



PoET CMV

Qualitativer Nukleinsäure Test
zur Verwendung mit *PoET Instrument*

In-vitro-Diagnostikum

REF P2G-28-30

IVD C€ 0123

Inhaltsverzeichnis

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

8.3	Analytische Spezifität	20
8.3.1	Experimentelles Design	20
8.3.2	Kreuzreagierende Substanzen und klinische Zustände	20
8.3.3	Endogene Interferenzen	21
8.3.4	Exogene Interferenzen	22
8.4	Gesamtsystem Ausfallrate	22
8.5	Klinische Leistungsparameter	22
8.5.1	Diagnostische Sensitivität	22
8.5.2	Diagnostische Spezifität	23
9	Überblick über Reagenzien und Material	23
10	Hersteller und Kundendienst	24
10.1	Meldungen	24
11	Marken und Patente	24
12	Referenzen	24
13	Symbole	26
14	Änderungshistorie	26

1 Zweckbestimmung

1.1 Verwendungszweck

PoET CMV ist ein PCR-Kit für den professionellen Gebrauch zur automatisierten *In-vitro*-Untersuchung von humanen Plasmaproben von Blutspendern. Mit *PoET CMV* erfolgt der qualitative Nachweis der DNA von Humanes Cytomegalovirus (CMV) mittels Real-Time PCR zum Screening von individuellen Proben oder Pools aus Aliquots individueller Proben. Darüber hinaus ist *PoET CMV* für die Bestätigung der Ergebnisse von im Screening getesteten Proben vorgesehen.

Die Prozessierung von *PoET CMV* 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

Das humane Cytomegalovirus (HCMV, CMV oder HHV-5) gehört zur Familie der Herpesviridae und zur Unterfamilie der Beta-Herpesviridae. Weitere sieben bekannte Viren, wie z. B. Herpes Simplex, gehören zur gleichen Unterfamilie (1).

Der Name des Virus leitet sich von seiner Fähigkeit ab, infizierte Zellen zu vergrößern (Zytomegalie). Sein Genom ist in ein Kapsid eingebettet. Außerdem befindet sich zwischen dem Kapsid und der Virus-hülle eine Proteinschicht namens Tegument (2). Das Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA (236 kbp). Für CMV ist nur ein Serotyp oder Genotyp bekannt, dessen Genom sich bei verschiedenen Virusisolaten unterscheidet. Acht virale Glykoproteine werden zur Unterscheidung zwischen den Isolaten verwendet (3), die phylogenetisch gesehen keine unterschiedlichen Genotypen darstellen.

CMV wird über Körperflüssigkeiten (z. B. Speichel, Urin und Genitalsekrete) übertragen. Die Übertragung durch Blut, Transplantate und Muttermilch ist von besonderer Bedeutung. Muttermilch spielt eine wesentliche Rolle als Reservoir der Viren und ist eine Grundlage der natürlichen Epidemiologie von CMV (4). CMV ist weltweit verbreitet und seine endemische Verbreitung schwankt zwischen 50 % und fast 100 %.

Die Inkubationszeit des Virus beträgt etwa vier bis sechs Wochen. Symptome treten bei immunkompetenten Personen selten auf und äußern sich vorwiegend in unspezifischen Symptomen wie Schnupfen und Husten. Schwerere Verläufe werden bei immuninkompetenten oder immunsupprimierten Personen beobachtet, insbesondere bei Transplantatempfängern, Neugeborenen oder HIV-Infizierten. Während bei Neugeborenen Wachstums- und Nervenstörungen auftreten, äußert sich die Infektion bei AIDS-Patienten häufig als Fieber, Kolitis, Retinitis oder tödliche Lungenentzündung. Das Virus gilt als plazentagängig und stellt eine Gefahr für das ungeborene Kind dar, wenn die Mutter infiziert ist. Es ist der häufigste virale Erreger von Embryo- und Fetopathien (5). Derzeit gibt es keine Impfung gegen CMV, aber es ist möglich in schweren Fällen virostatika Medikamente zu verabreichen. Wie alle Herpesviren geht auch CMV in eine latente Phase über (6).

2.2 Nutzen von NAT Tests

CMV kann durch die Transfusion von Blut und Blutprodukten übertragen werden. Diese durch Transfusionen übertragenen CMV-Infektionen (TT-CMV) sind selten, können aber Komplikationen verursachen, wenn die Empfänger immunsupprimiert oder immuninkompetent sind. Um das Risiko einer TT-CMV-Infektion für diese Patientengruppe zu minimieren, wird häufig empfohlen, nur CMV-getestete Blutprodukte für Transfusionen zu verwenden.

Die weltweite Seroprävalenz von CMV bei Blutspendern ist hoch (83,16 % CMV IgG) (7). In einer Seroprävalenzstudie, die mit deutschen Blutspendern durchgeführt wurde, wurden Antikörper bei etwa 30 % der jungen Erwachsenen und bei 70 % der über 50-Jährigen nachgewiesen (8).

Zum Schutz von Hochrisikoempfängern vor TT-CMV ist es sinnvoll, die Blutkonserven mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT) zu testen, um schwere Verläufe zu verhindern (2) (5).

2.3 Testprinzip

Das PCR-Kit *PoET CMV* besteht aus einer Real-Time PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis von CMV-spezifischer DNA in humanen Blutplasma-proben. *PoET CMV* amplifiziert drei verschiedene Zielsequenzen des CMV-Genoms. Die Zielsequenzen befinden sich in den gut konservierten Regionen der UL83-, UL123- und US9-Gene.

Alle PoET PCR-Kits enthalten zusätzlich zu den virusspezifischen Oligonukleotiden ein zweites heterologes, nicht-kompetitives Amplifikationssystem zur Amplifikation der internen Kontrollsequenz (*PoET Internal Control*, „IC“, separat erhältlich). Die IC wird jeder Probe zu Beginn der Probenvorbereitung zugesetzt.

3 PoET System Überblick

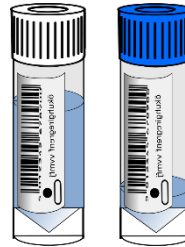
Das PoET System ist eine vollautomatisierte Lösung für die Extraktion, Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren von Infektionserregern in humanen Plasmaproben für Anwendungen im IVD-Hochdurchsatzscreening oder dem Nachweis aus einzelnen Proben. Das PoET System besteht aus einer Reihe an unterschiedlichen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

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

4 Reagenzien

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

PoET CMV	
GFE Katalognummer	P2G-28-30
Basis UDI-DI	42623533720LZ
Anzahl Reaktionen pro Kit	840



Kit Komponente	Name	Primärverpackung	Inhaltsstoffe	Menge pro Kit
<i>enzyme mix</i>	EM v1	Röhrchen mit Schraubdeckel (weiß)	H ₂ O, < 1 % Master Mix mit dUTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP und Taq Polymerase, < 0.001 % Uracil-N-glycosylase, < 0.002 % MMLV Reverse Transcriptase, < 0.01 % RNase Inhibitor	30 x 1130 µL
<i>oligo mix CMV</i>	O_CM v1	Röhrchen mit Schraubdeckel (blau)	Tris Puffer, < 0.3 % forward und reverse CMV und IC Primer, < 0.1 % CMV Sonden mit Fluoreszenzfarbstoff, < 0.05 % IC Sonden mit Fluoreszenzfarbstoff	30 x 148 µL

4.1 Lagerung und Handhabung der Reagenzien

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



Die Reagenzien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Nach Gebrauch 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 muss die Analyse auf dem *PoET Instrument* gestartet werden. Bei geöffneten Reagenzien, die mehrere Stunden gelagert wurden, ist die Funktionalität nicht mehr gewährleistet.



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

4.2 Zusätzlich benötigte Materialien

Diese Reagenzien und Verbrauchsartikel zur Verwendung auf *PoET Instrument* sind separat bei GFE erhältlich:

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 CMV Positive Control</i>	P3G-180-30
<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 Verbrauchsartikel auf *PoET Instrument* ist nicht zulässig.

4.3 Benötigte Geräte und Software

Material	Katalognummer
<i>PoET Instrument inkl. Calliope Software</i>	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 Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Alle Arbeitsflächen gemäß der „Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities“ (9) 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“ (10) und CLSI-Dokument M29A4 (11) 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 müssen zwischen der Handhabung von Proben, Kontrollen und Reagenzien gewechselt werden. 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 und Kontrollen werden auf Trockeneis versandt. Für die sichere Handhabung und Entsorgung sind die lokalen Anweisungen und Richtlinien zu beachten.
- Das/die Produkt(e) nach Erhalt überprüfen (d. h. gefrorener Zustand der PCR-Kits und Kontrollen, Unversehrtheit der Verpackung, Vollständigkeit). Wenn es Anzeichen für aufgetaute Reagenzien oder Beschädigungen gibt, dürfen diese Produkte nicht für den Test 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 dürfen nicht wiederverwendet werden.

- Verschiedene Chargen der gleichen Reagenzien nicht kombinieren.
- Reagenzien nicht mehr verwenden, nachdem ihre Haltbarkeit abgelaufen ist.
- Extraktionsreagenzien enthalten gefährliche Stoffe. Entsprechend dem Sicherheitsdatenblatt und Kapitel 7.13 dieser Gebrauchsanweisung sicher lagern, handhaben und entsorgen.

6 Prozessablauf

Der Prozess auf *PoET Instrument* besteht aus folgenden Schritten:

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

6.1 Probenvorbereitung

Das verwendete Probenmaterial ist Humanplasma (EDTA oder CPD).

Die Proben können als Einzelspenderproben oder als gepoolte Proben, bestehend aus Aliquots von Einzelspenden, bereitgestellt werden.

PoET Instrument bietet die Möglichkeit, Pools aus 6 Einzelspenden zu erstellen. Weitere Informationen zu den möglichen Probenformaten und Pooling-Optionen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Kapitel 6) zu finden.

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

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 einem universellen *enzyme mix* (EM) und einem spezifischen *oligo mix* (OM). Der OM enthält virusspezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden), die an hoch konservierte Regionen der viralen Nukleinsäuren binden. Darüber hinaus enthält der OM ein zweites heterologes, nicht-kompetitives Amplifikationssystem mit Primern und Sonden zur Amplifikation der internen Kontrollsequenz (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 eliminiert. 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 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 *enzyme mix* (EM) enthalten ist. In der PCR-Reaktion werden dann die cDNA-Kopien der IC und die DNA des Zielvirus parallel amplifiziert.

Das Reaktionsgemisch wird 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 gespalten.

In jedem Zyklus entstehen neue doppelsträngige DNA-Moleküle („Amplifikate“). Die PCR-Reaktion wird über 50 Zyklen durchgeführt. Ab dem sechsten PCR-Zyklus wird bei jedem Zyklus eine Fluoreszenzlichtmessung durchgeführt.

Sonden fügen eine zusätzliche Ebene der Spezifität 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, werden die Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff („Reporter“) am 5'-Ende und mit einem Quencher am 3'-Ende gekoppelt. Aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zum Quencher wird das Fluoreszenzsignal durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) stark gedämpft. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung durch eine externe Lichtquelle keine Fluoreszenz emittiert.

Während der Elongation wird der Reporterfarbstoff freigesetzt 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 zwei verschiedenen Fluoreszenzkanälen nachgewiesen werden.

6.4 Auswertung und Bericht

Nach dem PCR-Lauf auf dem *PoET Instrument* erfolgt die Analyse und Auswertung vollautomatisch mit der *Calliope* Software. 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 die PoET-Produktlinie wurde menschliches EDTA- und CPD-Plasma von lebenden Patienten als Probentyp verwendet. Alle leistungsbezogenen Informationen basieren auf diesem Material, das daher für die Verwendung mit dem *PoET Instrument* empfohlen wird.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann (12).



Alle Proben sind als potentiell infektiös zu behandeln.

7.3 Probennahme und Präanalytik

7.3.1 EDTA-Plasma

- Die Blutabnahme ist mit handelsüblichen EDTA-K2-Blutentnahmesystemen mit Gel-Barriere (z.B. Sarstedt oder Becton Dickinson) entsprechend den Herstellerangaben durchzuführen.
- Die Vollblutproben in den EDTA-K2-Blutentnahmeröhrchen mit Gelbarriere 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 zu finden (Kapitel 6).



Die Primärröhrchen müssen ausreichend gefüllt sein. Es ist darauf zu achten, dass keine Gelkomponenten oder Blutzellen das Plasma verunreinigen. Andernfalls kann dies zu einer Beeinträchtigung der Testleistung führen.

7.3.2 CPD-Plasma

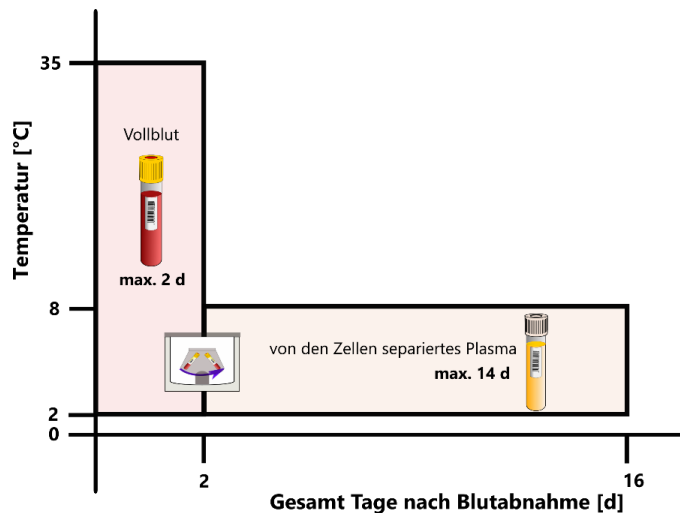
- Die Probenentnahme und die Herstellung von CPD-Plasma erfolgt mit Blutbeutelssystemen (z.B. Fresenius-Kabi oder Maco Pharma) gemäß den Anweisungen des Herstellers des Probenentnahmebeutels.
- Je nach Testmethode benötigt *PoET Instrument* ein Volumen von bis zu 1,5 mL pro Probe. Weitere Informationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden (Kapitel 6).

7.4 Probentransport

Die Transportdauer und -bedingungen müssen den Lagerbedingungen entsprechen (siehe nächstes Kapitel).

7.5 Probenlagerung

7.5.1 EDTA-Plasma



- Die Proben können transportiert und bis zur Trennung 48 Stunden lang bei +2 °C bis +35 °C gelagert werden.
- Nach der Trennung von den Zellen kann EDTA-Plasma in Primär- oder Sekundärröhrchen bei +2 °C bis +8 °C bis zu 14 Tage aufbewahrt werden, ohne dass sich die CMV-Viruslast messbar verändert.
- Plasmaproben können für 60 Tage bei ≤ -18 °C eingefroren gelagert werden.
- Gefrorene Plasmaproben müssen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut werden, um Präzipitate zu vermeiden.
- Aufgetaute Plasmaproben müssen umgehend nach Entnahme eines Aliquots zur Testung wieder eingefroren werden.
- Nicht mehr als drei Einfrier-/Auftauzyklen anwenden.



Die Testleistung kann durch eine zu lange Lagerung des EDTA-Plasmas beeinträchtigt werden.

Vollblutproben dürfen nicht eingefroren werden.

7.5.2 CPD-Plasma

- Die gefrorenen CPD-Plasmabeutel können bei ≤ -30 °C gelagert werden, bis die angegebene Haltbarkeitsdauer des einzelnen Beutels erreicht ist.
- Gefrorene Plasmaproben müssen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut werden, um Präzipitate zu vermeiden.
- Aufgetaute Plasmaproben können nicht gelagert werden und müssen umgehend nach Entnahme eines Aliquots zur Testung aliquotiert und wieder eingefroren werden.



Die Testleistung kann durch eine zu lange Lagerung des CPD-Plasmas beeinträchtigt werden.

7.6 Durchführung der Testung auf *PoET Instrument*

Die Bedienung von *PoET Instrument* ist detailliert im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch beschrieben (Kapitel 7 und 8).

Im Folgenden ist der Testablauf zusammenfassend dargestellt:

Schritt	Aktion(en)
1	<i>PoET Instrument</i> und PC einschalten
2	Wartung gemäß Anweisung auf dem Bildschirm durchführen.
3	Lauf vorbereiten: • Prozess-Modus auswählen • Proben in das Gerät laden • Testanforderungen zuweisen (Testtypen und Testparameter) Reagenzien und Verbrauchsartikel laden
4	Lauf starten
5	Ergebnisse prüfen
6	Probenröhrchen entladen. Falls nötig, Röhrchen für die weitere Verwendung mit Deckeln verschließen. Verbrauchsartikel und Reagenzgefäße (Röhrchen und Rechteckbecher) entladen und Abfall entsorgen.

Je nach den gewählten Testparametern 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

Informationen über Primär- und Sekundärröhrchen, die auf dem Gerät verwendet werden können, sind in Kapitel 4.2 „Zusätzlich benötigte Materialien“ und im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden.

Im Kühlschrank gelagerte EDTA-Proben können direkt verwendet und analysiert werden. Gefrorene EDTA- und CPD-Proben müssen in einem Wasserbad bei +37 °C aufgetaut werden.

7.8 Weitere Vorbereitungen

- 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 auf das *PoET Instrument* geladen werden.
- *PoET Extraction* und *PoET Prep Reagent* können direkt verwendet werden.
- Vor der Verwendung jedes Reagenzröhrchen visuell überprüfen, um sicherzustellen, dass keine Undichtigkeit vorliegt. Bei Anzeichen von Undichtigkeit darf das Röhrchen nicht für den Test verwendet werden.
- 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 nicht über eine 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 zurückbleiben.
- 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 finden Sie im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch.
- Das Be- und Entladen der Reagenzienträger des *PoET Instrument* gemäß den Angaben im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Kapitel 7) durchführen.
- Verbrauchsartikel sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Sie dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Für die ordnungsgemäße Wartung des Geräts bitte das *PoET Instrument* Benutzerhandbuch lesen.

7.9 Berechnung der Ergebnisse

Die Auswertung der PCR-Rohdaten erfolgt mit der *Calliope* Software. Jede einzelne Amplifikationskurve wird mit dem firmeneigenen Algorithmus von GFE analysiert (bewertet), und reaktiven Kurven werden „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 Zyklen geteilt durch den niedrigsten Fluoreszenzwert der ersten Zyklen. Er stellt die Signalstärke der einzelnen Kurve dar.

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 CMV Positive Control</i>	PCs werden als separate Reaktionen angesetzt. Die PCR-Positivkontrolle enthält synthetische Nukleinsäuren von CMV. Sie dient dem Beleg, dass die an der Amplifikationsreaktion von CMV beteiligten Reagenzien funktional sind.
PCR-Negativkontrolle (NC)	<i>PoET Negative Control</i>	NCs 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 (NCs)

PoET Negative Control besteht aus einer wässrigen Pufferlösung und wird als separate Reaktion angesetzt. Sie dient als PCR-Negativkontrolle dem Beleg, dass die an der Amplifikationsreaktion beteiligten Reagenzien nicht mit den jeweils nachzuweisenden Nukleinsäuren kontaminiert sind.

NC-Ergebnisse müssen „not reactive“ für das Zielvirus und die IC sein.

Wenn mehr als eine NC-Reaktion für das Zielvirus auf einer PCR-Platte vorhanden ist, darf nur eine NC reaktiv für das Zielvirus oder die IC sein.

Fall	NC-Ergebnis für Zielvirus und IC	Bewertung
1	Alle NC auf derselben PCR-Platte sind nicht reaktiv.	NC-Gesamtergebnis ist valide
2	Nur wenn > eine NC pro Zielvirus auf derselben PCR-Platte ist: Eine NC ist reaktiv.	NC-Gesamtergebnis ist valide
3	≥ Zwei oder alle NC auf einer PCR-Platte sind reaktiv.	NC-Gesamtergebnis ist invalide

Im Falle eines invaliden NC-Gesamtergebnisses wird der PoET-Lauf automatisch als ungültig für die entsprechende Probenreihe bewertet.

7.10.2 Validierung der PCR-Positivkontrollen (PCs)

PCR-Positivkontrollen werden als separate Reaktionen angesetzt. Sie dienen dem Beleg, dass die an der Amplifikationsreaktion der genannten Virusparameter beteiligten Reagenzien funktional sind.

PC-Ergebnisse müssen „reactive“ für das Zielvirus sein und die vorgegebenen Grenzwerte für PP und Q einhalten. Diese Grenzwerte sind in der *Calliope* Software hinterlegt.

Wenn mehr als eine PC-Reaktion für das Zielvirus auf einer PCR-Platte vorhanden ist, darf nur eine PC „not reactive“ für das Zielvirus sein oder den PP Grenzwert überschreiten oder den Q Grenzwert unterschreiten.

Fall	PC-Ergebnis für das Zielvirus	Bewertung
1	Alle PC auf derselben PCR-Platte sind reaktiv und innerhalb der PP und Q Grenzwerte.	PC-Gesamtergebnis ist valide
2	Nur wenn > eine PC pro Zielvirus auf derselben PCR-Platte ist: Eine PC ist nicht reaktiv oder außerhalb der PP / Q Grenzwerte.	PC-Gesamtergebnis ist valide
3	≥ Zwei oder alle PC auf einer PCR-Platte sind nicht reaktiv oder außerhalb der PP / Q Grenzwerte.	PC-Gesamtergebnis ist invalide

Im Falle eines invaliden PC-Gesamtergebnisses wird der PoET-Lauf automatisch als ungültig für die entsprechende Probenreihe bewertet.

7.10.3 Validierung der Internen Kontrolle (IC) und Ergebnisermittlung

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 gültig sind. Sind die Proben für das Zielvirus „not reactive“, müssen die IC-Ergebnisse reaktiv sein und die vorgegebenen Grenzwerte für PP und Q einhalten. Diese Grenzwerte werden in der *Calliope* Software gespeichert.

Ist die IC nicht reaktiv, überschreitet sie den Grenzwert für den PP-Wert oder bleibt sie unter dem Grenzwert für den Q-Wert, wird die entsprechende Probenposition auf der PCR-Platte als ungültig bewertet. Im Falle eines reaktiven Ergebnisses für das Zielvirus ist das Ergebnis der IC nicht relevant und kann reaktiv sein oder nicht.

Fall	IC	Bewertung
1	nicht reaktiv oder außerhalb der PP und/ oder Q Grenzwerte	IC Ergebnis ist invalide
2	reaktiv und innerhalb der PP und/ oder Q Grenzwerte	IC Ergebnis ist valide

7.11 Interpretation der Ergebnisse

Eine gültige Probenserie in einem einzelnen *PoET Instrument* Lauf kann sowohl valide als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Probenergebnisse sind nur valide, wenn die entsprechenden PCR-Kontrollen (PC, NC) der zugehörigen Probenserie valide sind und wenn keine Bearbeitungsfehler aufgetreten sind. Ungültige Probenergebnisse erfordern eine Testwiederholung.

Valide Probenergebnisse können entweder „reactive“ oder „not reactive“ sein:

Probenergebnis	Interpretation
Reactive	Zielvirus ist reaktiv und IC kann reaktiv sein oder nicht / die PP und Q Grenzwerte erfüllen oder nicht
Not reactive	Zielvirus ist nicht reaktiv und IC erfüllt die PP und Q Grenzwerte
Invalid	Zielvirus ist nicht reaktiv und IC nicht reaktiv oder erfüllt die PP und Q Grenzwerte nicht oder Ergebnis wurde wegen Bearbeitungsfehlern, z.B: Pipettierfehler oder ungültige Kontrollen auf invalide gesetzt.

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 (Kapitel 4 und 8) 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, nicht getestete Störsubstanzen und unsachgemäße Probenlagerung und -vorbereitung können die Stabilität der Viren und Nukleinsäuren negativ beeinflussen und die PCR-Ergebnisse beeinträchtigen.
- Blutproben, die aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen wurden, sowie Proben von heparinisierten Personen dürfen nicht verwendet werden, da Heparin die PCR beeinträchtigen kann.
- Bei CPD-Plasma Proben mit Albumin-Gehalten > 60 g/L sind zuverlässige Testergebnisse nicht gewährleistet.
- Präexpositionsprophylaxe-Präparate oder andere virostatistische 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

- *PoET Extraction lysis buffer* enthält Guanidiniumthiocyanat. Den Kontakt des Reagenzes mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Sollte es dennoch zu einem Kontakt kommen, sofort mit reichlich Wasser auswaschen. Der Lysepuffer darf nicht mit Natriumhypochloritlösung (Bleichmittel) in Berührung kommen. Diese Mischung kann ein hochgiftiges Gas erzeugen.
- Benutzte Extraktions- und PCR-Platten werden am Ende des Prozesses 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.

8 Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale von *PoET CMV* wurden unter Verwendung des „1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques; NIBSC code: 09/162“ erhoben.

8.1 Wichtigste Testmerkmale

Probentyp	EDTA oder CPD Plasma
Benötigtes Probenvolumen	200 – 1500 µL*
Prozessiertes Probenvolumen	40,5 – 1300 µL*
Nachweisgrenze	12,5 IU/mL
Spezifität	100 %
Testdauer	Je nach Testplan des PoET-Laufs liegen die Ergebnisse etwa 3,5 Stunden nach dem Laden der Probe in das Gerät vor.

* Abhängig von der benötigten Sensitivität für die Testung. Weitere Informationen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch zu finden oder beim lokalen GFE Vertreter zu erfragen.

8.2 Analytische Sensitivität

8.2.1 Nachweisgrenze (NWG)

Die Bestimmung der 95 %igen Nachweisgrenze (95 % NWG) für CMV mit dem PCR-Kit *PoET CMV* wurde mit einem Probenvolumen von 1,3 mL unter Verwendung von verdünnten Virusstandards in EDTA-Plasma 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.

Standard	CMV NIBSC code: 09/162
95 % NWG	12,5 IU/mL
Konfidenzintervall	9,3-19,0 IU/mL

Für CPD-Plasma wurde die Hitrage für die Viruskonzentration auf der Grundlage der 95 % NWG von EDTA-Plasma bestimmt. CPD-Plasma hat keinen negativen Einfluss auf die Sensitivität von *PoET CMV*.

8.2.2 NWG für kleinere Probenvolumen

Werden Proben mit einem Plasmavolumen < 1,3 mL im Test verwendet (z. B. bei Probenpools oder Einzelspenden mit geringerem Ausgangsvolumen), 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 CMV* wird entsprechend dem Verdünnungsfaktor reduziert.

Im Rahmen der Validierung des PCR-Kits *PoET CMV* wurde bestätigt, dass das Auffüllen mit SD anstelle von Plasma keinen Einfluss auf die NWG von *PoET CMV* hat. Weitere Informationen zum Probenauffüllvolumen sind im *PoET Instrument* Benutzerhandbuch (Kapitel 6) zu finden.

8.2.3 Serokonversionspanels

Drei im Handel erhältliche Serokonversionspanels für CMV entsprachen den Anforderungen der Gemeinsamen Spezifikationen (CS). Jedes Panel-Mitglied wurde in zwei verschiedenen Probenotypen getestet: a) 1:6 verdünnt mit EDTA-Plasma und b) 1:96 verdünnt mit EDTA-Plasma. Nach der Analyse mit dem PCR-Kit *PoET CMV* wurde ein Vergleich der Ergebnisse mit den Angaben in den Begleitdokumenten des Panels durchgeführt. Erwartungsgemäß werden mit dem PCR-Kit *PoET CMV* auch Proben als reaktiv bestimmt, die mit der in den jeweiligen Dokumenten genannten NAT-Testmethode (CE-IVD-gekennzeichnete Referenz-NAT für CMV) als reaktiv bestimmt wurden.

Nur für 1 der 3 CMV-Serokonversionspanels waren NAT-Referenzdaten verfügbar. Eine Probe innerhalb des Infektionsverlaufs wurde von *PoET CMV* in einer Verdünnung von 1:6 und 1:96 eindeutig nachgewiesen, während die Referenz-NAT ein nicht reaktives Ergebnis zeigte.

Für alle anderen Serokonversionspanels wurden in der Panelbeschreibung nur serologische Ergebnisse angegeben. Mit *PoET CMV* konnten jedoch einige Proben, die serologisch noch als CMV-negativ bewertet wurden, in jedem Panel bereits als CMV-reaktiv nachgewiesen werden. Umgekehrt ist zu beobachten, dass, sobald die serologischen Ergebnisse positiv sind und somit ein Rückgang der Viruslast zu erwarten ist, die Proben mit *PoET CMV* nicht mehr nachgewiesen werden können.

Basierend auf der begrenzten Verfügbarkeit von Serokonversionspanels liefert das PCR-Kit *PoET CMV* im Durchschnitt reaktive Ergebnisse ca. 5 Tage früher als der jeweilige serologische CMV-Referenztest, selbst bei Probenpools von ≥ 6 .

Die Prüfung der Serokonversionspanels weist somit auf die höhere Sensitivität der NAT-Techniken im Vergleich zu den serologischen Testmethoden hin (siehe Tabelle).

Panel	Abbott Architect	Abbott Architect	Roche cobas® TaqMan	<i>PoET CMV</i>	<i>PoET CMV</i>
	CMV IgM Test erster positiver Tag [#]	CMV IgG Test erster positiver Tag [#]	Referenz-NAT erster positiver Tag [#]	Probenpool ¹ (n=6) erster positiver Tag [#]	Probenpool ¹ (n=96) erster positiver Tag [#]
0615-0039 (SeraCare)	15	nv	15	7	15
SCP-CMV-002 (Biomex)	33	29	nv	26	26
SCP-CMV-005 (Biomex)	6	6	nv	0	0

nv: nicht verfügbar

Tag 0 entspricht dem Zeitpunkt der ersten Blutentnahme

¹ Der Test verwendete Probenverdünnungen, die einem Pool aus 6 oder 96 Spenden entsprechen.

8.2.4 Genotypenpanels

Die Prüfung der PCR-Inklusivität verschiedener Genotypen ist nicht anwendbar, da es bei CMV keine phylogenetisch unterschiedlichen Genotypen gibt.

8.3 Analytische Spezifität

8.3.1 Experimentelles Design

Der Einfluss von Störsubstanzen auf das PCR-Kit *PoET CMV* wurde anhand der Extraktion verschiedener Proben und des Nachweises von CMV untersucht. In einem Teil der Proben wurde CMV-negatives Plasma nur mit der jeweiligen Substanz versetzt. Ein anderer Teil der Proben wurde zusätzlich mit einem CMV-Virusstandard mit 2,5-facher 95 % NWG versetzt. Es wurden 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 auf das PCR-Kit *PoET CMV* untersucht. Zu diesem Zweck wurde negatives humanes EDTA-Plasma (NHP) mit Standards für die zu testenden Viren/Bakterien versetzt, extrahiert und amplifiziert. Zusätzlich wurde CMV-positives Plasma mit Standards für die zu testenden Viren/Bakterien versetzt und analysiert. Die CMV-positiven Proben wurden mit CMV in der 5-fachen 95 % NWG versetzt.

Testergebnisse für Kreuzreaktivität:

Spezies	Domäne	Nukleinsäure	Beobachtung
Hepatitis B Virus (HBV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis C Virus (HCV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis E Virus (HEV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Humanes Immundefizienz-Virus 2 (HIV-2)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Parvovirus B19 (B19V)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis A Virus (HAV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
West Nil Virus lineage 2 (WNV lineage 2)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Hepatitis D Virus (HDV)	Virus	RNA	Keine Beeinflussung
Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV1*)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV2*)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Human Herpesvirus 6B (HHV 6b*)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Human Herpesvirus 7 (HHV 7*)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Varizella Zoster Virus (VZV*)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Epstein-Barr Virus* (EBV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
BK Virus (BKV)	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Adenovirus	Virus	DNA	Keine Beeinflussung
Serratia marcescens	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung
Klebsiella pneumoniae	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung
Streptococcus pyogenes	Bakterium	DNA	Keine Beeinflussung

*) Herpesviridae

Bei den getesteten Viren und Bakterien konnte kein Einfluss auf die PCR-Leistung von *PoET CMV* festgestellt werden. Alle PCR-Reaktionen zeigten reaktive Ergebnisse für IC und keine falsch-reaktiven oder falsch-nicht-reaktiven Ergebnisse für CMV. Insbesondere wurde keine Kreuzreaktivität mit anderen Viren der Herpesviridae-Familie festgestellt.

8.3.3 Endogene Interferenzen

Um den Einfluss von Hämolyse und erhöhtem Bilirubin-, Albumin- und Triglyceridgehalt auf *PoET CMV* zu beurteilen, wurden Plasmaproben mit der jeweiligen endogenen Substanz in verschiedenen Konzentrationen bis hin zu abnorm hohen Werten versetzt. Diese Validierung wurde für EDTA- und CPD-Plasma durchgeführt.

Testergebnisse für endogene Substanzen mit EDTA-Plasma:

Endogene Substanz	Konzentration	Beobachtung
Bilirubin	≤ 50 mg/L	Keine Beeinflussung
Hämoglobin	≤ 2000 mg/L	Keine Beeinflussung
Triglyceride	≤ 40 g/L	Keine Beeinflussung
Albumin	≤ 120 g/L	Keine Beeinflussung

Die verschiedenen Konzentrationen der zugesetzten Störsubstanzen hatten keinen Einfluss auf die Detektion von positiven oder negativen Proben aus EDTA-Plasma mit *PoET CMV*.

Ergebnisse der Tests auf endogene Substanzen 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
	≥ 80 g/L	Beeinflussung beobachtet

Die verschiedenen Konzentrationen von Bilirubin, Hämoglobin und Triglyceriden hatten keinen Einfluss auf die Detektion von positiven oder negativen Proben aus CPD-Plasma mit *PoET CMV*.

Bei CPD-Plasma Proben mit Albumin-Konzentrationen bis zu 60 g/L ist keine Beeinflussung der Testergebnisse aufgetreten. Bei CPD-Plasma Proben mit Albumin-Konzentrationen > 60 g/L sind zuverlässige Testergebnisse nicht gewährleistet.

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“ (13) durchgeführt. Die Auswahl der Medikamente und deren Konzentrationen wurden aus dieser Richtlinie abgeleitet. Diese Validierungstests wurden nur mit EDTA-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 getesteten exogenen Substanzen zeigten in der jeweiligen Konzentration keine falsch-nicht-reaktiven oder falsch-reaktiven Ergebnisse.

8.4 Gesamtsystem Ausfallrate

Die Bestimmung der Systemausfallrate, die zu falschen nicht-reaktiven Ergebnissen (in Prozent nicht-reaktiver Proben) des Gesamtsystems (kurz „Ausfallrate“) des PCR-Kits *PoET CMV* führt, wurde durch die Untersuchung von 288 Proben auf CMV durchgeführt. Für diesen Test wurde negatives EDTA-Plasma mit CMV in dreifacher 95 % NWG versetzt.

Bei den 288 Analysen wurde kein Versagen beobachtet. Daraus ergibt sich eine Ausfallrate von 0 %.

8.5 Klinische Leistungsparameter

8.5.1 Diagnostische Sensitivität

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

Proben aus den Serokonversionspanels wurden ebenfalls als positive Spenderproben betrachtet und bei der Berechnung der Gesamtzahl der Proben berücksichtigt (1 Panel = 1 Spender).

Anzahl getesteter Proben	Anzahl reaktiver Proben	Diagnostische Sensitivität
128	128	100 %

Bei insgesamt 128 untersuchten Proben wurde eine diagnostische Sensitivität von 100 % erreicht. Alle Proben wurden mit *PoET CMV* zuverlässig nachgewiesen.

8.5.2 Diagnostische Spezifität

Um die diagnostische Spezifität des PCR-Kits *PoET CMV* zu bestimmen, wurden CMV-negative Proben anhand einzelner EDTA-Plasmaspenden aus Blutabnahmeröhrchen mit Gelbarriere untersucht.

Anzahl valider nicht reaktiver Proben	Anzahl falsch reaktiver Proben	Spezifität
938	0	100%

Unter den 938 gültigen Proben konnte keine falsch-reaktive Probe beobachtet werden. Somit kann für das PCR-Kit *PoET CMV* von einer Spezifität von 100 % ausgegangen werden, wenn EDTA-Plasma verwendet wird.

Die Spezifität von *PoET CMV* wurde zusätzlich anhand einzelner CMV-negativer CPD-Plasmaspenden untersucht.

Anzahl valider nicht reaktiver Proben	Anzahl falsch reaktiver Proben	Spezifität
47	0	100%

Unter den 47 gültigen Proben konnte keine falsch-reaktive Probe beobachtet werden. Somit kann für das PCR-Kit *PoET CMV* von einer Spezifität von 100 % ausgegangen werden, wenn CPD-Plasma verwendet wird.

9 Überblick über Reagenzien und Material

Material	Hersteller	Katalognummer	Lagerung
<i>PoET CMV</i>	GFE	P2G-28-30	≤ -18 °C
<i>PoET CMV Positive Control</i>	GFE	P3G-180-30	≤ -18 °C
<i>PoET Extraction</i>	GFE	P1A-24-04	+2 °C bis +8 °C, aufrecht
<i>PoET Prep Reagent</i>	GFE	P1B-24-20	+2 °C bis +25 °C, aufrecht
<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 Kundendienst



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

Altenhöferallee 3, 60438 Frankfurt/Main, Germany

Telefon: +49 (0) 69 / 400 5513 0

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

Fragen zu PoET-Produkten und -Schulungen bitte an den lokalen GFE-Vertreter richten:

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

10.1 Meldungen

Die zuständige Behörde vor Ort und GFE müssen informiert werden, wenn es bei der Verwendung dieses Produkts zu schwerwiegenden Vorkommnissen kommt.

Unter dem folgenden Link ist eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung zu finden: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Bis zum vollen Funktionsumfang von EUDAMED bitte an den lokalen GFE-Vertreter 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. Subfamily: Betaherpesvirinae - Herpesviridae - dsDNA Viruses - ICTV [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsDNA-viruses/w/herpesviridae/1616/subfamily-betaherpesvirinae
2. Humanes Cytomegalievirus (HCMV): Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl. 2018 Jan;61(1):116–28.
3. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, et al. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. J Virol. 2015 Aug 1;89(15):7673–95.
4. Götting J, Lazar K, Suárez NM, Steinbrück L, Rabe T, Goelz R, et al. Human Cytomegalovirus Genome Diversity in Longitudinally Collected Breast Milk Samples. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Apr 16;11:664247.
5. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. Molekulare Virologie [Internet]. 3rd ed. 2010 [cited 2022 Jul 5]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-8274-2241-5>

6. RKI - RKI-Ratgeber - Zytomegalievirus-Infektion [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html
7. Adane T, Getawa S. Cytomegalovirus seroprevalence among blood donors: a systematic review and meta-analysis. J Int Med Res. 2021 Aug;49(8):3000605211034656.
8. Newsdetail - 165 : Druckansicht [Internet]. [cited 2022 Jul 27]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/presse/pressemitteilungen/aktuellemitteilungen/newsdetail/article/test-auf-cytomegalievirus-genom-dna-bei-allen-blutspenden.html?type=98>
9. Rutala WA. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. 2008;163.
10. Wilson DE, Chosewood LC. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. :438.
11. Callihan DR, Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections: approved guideline. 2014.
12. 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 Sep;176(1–2):1–8.
13. McEnroe RJ, Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry: approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

13 Symbole

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

	Chargenbezeichnung		Seriennummer
	Katalognummer		Herstellungsdatum
	YYYY-MM Verwendbar bis (Jahr-Monat)		Einmalige Produktidentifizierung
	840 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen (n = Gesamtanzahl IVD Prüfungen)		GFE Logo
	-18°C Oberer Temperaturgrenzwert		Hersteller
	+ 2°C + 8°C Temperaturgrenzwerte		Vor Sonnenlicht schützen
	Gebrauchsanweisung beachten		In vitro-Diagnostikum
	Achtung Hinweis auf sicherheitsrelevante Informationen wie Warnungen oder Vorsichtsmaßnahmen		Dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für in-vitro-Diagnostika.
	Nicht wiederverwenden		Dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für in-vitro-Diagnostika und Identifikationsnummer der Benannten Stelle (0123)

14 Änderungshistorie

Version	Dokumentnummer	Datum [JJJJ-MM-TT]	Hinweise
1	IFU-0017	2023-03-09	Erstellung Dokumentvorlage: FB-0119 V01
2	IFU-0017	2026-01-15	- Fehlerkorrektur Artikelnummer <i>Extraction Plate Set</i> - Redaktionelle Änderungen Dokumentvorlage: FB-0119 V01