminophen / Paracetamol	Schmerzmittel	200 µg/mL	Keine Beeinflussung
Aspirin	Schmerzmittel	652 µg/mL	Keine Beeinflussung
Ibuprofen	Schmerzmittel	500 µg/mL	Keine Beeinflussung
Naproxen	Schmerzmittel	500 µg/mL	Keine Beeinflussung
Phenylephrin HCl	Abschwellend	82 µg/mL	Keine Beeinflussung
Atrovastatin	Statin	335 µg/mL	Keine Beeinflussung
Loratadin	Antihistamin	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 untersuchten exogenen Störstoffe haben weder für HCV, HBV, HIV-1 oder HIV-2-negative noch für HCV, HBV, HIV-1 oder HIV-2-positive Proben einen Einfluss auf die Analyseergebnisse mit *PoET Multiscreen* gezeigt.

8.4 Fehlerrate des Gesamtsystems

Die Bestimmung der Fehlerrate des Gesamtsystems (kurz „Ausfallrate“), die zu falsch-nicht-reaktiven Ergebnissen (in Prozent nicht-reaktiver Proben) des PCR-Kits *PoET Multiscreen* führt, wurde durch die Untersuchung von je 288 Proben von HCV, HBV, HIV-1 und HIV-2 durchgeführt. Für diesen Test wurde negatives EDTA-Plasma mit HCV, HBV, HIV-1 oder HIV-2 in 3-facher 95 % NWG versetzt.

Alle untersuchten validen Proben der verschiedenen Virus-Parameter waren reaktiv. Es wurde eine Wiederholbarkeit von 100 % erreicht, die Ausfallrate lag bei 0 %.

8.5 Klinische Leistungsparameter

8.5.1 Serokonversionspanels

Es wurden je zehn im Handel erhältliche Serokonversionspanels für die Parameter HCV und HIV-1 sowie neun Panels für HBV getestet. Für HIV-2 sind keine Serokonversionspanels verfügbar. Ziel war der Nachweis, dass *PoET Multiscreen* Proben als reaktiv ermittelt, die sich in der Phase vor der Serokonversion befinden. Der Abgleich mit den Testergebnissen der Nachweise auf pathogen-spezifische Antikörper erfolgte mit den in den Panel-Unterlagen benannten Vergleichstests.

Bei allen getesteten Serokonversionspanels konnte, im zeitlichen Verlauf der Proben eines Panels, eine Detektion von reaktiven Proben mit *PoET Multiscreen* noch vor den reaktiven Ergebnissen der Antikörper-Tests festgestellt werden. *PoET Multiscreen* kann als NAT-basierter Test eine Infektion bereits vor eintretender Serokonversion nachweisen.

Parallel zur Testung mit dem PCR-Kit *PoET Multiscreen* wurden zusätzlich Daten mit CE-markierten NAT-Referenztests erhoben. Beide Datensets wurden verglichen und bewertet. Die Übereinstimmung

der Ergebnisse der NAT-Tests liegt bei 95 %. Mit *PoET Multiscreen* konnten mehr Proben erfolgreich detektiert werden als mit den NAT-Referenztests.

8.5.2 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität wurde anhand verfügbarer Spenderproben (Proben, die im NAT-Referenztest positiv waren) sowie anhand negativer Einzelspenden, die zur Simulation positiver Einzelspenden mit Viren versetzt wurden, ermittelt.

Proben aus den Serokonversionspanels wurden ebenfalls als positive Spenderproben betrachtet, solange der Referenztest auch ein reaktives Ergebnis ausgewiesen hat.

Virus-Parameter	Anzahl getesteter Proben	Anzahl reaktiver Proben	Diagnostische Sensitivität
HCV	153	152	99,3 %
HBV	111	111	100 %
HIV-1	168	166	98,8 %
HIV-2	14	14	100 %
Gesamt	446	443	99,3 %

Bei insgesamt 446 untersuchten Proben wurde eine durchschnittliche diagnostische Sensitivität von 99,3 % erreicht. Für HBV und HIV-2 beträgt die diagnostische Sensitivität 100 %. Bei HIV-1 wurde sie mit 98,8 % und bei HCV mit 99,3 % bestimmt. *PoET Multiscreen* entspricht damit dem Stand der Technik und kann die genannten Viren zuverlässig nachweisen.

8.5.3 Diagnostische Spezifität

Um die diagnostische Spezifität des PCR-Kits *PoET Multiscreen* zu bestimmen, wurden HCV, HBV, HIV-1 oder HIV-2-negative Proben anhand einzelner EDTA- und CPD-Plasmaspenden untersucht.

Plasma	Anzahl valider nicht-reaktiver Proben	Anzahl falsch-reaktiver Proben	Spezifität
EDTA (mit und ohne Gelbarriere)	668	0	100 %
CPD	96	0	100 %

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

9 Überblick Reagenzien und Material

Reagenzien	Hersteller	Katalognummer	Lagerung
<i>PoET Multiscreen</i>	GFE	P2M-28-30	≤ -18 °C
<i>PoET Universal Positive Control</i>	GFE	P3M-360-60	≤ -18 °C
<i>PoET Extraction</i>	GFE	P1A-24-04	+2 °C bis +8 °C
<i>PoET Prep Reagent</i>	GFE	P1B-24-20	+2 °C bis +25 °C
<i>PoET Internal Control</i>	GFE	P1C-1440-60	≤ -18 °C
<i>PoET Negative Control</i>	GFE	P3A-500-30	≤ -18 °C

Material	Hersteller	Katalognummer
<i>PoET Instrument inkl. Calliope Software</i>	GFE	P9A
<i>1000 µL CO-RE II Tips</i>	Hamilton Bonaduz AG	235905
<i>300 µL CO-RE II Tips</i>	Hamilton Bonaduz AG	235903
<i>Extraction Plate Set</i>	GFE	43001-0730
<i>PCR Plate</i>	Azenta Life Sciences	SP-0362
<i>13 mL Tube & Cap</i>	Sarstedt AG & Co.	60.541.004 & 65.714

PoET Instrument Benutzerhandbuch für weitere Informationen beachten. Alle Artikel werden von GFE geliefert.

10 Hersteller und Kundenservice



Gesellschaft zur Forschung, Entwicklung und Distribution von Diagnostika im Blutspendewesen mbH
Altenhöferallee 3, 60438 Frankfurt am Main, Germany
Telefon: +49 (0) 69 / 400 5513 0

Fragen zu PoET-Produkten und -Schulungen bitte an die lokale GFE-Vertretung richten:

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

10.1 Meldungen

Die zuständige Behörde vor Ort und die lokale GFE-Vertretung müssen informiert werden, wenn es bei der Verwendung dieses Produkts zu (mutmaßlich) schwerwiegenden Vorkommnissen kommt.

Unter dem folgenden Link ist eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung von *PoET Multiscreen* zu finden: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Bis zum vollen Funktionsumfang von EUDAMED bitte an die lokale GFE-Vertretung wenden.

11 Marken und Patente

- *PoET* und *Calliope* sind eingetragene Namen im Besitz von GFE.
- Die in den PCR-Kits enthaltene *SuperScript® III reverse transcriptase* ist ein Produkt hergestellt und lizenziert durch Life Technologies by Thermo Fisher Scientific.
- Während der Anwendung der PCR-Kits kommen die PCR-Platten (*PCR Plates*) "*FrameStar® 96 (cut corner A12) with barcode* [Artikelnummer SP0362] 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 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.

12 Referenzen

1. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare Virologie [Internet] Verfügbar unter: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-8274-2241-5>
2. HCV Taxon Details | ICTV [Internet]. Verfügbar unter: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203127&taxon_name=Hepacivirus%20hominis
3. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, u. a. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* Baltim Md. Januar 2015;61(1):77–87. doi:10.1002/hep.27259 PubMed PMID: 25069599; PubMed Central PMCID: PMC4303918.
4. NCBI. Taxonomy browser (Hepacivirus hominis) [Internet] Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=3052230&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
5. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, u. a. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 20. Oktober 2018;218(11):1722–9. doi:10.1093/infdis/jiy401 PubMed PMID: 29982508.
6. Roth WK. History and Future of Nucleic Acid Amplification Technology Blood Donor Testing. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. April 2019;46(2):67–75. doi:10.1159/000496749 PubMed PMID: 31191192; PubMed Central PMCID: PMC6514489.
7. Glebe D, Goldmann N, Lauber C, Seitz S. HBV evolution and genetic variability: Impact on prevention, treatment and development of antivirals. *Antiviral Res*. Februar 2021;186:104973. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104973 PubMed PMID: 33166575.
8. Locarnini SA, Littlejohn M, Yuen LKW. Origins and Evolution of the Primate Hepatitis B Virus. *Front Microbiol*. 2021;12:653684. doi:10.3389/fmicb.2021.653684 PubMed PMID: 34108947; PubMed Central PMCID: PMC8180572.
9. McNaughton AL, D'Arienzo V, Ansari MA, Lumley SF, Littlejohn M, Revill P, u. a. Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood. *Gastroenterology*. Januar 2019;156(2):384–99. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.058 PubMed PMID: 30268787; PubMed Central PMCID: PMC6347571.

10. Günther S, Sommer G, Iwanska A, Will H. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology*. 24. November 1997;238(2):363–71. doi:10.1006/viro.1997.8863 PubMed PMID: 9400609.
11. Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, Homs M. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: mass sequencing approach. *World J Gastroenterol*. 7. November 2013;19(41):6995–7023. doi:10.3748/wjg.v19.i41.6995 PubMed PMID: 24222943; PubMed Central PMCID: PMC3819535.
12. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*. 2014;57(3–4):141–50. doi:10.1159/000360947 PubMed PMID: 25034481.
13. Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, u. a. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. Juni 2013;16:355–61. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.021 PubMed PMID: 23538336.
14. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaei S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*. 21. Juni 2014;20(23):7152–68. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7152 PubMed PMID: 24966586; PubMed Central PMCID: PMC4064061.
15. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, u. a. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. Oktober 2009;83(20):10538–47. doi:10.1128/JVI.00462-09 PubMed PMID: 19640977; PubMed Central PMCID: PMC2753143.
16. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 14. Mai 2014;20(18):5427–34. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427 PubMed PMID: 24833873; PubMed Central PMCID: PMC4017058.
17. RKI. Hepatitis B und D RKI Ratgeber [Internet]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html
18. Robert Koch Institut. HIV-Infektion/AIDS - RKI-Ratgeber [Internet]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html
19. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. September 2011;1(1):a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841 PubMed PMID: 22229120; PubMed Central PMCID: PMC3234451.
20. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2024 [Internet: <https://edoc.rki.de/handle/176904/13608>]. doi:10.25646/13601
21. Visseaux B, Bertine M, Le Hingrat Q, Ferré V, Charpentier C, Collin F, u. a. HIV-2 diversity displays two clades within group A with distinct geographical distribution and evolution. *Virus Evol*. Januar 2021;7(1):1. doi:10.1093/ve/veab024 PubMed PMID: 34422316; PubMed Central PMCID: PMC8377049.
22. Kitawi R, Ledger S, Kelleher AD, Ahlenstiel CL. Advances in HIV Gene Therapy. *Int J Mol Sci*. 28. Februar 2024;25(5):2771. doi:10.3390/ijms25052771 PubMed PMID: 38474018; PubMed Central PMCID: PMC10931721.

23. 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 (Paris). November 2009;49(11):2454–89. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02322.x PubMed PMID: 19682345.
24. Faddy HM, Osiowy C, Custer B, Busch M, Stramer SL, Adesina O, u. a. International review of blood donation nucleic acid amplification testing. Vox Sang. 2024;119(4):315–25. doi:10.1111/vox.13592
25. Rutala WA. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. US Dep Health Hum Serv Cent Dis Control Prev. 2008.
26. Wilson D, Chosewood L. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories—6th Edition. US Dep Health Hum Serv Public Health Serv Cent Dis Control Prev Natl Inst Health. Juni 2020.
27. Callihan D. Clinical & Laboratory Standards Institute [Internet]. [zitiert 27. Februar 2024]. M29A4: Protecting Lab Workers from Workplace Infections. Verfügbar unter: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29/>
28. 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. September 2011;176(1–2):1–8. doi:10.1016/j.jviromet.2011.05.012 PubMed PMID: 21645549; PubMed Central PMCID: PMC3143304.
29. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, u. a. HIV-1 nomenclature proposal. Science. 7. April 2000;288(5463):55–6. doi:10.1126/science.288.5463.55d PubMed PMID: 10766634.
30. Meyer A von, Pick KH, Hallbach J. Nachevaluierung des Referenzbereiches für Albumin im Serum/Plasma mit Farbstoffbindungsmethoden (Bromkresolgrün und Bromkresolpurpur) / Update of reference values for albumin in serum/plasma with bromcresol green or bromcresol purple methods. LaboratoriumsMedizin. 1. Mai 2010;34(3):155–7. doi:10.1515/jlm.2010.030
31. McEnroe R. Clinical & Laboratory Standards Institute [Internet]. 2021. CLSI EP07 Interference Testing in Clinical Chemistry, 3rd Edition. Verfügbar unter: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep07/>

13 Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von GFE-Produkten verwendet:

 LOT	Chargenbezeichnung	 SN	Seriennummer
 REF	Katalognummer	 UDI	Einmalige Produktidentifizierung
	GFE-Logo		Hersteller
 YYYY-MM	Verwendbar bis (Jahr-Monat)		Herstellungsdatum
 +X°C	Temperaturgrenzwerte	 -X°C	Oberer Temperaturgrenzwert
 Σ n	Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen (n = Gesamtanzahl IVD Prüfungen)		Achtung Hinweis auf sicherheitsrelevante Informationen wie Warnungen oder Vorsichtsmaßnahmen
	Vor Sonnenlicht schützen		Nicht wiederverwenden
 IVD	In-vitro-Diagnostikum	 www.gfeblut.de	Gebrauchsanweisung beachten (Hinweis auf eIFU)
	Dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für in-vitro-Diagnostika.	 0123	CE-Kennzeichnung und Identifikationsnummer der Benannten Stelle (0123)

14 Änderungshistorie

Version	Dokumentnummer	Datum [YYYY-MM-DD]	Hinweise
1	IFU-0029	2025-07-03	Neuerstellung Dokumentvorlage: FB-0119 V04
2	IFU-0029	2025-12-17	- Fehlerkorrektur Artikelnummer <i>Extraction Plate Set</i> - Verallgemeinerung Schlagworte für Benutzerhandbuch <i>PoET Instrument</i> Dokumentvorlage: FB-0119 V04
3	IFU-0029	2026-06-30	- Aktualisierung Kap. 2.1 Erregerinformation - Kap. 8.2.3 Genotypenpanel überarbeitet inkl. Aktualisierung der Subtypen für HIV-1, Aufnahme Übersichtstabelle - redaktionelle Änderungen Dokumentvorlage: FB-0119 V04