

VIRAL MENINGITIS REALTIME PCR KIT

REF RTPCR011-LPD Σ 48

CE Für die *In-vitro*-Diagnostik

ZWECKBESTIMMUNG

Echtzeit-RT-PCR-Kit zum Nachweis von Nukleinsäure aus Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2), Varizellen-Zoster (VZV), Enteroviren (EVs), humanen Parechoviren (HPeVs), West-Nil-Viren (WNV) und Toskana-Viren (TOSV) in menschlichen Zerebrospinalflüssigkeitsproben (CSF).

Bei diesem Test handelt es sich um einen automatischen, qualitativen Test zur Diagnosehilfe.

EINLEITUNG

Die Herpes-simplex-Viren 1 (HSV-1) und 2 (HSV-2) sind behüllte, ikosaedrische, doppelsträngige DNA-Viren mit einem Durchmesser von 120 bis 200 nm. Obwohl Primärfektionen mit den Herpes-simplex-Viren 1 und 2 asymptomatisch verlaufen, zeigt sich HSV-1 in Form von Läsionen an Mund, Lippen und Gesicht, und HSV-2 verursacht Herpes genitalis. Wiederholt auftretende Herpes-simplex-Infektionen sind häufig.

Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) ist ein behülltes, ikosaedrisches, doppelsträngiges DNA-Virus mit einem Durchmesser von 150 bis 200 nm. Varicella (die Primärfektion) tritt am häufigsten bei Kindern auf und ist durch ein generalisiertes Bläschenexanthem gekennzeichnet. Herpes zoster, der durch die Reaktivierung des latenten Varicella-Virus hervorgerufen wird, tritt bei Erwachsenen auf und besteht aus einer schmerzhaften Eruption vesikulärer Läsionen in Begleitung einer Entzündung der Nervenganglien.

Enteroviren (EVs) sind unbehüllte, ikosaedrische, positive Einzelstrang-RNA-Viren von kleiner Größe (25-30 nm). Sie sind für eine Vielzahl klinischer Erkrankungen verantwortlich, darunter aseptische Meningitis, Enzephalitis, Myokarditis und Perikarditis, Atemwegserkrankungen oder Hand-Fuß-Mund-Krankheit.

Humane Parechoviren (HPeVs) gehören zur Familie der *Picornaviridae*, die unbehüllte, ikosaedrische, positive Einzelstrang-RNA-Viren von kleiner Größe (30 nm) umfasst. Humane Parechoviren werden in 19 Subtypen unterteilt. Sie vermehren sich in den Atemwegen und im Magen-Darm-Trakt. Infektionen treten besonders bei kleinen Kindern auf, sind jedoch oft asymptomatisch. Sie können Atemwegsinfektionen und Durchfall verursachen. Sie wurden gelegentlich mit Infektionen des zentralen Nervensystems in Verbindung gebracht, die Meningitis hervorrufen.

Das Toskana-Virus (TOSV) gehört zur Gattung *Phlebovirus* und ist ein Arbovirus, das von Sandmücken übertragen wird. In der Mittelmeerregion ist TOSV die Hauptursache für Meningitis und Enzephalitis.

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein behülltes, polyedrisches, positives Einzelstrang-RNA-Virus mit einem Durchmesser von 40 bis 50 nm. Obwohl die meisten Infektionen asymptomatisch sind oder zu einer leichten Erkrankung führen, entwickeln einige Patienten schwere Erkrankungen, einschließlich Enzephalitis und aseptischer Meningitis.

PRÜFGRUNDSATZ

Basierend auf der Amplifikation spezifischer Nukleinsäurefragmente aus Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2), Varizellen-Zoster (VZV), Enteroviren (EVs), humanen Parechoviren (HPeVs), West-Nil-Viren (WNV) und Toskana-Viren (TOSV) durch Echtzeit-PCR in menschlichen Zerebrospinalflüssigkeitsproben (CSF).

Zwei lyophilisierte Mastermische (VIRCELL VME RT-PCR MIX A und VIRCELL VME RT-PCR MIX B) stehen für das Screening und zur Bestätigung zur Verfügung, wobei für jedes Virus ein unabhängiges Zielgen verwendet wird.

VIRCELL VME RT-PCR MIX A zielt auf ein spezifisches Fragment des Gens *US4* für HSV-1, des Gens *UL27* für HSV-2 und des *ORF29*-Gens für VZV ab, während VIRCELL VME RT-PCR MIX B auf ein spezifisches Fragment der 5'UTR für EVs und HPeVs, der 3'UTR für WNV und das *N*-Gen für TOSV abzielt.

Eine Amplifikationskontrolle ist enthalten, um die Abwesenheit eines Übertrags von Amplifikationsinhibitoren sowie den korrekten Amplifikationsablauf zu überprüfen. Diese Kontrolle besteht aus einem spezifischen Nukleinsäurefragment von Bakteriophage MS2 und einem spezifischen Oligopaar/Sonde zur Amplifikation.

Die Methode gliedert sich in 2 wesentliche Schritte: RNA-DNA-Extraktion und Amplifikation/Nachweis durch spezifische Oligopaare und Sonden. Im VIRCELL VME RT-PCR MIX A wird HSV-1-DNA im FAM-Kanal, HSV-2-DNA im HEX/VIC-Kanal und VZV-DNA im Texas Red/ROX-Kanal nachgewiesen, während im VIRCELL VME RT-PCR MIX B, EVs-RNA im FAM-Kanal, TOSV-RNA im HEX/VIC-Kanal, HPeVs-RNA im Texas Red/ROX-Kanal und WNV-RNA im Q705/Cy5.5-Kanal nachgewiesen wird. Die interne Kontrolle MS2 wird im Cy5-Kanal nachgewiesen.

EIGENSCHAFTEN DES KITS

VIRCELL RT-PCR MIX und VIRCELL POSITIVE CONTROL sind lyophilisiert. Sie müssen vor dem Gebrauch erst rekonstituiert werden (siehe „Produktvorbehandlung“). Die restlichen Reagenzien sind schon gebrauchsfertig. Dieser Kit basiert auf der reversen Transkription, Amplifikation und dem Nachweis durch Echtzeit-PCR.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

[1] VIRCELL VME RT-PCR MIX LPD: 1 Platte mit 96 Röhrcchen, teilbar in 12 Streifen mit 8 Röhrcchen. Jeder Streifen enthält 4 Röhrcchen mit VME RT-PCR MIX A, mit Taq-Polymerase, Puffer, spezifische Primer/Sonden für HSV-1 (*US4*-Gen), HSV-2 (*UL27*-Gen) und VZV (*ORF29*-Gen) und als interne Kontrolle Primer/Sonde für den Bakteriophagen MS2 und 4 Röhrcchen mit VME RT-PCR MIX B, mit reverser Transkriptase, Taq-Polymerase, Puffer, spezifische Primer/Sonde für EVs und HPeVs (5'UTR), WNV (3'UTR) und TOSV (*N*-Gen) und als interne Kontrolle Primer/Sonde für den Bakteriophagen MS2. 1 Reaktion pro Röhrcchen. Lyophilisiert. Siehe Abbildung 1 für die Verteilung von VME RT-PCR MIX A und VME RT-PCR MIX B auf dem Streifen.

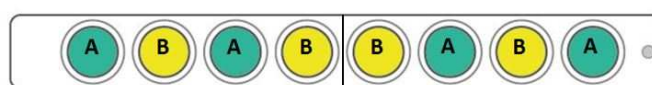


Abbildung 1: Verteilung von VME RT-PCR MIX A und VME RT-PCR MIX B auf dem Streifen.
Legende: A= VME RT-PCR MIX A und B= VME RT-PCR MIX B

[3] VIRCELL VME POSITIVE CONTROL: 1 Fläschchen mit einem Gemisch aus lyophilisierten nicht infektiösen Nukleinsäuren zur Verwendung als Positivkontrolle. Roter Verschluss.

[4] VIRCELL NEGATIVE CONTROL: 200 µl entionisiertem Wasser für den Gebrauch als Negativkontrolle. Grüner Verschluss.

[5] VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION: 2 x 1 ml wässriger Lösung für die Herstellung der PCR-Mischung. Gelber Verschluss.

[6] VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 µl wässriger Lösung zur Herstellung der Positivkontrolle. Brauner Verschluss.

[7] VIRCELL RT-PCR MIX CAPS: 12 Streifen mit 8 RT-PCR-kompatiblen Verschlüssen.

Spezielle Materialien, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden:

- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank.
- RNA-Extraktions-Kit (siehe Empfehlungen unter „Testverfahren“).
- qRT-PCR-Thermocycler.
- Präzisions-Mikropipetten.
- Sterile Spitzen mit Aerosolbarriere.
- Mikrozentrifuge.
- PCR-Kabine (empfohlen).
- Vortex.

LAGERUNGS- UND HANDHABUNGSBEDINGUNGEN

Bei 2-8°C lagern. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums einsetzen. Das Verfallsdatum der Reagenzien ist nur gültig bei Lagerung in gut verschlossenem Zustand bei 2-8°C.

HALTBARKEIT NACH ANBRUCH

VIRCELL POSITIVE CONTROL rekonstituierte: bei Temperaturen -25 bis -15 °C lagern und vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

VIRCELL RT-PCR MIX rekonstituierte: bei Temperaturen -25 bis -15 °C lagern und vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Restliche Reagenzien: Siehe Verfallsdatum auf der Packung (bei 2-8°C).

VIRCELL RT-PCR MIX sollten unmittelbar nach der Rekonstitution verwendet und in einem vor Licht geschützten Kühlrack aufbewahrt werden.

VIRCELL, S.L. haftet nicht für die unsachgemäße Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien.

WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Das Produkt sollte auf Personal begrenzt werden, das in der Technik geschult wurde.
3. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig.

4. Verwenden Sie nur die in dieser Broschüre beschriebenen Protokolle. Wenn die Bedingungen nicht den Angaben entsprechen, sind die Ergebnisse möglicherweise falsch.

5. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien persönliche Schutzausrüstung. Waschen Sie Ihre Hände beim Umgang mit Proben und Reagenzien gründlich. Alle Verfahren müssen in Übereinstimmung mit den genehmigten Sicherheitsstandards durchgeführt werden.

6. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.

7. Nicht mit dem Mund pipettieren.

8. Keine beschädigten Kits verwenden.

9. Verwenden Sie das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr.

10. Lassen Sie die Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich auf einer anderen Temperatur als empfohlen.

11. Halten Sie Behälter für Proben und Reagenzien geschlossen, wenn diese nicht bearbeitet werden.

12. Vermeiden Sie die Verwendung von Proben, die wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt sind.

13. Verwenden unter aseptischen Bedingungen, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.

14. Jedes nicht verwendete Material muss gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgt werden.

15. Die Komponenten dieses Geräts können genetisches Material oder Substanzen tierischen und/oder menschlichen Ursprungs haben. Auch wenn dieses Material nicht infektiös ist, muss es als potenziell infektiös behandelt werden. Das gesamte Material muss als potenziell infektiös gehandhabt und entsorgt werden. Beachten Sie die lokalen Bestimmungen für Abfälle.

16. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur VIRCELL NEGATIVE CONTROL, VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION und VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION sind mit entsprechenden, weiteren RTPCR VIRCELL-Referenzen und -Artikeln kompatibel.

17. Die Proben müssen gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien so behandelt werden, als wären sie infektiös, gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien. Halten Sie alle Arbeitsflächen mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5% Natriumhypochlorit in entionisiertem oder destilliertem Wasser sauber und steril.

18. Um zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, ist es ratsam, die Proben so früh wie möglich nach deren Gewinnung zu testen. Es sind keine Untersuchungen über die Auswirkungen der Transportzeit durchgeführt worden.

19. Für die Durchführung des Tests ist es notwendig, über voneinander getrennte Arbeitsbereiche zu verfügen: einen Bereich vor der Amplifikation und einen Bereich für die Amplifikation.

20. Wegen der hohen analytischen Sensitivität des Tests müssen die Vorsichtsmaßnahmen verschärft werden, um die Reinheit der Reagenzien des Kits und der Amplifikationsmischungen zu gewährleisten. Alle verwendeten Reagenzien müssen den höchsten Reinheitsgrad aufweisen.

21. Es wird empfohlen, konventionelle DNA/RNA-Reinigungskits zu verwenden.

22. Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretenden schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

BEDINGUNGEN FÜR DIE ENTNAHME, BEHANDLUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBE

Der Kit kann mit klinischen Zerebrospinalflüssigkeitsproben verwendet werden.

Verzögern Sie weder den Transport noch Laboruntersuchungen. Die Proben könnten bei 2 bis 8 °C bis zu 4 Stunden nach der Entnahme gelagert werden. Wenn eine Verzögerung zu erwarten ist, wird eine Lagerung bei -90 bis -70 °C empfohlen.

PRODUKTVORBEHANDLUNG

Alle gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig, außer VIRCELL RT-PCR MIX [1] und VIRCELL POSITIVE CONTROL [3].

[1] VIRCELL RT-PCR MIX. Fügen Sie für die Rekonstitution pro Fläschchen 15 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu.

⚠ Der rekonstituierte VIRCELL RT-PCR MIX ist direkt nach Zugabe der Rekonstitutionslösung zu verwenden und sollte bis zur Verwendung in einem vor Licht geschützten Gefrier-Rack aufbewahrt werden.

[3] VIRCELL POSITIVE CONTROL. Führen Sie für die Rekonstitution die folgenden Schritte aus:

- Zentrifugieren Sie das entsprechende Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.

- Fügen Sie 100 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION [6] hinzu.

- Mischen Sie 1-2 Sekunden lang mit einem Vortexmischer.

- Zentrifugieren Sie das Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.

Nach der Rekonstitution kann die VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] bei Temperaturen unter -25 bis -15 °C eingefroren werden für ihren Gebrauch bei späteren Ansätzen.

TESTVERFAHREN

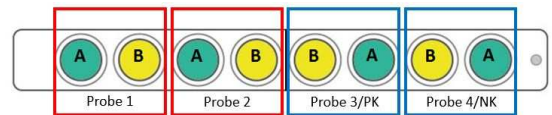
1. DNA/RNA-Extraktion (durchgeführt im Prä-Amplifikationsbereich):

1.1. Es wird empfohlen, ein kommerzielles Extraktionskit für DNA/RNA-Extraktionen zu verwenden. Bei der Verwendung von kommerziellen Extraktionskits sind die Anweisungen des Herstellers zu befolgen. Kontakt zum Kundendienst.

2. Amplifikation mit RT-PCR (durchgeführt im Amplifikationsbereich):

2.1. Rekonstitution des VIRCELL RT-PCR MIX: Die mitgelieferte Platte mit 96 Röhrchen könnte je nach zu testenden Proben leicht in einen oder mehrere einzelne 8-Röhrchen-Streifen geteilt werden. Bitte beachten Sie, dass jeder 8-Röhrchen-Streifen für 4 Proben verwendet wird. Fügen Sie pro Fläschchen 15 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu. Nach der Rekonstitution/dem Auftauen kalt halten.

2.2. Hinzufügen der Probe: Geben Sie 5 µl jeder extrahierten DNA/RNA-Probe in ein Röhrchen mit RT-PCR MIX A und ein Röhrchen mit RT-PCR-MIX B. Fügen Sie den entsprechenden Röhrchen mit RT-PCR MIX A und RT-PCR MIX B 5 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] und VIRCELL NEGATIVE CONTROL [4] hinzu. Die Negativkontrolle ist Wasser.



2.3. Verschließen Sie die Röhrchen mit VIRCELL RT-PCR MIX CAPS [7].

2.4. Es wird empfohlen, die Platte/-streifen kurz zu zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich der Fläschcheninhalt unten im Röhrchen befindet.

2.5. RT-PCR-Programm: Geben Sie die PCR-Röhrchen in den Echtzeit-Thermocycler und führen Sie das folgende Programm* aus:

1 Zyklus	51 °C	20 Minuten
1 Zyklus	95 °C	2 Minuten
45 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	58 °C	45 Sekunden*

* Fluoreszenzdaten (FAM, HEX/VIC, Texas Red/ROX, Q705/Cy5.5 und Cy5) sollten erfasst werden.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Jede Charge wird unter Einhaltung strenger Vorgaben internen Qualitätskontrollen unterzogen, bevor sie freigegeben wird.

TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER

Bei jeder Testdurchführung muss eine Negativkontrolle mit eingeschlossen werden. Die Negativkontrolle ist Wasser. Daher sollte nur die Amplifikation der internen Kontrolle festgestellt werden. Durch die Negativkontrolle wird die Kontamination des Reagenzes oder der Umgebung überprüft.

Es wird empfohlen, die Positivkontrolle bei jedem Durchlauf einzubeziehen. Die Positivkontrolle überprüft auf fehlerhafte Reagenzien und die korrekte Durchführung des Arbeitsvorgangs.

Die Thermocycler Software berechnet voraussichtlich automatisch den Baseline-Fluoreszenzwert (Schwellenwert) auf Grundlage der Amplifikationskurve für jedes Zielgen (Fluoreszenzdetektion). Dennoch wird empfohlen, die Schwellenwerte für die verschiedenen Detektionskanäle individuell festzulegen. Um einen Schwellenwert für jedes Zielgen festzulegen, wird empfohlen, die Amplifikationskurven der positiven und negativen Kontrollen als Referenz zu verwenden. Der Schwellenwert sollte auf den Beginn des exponentiellen Anstiegs der gemessenen Fluoreszenz und oberhalb des Hintergrundsignals festgelegt werden.

Die Ergebnisinterpretation der Kontrollen lautet wie folgt:

KONTROLLE	HSV-1 (FAM)	HSV-2 (HEX/VIC)	VZV (Texas/ROX)	EVs (FAM)	TOSV (HEX/VIC)	HPEVs (Texas/ROX)	WNV (Q705/Cy5.5)	IC (Cy5)	Interpretation
VIRCELL VME POSITIVE CONTROL	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Korrekt
	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig
VIRCELL NEGATIVE CONTROL	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Korrekt
	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisinterpretation wird in den nachstehenden Tabellen dargestellt:

Tabelle 1: RT-PCR MIX A

ERGEBNIS	HSV-1 (FAM)	HSV-2 (HEX/VIC)	VZV (Texas/ROX)	IC ¹ (Cy5)	Interpretation
1	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig ² (Probe / den Kit/Ablauf betreffend)
2	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Negative
3	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-1
4	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-2
5	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	VZV
6	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-1 + VZV
7	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-1 + HSV-2
8	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-2 + VZV
9	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HSV-1 + HSV-2 + VZV

Tabelle 2: RT-PCR MIX B

ERGEBNIS	EVs (FAM)	TOSV (HEX/VIC)	HPEVs (Texas/ROX)	WNV (Q705/Cy5.5)	IC ¹ (Cy5)	Interpretation
1	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig ² (Probe / den Kit/Ablauf betreffend)
2	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Negative
3	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs
4	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TOSV
5	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HPEVs
6	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	WNV
7	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + TOSV

ERGEBNIS	EVs (FAM)	TOSV (HEX/VIC)	HPeVs (Texas/ROX)	WNV (Q705/Cy5.5)	IC ¹ (Cy5)	Interpretation
8	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + HPeVs
9	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + WNV
10	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TOSV + HPeVs
11	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	HPeVs + WNV
12	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TOSV + WNV
13	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + TOSV + HPeVs
14	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + TOSV + WNV
15	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TOSV + HPeVs + WNV
16	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	EVs + TOSV+ HPeVs+ WNV

¹ Bei einer hohen Vervielfältigungszahl der Zielnukleinsäure kann die Amplifikation der internen Kontrolle (IC) in den Ergebnissen 3 bis 9 (Tabelle 1) und 3 bis 16 (Tabelle 2) beeinträchtigt sein. Die Amplifikation oder eine fehlende IC-Amplifikation ändert nichts an der Interpretation des Ergebnisses.

Bei einem ungültigen oder unklaren Ergebnis wird empfohlen, die DNA/RNA-Extraktion aus der Originalprobe zu wiederholen und erneut zu testen. Bei einer fehlgeschlagenen Amplifikation der internen Kontrolle kann eine unsachgemäße Extraktion von Nukleinsäuren oder eine Hemmung der Amplifikation angenommen werden. Es wird empfohlen, eine neue Probe zu testen.

VERWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN

- Dieser Kit ist für die Verwendung mit humanen Zerebrospinalflüssigkeitsproben (CSF) vorgesehen. Eine Leistungsbewertung mit anderen Probenotypen wurde nicht durchgeführt.
- Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.
- Der Nachweis der Virusnukleinsäuren hängt von der Menge der Viruslast in der Probe ab und kann durch Probenahmeverfahren, Patientenfaktoren, das Infektionsstadium und/oder den Erregerstamm beeinträchtigt werden. Falsch negative Ergebnisse können auch entstehen, wenn Amplifikationsinhibitoren in der Probe vorhanden sind. Es sollten validierte Extraktionsmethoden für virale DNA/RNA verwendet werden.
- Die Ergebnisse des Tests sind qualitativer Natur. Es existiert keinerlei Korrelation zwischen der Größe des positiven Ergebniswertes und der Anzahl an Mikroorganismen in der Probe.
- Der Test funktioniert nur innerhalb der Grenzen der genomischen Regionen, für die die Sonden ausgewählt worden sind. Der Test zielt auf stark konservierte Regionen ab, Aufgrund der hohen Variabilität der DNA/RNA Genome, ist es möglich, dass bestimmte Subtypen nicht festgestellt werden. Zur Zeit der Entwicklung wurden keine Mutationen der Zielregionen detektiert.
- Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein des Mikroorganismus in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze des Tests nicht aus.
- Ein positiver Test schließt die Möglichkeit nicht aus, dass andere Pathogene vorhanden sind.
- Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSMERKMALE

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

EVs

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100
Sensitivität (%)	96
	95% CI

Spezifität (%)	100
	95% CI
PPV (%)	100
NPV (%)	96.15
LR+/LR-	-0,97/-0,95
Echt-positiv	48
Echt-negativ	50
Falsch-positiv	0
Falsch-negativ	2
Grenzfälle	0

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

HPeVs

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100
Sensitivität (%)	96
	95% CI
Spezifität (%)	100
	95% CI
PPV (%)	100
NPV (%)	96.15
LR+/LR-	-0,97/-0,95
Echt-positiv	48
Echt-negativ	50
Falsch-positiv	0
Falsch-negativ	2
Grenzfälle	0

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

HSV-1

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100	
Sensitivität (%)	92	
	95% CI	81-97
Spezifität (%)	100	
	95% CI	93-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	92.59	
LR+/LR-	-0,93/-0,91	
Echt-positiv	46	
Echt-negativ	50	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	4	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

HSV-2

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100	
Sensitivität (%)	98	
	95% CI	89-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	93-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	98.04	
LR+/LR-	-0,99/-0,97	
Echt-positiv	49	
Echt-negativ	50	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

TOSV

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100	
Sensitivität (%)	98	
	95% CI	89-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	93-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	98.04	
LR+/LR-	-0,99/-0,97	
Echt-positiv	49	
Echt-negativ	50	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

VZV

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100	
Sensitivität (%)	94	
	95% CI	83-98
Spezifität (%)	100	
	95% CI	93-100

PPV (%)	100
NPV (%)	94.33
LR+/LR-	-0,95/-0,93
Echt-positiv	47
Echt-negativ	50
Falsch-positiv	0
Falsch-negativ	3
Grenzfälle	0

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

WNV

Menschliche Zerebrospinalflüssigkeitsproben/klinische Scheinproben wurden im Vergleich zu einem kommerziellen Echtzeit-PCR-Kit getestet. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	100	
Sensitivität (%)	98	
	95% CI	90-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	93-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	98.04	
LR+/LR-	-0,99/-0,97	
Echt-positiv	49	
Echt-negativ	50	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
 PPV: Positiver prädiktiver Wert
 NPV: Negativer prädiktiver Wert
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

GENAUIGKEIT

4 Proben (2 positive und die Positiv- und Negativkontrolle) wurden zweimal in 2 Durchläufen pro Tag in 2 verschiedenen qRT-PCR-Thermocyclern an 20 aufeinanderfolgenden Tagen amplifiziert. Es wurden die Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs, die Genauigkeit zwischen den Durchläufen, die Genauigkeit zwischen den Tagen und die Genauigkeit zwischen den Labors ermittelt. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

EVs

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,4	1,2	0,8	1,5
Positive Probe 1	1,3	0,8	0,7	1,7
Positive Probe 2	2,4	1,3	1,0	2,2
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

HPeVs

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,5	0,7	0,8	1,2
Positive Probe 1	1,5	0,8	0,2	1,6
Positive Probe 2	2,2	1,1	0,4	2,0
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

HSV-1

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,7	1,4	1,0	1,8
Positive Probe 1	1,1	1,6	0,3	1,9
Positive Probe 2	1,1	1,4	0,7	1,7
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

HSV-2

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,5	1,0	0,9	1,5
Positive Probe 1	0,5	0,9	0,8	1,3
Positive Probe 2	1,6	0,4	0,8	1,7
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

TOSV

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,5	2,2	0,8	2,4
Positive Probe 1	0,9	0,4	1,0	1,4
Positive Probe 2	1,1	0,5	0,9	1,3
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

VZV

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,7	0,8	0,8	1,3
Positive Probe 1	0,8	0,8	1,4	1,8
Positive Probe 2	1,1	0,2	0,9	1,4
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

WNV

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,6	1,4	2,3	2,7
Positive Probe 1	1,0	0,7	2,3	2,4
Positive Probe 2	2,1	0,7	1,4	2,6
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

KREUZREAKTIVITÄT

Die Spezifität wurde durch den Test eines Panels bestätigt, das aus verschiedenen Mikroorganismen besteht, die an Meningitis beteiligt sind oder in menschlichen Proben vorkommen: Zytomegalie-Virus, *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, Humanes Herpesvirus 6, Humanes Herpesvirus 8, Epstein-Barr-Virus, Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV), St. Louis-Enzephalitis-Virus, Gelbfieber-Virus, *Staphylococcus aureus*, Rotavirus, Rhinovirus 14, Rhinovirus 5, Adenovirus 41, *Mycobacterium tuberculosis*, Masern-Virus, Western Equine Encephalitis Virus, Venezolanisches Pferdeenzephalitis-Virus, HCoV-229E, Dengue-Virus 1, Dengue-Virus 2, Dengue-Virus 3, Dengue-Virus 4, Chikungunya-Virus, Ross-River-Virus, *Pseudomonas aeruginosa*, Zika-Virus, Influenza-A-Virus und Mumps-Virus.

Eine Kreuzreaktivität wurde nicht festgestellt, mit Ausnahme von Rhinovirus 5, für das eine mäßige Kreuzreaktivität beim EVs-Nachweis beobachtet wurde. Kreuzreaktionen der Primer/Sonden, die für den EVs-Nachweis verwendet wurden, mit anderen Rhinoviren B, insbesondere Rhinovirus B6, sind aufgrund der in silico-Sequenzanalyse ebenfalls zu erwarten.

Zusätzlich wurde eine in-silico-Analyse der Primer-/Sondensequenzen zum Vergleich mit anderen Mikroorganismen, die in die in klinischen Proben gefunden werden können, durchgeführt. Die Sequenz von 10 Mikroorganismen, die in klinischen Proben gefunden werden konnten, wurde analysiert: *Blastomyces* spp, *Histoplasma* spp, Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1, John-Cunningham-Virus, *Coccidioides immitis*, Powassan-Virus, *Naegleria fowleri*, *Taenia solium*, Virus der lymphozytären Choriomeningitis und Rabiesvirus.

Fünf der 10 getesteten Mikroorganismen (*Histoplasma* spp, HIV-1, *Coccidioides immitis*, Virus der lymphozytären Choriomeningitis und Rabiesvirus) zeigten eine Homologie von $\geq 80\%$ mit einem der Primer. Kreuzreaktionen und/oder Interferenzen mit dem Assay aufgrund der Anwesenheit dieser Organismen konnten nicht getestet werden, sind aber unwahrscheinlich.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die LOD (Limit of Detection) von HSV-1, HSV-2, VZV, EVs, HPeVs, TOSV und WNV wurde anhand einer negativen künstlichen menschlichen Liquormatrix bewertet. Die virale DNA/RNA wurde unter Verwendung von OptiPure Viral Autoplate auf einem M9600-Gerät (TANBead) extrahiert.

Es wurde eine vorläufige LOD (Limit of Detection) bestimmt, indem 5 Replikate von dreifachen seriellen Verdünnungen quantifizierter HSV-1-, HSV-2-, VZV-, EVs-, HPeVs-, TOSV- und WNV-Proben getestet wurden.

Nach dem Festlegen einer angenäherten LoD wurde die Endkonzentration bestätigt, indem 20 Replikate dreifacher serieller Verdünnungen getestet wurden. Die LoD wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, in der $\geq 95\%$ (19/20) der Replikate positiv sind.

	EVs	HPeVs	HSV-1	HSV-2	TOSV	VZV	WNV
LoD (kopien/ μ L)	1	1,7	3,2	3,1	1	3	1,4
LoD (kopien/mL)	1000	1700	3200	3050	1000	3000	1400
LoD (kopien/reaktion)	5	8,5	16	15,3	5	15	7

INKLUSIVITÄT

Es wurde eine in-silico-Analyse der im Test enthaltenen analysierten Gene durchgeführt, um die Inklusivität für die verschiedenen vorhandenen HSV-1-, HSV-2-, VZV-, EVs-, HPeVs-, TOSV- und WNV-Sequenzen zu bestimmen.

Die Kriterien für die Einbeziehung der verschiedenen Sequenzen in die Analyse waren geografische Daten und das Datum, an dem die Sequenz hinterlegt wurde. In die Analyse jedes Virus wurden verschiedene Abstammungslinien, Typen oder Subtypen einbezogen.

Der Zugriff auf die Sequenzen erfolgte über die Datenbanken der GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Die Ergebnisse der In-silico-Analyse zeigen, dass der VIRAL MENINGITIS REALTIME PCR KIT voraussichtlich alle derzeit verfügbaren HSV-1-, HSV-2-, VZV-, EVs-, HPeVs-, TOSV- und WNV-Sequenzen nachweisen wird.

EXTERNE KONTROLLE

Die folgenden Kontrollen sind erforderlich, werden aber nicht mit dem Test-Kit geliefert:

- als positive Extraktionskontrolle, AMPLIRUN® TOTAL HSV-1/HSV-2 CONTROL (CSF) Kat. MBTC009 (Vircell)

Externe Kontrollen helfen bei der Kontrolle von Kreuzkontaminationen während des Extraktionsvorgangs und dienen zusätzlich als Validierungsinstrument für Extraktionsreagenzien.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLLE



Für die *In-vitro* Diagnostik



Verwendbar bis (Verfallsdatum)



Bei x-y°C lagern



Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen



Chargen-Nummer



Bestell-Nummer



Gebrauchsanleitung beachten



Rekonstituieren in <X> µl



Hersteller

LITERATUR

1. Cabrerizo, M. et al. 2014. Design and validation of a real-time RT-PCR for the simultaneous detection of enteroviruses and parechoviruses in clinical samples. *J Virol Methods*, 208, 125–128.
2. Dierssen, U. et al. 2008. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol*, 42(1), 58-64.
3. McGill, F. et al. 2017. Viral meningitis: current issues in diagnosis and treatment. *Current opinion in infectious diseases*, 30 (2), 248 -256.
4. Ryncarz, A. J. et al. 1999. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol*, 37, 1941-1947.

Versionsnummer: L-RTPCR011-LPD-DE-01

Datum: 2021/11/26

Aktualisierungen: Neue Bestellnummer

