

Aptima™ CMV Quant Assay

In-vitro-Diagnostikum

Nur zum US-Export

| | |
|--|-----------|
| Allgemeine Informationen | 2 |
| Verwendungszweck | 2 |
| Zusammenfassung und Testerklärung | 2 |
| Testprinzip | 2 |
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 3 |
| Probenentnahme und -lagerung | 8 |
| Im Panther System gelagerte Proben | 11 |
| Transport von Patientenproben | 11 |
| Panther System | 12 |
| Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien | 12 |
| Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien | 14 |
| Optionale Materialien | 15 |
| Testverfahren mit dem Panther System | 15 |
| Verfahrenshinweise | 22 |
| Qualitätskontrolle | 23 |
| Assay-Kalibrierung | 23 |
| Negativ- und Positivkontrollen | 23 |
| Interner Kalibrator/Interne Kontrolle | 23 |
| Interpretation der Ergebnisse | 24 |
| Einschränkungen | 25 |
| Performance | 26 |
| Detektionsgrenze mit dem 1. internationalen WHO-Standard | 26 |
| Nachweisgrenze für CMV-Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen | 27 |
| Linearer Bereich | 29 |
| Linearität bei CMV-Genotypen | 31 |
| Untere Quantifizierungsgrenze unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards | 33 |
| Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze bei CMV-Genotypen und arzneimittelresistenten Mutationen | 35 |
| Rückführbarkeit auf den 1. internationalen WHO-Standard | 38 |
| Präzision | 40 |
| Mögliche Störsubstanzen | 41 |
| Spezifität | 42 |
| Analytische Spezifität | 43 |
| Verschleppung | 44 |
| Methodenkorrelation | 44 |
| Reproduzierbarkeit | 46 |
| Bibliographie | 48 |
| Kontaktdaten | 49 |

Allgemeine Informationen

Verwendungszweck

Der Aptima CMV Quant Assay ist ein In-vitro-Test zur Nukleinsäure-Amplifikation für die Quantifizierung von DNA des menschlichen Cytomegalovirus in menschlichem EDTA-Plasma und Vollblut auf dem vollautomatischen Panther System.

Der Aptima CMV Quant Assay ist als Hilfsmittel für die Diagnose sowie bei der Behandlung von Patienten mit einer Organtransplantation und Patienten mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation vorgesehen.

Der Aptima CMV Quant Assay ist nicht für die Verwendung als Screening-Assay auf das Vorhandensein von CMV im Blut oder Blutprodukten bestimmt.

Zusammenfassung und Testerklärung

Das menschliche CMV ist ein ubiquitäres Virus mit 240 kb linearer, doppelsträngiger DNA, das zur Herpes-Familie gehört. Die Seroprävalenz des CMV variiert je nach untersuchter Population und geografischer Region weltweit zwischen 45 und 100 %.^{1,2} Bei immunkompetenten Wirten verläuft die CMV-Infektion in der Regel asymptomatisch und selbstlimitiert. Bei immunschwachen Personen, wie Transplantatempfängern und Personen mit einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus, ist das CMV eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität.

Ähnlich wie andere Herpesviren etabliert das CMV nach der primären Infektion eine lebenslange, latente Infektion, die sporadisch reaktiviert werden kann. Bei Transplantatempfängern können die Übertragung eines latenten CMV im Transplantat oder die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion beim Wirt zu einer breit gestreuten Virusreplikation und Dissemination auf zahlreiche Organe führen, die oft lebensbedrohlich ist.³

Quantitative Nukleinsäure-Amplifikationstests sind die bevorzugte Methode zur Überwachung von CMV-Infektionen und -Erkrankungen bei Transplantatempfängern, da sie schnell und sensitiv sind.⁴ Die jüngsten Richtlinien empfehlen eine mindestens wöchentliche Überwachung der CMV-Viruslast als Entscheidungshilfe für den Start einer Anti-CMV-Behandlung und zur Überwachung des Ansprechens auf die Behandlung.^{5,6,8} Generell werden höhere Viruslastwerte mit einem erhöhten Risiko für eine CMV-Erkrankung korreliert.^{4,9} Daher ist die Quantifizierung von CMV-DNA in Verbindung mit einer klinischen Präsentation und anderen Labormarkern wesentlich für die Behandlung von Patienten mit einer CMV-Infektion.

Testprinzip

Der Aptima CMV Quant Assay ist ein In-vitro-Test zur Nukleinsäure-Amplifikation, der mit Hilfe des Panther System* realtime transkriptionsvermittelte Amplifikations(TMA)-Technik verwendet, um die CMV-DNA der Genotypen 1, 2, 3 und 4 zu quantifizieren. Das Primer-Design zielt auf das hochkonservierte UL56-Gen ab, um eine präzise Quantifizierung der CMV-DNA sicherzustellen. Der Assay ist auf den 1. internationalen WHO-Standard (NIBSC-Code: 09/162) für das menschlichen Cytomegalovirus standardisiert²¹.

Der Aptima CMV Quant Assay umfasst drei Hauptschritte, die in einem einzigen Reaktionsgefäß im Panther System stattfinden: Target Capture, Target-Amplifikation durch TMA und Detektion der Amplifikationsprodukte (Amplikons) mithilfe von fluoreszenzmarkierten Sonden (Torches).

*Einschließlich Varianten des Panther Systems.

Beim Target-Capture wird die Virus-DNA von den Proben isoliert: Die Patientenprobe wird mit einem Detergens behandelt, um die Virushülle aufzulösen, Proteine zu denaturieren und die genomische Virus-DNA freizusetzen. Capture-Oligonukleotide hybridisieren an hoch konservierte Regionen der ggf. in der Testprobe vorhandenen CMV-DNA. Das hybridisierte Target wird anschließend an magnetische Mikropartikel gebunden, die dann in einem Magnetfeld von der Patientenprobe getrennt werden. Irrelevante Bestandteile werden durch Waschschriffe aus dem Reaktionsröhrchen entfernt.

Die Target-Amplifikation findet durch TMA statt, eine transkriptionsvermittelte Nukleinsäureamplifikationsmethode, bei der zwei Enzyme, die reverse Transkriptase des MMLV (Moloney murines Leukämievirus) und die T7-RNA-Polymerase zum Einsatz kommen. Die reverse Transkriptase erzeugt eine DNA-Kopie (mit einer Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase) der Targetsequenz. T7-RNA-Polymerase produziert mehrere Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie.

Die Detektion wird erreicht, indem einzelsträngige Nukleinsäure-Torches verwendet werden, die während der Amplifikation des Targets vorhanden sind und spezifisch und in Echtzeit an das Amplikon hybridisieren. Jede Sonde hat ein Fluorophor und einen Quencher. Wenn die Sonde nicht mit dem Amplikon hybridisiert, befindet sich der Quencher nahe bei dem Fluorophor und unterdrückt die Fluoreszenz. Bindet die Sonde jedoch an das Amplikon, ist der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor größer, sodass dieses bei Anregung mit einer Lichtquelle ein Signal mit einer bestimmten Wellenlänge abgibt. Je mehr Sonden an Amplikons hybridisieren, desto stärker ist das erzeugte Fluoreszenzsignal. Der Zeitraum, der verstreicht, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, ist zur CMV-Ausgangskonzentration proportional. Jede Reaktion hat einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (Internal Control, IC) zur Überprüfung auf Schwankungen bei der Probenbearbeitung, Amplifikation und Detektion. Die Konzentration einer Probe wird von der Panther System Software bestimmt, indem die CMV- und IC-Signale in jeder Reaktion mit Kalibrierungsdaten verglichen werden.

Assay-Ergebnisse werden über einen in die Panther Software integrierten Umrechnungsfaktor von Kopien/ml in IU/ml umgerechnet. Für Vollblut- und Plasmaproben wird der gleiche Umrechnungsfaktor verwendet. Auf CMV-Viruslast-Ergebnisse für Vollblutproben wird ein Verdünnungsfaktor von 4 angewendet, wenn der Vollblut-Umrechnungsfaktor in Panther ausgewählt wird.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- A. *In-vitro*-Diagnostikum.
- B. Für den professionellen Einsatz.
- C. Zur Verringerung des Risikos ungültiger Ergebnisse müssen die Packungsbeilage und das entsprechende *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System)* vollständig durchgelesen werden, bevor dieser Assay durchgeführt wird.

Laborbezogen

- D. VORSICHT: Die Kontrollen für diesen Assay enthalten Humanplasma. In von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Verfahren ist das Plasma negativ auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HCV, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 und HIV-Antigen. Das Plasma ist außerdem bei Testung mit zugelassenen Nukleinsäuretests von Probenpools nicht-reaktiv auf CMV-DNA, HBV-DNA, HCV-RNA und HIV-1-RNA. Alle aus Humanblut stammenden Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln.^{10,11,12}

- E. Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima CMV Quant Assays und in der Handhabung potenziell infektiösen Materials geschult sind. Bei Materialverschüttung sind die betroffenen Flächen unter Einhaltung entsprechender vor Ort gültiger Verfahren sofort zu desinfizieren.
- F. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.
- G. Die normalen Vorsichtsmaßnahmen im Labor ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen. Beim Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien ungepuderte Einweghandschuhe, Augenschutz und Laborkittel tragen. Nach der Handhabung von Proben und Kit-Reagenzien die Hände gründlich waschen.
- H. Arbeitsflächen, Pipetten und andere Geräte müssen regelmäßig mit einer 2,5- bis 3,5%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden.
- I. Material, das in Kontakt mit Patientenproben und Reagenzien gelangt ist, nach allen geltenden Vorschriften entsorgen.^{10,11,12,13} Alle Arbeitsflächen gründlich reinigen und desinfizieren.
- J. Die Kontrollen enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Für den Reagenzientransfer keine Metallröhrchen verwenden. Wenn Lösungen mit Natriumazidverbindungen in ein Abwassersystem entsorgt werden, sind sie zu verdünnen und mit reichlich fließendem Leitungswasser hinunterzuspülen. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen, um Ablagerungen in Metall-Abflussrohren zu vermeiden, die eine Explosionsgefahr bilden können.
- K. Zu der guten Standardpraxis für Molekularbiologie-Laboratorien gehört auch die Überwachung der Laborumgebung. Zur Überwachung der Laborumgebung wird folgende Vorgehensweise empfohlen:
1. Einen Tupfer mit Wattespitze und ein Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) bereitlegen.
 2. Jedes SAT entsprechend beschriften.
 3. Jedes SAT mit 1 ml Aptima Probenverdünner füllen.
 4. Zum Aufnehmen der Oberflächenproben einen Tupfer leicht mit nukleasefreiem entionisiertem Wasser befeuchten.
 5. Den Probenentnahmetupfer auf der betreffenden Oberfläche in einer vertikalen Bewegung von oben nach unten führen. Während der Probengewinnung den Probenentnahmetupfer etwa eine halbe Drehung drehen.
 6. Die Tupferprobe sofort in das Röhrchen geben und im Verdünner vorsichtig schwenken, um möglicherweise auf dem Tupfer vorhandenes Material zu extrahieren. Den Tupfer an der Seite des Transportröhrchens ausdrücken, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu extrahieren. Den Tupfer entsorgen und das Röhrchen mit der Kappe verschließen.
 7. Die Schritte mit den verbleibenden Tupferproben wiederholen.
 8. Die Tupferprobe mit dem molekularen Assay testen.

Probenbezogen





- L. Proben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assays sind die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen^{10,11,12} zu befolgen. Entsprechend den vor Ort geltenden Bestimmungen sind angemessene Handhabungs- und Entsorgungsmethoden festzulegen.¹¹ Dieses Verfahren darf nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima CMV Quant Assays und in der Handhabung infektiösen Materials geschult sind.
- M. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerungsbedingungen aufrechterhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht untersucht.






- N. Kreuzkontamination während der Probenhandhabungsschritte vermeiden. Insbesondere ist darauf zu achten, beim Lösen oder Entfernen von Kappen von Patientenproben eine Kontamination durch Verbreitung von Aerosolen zu vermeiden. Die Proben können sehr hohe Konzentrationen von Organismen aufweisen. Es ist sicherzustellen, dass die Probenbehälter nicht miteinander in Berührung kommen. Benutzte Materialien dürfen nicht über offene Behälter hinweg entsorgt werden. Die Handschuhe wechseln, wenn diese mit Proben in Kontakt gekommen sind.

Testbezogen

- O. Das Reagenzien-Kit, den Kalibrator oder die Kontrollen nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- P. Assay-Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Chargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren. Assay-Flüssigkeiten dürfen verschiedene Chargennummern aufweisen. Kontrollen und Kalibratoren dürfen verschiedene Chargennummern aufweisen.
- Q. Eine Kontamination der Reagenzien mit Mikroben oder Nuklease ist zu vermeiden.
- R. Alle Assay-Reagenzien verschließen und bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assay-Leistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Assay-Reagenzien beeinträchtigt werden. Siehe *Testverfahren mit dem Panther System* für weitere Informationen.
- S. Assay-Reagenzien oder Flüssigkeiten nur auf ausdrückliche Anweisung miteinander kombinieren. Reagenzien und Flüssigkeiten nicht nachfüllen. Das Panther System überprüft die Reagenzien-Füllstände.
- T. Berührung des TER mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit diesem Reagenz den betroffenen Bereich mit Wasser abspülen. Wird dieses Reagenz verschüttet, muss es mit Wasser verdünnt und anschließend entsprechend den örtlich geltenden Vorschriften weiter verfahren werden.
- U. Einige Reagenzien in diesem Kit sind mit Risiko- und Sicherheitssymbolen gekennzeichnet.

Hinweis: Die Gefahrenkommunikation spiegelt die Einstufung der EU-Sicherheitsdatenblätter (SDB) wider. Spezifische Informationen zu den Gefahren für Ihre Region finden Sie in dem regionalspezifischen SDS in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologicds.com.

| Gefahrenhinweise für Kanada | |
|---|--|
|  | <p>CMV-Kit-Kontrollen <i>Humanplasma 95 - 100 %</i> <i>Natriumazid 1 %</i></p> |
|  | <p>ACHTUNG H312 - Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt EUH032 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase P280 – Augen-/Gesichtsschutz tragen Inhalt/Behälter in einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage entsorgen</p> |
|  | <p>Target Enhancer-Reagenz (TER) <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 5 - 10 %</i></p> |
|  | <p>GEFAHR H302 - Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H314 - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden P264 - Nach Gebrauch Gesicht, Hände und ungeschützte Hautpartien gründlich waschen P270 - Beim Arbeiten mit diesem Produkt nicht essen, trinken oder rauchen P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen P303 + P361 + P353 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut (oder Haar) mit Wasser abwaschen/duschen P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P405 - Abgeschlossen lagern</p> |

| Gefahrenhinweise für Europa | |
|---|--|
|  | <p>CMV-Kit-Kontrollen <i>Humanplasma 95 - 100 %</i> <i>Natriumazid 1 %</i></p> |
|  | <p>ACHTUNG H312 - Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt H412 - Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung EUH032 - Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase P273 - Freisetzung in die Umwelt vermeiden P280 – Augen-/Gesichtsschutz tragen</p> |
|  | <p>Target Enhancer-Reagenz (TER) <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 5 - 10 %</i></p> |
|  | <p>GEFAHR H302 - Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H314 - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen P303 + P361 + P353 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen</p> |
| Gefahrenhinweise für Australien | |
|  | <p>CMV-Kit-Kontrollen <i>Humanplasma 95 - 100 %</i> <i>Natriumazid 1 %</i></p> |
|  | <p>ACHTUNG H312 - Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt H412 - Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung EUH032 - Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase P273 - Freisetzung in die Umwelt vermeiden P280 – Augen-/Gesichtsschutz tragen</p> |
|  | <p>Target Enhancer-Reagenz (TER) <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 5 - 10 %</i></p> |
|  | <p>GEFAHR H302 - Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H314 - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen P303 + P361 + P353 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen</p> |
| | <p>Kit-Kalibrator <i>HEPES 15 - 20 %</i> <i>Lithiumhydroxid, Monohydrat 1 - 5 %</i> <i>Bernsteinsäure 1 - 5 %</i></p> <p>H312 - Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt H412 - Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung EUH032 - Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase P273 - Freisetzung in die Umwelt vermeiden P280 – Augen-/Gesichtsschutz tragen</p> |

Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien

A. Die folgende Tabelle zeigt die Lagerungsbedingungen und die Stabilität der Reagenzien, der Kontrollen und des Kalibrators.

| Reagenz | Lagerung im ungeöffneten Zustand | Offenes Kit (rekonstituiert) | |
|---|----------------------------------|------------------------------|---|
| | | Lagerung | Stabilität |
| qCMV Amplifikationsreagenz | 2 °C bis 8 °C | | |
| qCMV Amplifikationsrekonstitutionslösung | 2 °C bis 8 °C | 2 °C bis 8 °C | 30 Tage ^a |
| qCMV Enzymreagenz | 2 °C bis 8 °C | | |
| qCMV Lösung zur Enzymrekonstitution | 2 °C bis 8 °C | 2 °C bis 8 °C | 30 Tage ^a |
| qCMV Promotorreagenz | 2 °C bis 8 °C | | |
| qCMV Promotorekonstitutionslösung | 2 °C bis 8 °C | 2 °C bis 8 °C | 30 Tage ^a |
| qCMV Target-Capture-Reagenz | 2 °C bis 8 °C | 2 °C bis 8 °C | 30 Tage ^a |
| qCMV PCAL (Positivkalibrator) | -15 °C bis -35 °C | 15 °C bis 30 °C | Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden aufbrauchen |
| qCMV NC CONTROL – (Negativkontrolle) | -15 °C bis -35 °C | 15 °C bis 30 °C | Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden aufbrauchen |
| qCMV LPC CONTROL + (schwach positive Kontrolle) | -15 °C bis -35 °C | 15 °C bis 30 °C | Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden aufbrauchen |
| qCMV HPC CONTROL + (stark positive Kontrolle) | -15 °C bis -35 °C | 15 °C bis 30 °C | Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 24 Stunden aufbrauchen |
| qCMV Target-Enhancer-Reagenz | 15 °C bis 30 °C | 15 °C bis 30 °C | 30 Tage ^a |

^aWenn Reagenzien aus dem Panther System genommen werden, sind sie sofort wieder bei ihren jeweiligen Lagerungstemperaturen aufzubewahren.

- B. Alle unbenutzten und rekonstituierten Reagenzien, das Target-Capture-Reagenz (Target Capture Reagent, TCR) und das Target-Enhancer-Reagenz (Target Enhancer Reagent, TER) nach 30 Tagen oder nach Ablauf des Verfallsdatums der Hauptcharge (das frühere Datum ist ausschlaggebend) entsorgen.
- C. Im Panther System gelagerte Reagenzien sind im Gerät 96 Stunden stabil. Reagenzien können bis zu 8 Mal in das Panther System geladen werden. Das Laden von Reagenzien wird jedes Mal im Panther System-Protokoll vermerkt.
- D. Nach dem Auftauen des Kalibrators muss die Lösung klar sein, d. h., keine Trübungen oder Präzipitate aufweisen. Sicherstellen, dass sich die Niederschläge gelöst haben. Den Kalibrator nicht verwenden, wenn darin Gelbildung, Niederschlag oder eine Trübung vorhanden ist.
- E. Das gefriergetrocknete Promotorreagenz und das rekonstituierte Promotorreagenz sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern und für die Anwendung vorzubereiten.
- F. Das qCMV Target-Enhancer-Reagenz muss vor Gebrauch eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C erreichen.

Probenentnahme und -lagerung

Hinweis: Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös zu handhaben. Es sind allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.

Hinweis: Bei den Schritten, die eine Handhabung von Proben erfordern, darauf achten, dass es zu keiner Kreuzkontamination kommt. Benutztes Material ist beispielsweise so zu entsorgen, dass es nicht über geöffnete Röhrchen geführt wird.

Hinweis: Nur sekundäre Röhrchen aus Plastik werden für die Probenlagerung empfohlen.

Für die Plasmavorbereitung können in die folgenden Glas- oder Kunststoffröhrchen entnommene Vollblutproben verwendet werden:

- Röhrchen mit EDTA-Antikoagulanzen
- Plasmapräparationsröhrchen (PPTs)

A. Probenentnahme

1. Plasma: Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Plasma unter Einhaltung der Herstelleranweisungen für das jeweils verwendete Röhrchen vom Erythrozytenpellet trennen. Plasma kann in einem primären Röhrchen im Panther System getestet oder zuvor in ein sekundäres Röhrchen wie ein Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) überführt werden. Das Mindestvolumen an Plasma für primäre Entnahmeröhrchen beträgt bis zu 1200 µl für den Erhalt des Probenvolumens von 500 µl. Für sekundäre Röhrchen beträgt das Mindestvolumen 700 µl für den Erhalt des Probenvolumens von 500 µl. In der folgenden Tabelle sind die Anforderungen an das Totvolumen für jeden primären und sekundären Röhrchentyp angegeben.

| Röhrchen (Größe und Typ) | Totvolumen beim Panther-System |
|---|--------------------------------|
| Aptima Probenaliquotröhrchen (Sample Aliquot Tube; SAT) | 0,2 ml |
| 12 x 75 mm | 0,5 ml |
| 13 x 100 mm | 0,5 ml |
| 13 x 100 mm mit Gel | 0,3 ml |
| 16 x 100 mm mit Gel | 0,7 ml |

Wird der Test nicht sofort durchgeführt, kann das Plasma nach den nachstehenden Spezifikationen gelagert werden. Bei Überführung in ein sekundäres Röhrchen kann das Plasma bei -20 °C oder -70 °C eingefroren werden. Die Proben sollten höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Plasmaproben dürfen nicht in primären EDTA-Entnahmeröhrchen eingefroren werden.

2. Vollblut muss vor dem Test im Panther System mit vorgefüllten Röhrchen mit Vollblutverdünner vorbereitet werden. Nicht vorbereitete Vollblutproben sollten höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

B. Bedingungen für die Lagerung von Patientenproben

1. EDTA-Plasmaproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im primären Entnahmeröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- Im primären Entnahmeröhrchen oder sekundären Röhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- Im sekundären Röhrchen bis zu 60 Tage lang bei -20 °C bis -70 °C.

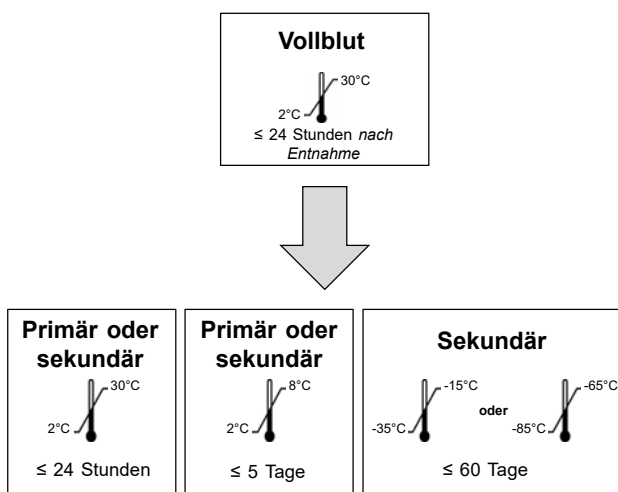


Abbildung 1. Bedingungen für die Lagerung von EDTA-Röhrchen

2. PPT-Patientenproben

Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Anschließend kann Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden:

- Im PPT bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C,
- im PPT bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
- im PPT bis zu 60 Tage lang bei -20 °C oder -70 °C.

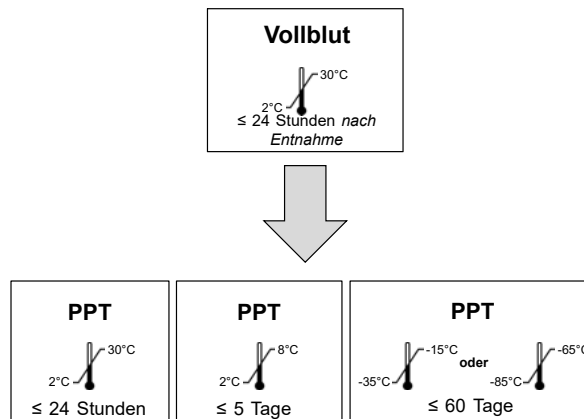


Abbildung 2. Bedingungen für die Lagerung von PPTs

3. Vollblutproben

Vollblut kann bei 15 °C bis 30 °C für bis zu 36 Stunden nach der Probenentnahme gelagert werden. Entnommenes Vollblut kann unter einer der folgenden Bedingungen gelagert werden:

- im primären Entnahmeröhrchen bei 2 °C bis 8 °C bis zu 5 Tage lang oder
- im primären Entnahmeröhrchen bis zu 60 Tage lang bei 20 °C bis 70 °C.

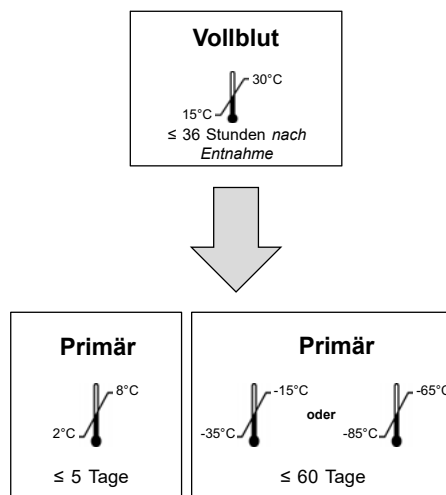


Abbildung 3. Bedingungen für die Lagerung von Vollblutproben

Im Panther System gelagerte Proben

Plasma und vorbereitete Vollblutproben können bis zu 8 Stunden lang unverschlossen im Panther System stehen gelassen werden. Solange die Gesamtverweildauer im System vor dem Pipettieren der Probe durch das Panther System 8 Stunden nicht übersteigt, können die Proben wieder aus dem Panther System genommen und getestet werden.

Transport von Patientenproben

Die unter *Probenentnahme und -lagerung* beschriebenen Lagerbedingungen für Proben müssen eingehalten werden.

Hinweis: Ein Versand der Patientenproben muss in Übereinstimmung mit geltenden nationalen, internationalen und regionalen Frachtbestimmungen erfolgen.

Panther System

Nachstehend sind die Reagenzien für den Aptima CMV Quant Assay für das Panther System gelistet. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben den Reagenzbezeichnungen angegeben.

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

Kit mit Aptima CMV Quant Assay, 100 Tests (Kat. Nr. PRD-05074)
(1 Assay-Box, 1 Kalibrator-Kit, 1 Kit mit Kontrollen und 1 Box mit Target Enhancer-Reagenz)

Aptima CMV Quant Assay-Box
(Lagerung bei 2 °C bis 8 °C nach Empfang)

| Symbol | Komponente | Menge |
|-------------|--|--------------|
| A | qCMV Amplifikationsreagenz <i>Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in gepufferter Lösung.</i> | 1 Fläschchen |
| E | qCMV Enzymreagenz <i>Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, getrocknet, in HEPES-gepufferter Lösung.</i> | 1 Fläschchen |
| PRO | qCMV Promotorreagenz <i>Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in gepufferter Lösung.</i> | 1 Fläschchen |
| AR | qCMV Amplifikationsrekonstitutionslösung <i>Wässrige Lösung mit Glycerol und Konservierungsmitteln.</i> | 1 x 7,2 ml |
| ER | qCMV Lösung zur Enzymrekonstitution <i>HEPES-gepufferte Lösung mit einer oberflächenaktiven Substanz und Glycerol.</i> | 1 x 5,8 ml |
| PROR | qCMV Promotorekonstitutionslösung <i>Wässrige Lösung mit Glycerol und Konservierungsmitteln.</i> | 1 x 4,5 ml |
| TCR | qCMV Target-Capture-Reagenz <i>Nukleinsäuren in einer gepufferten Salzlösung mit nicht-infektiösen Nukleinsäuren in der Festphase und einem internen Kalibrator.</i> | 1 x 72,0 ml |
| | Rekonstitutionsverbindungsstücke | 3 |
| | Barcode-Blatt für Hauptcharge | 1 Blatt |

Kit mit Aptima CMV Quant Calibrator(Kat. Nr. PRD-05075)
(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

| Symbol | Komponente | Menge |
|-------------|--|------------|
| PCAL | qCMV Positivkalibrator <i>Plasmid-DNA in gepufferter Lösung.</i> | 5 x 2,5 ml |
| | Barcode-Etikett des Kalibrators | — |

Kit mit Aptima CMV Quant-Kontrollen(Kat. Nr. PRD-05076)
(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

| Symbol | Komponente | Menge |
|--------|--|------------|
| NC | qCMV Negativkontrolle <i>CMV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i> | 5 x 0,8 ml |
| LPC | qCMV Schwach positive Kontrolle <i>Inaktiviertes CMV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i> | 5 x 0,8 ml |
| HPC | qCMV Stark positive Kontrolle <i>Inaktiviertes CMV-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2 % Natriumazid als Konservierungsmittel.</i> | 5 x 0,8 ml |
| | Barcode-Etikett der Kontrolle | — |

Aptima CMV Quant Target-Enhancer-Reagenz-Box
(Lagerung bei 15 °C bis 30 °C nach Empfang)

| Symbol | Komponente | Menge |
|--------|---|-------------|
| TER | qCMV Target-Enhancer-Reagenz <i>Konzentrierte Lithiumhydroxid-Lösung.</i> | 1 x 46,0 ml |

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Hinweis: Die von Hologic erhältlichen Materialien sind mit der Katalognummer aufgeführt, sofern nicht anders angegeben.

| Material | Kat.- Nr. |
|---|--|
| Panther™ System | — |
| Panther Durchlaufkit für Echtzeitassays (nur für Echtzeitassays) | PRD-03455 (5000 Tests) |
| <i>Aptima™ Assayflüssigkeitskit (auch als Universal-Flüssigkeitskit bezeichnet) enthält Aptima-Waschlösung, Aptima-Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit und Aptima-Ölreagenz</i> | 303014 (1000 Tests) |
| <i>Multi-Röhrchen-Einheiten (MTUs)</i> | 104772-02 |
| <i>Panther Entsorgungsbeutel-Kit</i> | 902731 |
| <i>Panther Abfallabdeckung</i> | 504405 |
| oder Panther System-Durchlaufkit (wenn Echtzeit- und Nicht-Echtzeit-TMA-Assays gleichzeitig laufen) enthält MTUs, Entsorgungsbeutel, Abfallabdeckungen, Auto Detect und Assayflüssigkeiten | 303096 (5000 Tests) |
| Röhrchen mit Vollblutverdünner (nur für die Vorbereitung von Vollblutproben) | PRD-06783 (100 vorgefüllte Röhrchen pro Beutel) |
| Spitzen, 1000 µl, leitfähig, zur Flüssigkeitsstandmessung | 10612513 (Tecan) |
| Bleichmittel, 5 %ige bis 7 %ige (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung | — |
| Nicht-durchstechbare Einweghandschuhe | — |
| Undurchlässige Ersatzkappen | 103036A |
| Hologic nicht-durchstechbare Ersatzkappen (Einweg-Röhrchenkappe für Vorbereitung von Vollblut) | PRD-06720 |
| Ersatzkappen für Reagenzien | |
| <i>Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz Rekonstitutionsflaschen</i> | <i>CL0041 (100 Kappen)</i> |
| <i>TCR-Flasche</i> | <i>CL0040 (100 Kappen)</i> |
| <i>TER-Flasche</i> | <i>903302 (100 Kappen)</i> |
| Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite | — |
| Fusselfreie Tücher | — |
| Pipette | — |
| Spitzen | — |
| Primäre Entnahmeröhrchen (EDTA und PPT) Optionen: | — |
| <i>13 mm x 100 mm</i> | |
| <i>13 mm x 75 mm</i> | |
| <i>16 mm x 100 mm</i> | |
| Zentrifuge | — |
| Vortex-Mischer | — |

Optionale Materialien

| Material | Kat.- Nr. |
|---|-----------|
| Optionen für sekundäre Röhrchen: | |
| 12 mm x 75 mm | — |
| 13 mm x 100 mm | — |
| 16 mm x 100 mm | — |
| <i>Aptima Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tubes, SAT) (100 St.)</i> | 503762 |
| Kappe für Transportröhrchen (100 St.) | 504415 |
| <i>Kappe für SAT</i> | |
| Aptima Probenverdünner | PRD-03003 |
| Aptima Probenverdünner-Kit | PRD-03503 |
| <i>enthält Aptima Probenverdünner, 100 SATs und 100 Kappen</i> | |
| Transferpipetten | — |
| Wattestäbchen | — |
| Wippschüttler für Röhrchen | — |

Testverfahren mit dem Panther System

Hinweis: Nähere Verfahrensinformationen finden Sie in der entsprechenden Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System.

A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

1. Die Arbeitsflächen, auf denen die Reagenzien vorbereitet werden, reinigen. Die Arbeitsflächen mit einer 2,5- bis 3,5 %igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung abwischen. Die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf den Flächen einwirken lassen. Diese anschließend mit entionisiertem Wasser abspülen. Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen. Die Labortischoberflächen mit sauberen, saugfähigen Labortischunterlagen mit Kunststoffrückseite abdecken.
2. Eine separate Arbeitsfläche, auf der die Proben vorbereitet werden, reinigen. Gehen Sie dabei wie vorstehend beschrieben vor (Schritt A.1).
3. Alle Pipetten reinigen. Gehen Sie bei der Reinigung wie vorstehend beschrieben vor (Schritt A.1).

B. Vorbereitung von Kalibrator und Kontrollen

Lassen Sie den Kalibrator und die Kontrollen vor der Verarbeitung eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C annehmen, indem Sie folgenderweise vorgehen:

1. Den Kalibrator und die Kontrollen aus der Lagerung (-15 °C bis -35 °C) entnehmen und bei 15 °C bis 30 °C platzieren. Jedes Röhrchen während des Auftauens zum gründlichen Mischen vorsichtig umdrehen. Darauf achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch vollständig aufgetaut ist.

Option. Die Röhrchen mit dem Kalibrator und den Kontrollen können auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung platziert werden, um ihren Inhalt gründlich zu mischen. Darauf achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch vollständig aufgetaut ist.

Hinweis: Beim Umdrehen des Kalibrators und der Kontrollen übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.

2. Wenn der Röhrcheninhalt aufgetaut ist, trocknen Sie das Röhrchen außen mit einem sauberen, trockenen Einwegtuch ab.
3. Zur Verhinderung einer Kontamination sollten Sie die Röhrchen zu diesem Zeitpunkt nicht öffnen.

C. Reagenzrekonstitution/Vorbereitung eines neuen Kits

Hinweis: Die Reagenzrekonstitution sollte vor dem Arbeiten mit dem Panther System durchgeführt werden.

1. Gehen Sie folgenderweise vor, um das Target Capture-Reagenz (TCR) vorzubereiten:
 - a. Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TCR-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.
 - b. Schütteln Sie die TCR-Flasche sofort kräftig 10 Mal. Lassen Sie die TCR-Flasche mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen. Während dieser Zeit sollten Sie das TCR-Fläschchen mindestens alle 10 Minuten schwenken und umdrehen.

Option. Das TCR-Fläschchen kann auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung folgenderweise vorbereitet werden: Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C) und schütteln Sie es sofort kräftig 10 Mal. Platzieren Sie die TCR-Flasche auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung und lassen Sie sie mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.
 - c. Vergewissern Sie sich vor dem Gebrauch, dass alle Präzipitate gelöst und die Magnetpartikel suspendiert sind.
2. Zum Rekonstituieren von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz gehen Sie folgenderweise vor:
 - a. Nehmen Sie die gefriergetrockneten Reagenzien und die entsprechenden Rekonstitutionslösungen aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Paaren Sie jede Rekonstitutionslösung mit ihrem gefriergetrockneten Reagenz.
 - b. Vergewissern Sie sich, dass das Etikett der Rekonstitutionslösung und das des gefriergetrockneten Reagenzes dieselbe Farbe aufweisen. Kontrollieren Sie die Chargennummern, um sicherzustellen, dass die richtigen Reagenzien miteinander gepaart werden.
 - i. Öffnen Sie das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz, indem Sie die Metallversiegelung und den Gummistopfen entfernen.
 - ii. Führen Sie das gekerbte Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks (schwarz) fest in das Fläschchen ein (Abbildung 4, Schritt 1).
 - iii. Die Flasche mit der entsprechenden Rekonstitutionslösung öffnen und den Verschluss auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche legen.
 - iv. Die Flasche mit der Rekonstitutionslösung auf eine stabile Fläche stellen (z. B. auf den Labortisch.) Drehen sich dann das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz über dem Fläschchen mit der Rekonstitutionslösung um und befestigen Sie das Verbindungsstück an dem Fläschchen mit Rekonstitutionslösung (Abbildung 4, Schritt 2).
 - v. Drehen Sie die zusammengefügte Gefäße langsam um, damit die Lösung in das Glasfläschchen laufen kann (Abbildung 4, Schritt 3).

- vi. Schwenken Sie die zusammengefügt Gefäße mindestens 10 Sekunden lang (Abbildung 4, Schritt 4).
- vii. Warten Sie mindestens 30 Minuten, damit das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gehen kann.
- viii. Nachdem das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gegangen ist, schwenken Sie die zusammengefügt Flaschen mindestens 10 Sekunden lang und mischen Sie anschließend die Lösung gründlich, indem Sie das Glasfläschchen leicht nach vorne und hinten kippen.
- c. Drehen Sie die zusammengefügt Flaschen dann wieder langsam um, damit die Lösung wieder komplett zurück in die Flasche der Rekonstitutionslösung fließen kann (Abbildung 4, Schritt 5).
- d. Entfernen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 4, Schritt 6).
- e. Die Flasche wieder verschließen. Die Initialen des Anwenders und das Rekonstitutionsdatum auf das Etikett schreiben (Abbildung 4, Schritt 7).
- f. Entsorgen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstück und das Glasfläschchen (Abbildung 5, Schritt 8).

Warnung: Bei der Rekonstitution von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.

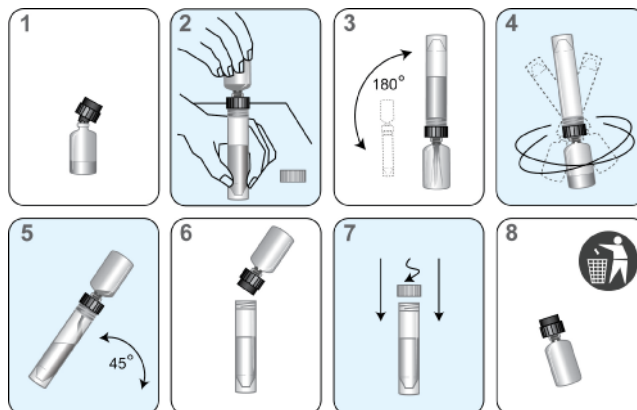


Abbildung 4. Rekonstitution von Reagenzien

- 3. Nehmen Sie das qCMV Target-Enhancer-Reagenz aus der Lagerung (15 °C bis 30 °C). Tragen Sie die Initialen des Bedieners und das Öffnungsdatum auf dem Etikett ein. Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TER-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.
- D. Reagenzienvorbereitung für bereits vorbereitete Reagenzien
- 1. Nehmen Sie die bereits angesetzten Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Bereits angesetzte Amplifikations-, Enzym-, Promoter- und TCR-Reagenzien müssen vor Beginn des Assays auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C gebracht werden.
 - 2. Nehmen Sie das TER aus der Lagerung (15 °C bis 30 °C).
 - 3. Bei bereits vorbereiteten TCR führen Sie vor dem Laden in das System den Schritt C.1 oben durch.

4. Vor dem Laden in das System müssen Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien zum gründlichen Mischen geschwenkt und umgedreht werden. Beim Umdrehen von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Option. Die zuvor vorbereiteten Reagenzien können auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung folgenderweise vorbereitet werden: Nehmen Sie die Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Platzieren Sie die Reagenzien auf einer geeigneten Wippe und lassen Sie sie mindestens 30 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.

5. Reagenzflaschen nicht nachfüllen. Das Panther System erkennt Flaschen, die nachgefüllt wurden, und nimmt sie nicht an.

E. Handhabung von Plasmaproben

1. Stellen Sie sicher, dass vorbereitete Proben in primären Röhrchen oder unverdünnte Proben in sekundären Röhrchen ordnungsgemäß entsprechend *Probenentnahme und -lagerung* gelagert wurden.
2. Vergewissern Sie sich, dass gefrorene Patientenproben ganz aufgetaut sind. Mischen Sie die aufgetauten Patientenproben gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
3. Bringen Sie die Patientenproben vor der Verarbeitung auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Siehe *Im Panther System gelagerte Proben* für zusätzliche Informationen zu im System gelagerten Proben.
4. Stellen Sie sicher, dass alle primären Entnahmeröhrchen bis zu 1200 µL Patientenprobe oder alle sekundären Röhrchen mindestens 700 µL Patientenprobe enthalten. In der unter *Probenentnahme* angeführten Tabelle finden Sie die Anforderungen an das Totvolumen für jeden primären und sekundären Röhrchentyp.
5. Zentrifugieren Sie jede Patientenprobe unmittelbar vor dem Laden in einen Probenständer 10 Minuten bei 1000 bis 3000g. Bei diesem Schritt nicht die Kappen entfernen.

Für Informationen zum Laden des Ständers und zum Abnehmen der Deckel siehe Schritt G.2 nachstehend.

F. Handhabung von Vollblutproben

1. Sicherstellen, dass nicht verarbeitete Patientenproben in primären Röhrchen ordnungsgemäß entsprechend *Probenentnahme und -lagerung* gelagert werden.
2. Vergewissern Sie sich, dass gefrorene Patientenproben ganz aufgetaut sind. Bringen Sie die Patientenproben vor der Verarbeitung auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Siehe *Im Panther System gelagerte Proben* für zusätzliche Informationen zu im System gelagerten Proben.
3. Drehen Sie die Röhrchen mit Vollblut mindestens 3 Mal vorsichtig um oder mischen Sie sie vorsichtig auf einer Schwenkvorrichtung, bis das Blut homogen ist.
4. Führen Sie vor der Probenvorbereitung für jede Patientenprobe das folgende Verfahren durch.
 - a. Das Blut in den primären Röhrchen sollte gründlich durch Umdrehen gemischt werden und die Probe sollte umgehend in das Röhrchen mit dem Vollblutverdünner überführt werden.
 - b. Geben Sie 500 µl der Vollblutprobe in das vorgefüllte Röhrchen mit Vollblutverdünner.
 - c. Setzen Sie die Kappe wieder auf und mischen Sie die Probe mindestens 5 Sekunden lang mit dem Vortex-Mischer.

Für Informationen zum Laden des Ständers und zum Abnehmen der Deckel siehe Schritt G.2 nachstehend.

G. Vorbereitung des Systems

1. Das System entsprechend den Anweisungen im *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Bedienungsanleitung für das Panther/Panther Fusion System)* und den *Verfahrenshinweise einrichten*. Achten Sie darauf, dass Reagenzienstände und TCR-Adapter geeigneter Größe verwendet werden.
2. Die Proben in den Probenstände laden. Führen Sie für jedes Probenröhrchen (Patientenproben und ggf. Kalibrator und Kontrollen) die folgenden Schritte durch:
 - a. Die Kappe eines Probenröhrchens lösen, aber noch nicht abnehmen.
Hinweis: *Besonders darauf achten, eine Kontamination durch Aerosolausbreitung zu vermeiden. Die Kappen der Proben vorsichtig lösen.*
 - b. Das Probenröhrchen in den Probenstände laden.
 - c. Wiederholen Sie die Schritte 2.a und 2.b für jede verbleibende Probe.
 - d. Wenn die Proben in den Probenstände geladen sind, die Kappen von allen Probenröhrchen abnehmen und werfen. Zur Vermeidung von Kontamination die Kappen nicht über einen Probenstände oder ein Probenröhrchen führen.
 - e. Ggf. eine neue Einweg-Transferpipette verwenden, um etwaige Luftblasen oder Schaum zu entfernen. Luftblasen im Röhrchen stören die Füllstandsmessung des Panther Systems.
 - f. Wenn die letzte Kappe entfernt wurde, laden Sie den Probenstände in ein Probenfach.
Hinweis: *Sichern Sie bei gleichzeitiger Analyse anderer Assays und Probentypen den Probenhalter, bevor Sie den Probenstände in ein Probenfach laden.*
 - g. Wiederholen Sie die Schritte 2.a bis 2.f für den nächsten Probenstände.

H. Vorbereitung des Systems – Anwenden des Vollblutproben-Umrechnungsfaktors

1. Das System entsprechend den Anweisungen in der Bedienungsanleitung für das Panther System (*Panther System Operator's Manual*) einrichten.
2. Probenstände laden.
3. Den Vollblut-Umrechnungsfaktor auf Assay-Testanforderungen für Vollblutproben anwenden.

Hinweis: *Der Vollblut-Umrechnungsfaktor kann auf einen ganzen Ständer oder eine einzelne Testanforderung angewendet werden.*

So kann der Vollblut-Umrechnungsfaktor auf einen ganzen Ständer mit Vollblutproben angewendet werden:

- a. Auf dem Bildschirm „*Laden von Probenständen*“ auf den auszuwählenden Ständer doppelklicken. Für den ausgewählten Ständer wird der Bildschirm *Laden von Probenständen* angezeigt.
- b. **Alle verdünnen** auswählen.
Das Fenster „Verdünnungsfaktor“ erscheint.

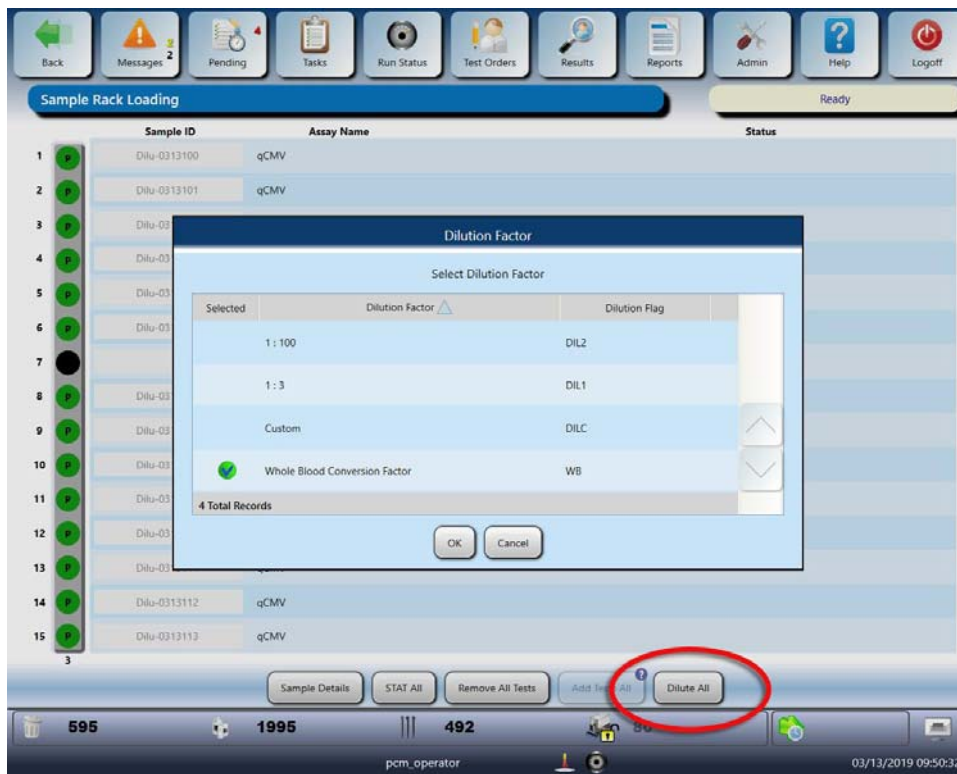


Abbildung 5. Das Fenster „Verdünnungsfaktor“ im Bildschirm „Probenständer laden“

- c. **Vollblut-Umrechnungsfaktor** auswählen.
- d. **OK** wählen.
Das Fenster *Verdünnungsfaktor für Probenständer einrichten* wird angezeigt.
- e. **Ja** auswählen, um die Vollblut-Umrechnungsfaktormarkierung auf den ganzen Ständer mit Vollblutproben anzuwenden.

So kann der Vollblut-Umrechnungsfaktor auf eine einzelne Testanforderung angewendet werden (z. B. bei der vierten Probe im Ständer, siehe folgende Abbildung):

- a. Im Bildschirm „*Probenständerfach*“ auf den geladenen Ständer doppelklicken, der die Zielproben enthält.
Für den ausgewählten Probenständer wird der Bildschirm *Laden von Probenständern* angezeigt.
- b. Auf dem Bildschirm *Sample Rack Loading* (Laden von Probenständern) auf die Patientenprobe(n) von Interesse doppelklicken.
Der Bildschirm *Probendetails* öffnet sich mit den aktuellen Testanforderungen für die ausgewählte Probe.
- c. Im Bereich *Test Orders* (Testanforderungen) die interessierende Testanforderung wählen.
- d. **Verdünnung anwenden** auswählen.

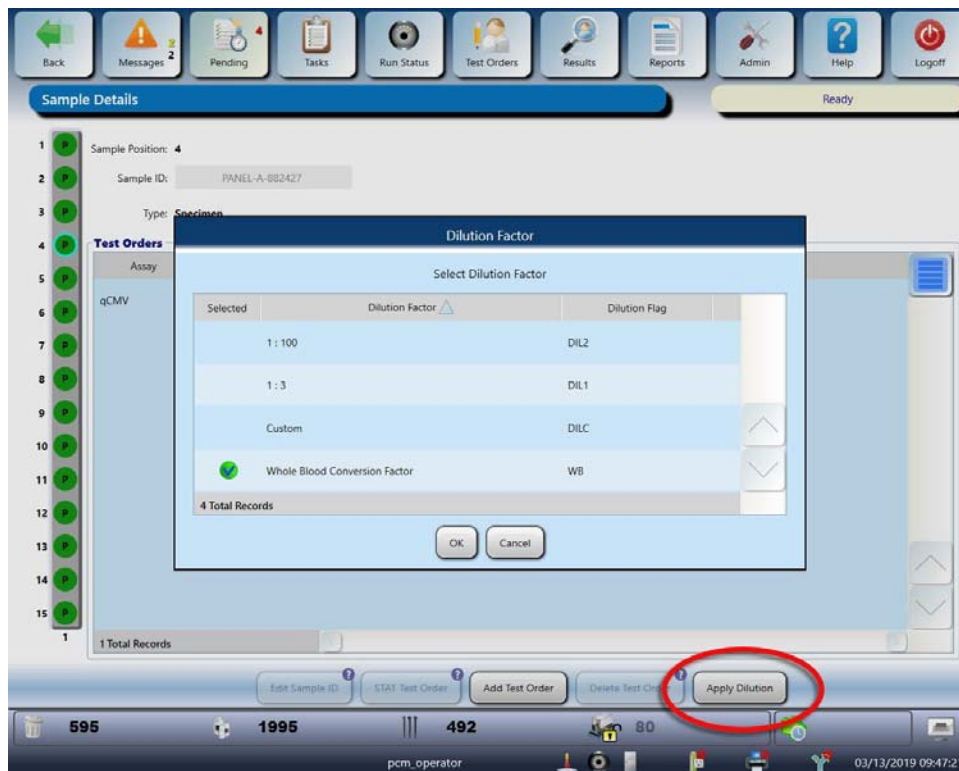


Abbildung 6. Das Fenster „Verdünnungsfaktor“ im Bildschirm „Probendetails“

- e. **Vollblut-Umrechnungsfaktor** auswählen.
 - f. **OK** wählen, um den Vollblut-Umrechnungsfaktor bei allen ausgewählten Testanforderungen anzuwenden.
4. Bei Bedarf kann der Vollblut-Umrechnungsfaktor vor Beginn der Verarbeitung aus Testanforderungen entfernt werden.

So kann der Vollblut-Umrechnungsfaktor aus einem gesamten Probenständer entfernt werden:

1. Auf dem Bildschirm „Laden von Probenständern“ auf den auszuwählenden Ständer doppelklicken.
Für den ausgewählten Ständer wird der Bildschirm *Laden von Probenständern* angezeigt.
2. **Alle verdünnen** auswählen.
3. Im Fenster *Verdünnungsfaktor* die Auswahl für **Vollblut-Umrechnungsfaktor** aufheben.
4. **OK** wählen.
Das Fenster *Verdünnungsfaktor für Probenständer einrichten* wird angezeigt.
5. **Ja** auswählen, um den Vollblut-Umrechnungsfaktor aus einem gesamten Probenständer zu entfernen.

So kann der Vollblut-Umrechnungsfaktor aus Assay-Testanforderungen entfernt werden:

1. Im Bildschirm „Probenständerfach“ auf den geladenen Ständer doppelklicken, der die Zielproben enthält.

Für den ausgewählten Probenständer wird der Bildschirm *Laden von Probenständern* angezeigt.

2. Auf dem Bildschirm *Sample Rack Loading* (Laden von Probenständern) auf die Patientenprobe(n) von Interesse doppelklicken.

Im Bildschirm *Probendetails* werden die aktuellen Testanforderungen für die ausgewählte Probe angezeigt.

3. Im Bereich *Test Orders* (Testanforderungen) die interessierende Testanforderung wählen.
4. „**Verdünnung anwenden**“ wählen.
5. Im Fenster *Verdünnungsfaktor* die Auswahl für **Vollblut-Umrechnungsfaktor** aufheben.
6. **OK** auswählen, um den Vollblut-Umrechnungsfaktor aus der Testanforderung zu löschen.

Verfahrenshinweise

A. Kalibrator und Kontrollen

1. Der qCMV-Positivkalibrator, die Röhren mit der qCMV schwach positiven, der qCMV stark positiven und der negativen qCMV-Kontrolle können in jede Position im Probenständer und in jede Probenfach-Bahn im Panther System geladen werden. Die Pipettierung der Proben beginnt, wenn eine der beiden folgenden Bedingungen erfüllt ist:
 - a. Der Kalibrator und die Kontrollen werden derzeit vom System verarbeitet.
 - b. Gültige Ergebnisse für die Kalibratoren und Kontrollen werden auf dem System registriert.
2. Sobald der Kalibrator und die Röhren mit den Kontrollen pipettiert worden sind und mit dem Aptima CMV Quant Assay-Reagenzien-Kit verarbeitet werden, können bis zu 24 Stunden lang Patientenproben mit dem zugehörigen rekonstituierten Kit getestet werden, **es sei denn**:
 - a. Die Kalibrator- oder Kontrollenergebnisse sind ungültig.
 - b. Das zugehörige Assay-Reagenzien-Kit aus dem System genommen wird.
 - c. Das zugehörige Assay-Reagenzien-Kit die Stabilitätsgrenze überschritten hat.
3. Das Kalibrator- und alle Kontrollenröhren können einmal verwendet werden. Wenn versucht wird, mehr als einmal aus dem Röhren zu pipettieren, kann es zu Verarbeitungsfehlern kommen.

B. Handschuhpuder

Wie bei jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhren verursachen. Es werden ungepuderte Handschuhe empfohlen.

Qualitätskontrolle

Ein Lauf- oder Patientenprobenergebnis kann von einem Anwender für ungültig erklärt werden, wenn während der Durchführung des Assays technische, anwender- oder gerätebezogene Probleme aufgetreten sind und dokumentiert wurden. In diesem Fall müssen die Proben erneut getestet werden.

Patientenproben mit ungültigen Ergebnissen müssen erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

Assay-Kalibrierung

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss eine Assay-Kalibrierung durchgeführt worden sein. Ein einzelner Positivkalibrator wird jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit in das Panther System geladen wird, dreimal analysiert. Sobald festgelegt ist, die Kalibrierung bis zu 24 Stunden gültig. Der Anwender wird von der Software des Panther Systems darauf aufmerksam gemacht, wenn eine Kalibration erforderlich ist. Der Anwender scannt einen Kalibrierungskoeffizienten, der auf jedem Reagenzien-Kit beiliegenden Master-Lot-Barcodeblatt angegeben ist.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme des Kalibrators von der Software des Panther Systems automatisch verifiziert. Wenn weniger als zwei Kalibratorreplikate gültig sind, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Negativ- und Positivkontrollen

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss ein Satz von Assay-Kontrollen getestet werden. Ein Replikat der Negativkontrolle, der schwach positiven Kontrolle und der stark positiven Kontrollen muss jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit in das Panther System geladen wird, getestet werden. Sobald festgelegt sind, die Kontrollen bis zu 24 Stunden gültig. Der Anwender wird von der Panther System-Software darauf aufmerksam gemacht, wenn Kontrollen erforderlich sind.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme der Kontrollen von der Panther System-Software automatisch verifiziert. Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss die Negativkontrolle ein Ergebnis „Nicht nachgewiesen“ liefern und die Ergebnisse der Positivkontrollen müssen innerhalb vordefinierter Parameter liegen. Wenn das Ergebnis für eine der Kontrollen ungültig ist, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Interner Kalibrator/Interne Kontrolle

Jede Probe enthält einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (IC). Während der Verarbeitung werden IC-Akzeptanzkriterien von der Software des Panther Systems automatisch verifiziert. Wenn ein IC-Ergebnis ungültig ist, wird das Probenergebnis für ungültig erklärt. Jede Probe mit ungültigem IC-Ergebnis muss erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

Die Software des Panther Systems dient zur genauen Verifizierung der Prozesse, wenn Verfahren gemäß den Anweisungen in der Packungsbeilage und im *Panther/PantherFusion System Operator's Manual (Bedienungsanleitung für das Panther System)* durchgeführt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Das Panther System bestimmt die Konzentration der CMV-DNA in Patientenproben und in Kontrollen automatisch, indem es die Ergebnisse mit einer Kalibrationskurve vergleicht. CMV-DNA-Konzentrationen werden in IU/ml und \log_{10} IU/ml angegeben. In Tabelle 1 und Tabelle 2 ist die Ergebnisauswertung gezeigt.

Tabelle 1: Interpretation der Plasma-Ergebnisse

| Angegebenes Aptima CMV Quant Assay-Ergebnis | | Auswertung |
|---|-----------------------------|--|
| IU/ml | \log_{10} -Wert | |
| Nicht nachgewiesen | Nicht nachgewiesen | CMV-DNA nicht nachgewiesen |
| < 53 nachgewiesen | < 1,72 | Es wird CMV-DNA nachgewiesen, aber unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ). |
| 53 bis 10,000,000 | 1,72 bis 7,00 | Die CMV-DNA-Konzentration liegt im quantitativen Bereich von LLoQ bis ULoQ IU/ml |
| > 10.000.000 | > 7,00 | Die CMV-DNA-Konzentration liegt über der Quantifizierungsgrenze (ULoQ). |
| Ungültig^a | Ungültig^a | Bei der Bestimmung ist ein Fehler aufgetreten. Die Probe sollte noch einmal getestet werden. |

^aUngültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Tabelle 2: Interpretation der Vollblut-Ergebnisse

| Angegebenes Aptima CMV Quant Assay-Ergebnis | | Auswertung |
|---|-----------------------------|--|
| IU/ml | \log_{10} -Wert | |
| Nicht nachgewiesen | Nicht nachgewiesen | CMV-DNA nicht nachgewiesen |
| < 176 nachgewiesen | < 2,24 | Es wird CMV-DNA nachgewiesen, aber unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ). |
| 176 bis 10.000.000 | 2,24 bis 7,00 | Die CMV-DNA-Konzentration liegt im quantitativen Bereich von LLoQ bis ULoQ IU/ml |
| > 10.000.000 | > 7,00 | Die CMV-DNA-Konzentration liegt über der Quantifizierungsgrenze (ULoQ). |
| Ungültig^a | Ungültig^a | Bei der Bestimmung ist ein Fehler aufgetreten. Die Probe sollte noch einmal getestet werden. |

^aUngültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Einschränkungen

- A. Dieser Test darf nur von Mitarbeitern durchgeführt werden, die im Verfahren unterwiesen wurden. Eine Nichtbefolgung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben.
- B. Zuverlässige Ergebnisse hängen von der korrekten Entnahme, dem Transport, der Lagerung und der Verarbeitung der Patientenproben ab.
- C. Es besteht die seltene Möglichkeit, dass Mutationen in den hoch konservierten Regionen des Virusgenoms, an die die Primer und/oder Sonden im Aptima CMV Quant Assay binden, den Assay stören und so das Virus zu gering quantifiziert oder sogar überhaupt nicht nachgewiesen wird.

Performance

Detektionsgrenze mit dem 1. internationalen WHO-Standard

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Assays ist definiert als die CMV-DNA-Konzentration, die gemäß CLSI EP17-A2 mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95 % festgestellt wird.¹⁴

Nachweisgrenze mit den WHO-Standards in Plasma

Die LoD wurde bestimmt durch Testung von Panels des 1. internationalen WHO-Standards (NIBSC-Code 09/162) für CMV²¹, die in CMV-negativem Humanplasma verdünnt wurden. 60 Replikate jeder Verdünnung wurden mit je drei Reagenzchargen getestet, was je Verdünnung insgesamt 180 Replikate ergab. Zur Aufstellung der vorhergesagten Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 3 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze. Die LoD für den Aptima CMV Quant Assay mit dem 1. internationalen WHO-Standard beträgt 40,7 IU/ml für Plasma.

Tabelle 3: Nachweisgrenze in Plasma mit dem 1. internationalen WHO-Standard für CMV

| Vorhergesagte Nachweisgrenze | Konzentration (IU/ml) |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 10 % | 1,9 |
| 20 % | 2,9 |
| 30 % | 4,0 |
| 40 % | 5,3 |
| 50 % | 6,9 |
| 60 % | 9,1 |
| 70 % | 12,2 |
| 80 % | 17,1 |
| 90 % | 27,5 |
| 95 % | 40,7 |

Nachweisgrenze mit den WHO-Standards in Vollblut

Die LoD wurde bestimmt durch Testung von Panels des 1. internationalen WHO-Standards für CMV, die in CMV-negativem Vollplasma verdünnt wurden. 60 Replikate jeder Verdünnung wurden mit je drei Reagenzchargen getestet, was je Verdünnung insgesamt 180 Replikate ergab. Zur Aufstellung der vorhergesagten Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Bei den in Tabelle 4 dargestellten LoD-Werten handelt es sich um die Ergebnisse der Reagenzchargen mit der höchsten vorhergesagten Nachweisgrenze. Die LoD für den Aptima CMV Quant Assay mit dem 1. internationalen WHO-Standard beträgt 131,0 IU/ml für Vollblut.

Tabelle 4: Nachweisgrenze für Vollblut mit dem 1. internationalen WHO-Standard für CMV

| Vorhergesagte Nachweisgrenze | Konzentration (IU/ml) |
|------------------------------|-----------------------|
| 10 % | 8,8 |
| 20 % | 13,2 |
| 30 % | 17,7 |
| 40 % | 22,7 |
| 50 % | 28,7 |
| 60 % | 36,2 |
| 70 % | 46,5 |
| 80 % | 62,4 |
| 90 % | 93,7 |
| 95 % | 131,0 |

Nachweisgrenze für CMV-Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen

Nachweisgrenze für CMV-Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen in Plasma

Die LoD wurde für drei unterschiedliche Genotypen auf Grundlage einer Glykoprotein-B-Sequenz⁷ (gB-2, gB-3 und gB-4) sowie arzneimittelresistenter Mutationen durch Testung verschiedener CMV-Konzentrationen im Bereich der etablierten Nachweisgrenze für Plasma mit dem WHO-Standard (Genotyp gB.1) verifiziert. Die Testung wurde mit 30 Replikaten pro Panelprobe pro Reagenzcharge mit zwei Chargen von Aptima CMV Quant-Reagenzien durchgeführt. Die höchste verifizierte LoD für alle drei Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen war 40 IU/ml mit beiden Reagenzchargen.

Hinweis: Die Leistung des Aptima CMV Quant Assays mit arzneimittelresistenten Mutationen des Cytomegalovirus wurde nur für Plasma-Patientenproben beurteilt.

Tabelle 5: Nachweisgrenze für CMV-Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen in Plasma

| Genotyp | Konzentration (IU/ml) |
|--|-----------------------|
| gB-2 | 40 |
| gB-3 | 40 |
| gB-4 | 35 |
| Arzneimittelresistente Mutation UL54 und UL97* | 35 |
| Arzneimittelresistente Mutation UL56** | 35 |

*UL54-Genmutationen können zu Kreuzresistenzen mit verschiedenen antiviralen Wirkstoffen für die Behandlung einer CMV-Infektion führen, z. B. Ganciclovir (GVC), Cidofovir (CDV) und Foscarnet (PFA). UL97-Genmutationen führen außerdem zu einer Resistenz gegen Ganciclovir (GVC).

**UL56-Genmutationen führen zu einer Resistenz gegen Letemovir (LET).

Die Gesamt-LoD in Plasma beträgt 40,7 IU/ml.

Nachweisgrenze bei CMV-Genotypen in Vollblut

Die LoD wurde für drei unterschiedliche Glykoprotein-B-Genotypen (gB-2, gB-3 und gB-4) durch Testung verschiedener CMV-Konzentrationen im Bereich der etablierten LoD für Vollblut mit dem WHO-Standard für CMV (Genotyp gB.1) verifiziert. Die Testung wurde mit 30 Replikaten pro Panelprobe pro Reagenzcharge mit zwei Chargen von Aptima CMV Quant-Reagenzien durchgeführt. Die höchste verifizierte LoD für alle drei Genotypen war 150 IU/ml mit beiden Reagenzchargen.

Tabelle 6: Nachweisgrenze bei CMV-Genotypen in Vollblut

| Genotyp | Konzentration (IU/ml) |
|----------------|------------------------------|
| gB-2 | 150 |
| gB-3 | 150 |
| gB-4 | 130 |

Die Gesamt-LoD in Vollblut beträgt 150 IU/ml.

Linearer Bereich

Linearer Bereich in Plasma

Der lineare Bereich wurde durch Testung von CMV-Panels etabliert, die gemäß CLSI EP06-A in CMV-negativem Humanplasma verdünnt wurden.¹⁵ Die Panels variierten zwischen Konzentrationen von 1,62 log IU/ml und 7,30 log IU/ml. Der Aptima CMV Quant Assay zeigte über den gesamten Testbereich Linearität. Die obere Quantifizierungsgrenze (ULoQ) des Assays beträgt 7 log IU/ml, wie in Abbildung 7 dargestellt.

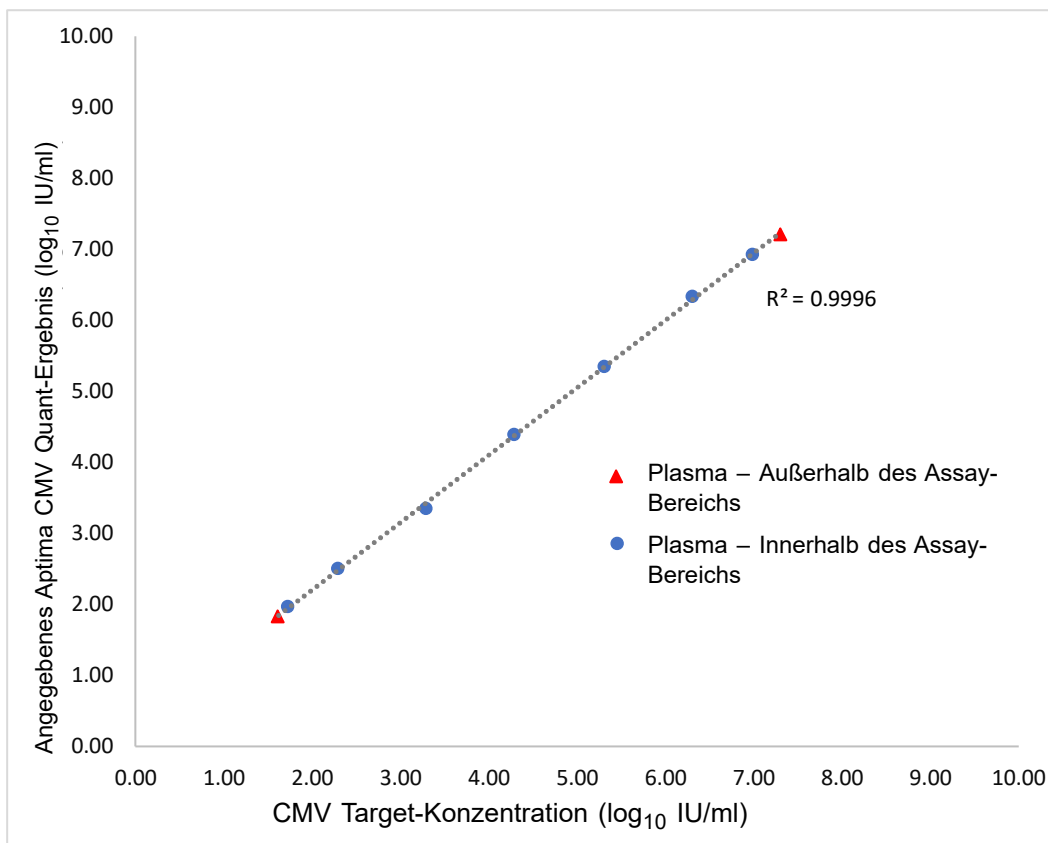


Abbildung 7. Linearität in Plasma

Linearer Bereich in Vollblut

Der lineare Bereich wurde durch Testung von CMV-Panels etabliert, die gemäß CLSI EP06-A in CMV-negativem menschlichem Vollblut verdünnt wurden.¹⁵ Die Panels variierten zwischen Konzentrationen von 2,15 log IU/ml und 7,3 log IU/ml für Vollblut. Der Aptima CMV Quant Assay zeigte über den gesamten Testbereich Linearität. Die obere Quantifizierungsgrenze (ULoQ) des Assays beträgt 7 log IU/ml, wie in Abbildung 8 dargestellt.

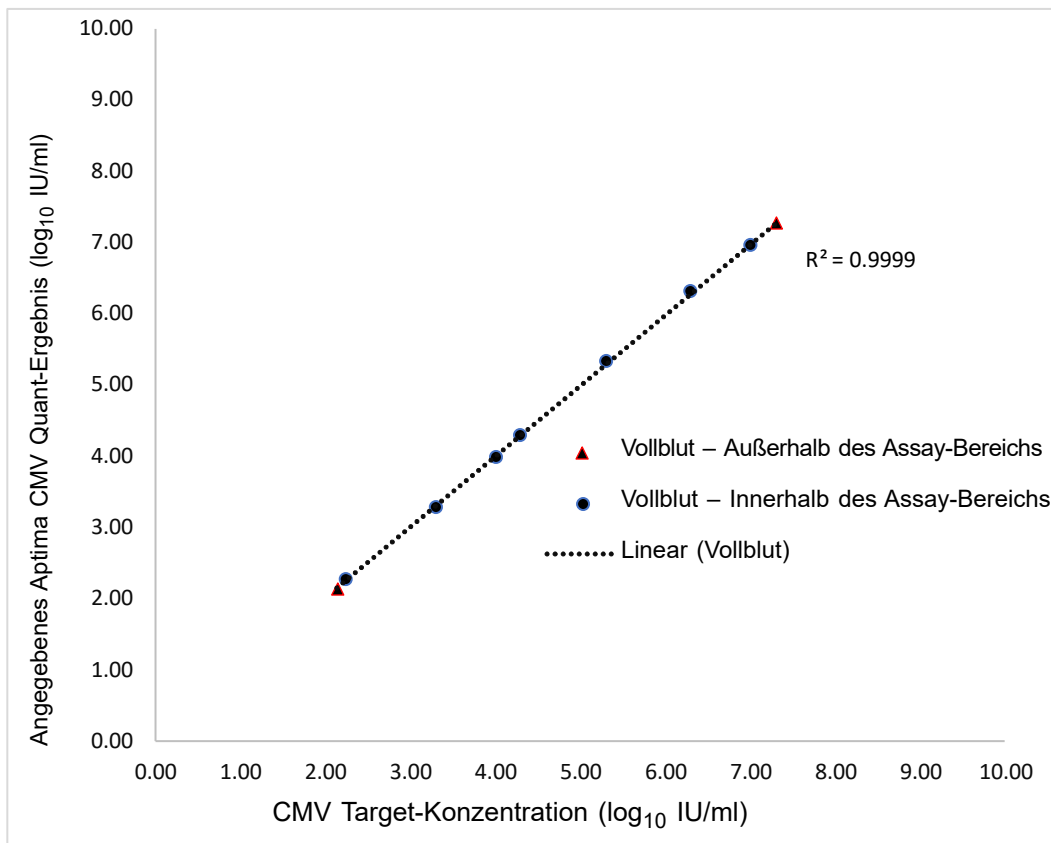


Abbildung 8. Linearität in Vollblut

Linearität bei CMV-Genotypen

Linearität bei CMV-Genotypen Plasma

Die Linearität für die Glykoprotein-Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 wurde durch Testung von CMV-Panels verifiziert, die in CMV-negativem Plasma bei Konzentrationen zwischen 1,72 log IU/ml und 7,00 log IU/ml verdünnt wurden. Über den gesamten Bereich wurde Linearität für alle getesteten Genotypen aufgezeigt, wie in Abbildung 9 dargestellt.

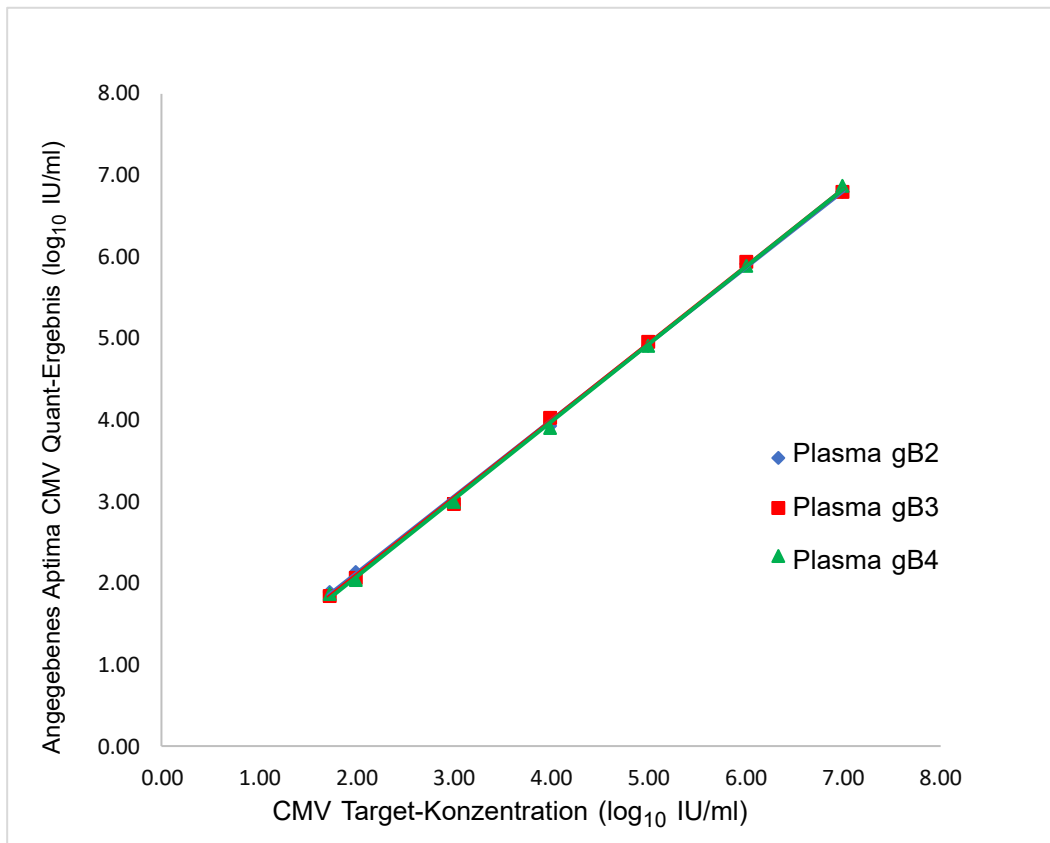


Abbildung 9. Linearität bei den CMV-Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 in Plasma

Linearität bei CMV-Genotypen Vollblut

Das lineare Ansprechen für die Glykoprotein-Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 wurde durch Testung von CMV-Panels verifiziert, die in CMV-negativem Vollblut bei Konzentrationen zwischen 2,25 log IU/ml und 7,00 log IU/ml verdünnt wurden. Über den gesamten Bereich wurde Linearität für alle drei getesteten Genotypen aufgezeigt, wie in Abbildung 10 dargestellt.

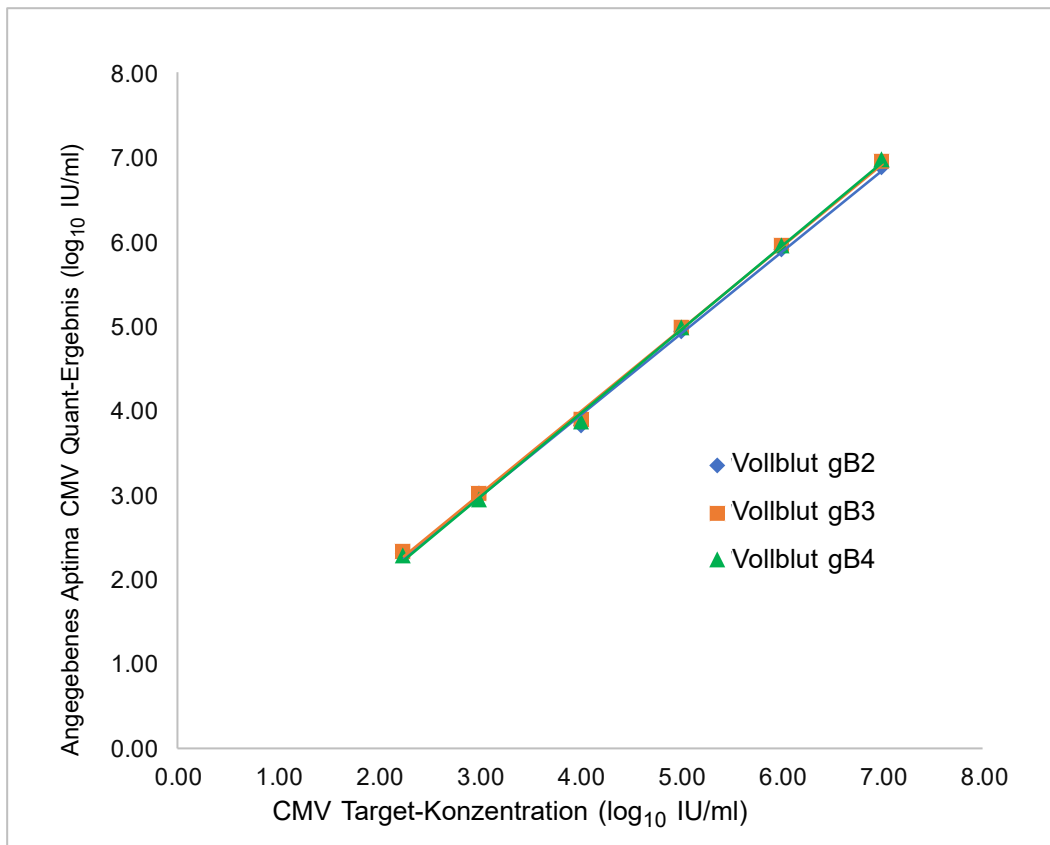


Abbildung 10. Linearität bei den CMV-Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 in Vollblut

Untere Quantifizierungsgrenze unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLoQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der CMV-DNA innerhalb eines Gesamtfehlers (Total Error, TE) zuverlässig gemäß CLSI EP17-A2 quantifiziert werden kann.¹⁴ Der Gesamtfehler wurde unter Verwendung des Westgard-Modells geschätzt: Gesamtfehler (TE) = |Abweichung| + 2 SAT. Zur Gewährleistung der Genauigkeit der Messungen wurde für den Gesamtfehler des Aptima CMV Quant Assays 1 log IU/ml festgelegt (d. h. bei der LLoQ ist eine Differenz von mehr als 1 log IU/ml zwischen zwei Messungen statistisch signifikant).

Untere Quantifizierungsgrenze unter Verwendung des WHO-Standards in Plasma

Die LLoQ wurde bestimmt durch Testung von Panels des 1. internationalen WHO-Standards (NIBSC-Code 09/162, Genotyp gB-1) für CMV-DNA, die in CMV-negativem Humanplasma verdünnt wurde. 60 Replikate jeder Verdünnung wurden mit je drei Reagenzchargen getestet, was je Verdünnung insgesamt 180 Replikate ergab. Die LLoQ-Ergebnisse für die drei Reagenzchargen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration, die die TE-Anforderungen und $\geq 95\%$ Detektion erfüllen, sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die mit dem 1. internationalen WHO-Standard generierte LLoQ für CMV in Plasma beträgt 53 IU/ml.

Tabelle 7: Bestimmung der LLoQ unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards für CMV in verdünntem Plasma

| Reagenzcharge | N | N nachgewiesen | Target-Konzentration | Aptima CMV Quant | SAT | [Abweichung] | Berechneter TE |
|---------------|----|----------------|----------------------|------------------|-------------|--------------|----------------|
| | | | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) |
| 1 | 60 | 56 | 1,48 | 1,64 | 0,36 | 0,16 | 0,87 |
| | 60 | 59 | 1,54 | 1,72 | 0,29 | 0,18 | 0,76 |
| | 60 | 59 | 1,60 | 1,74 | 0,28 | 0,14 | 0,70 |
| | 60 | 59 | 1,70 | 1,85 | 0,19 | 0,15 | 0,53 |
| 2 | 60 | 56 | 1,48 | 1,56 | 0,29 | 0,09 | 0,67 |
| | 60 | 58 | 1,54 | 1,61 | 0,27 | 0,07 | 0,60 |
| | 60 | 58 | 1,60 | 1,69 | 0,28 | 0,09 | 0,64 |
| 3 | 60 | 60 | 1,70 | 1,83 | 0,24 | 0,14 | 0,62 |
| | 60 | 56 | 1,48 | 1,67 | 0,26 | 0,19 | 0,71 |
| | 60 | 58 | 1,54 | 1,67 | 0,24 | 0,13 | 0,60 |
| | 60 | 60 | 1,60 | 1,78 | 0,19 | 0,18 | 0,55 |
| | 60 | 60 | 1,70 | 1,87 | 0,22 | 0,17 | 0,61 |

SAT = Standardabweichung

Panelproben, die das Genauigkeitsziel (TE ≤ 1) und $\geq 95\%$ Detektion für die Reagenzchargen 1, 2 und 3 erfüllen, sind grau unterlegt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der LLoQ für Plasma unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards für CMV

| Reagenzcharge | (IU/ml) | (log IU/ml) |
|---------------|---------|-------------|
| 1 | 53 | 1,72 |
| 2 | 41 | 1,61 |
| 3 | 47 | 1,67 |

Untere Quantifizierungsgrenze unter Verwendung des WHO-Standards in Vollblut

Die LLoQ wurde bestimmt durch Testung von Panels des 1. internationalen WHO-Standards für CMV-DNA, die in CMV-negativem menschlichem Vollblut verdünnt wurden. 60 Replikate jeder Verdünnung wurden mit je drei Reagenzchargen getestet, was je Verdünnung insgesamt 180 Replikate ergab. Die Ergebnisse für die drei Reagenzchargen sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration, die die TE-Anforderungen und $\geq 95\%$ Detektion erfüllen, sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die mit dem 1. internationalen WHO-Standard generierte LLoQ für CMV in Vollblut beträgt 176 IU/ml.

Tabelle 9: Bestimmung der LLoQ unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards für CMV in verdünntem Vollblut

| Reagenzcharge | N | N nachgewiesen | Target-Konzentration | Aptima CMV Quant | SAT | [Abweichung] | Berechneter TE |
|---------------|----|----------------|----------------------|------------------|-------------|--------------|----------------|
| | | | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) |
| 1 | 60 | 58 | 2,11 | 2,06 | 0,47 | 0,06 | 1,00 |
| | 60 | 59 | 2,16 | 2,04 | 0,51 | 0,12 | 1,14 |
| | 60 | 60 | 2,20 | 2,14 | 0,44 | 0,06 | 0,94 |
| | 60 | 59 | 2,24 | 2,28 | 0,26 | 0,04 | 0,56 |
| 2 | 60 | 60 | 2,11 | 2,02 | 0,42 | 0,09 | 0,93 |
| | 60 | 60 | 2,16 | 2,12 | 0,26 | 0,04 | 0,56 |
| | 60 | 59 | 2,20 | 2,14 | 0,30 | 0,07 | 0,67 |
| | 60 | 60 | 2,24 | 2,26 | 0,26 | 0,02 | 0,53 |
| 3 | 60 | 59 | 2,11 | 2,25 | 0,43 | 0,13 | 1,00 |
| | 60 | 59 | 2,16 | 2,34 | 0,27 | 0,18 | 0,72 |
| | 60 | 60 | 2,20 | 2,38 | 0,30 | 0,17 | 0,77 |
| | 60 | 60 | 2,24 | 2,39 | 0,30 | 0,15 | 0,74 |

SAT = Standardabweichung

Panelproben, die das Genauigkeitsziel ($TE \leq 1$) und $\geq 95\%$ Detektion für die Reagenzchargen 1, 2 und 3 erfüllen, sind schattiert.

Tabelle 10: Zusammenfassung der LLoQ für Vollblut unter Verwendung des 1. internationalen WHO-Standards für CMV

| Reagenzcharge | (IU/ml) | (log IU/ml) |
|---------------|---------|-------------|
| 1 | 138 | 2,14 |
| 2 | 106 | 2,02 |
| 3 | 176 | 2,25 |

Bestimmung der unteren Qualifizierungsgrenze bei CMV-Genotypen und arzneimittelresistenten Mutationen

Untere Quantifizierungsgrenze für Genotypen und arzneimittelresistente Mutationen in Plasma

Die unter Verwendung des WHO-Standards etablierte LLoQ wurde durch Testung der CMV-Genotypen gB-2, gB-3, gB-4 und arzneimittelresistenter Mutationen in CMV-negativem Humanplasma verifiziert. Es wurden 60 Replikate jeder Panelprobe mit einer Reagenzcharge getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Die berechnete LLoQ für die Genotypen gB-2, gB-3, gB-4 und arzneimittelresistenter Mutationen aus der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration, die die TE-Anforderungen und $\geq 95\%$ Detektion erfüllt, ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Gesamt-LLoQ für Plasma in diesem Assay beträgt 53 IU/ml.

Hinweis: Die Leistung des Aptima CMV Quant Assays mit arzneimittelresistenten Mutationen des Cytomegalovirus wurde nur für Plasma-Patientenproben beurteilt.

Tabelle 11: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen und arzneimittelresistenten Mutationen in Plasma

| Genotyp | N | % Nachgewiesen | Target- Konzentration (log ₁₀ IU/ml) | Aptima CMV Quant (log ₁₀ IU/ml) | SAT (log ₁₀ IU/ml) | [Abweichung] (log ₁₀ IU/ml) | Berechneter TE (log ₁₀ IU/ml) |
|---------|----|-------------------|---|--|----------------------------------|---|---|
| gB-2 | 60 | 93,3 | 1,48 | 1,38 | 0,41 | 0,10 | 0,92 |
| | 60 | 96,7 | 1,54 | 1,39 | 0,39 | 0,16 | 0,95 |
| | 60 | 93,3 | 1,60 | 1,49 | 0,38 | 0,11 | 0,87 |
| | 60 | 96,7 | 1,65 | 1,70 | 0,24 | 0,04 | 0,51 |
| | 60 | 95,0 | 1,70 | 1,54 | 0,32 | 0,16 | 0,80 |
| gB-3 | 60 | 91,7 | 1,48 | 1,27 | 0,38 | 0,20 | 0,97 |
| | 60 | 91,7 | 1,54 | 1,27 | 0,40 | 0,27 | 1,07 |
| | 60 | 88,3 | 1,60 | 1,31 | 0,47 | 0,29 | 1,23 |
| | 60 | 93,3 | 1,65 | 1,46 | 0,34 | 0,20 | 0,88 |
| | 60 | 91,7 | 1,70 | 1,57 | 0,29 | 0,13 | 0,71 |
| | 60 | 98,3 | 1,74 | 1,55 | 0,30 | 0,19 | 0,79 |

Tabelle 11: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen und arzneimittelresistenten Mutationen in Plasma

| Genotyp | N | % Nachgewiesen | Target- Konzentration | Aptima CMV Quant | SAT | [Abweichung] | Berechneter TE |
|---|----|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | (log ₁₀ IU/ml) | (log ₁₀ IU/ml) | (log ₁₀ IU/ml) | (log ₁₀ IU/ml) | (log ₁₀ IU/ml) |
| gB-4 | 60 | 96,7 | 1,48 | 1,38 | 0,39 | 0,09 | 0,88 |
| | 60 | 98,3 | 1,54 | 1,51 | 0,33 | 0,03 | 0,69 |
| | 60 | 95,0 | 1,60 | 1,66 | 0,36 | 0,06 | 0,79 |
| | 60 | 98,3 | 1,65 | 1,66 | 0,29 | 0,01 | 0,59 |
| | 60 | 100,0 | 1,70 | 1,70 | 0,24 | 0,00 | 0,48 |
| Arzneimittel- resistente Mutation (UL54 und UL97) | 60 | 95,0 | 1,48 | 1,57 | 0,32 | 0,10 | 0,74 |
| | 60 | 98,3 | 1,54 | 1,58 | 0,32 | 0,04 | 0,68 |
| | 60 | 98,3 | 1,60 | 1,72 | 0,33 | 0,12 | 0,79 |
| | 60 | 100,0 | 1,65 | 1,74 | 0,22 | 0,08 | 0,51 |
| | 60 | 100,0 | 1,70 | 1,83 | 0,24 | 0,14 | 0,61 |
| Arzneimittel- resistente Mutation (UL56) | 60 | 95,0 | 1,48 | 1,54 | 0,28 | 0,07 | 0,64 |
| | 60 | 96,7 | 1,54 | 1,60 | 0,30 | 0,06 | 0,65 |
| | 60 | 100,0 | 1,60 | 1,69 | 0,26 | 0,08 | 0,60 |
| | 60 | 100,0 | 1,65 | 1,78 | 0,29 | 0,12 | 0,71 |
| | 60 | 100,0 | 1,70 | 1,74 | 0,27 | 0,05 | 0,58 |

SAT = Standardabweichung

Panelproben, die das Genauigkeitsziel (TE ≤ 1) und ≥ 95 % Detektion für die Reagenzchargen 1, 2 und 3 erfüllen, sind grau unterlegt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der LLoQ bei Genotypen und arzneimittelresistenten Mutationen in Plasma

| Genotyp | LLoQ | |
|---|---------|---------------------------|
| | (IU/ml) | (Log ₁₀ IU/ml) |
| gB-2 | 50 | 1,70 |
| gB-3 | 35 | 1,55 |
| gB-4 | 24 | 1,38 |
| Arzneimittelresistente Mutation UL54 und UL97* | 38 | 1,57 |
| Arzneimittelresistente Mutation UL56** | 35 | 1,54 |

*UL54-Genmutationen können zu Kreuzresistenzen mit verschiedenen antiviralen Wirkstoffen für die Behandlung einer CMV-Infektion führen, z. B. Ganciclovir (GVC), Cidofovir (CDV) und Foscarnet (PFA). UL97-Genmutationen führen außerdem zu einer Resistenz gegen Ganciclovir (GVC).

**UL56-Genmutationen führen zu einer Resistenz gegen Letemovir (LET).

Untere Quantifizierungsgrenze bei Genotypen in Vollblut

Die unter Verwendung des WHO-Standards etablierte LLoQ wurde durch Testung der CMV-Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 in CMV-negativem menschlichem Vollblut verifiziert. Es wurden 60 Replikate jeder Panelprobe mit einer Reagenzcharge getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt. Die LLoQ für die Genotypen gB-2, gB-3 und gB-4 aus der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration, die die TE-Anforderungen und ≥ 95 % Detektion erfüllt, ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Gesamt-LLoQ für Vollblut in diesem Assay beträgt 176 IU/ml.

Tabelle 13: Bestimmung der LLoQ bei Genotypen in Vollblut

| Genotyp | N | N nachgewiesen | Target-Konzentration | Aptima CMV Quant | SAT | [Abweichung] | Berechneter TE |
|---------|----|----------------|----------------------|------------------|-------------|--------------|----------------|
| | | | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) | (log IU/ml) |
| gB-2 | 60 | 56 | 2,08 | 1,77 | 0,43 | 0,30 | 1,16 |
| | 60 | 56 | 2,15 | 1,87 | 0,39 | 0,27 | 1,06 |
| | 60 | 56 | 2,20 | 1,80 | 0,59 | 0,40 | 1,58 |
| | 60 | 58 | 2,26 | 1,97 | 0,41 | 0,28 | 1,11 |
| | 60 | 59 | 2,30 | 2,06 | 0,50 | 0,24 | 1,24 |
| | 60 | 57 | 2,34 | 2,01 | 0,52 | 0,33 | 1,38 |
| | 60 | 59 | 2,38 | 2,11 | 0,36 | 0,27 | 1,00 |
| | 60 | 60 | 2,41 | 2,19 | 0,30 | 0,23 | 0,84 |
| gB-3 | 60 | 46 | 2,08 | 1,73 | 0,59 | 0,35 | 1,53 |
| | 60 | 54 | 2,15 | 1,78 | 0,50 | 0,36 | 1,37 |
| | 60 | 54 | 2,20 | 1,87 | 0,50 | 0,33 | 1,34 |
| | 60 | 58 | 2,26 | 2,02 | 0,52 | 0,23 | 1,27 |
| | 60 | 58 | 2,30 | 2,02 | 0,32 | 0,28 | 0,92 |
| gB-4 | 60 | 55 | 2,08 | 1,78 | 0,53 | 0,30 | 1,37 |
| | 60 | 57 | 2,15 | 1,97 | 0,40 | 0,18 | 0,97 |
| | 60 | 58 | 2,20 | 2,09 | 0,39 | 0,12 | 0,89 |

SAT = Standardabweichung

Tabelle 14: Zusammenfassung der LLoQ bei Genotypen in Vollblut

| Genotyp | LLoQ | |
|---------|---------|-------------|
| | (IU/ml) | (log IU/ml) |
| gB-2 | 129 | 2,11 |
| gB-3 | 104 | 2,02 |
| gB-4 | 93 | 1,97 |

Rückführbarkeit auf den 1. internationalen WHO-Standard

Für die Etablierung der Rückführbarkeit auf den WHO-Standard wurde während der gesamten Produktentwicklung und Produktfertigung eine Reihe sekundärer Standards mit bekannten Konzentrationen verwendet. Der CMV-WHO-Standard wurde zusammen mit den sekundären Standards verdünnt und getestet, sowie mit Assaykontrollen und Kalibratoren, die im Aptima CMV Quant Assay verwendet werden, um die Rückführbarkeit gemäß CLSI EP32-R zu beurteilen.¹⁶ Die sekundären Standards variierten zwischen Konzentrationen von 1,80 bis 6,60 log₁₀ IU/ml.

Rückführbarkeit auf den WHO-Standard unter Verwendung von Plasma

Die für den CMV-WHO-Standard getesteten Konzentrationen betragen zwischen 2,18 und 4,70 log₁₀ IU/ml. Die WHO-Plasmapanels, sekundären Standards, Assaykontrollen und Assay-Kalibratoren wurden im linearen Bereich des Assays wie erwartet wiederhergestellt, wie in Abbildung 11 zu sehen ist.

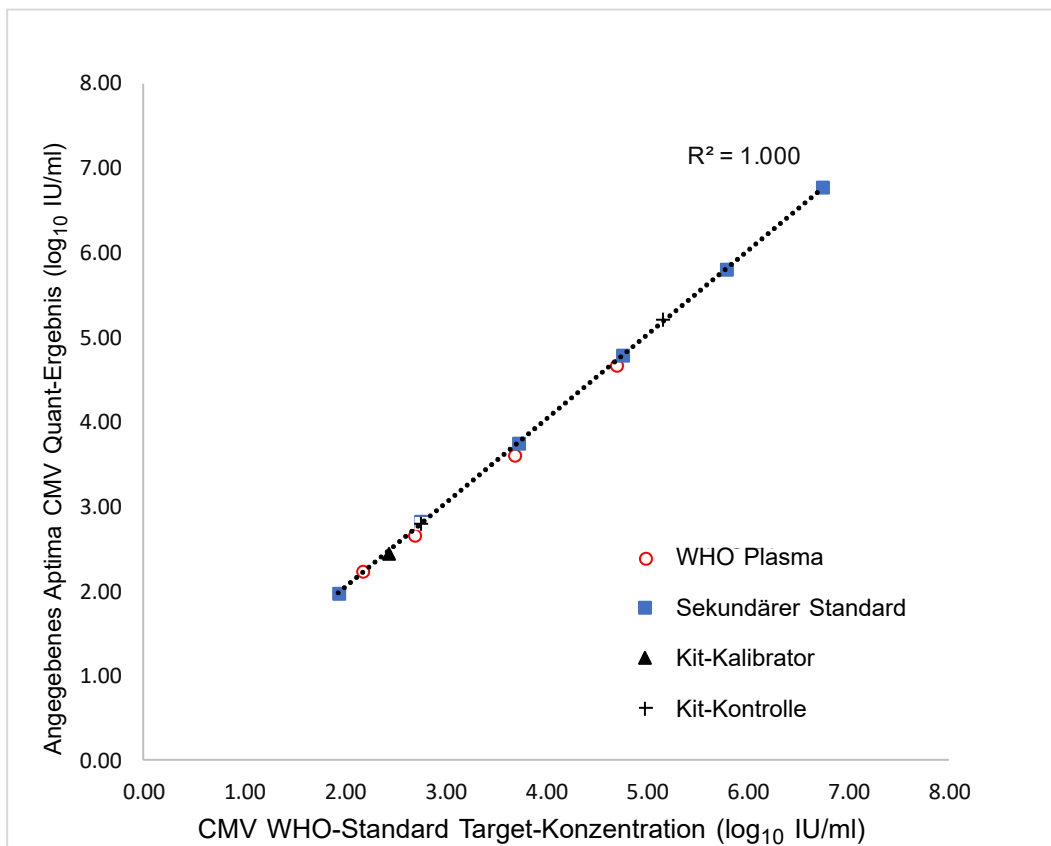


Abbildung 11. Rückführbarkeit zwischen den Target-Konzentrationen und gemeldeten Konzentrationen des 1. CMV-WHO-Standards im Aptima CMV Quant Assay (in Plasma verdünnter WHO-Standard)

Rückführbarkeit auf den WHO-Standard unter Verwendung von Vollblut

Die für den CMV-WHO-Standard in Vollblut getesteten Konzentrationen betragen zwischen 2,70 und 4,70 \log_{10} IU/ml. Die Vollblut-Panels mit WHO-Standards, sekundären Standards, Assaykontrollen und Assay-Kalibratoren wurden im linearen Bereich des Assays wie erwartet wiederhergestellt, wie in Abbildung 12 zu sehen ist.

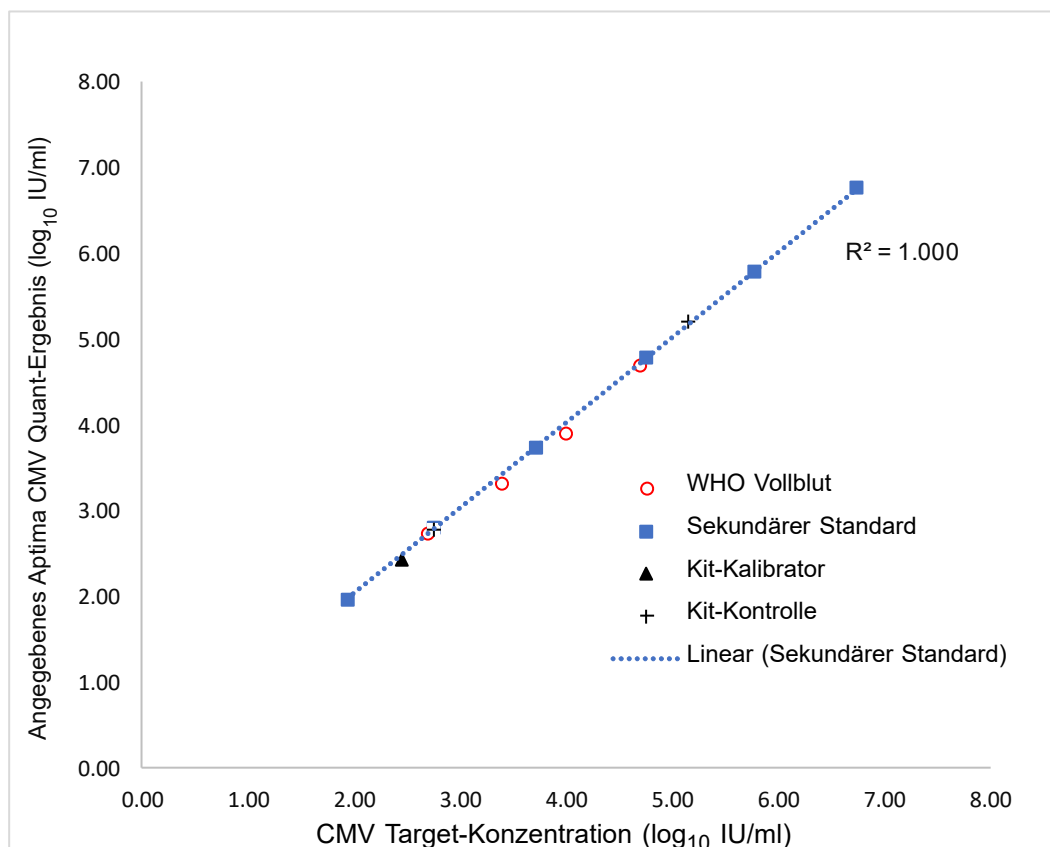


Abbildung 12. Rückführbarkeit zwischen den Zielkonzentrationen und gemeldeten Konzentrationen des 1. CMV-WHO-Standards im Aptima CMV Quant Assay (in Vollblut verdünnter WHO-Standard)

Präzision

Plasma

Zur Beurteilung der Präzision wurde ein Panel mit 6 Proben durch Verdünnen CMV-positiver klinischer Patientenproben oder von kultiviertem CMV in CMV-negativem Plasma erstellt. Das Panel wurde von drei Anwendern mit drei Reagenzchargen auf drei Panther Systemen in einem Zeitraum von mindestens 20 Tagen getestet. Jeder Anwender führte zwei Durchläufe pro Tag durch und jede Panelprobe wurde in jedem Durchlauf doppelt getestet. Die Studie wurde gemäß den Empfehlungen des CLSI EP-05-A3 entworfen und analysiert.¹⁷

Tabelle 15 zeigt die Präzision der Assay-Ergebnisse (in log IU/ml) zwischen Geräten, Anwendern, Reagenzchargen, Reagenzdurchläufen, Durchläufen, innerhalb von Durchläufen und gesamt. Die Gesamtvariabilität war hauptsächlich durch die Variabilität innerhalb der Durchläufe bestimmt (d. h. durch Zufallsfehler).

Tabelle 15: Präzision des Aptima CMV Quant Assays in Plasma

| N | Mittlere Konzentration (log IU/ml) | Zwischen Chargen SAT | Zwischen Geräten SAT | Vergleich Anwender SAT | Zwischen Tagen SAT | Zwischen Durchläufen SAT | Innerhalb von Durchläufen SAT | Gesamt SAT |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------|
| 108 | 2,28 | 0,02 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,06 | 0,16 | 0,18 |
| 108 | 2,82 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,07 | 0,11 | 0,14 |
| 108 | 3,49 | 0,07 | 0,00 | 0,01 | 0,06 | 0,06 | 0,11 | 0,15 |
| 108 | 4,53 | 0,04 | 0,02 | 0,04 | 0,00 | 0,07 | 0,07 | 0,11 |
| 108 | 5,57 | 0,06 | 0,00 | <0,001 | 0,04 | 0,02 | 0,09 | 0,12 |
| 108 | 6,67 | 0,06 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,12 |

SAT = Standardabweichung

Hinweis: Die Variabilität von einigen Faktoren kann numerisch negativ sein. Das kann auftreten, wenn die durch diese Faktoren bedingte Variabilität sehr klein ist. In diesem Fall wird SAT als 0 angezeigt.

Vollblut

Zur Beurteilung der Präzision wurde ein Panel mit 6 Proben durch Verdünnen CMV-positiver klinischer Patientenproben oder Versetzen mit kultiviertem CMV in CMV-negativem Vollblut erstellt. Das Panel wurde von drei Anwendern mit drei Reagenzchargen auf drei Panther Systemen in einem Zeitraum von mindestens 20 Tagen getestet. Jeder Anwender führte zwei Durchläufe pro Tag durch und jede Panelprobe wurde in jedem Durchlauf doppelt getestet.

Tabelle 16 zeigt die Präzision der Assay-Ergebnisse (in log IU/ml) zwischen Geräten, Anwendern, Chargen, Durchläufen, Tagen, innerhalb von Durchläufen und gesamt. Die Gesamtvariabilität war hauptsächlich durch die Variabilität zwischen den Durchläufen bestimmt (d. h. durch Zufallsfehler).

Tabelle 16: Präzision des Aptima CMV Quant Assays in Vollblut

| N | Mittlere Konzentration (log IU/ml) | Zwischen Lot (Charge) SAT | Zwischen Geräten SAT | Vergleich Anwender SAT | Zwischen Tagen SAT | Zwischen Durchläufen SAT | Innerhalb von Durchläufen SAT | Gesamt SAT |
|-----|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------|
| 108 | 2,78 | 0,00 | 0,01 | 0,05 | 0,00 | 0,08 | 0,14 | 0,17 |
| 108 | 3,38 | 0,03 | 0,00 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | 0,14 |
| 108 | 3,95 | 0,06 | 0,00 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,13 | 0,18 |
| 108 | 4,76 | 0,03 | 0,01 | 0,08 | 0,00 | 0,07 | 0,12 | 0,16 |
| 108 | 5,64 | 0,01 | 0,00 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,13 |
| 108 | 6,74 | 0,03 | 0,00 | 0,05 | 0,00 | 0,04 | 0,09 | 0,12 |

SAT = Standardabweichung

Hinweis: Die Variabilität von einigen Faktoren kann numerisch negativ sein. Das kann auftreten, wenn die durch diese Faktoren bedingte Variabilität sehr klein ist. In diesem Fall wird SAT als 0 angezeigt.

Mögliche Störsubstanzen

Es wurde die Anfälligkeit des Aptima CMV Quant Assays gegenüber Interferenzen durch erhöhte Konzentrationen endogener Stoffe, Antikoagulanzen und von Wirkstoffen, die Patienten mit einer Transplantation häufig verordnet werden, evaluiert. Die Testkonzentrationen für jede der interferierenden Substanzen wurden basierend auf den verfügbaren Literaturreferenzen und der Orientierungshilfe durch CLSI EP07¹⁸ und EP37¹⁹ ausgewählt. Es wurden CMV-negative Plasmaproben und mit CMV versetzte Proben mit Konzentrationen von 2,22 log IU/ml und 3,30 log IU/ml getestet. CMV-negative Vollblutproben und mit CMV versetzte Proben mit CMV-DNA-Konzentrationen von 2,72 und 4,00 log IU/ml wurden auf Hämoglobin getestet.

Bei Vorliegen von Albumin (60 mg/ml), Hämoglobin (10 mg/ml), Triglyzeriden (15 mg/ml), unkonjugiertem Bilirubin (0,4 mg/ml) oder humangenomischer DNA (2 µg/ml) fand sich keine Interferenz der Assay-Leistung. Bei Vorliegen von 100 mg/ml Hämoglobin, das mit Vollblutproben versetzt wurde, fand sich keine Interferenz der Assay-Leistung in Vollblutproben.

Klinische Plasmaproben von Patienten mit erhöhten Konzentrationen definierter Stoffe oder von Patienten mit den in Tabelle 17 gelisteten Krankheiten wurden mit dem Aptima CMV Quant Assay getestet. Es wurde keine Interferenz der Assay-Leistung beobachtet.

Tabelle 17: Getestete Typen klinischer Patientenproben

| Typen klinischer Patientenproben | Anzahl der getesteten klinischen Patientenproben |
|--|--|
| 1 Antinukleäre Antikörper (ANA) | 10 |
| 2 Systemischer Lupus erythematodes (SLE) | 10 |
| 3 Rheumatoide Arthritis (RA) | 10 |

Bei Vorhandensein der in Tabelle 18 gelisteten exogenen Stoffe in Konzentrationen vom mindestens Dreifachen der C_{\max} von Medikamenten in Humanplasma fand sich keine Interferenz der Assay-Leistung.

Tabelle 18: Exogene Stoffe

| Pool von exogenen Stoffen | Getestete exogene Stoffe |
|---------------------------|--|
| 1 | Cefotetan, clavulanate Kalium, Ticarcillin disodium, Vancomycin |
| 2 | Piperacillin |
| 3 | Sulfamethoxazol |
| 4 | Tazobactam-Natrium, Trimethoprim, Fluconazol |
| 5 | Ganciclovir, Valganciclovir, Cidofovir, Foscarnet, Valacyclovir, Acyclovir, Letermovir |
| 6 | Azathioprin, Cyclosporin, Mycophenolat-Mofetil, Mycophenolsäure |
| 7 | Sirolimus, Tacrolimus, Prednison, Everolimus |
| 8 | Natriumcitrat, EDTA, Heparin |

Spezifität

Die Spezifität wurde durch Testung von 780 gefrorenen, CMV-negativen klinischen Patientenproben ermittelt. Die Spezifität wurde als Prozentsatz von CMV-negativen Proben berechnet, wobei die Ergebnisse „Nicht nachgewiesen“ der Gesamtzahl der für jeden Probentyp getesteten Proben gegenübergestellt wurde.

CMV-DNA wurde nicht nachgewiesen in 389 Proben für Plasma sowie in 390 Proben für Vollblut. Die Spezifität lag bei 99,7 % (389/390, 95 % KI: 98,6 -100 %) für Plasma und 100 % (390/390, 95 % KI: 99,3 - 100 %). Die kombinierte Spezifität des Aptima CMV Quant Assays für Plasma und Vollblut betrug 99,9 % (779/780, 95 % KI: 99,3 - 100 %).

Tabelle 19: Spezifität in Plasma- und Vollblutproben

| | Plasma | Vollblut | Plasma und Vollblut |
|-----------------------|------------|------------|---------------------|
| Gültige Replikate (n) | 390 | 390 | 780 |
| Nicht nachgewiesen | 389 | 390 | 779 |
| Spezifität | 99,7 % | 100 % | 99,9% |
| (95 % KI) | (98,6-100) | (99,3-100) | (99,3-100) |

KI=Konfidenzintervall

Analytische Spezifität

Die potenzielle Kreuzreaktivität auf die in Tabelle 20 gelisteten Pathogene wurde in CMV-negativen Humanplasma-Proben bei Vorliegen oder Abwesenheit von CMV mit 2,2 log IU/ml und 3,3 log IU/ml beurteilt. Außerdem wurden drei in Vollblutproben gefundene Blutparasiten in CMV-negativem Vollblut bei Vorliegen oder Abwesenheit von CMV mit 2,7 log IU/ml und 4,0 log IU/ml beurteilt. Die Pathogene wurden mit der höchsten verfügbaren Konzentration getestet. Es wurde keine Kreuzreaktivität oder Interferenz beobachtet.

Tabelle 20: Zur Ermittlung der Analysespezifität getestete Erreger

| Mikroorganismus/Pathogen | Konzentration | | Mikroorganismus/Pathogen | Konzentration | |
|------------------------------------|---------------|------------------------|--|---------------|-----------|
| Adenovirus Typ 4 | 1.886 | TCID50/ml ^a | <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| BK Polyomavirus | 1.000.000 | cp/ml ^b | <i>Mycoplasma genitalium</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Epstein-Barr-Virus | 1.000.000 | cp/ml | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Hepatitis-B-Virus | 1.000.000 | IU/ml ^c | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Hepatitis-C-Virus | 1.000.000 | cp/ml | <i>Propionibacterium acnes</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Herpes-Simplex-Virus Typ 1 | 1.428.571 | TCID50/ml | <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium | 1.000.000 | KBE/ml |
| Herpes-Simplex-Virus Typ 2 | 147.143 | TCID50/ml | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| HIV-1-Subtyp B | 1.000.000 | cp/ml | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Humanes Herpesvirus 6A | 1.000.000 | cp/ml | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Humanes Herpesvirus 7 | 1.428.571 | TCID50/ml | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Humanes Herpesvirus 8 | 1.000.000 | cp/ml | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Humanes Metapneumovirus | 192.857 | TCID50/ml | <i>Aspergillus niger</i> | 485.000 | KBE/ml |
| Humanes Papillomvirus Typ 18 | 1.000.000 | cp/ml | <i>Candida albicans</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Humanes Parainfluenzavirus | 944 | TCID50/ml | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1.000.000 | KBE/ml |
| Influenzavirus | 3.857 | TCID50/ml | <i>Trichomonas vaginalis</i> | 1.000.000 | Zellen/ml |
| Rhinovirus | 7.257 | TCID50/ml | <i>Leishmania major</i> | 1.000.000 | Zellen/ml |
| Varicella-Zoster-Virus | 1.000.000 | cp/ml | <i>Babesia microti</i> * | 1.000.000 | Zellen/ml |
| Zika-Virus | 29.286 | TCID50/ml | <i>Plasmodium falciparum</i> | 1.000.000 | Zellen/ml |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 1.000.000 | KBE/ml ^d | ^a TCID50/ml = Gewebekultur-Infektionsdosis - Einheiten pro ml | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 1.000.000 | KBE/ml | ^b cp/ml = Viruskopien pro ml | | |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 1.000.000 | KBE/ml | ^c IU/ml = Internationale Einheiten pro ml | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 1.000.000 | KBE/ml | ^f KBE/ml = Kolonie-bildende Einheiten pro ml | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 1.000.000 | KBE/ml | *getestet mit Vollblutprobentyp | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1.000.000 | KBE/ml | | | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1.000.000 | KBE/ml | | | |

Verschleppung

Die Verschleppungskontamination wurde mit Plasma als einen Probentyp unter Verwendung anderer Viruslast-Assays (Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, Aptima HCV Quant Assay, Aptima HBV Quant Assay) für das Panther System beurteilt. In früheren Testungen wurde keine Verschleppungskontamination beobachtet. Um nachzuweisen, dass das Panther System das Risiko falsch positiver Ergebnisse infolge einer Verschleppungskontamination beim Vollblutprobentyp auf ein Mindestmaß beschränkt, wurde eine Studie mit gespikten Panels auf drei Panther Systemen durchgeführt. Die Beurteilung der Verschleppung erfolgte anhand von hochtitrigen, mit CMV-DNA versetzten Vollblutproben (6 log IU/ml), die im Schachbrettmuster zwischen CMV-negativen Proben verteilt waren. Zur Testung wurden 12 Durchläufe durchgeführt. Die Gesamtverschleppungsrate betrug 0,24 % (1/423).

Methodenkorrelation

Diese Studie wurde gemäß CLSI EP09c entworfen.¹⁹

Plasma-Methodenkorrelation

Die Leistung des Aptima CMV Quant Assays wurde im Vergleich zum Roche cobas® CMV auf dem cobas® 6800 System beurteilt durch Testung von unverdünnten klinischen Patientenproben von CMV-positiven Patienten sowie von künstlichen, aus verschiedenen Stämmen des kultivierten Virus hergestellten Patientenproben, die zu allen vier Genotypen gehören und mit negativem EDTA-Plasma von Einzelspendern versetzt wurden. Für die in Abbildung 13 dargestellte Deming-Regression wurden insgesamt 160 klinische Patientenproben und 115 künstliche Proben innerhalb des linearen Bereichs verwendet, der beiden Assays gemeinsam war.

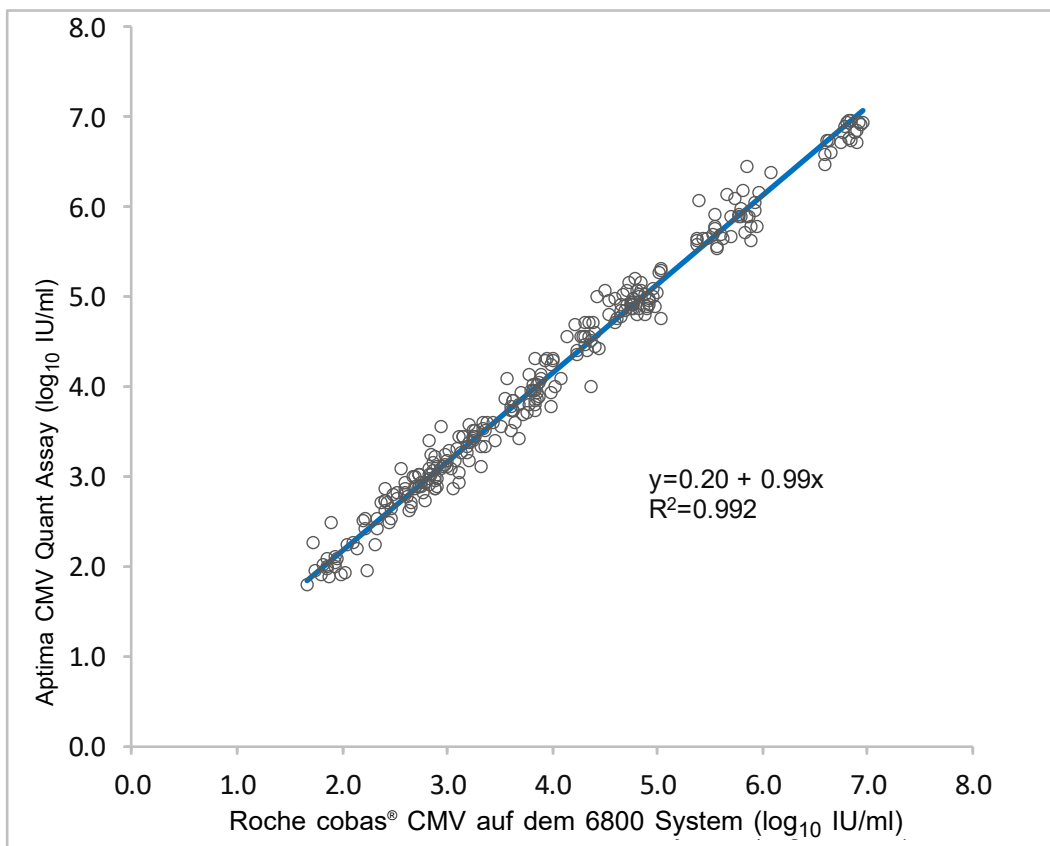


Abbildung 13. Korrelation zwischen der CMV-Viruslast im Aptima CMV Quant Assay und im Roche cobas® CMV Assay für die Testung von Plasmaproben

Vollblut-Methodenkorrelation

Die Leistung des Aptima CMV Quant Assays wurde im Vergleich zum Abbott CMV RealTime Assay auf der m2000-Plattform beurteilt durch Testung von unverdünnten klinischen Patientenproben von CMV-positiven Patienten sowie von künstlichen, aus kultiviertem Virus hergestellten Patientenproben, die mit negativem EDTA-Vollblut von Einzelspendern versetzt wurden. Für die in Abbildung 14 dargestellte Deming-Regression wurden insgesamt 159 klinische Patientenproben und 83 künstliche Proben innerhalb des linearen Bereichs verwendet, der beiden Assays gemeinsam war.

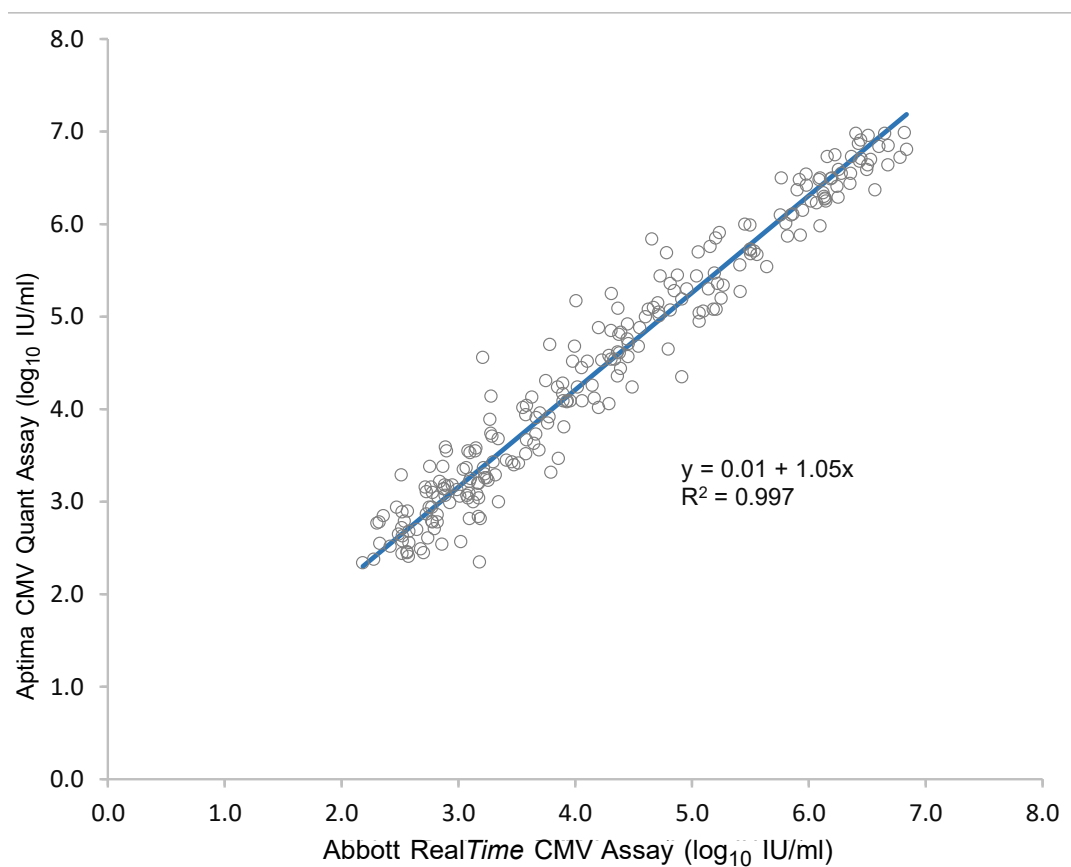


Abbildung 14. Korrelation zwischen der CMV-Viruslast im Aptima CMV Quant Assay und im Abbott RealTime CMV Assay für die Testung von Vollblutproben

Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit in Plasmaproben

Die Reproduzierbarkeit des Aptima CMV Quant Assays in Plasma wurde an drei externen Standorten beurteilt. Zwei Anwender führten den Test an jedem Standort durch. Jeder Anwender führte im Rahmen des Tests 5 Tage lang einen Lauf pro Tag mit einer Reagenzcharge durch. Für jeden Durchlauf gab es drei Replikate jeder Panelprobe.

Die Reproduzierbarkeit wurde mit Panelproben getestet, die durch das Verdünnen CMV-positiver klinischer Patientenproben oder von kultiviertem CMV in CMV-negatives EDTA-Plasma vorbereitet wurden. Die CMV-DNA-Konzentrationen erstreckten sich über den linearen Bereich des Assays.

Tabelle 21 zeigt die Reproduzierbarkeit und Präzision der Assayergebnisse für jede positive Panelprobe zwischen Standorten, zwischen Anwendern, zwischen Tagen, zwischen Durchläufen, innerhalb von Durchläufen und insgesamt. Der Variationskoeffizient wurde mithilfe der folgenden Gleichung berechnet, bei der σ^2 die Probenvarianz der Daten nach der \log_{10} -Transformation ist.

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2 \times \ln(10)} - 1}$$

Tabelle 21: Reproduzierbarkeit der CMV-DNA-Level des Aptima CMV Quant Assays des Panther System bei positiven Panelproben in Plasma

| N | Beobachteter Mittelwert | | Beitrag zur Gesamtabweichung SAT (%VK ²) | | | | | Gesamtabweichung SAT |
|----|-------------------------|-------------------------|--|-------------------|---------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| | IU/ml | Log ₁₀ IU/ml | Zwischen Standorten | Zwischen Anwender | Zwischen Tage | Zwischen Läufen | Innerhalb des Läufen | |
| 90 | 198,33 | 2,26 | 0,05 (11,19) | 0,00 (0) | 0,06 (12,94) | 0,00 (0) | 0,17 (39,59) | 0,18 (43,68) |
| 90 | 603,27 | 2,76 | 0,02 (3,99) | <0,01 (2,22) | 0,07 (15,68) | 0,04 (10,25) | 0,12 (27,04) | 0,14 (33,67) |
| 90 | 2428,54 | 3,36 | 0,06 (12,83) | 0,00 (0) | 0,09 (21,42) | 0,06 (12,83) | 0,11 (24,69) | 0,16 (38,27) |
| 90 | 27623,02 | 4,42 | 0,07 (15,98) | 0,00 (0) | 0,04 (9,29) | 0,06 (13,85) | 0,08 (19,38) | 0,13 (30,63) |
| 90 | 284107,74 | 5,44 | 0,07 (15,58) | 0,00 (0) | 0,04 (10,22) | 0,00 (0) | 0,09 (21,66) | 0,12 (28,90) |
| 90 | 3821364,62 | 6,57 | 0,08 (19,12) | 0,00 (0) | 0,06 (14,22) | 0,02 (4,02) | 0,08 (17,45) | 0,13 (30,25) |

%VK=log-normaler Variationskoeffizient, SAT=Standardabweichung (log₁₀ IU/ml)

Hinweis: Variabilität von einigen Faktoren kann möglicherweise zahlenmäßig negativ sein. Dies kann auftreten, wenn die Variabilität aufgrund solcher Faktoren sehr gering ist. In diesen Fällen gelten SAT und %VK gleich 0.

Reproduzierbarkeit bei Vollblutproben

Die Reproduzierbarkeit des Aptima CMV Quant Assays in Vollblut wurde an drei externen Standorten beurteilt. Zwei Anwender führten den Test an jedem Standort durch. Jeder Anwender führte im Rahmen des Tests 5 Tage lang einen Lauf pro Tag mit einer Reagenzcharge durch. Für jeden Durchlauf gab es drei Replikate jeder Panelprobe.

Die Reproduzierbarkeit wurde mit Panelproben getestet, die durch das Verdünnen CMV-positiver klinischer Patientenproben oder von kultiviertem CMV in CMV-negatives EDTA-Vollblut vorbereitet wurden. Die CMV-DNA-Konzentrationen erstreckten sich über den linearen Bereich des Assays.

Tabelle 22 zeigt die Reproduzierbarkeit und Präzision der Assayergebnisse für jede positive Panelprobe zwischen Standorten, zwischen Anwendern, zwischen Tagen, zwischen Durchläufen, innerhalb von Durchläufen und insgesamt. Davon ausgeschlossen ist eine Abweichung (0,2 %, 1/533). Der Variationskoeffizient wurde mithilfe der folgenden Gleichung berechnet, bei der σ^2 die Probenvarianz der Daten nach der Log_{10} -Transformation ist.

$$\%CV = 100 \times \sqrt{10^{\sigma^2 \times \ln(10)} - 1}$$

Die Übereinstimmungswerte betragen für alle CMV-positiven und CMV-negativen Panelproben 100 %.

Tabelle 22: Reproduzierbarkeit der CMV-DNA-Level des Aptima CMV Quant Assays im Panther System bei positiven Panelproben in Vollblut

| N | Beobachteter Mittelwert | | Beitrag zur Gesamtabweichung SAT (%VK ²) | | | | | Gesamtabweichung SAT (%VK) |
|----|-------------------------|-------------------------|--|-------------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------------------------|
| | IU/ml | Log ₁₀ IU/ml | Zwischen Standorten | Zwischen Anwender | Zwischen Tage | Zwischen Läufen | Innerhalb des Läufen | |
| 89 | 604,32 | 2,73 | 0,00 (0) | 0,00 (0) | 0,00 (0) | 0,11 (25,39) | 0,18 (43,23) | 0,21 (51,32) |
| 89 | 2188,59 | 3,32 | <0,01 (0) | 0,00 (0) | 0,00 (0) | 0,07 (15,25) | 0,11 (25,34) | 0,13 (29,83) ^a |
| 89 | 7830,84 | 3,87 | 0,04 (8,75) | 0,04 (8,16) | 0,00 (0) | 0,08 (17,71) | 0,13 (30,28) | 0,16 (37,70) |
| 88 | 48897,12 | 4,66 | 0,03 (7,11) | 0,00 (0) | 0,00 (0) | 0,10 (22,47) | 0,11 (24,99) | 0,15 (34,89) |
| 88 | 375626,91 | 5,56 | 0,04 (9,59) | 0,04 (9,96) | 0,00 (0) | 0,05 (12,04) | 0,09 (21,18) | 0,12 (28,34) |
| 89 | 4609046,44 | 6,64 | 0,08 (18,15) | 0,00 (0) | 0,05 (11,42) | 0,03 (6,32) | 0,10 (22,74) | 0,14 (32,39) |

%VK=log-normaler Variationskoeffizient, SAT=Standardabweichung (log₁₀ IU/ml)

Hinweis: Variabilität von einigen Faktoren kann möglicherweise zahlenmäßig negativ sein. Dies kann auftreten, wenn die Variabilität aufgrund solcher Faktoren sehr gering ist. In diesen Fällen gelten SAT und %VK gleich 0.

^aErgebnis der Gesamtabweichung ohne die Abweichung, die das potenzielle Ergebnis eines Problems bei der Probenvorbereitung sein könnte,

Bibliographie

1. **Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ.** Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-2004. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:531-540.
2. **Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB.** Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection. *Reviews in Medical Virology* 2010;20:202-213.
3. **Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH.** The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies *Cell and Mol Immunol.* 2015;12:128-138.
4. **Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al.** The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 2018;102(6):900-931.
5. **Emery VC, Sabin CA, Cope AV, et al.** Application of Viral-Load Kinetics to Identify Patients who Develop Cytomegalovirus Disease After Transplantation. *Lancet.* 2000; 10;355(9220):2032-6.
6. **Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al.** Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Predicting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 1999; 15;68(9):1305-11.
7. **Humar A, Kumar D, Gilbert C, et al.** Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes and Response to Antiviral Therapy, in Solid-Organ–Transplant Recipients with CMV Disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003;188(4):581–4,
8. **Razonable RR, Hayden RT.** Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection After Solid Organ Transplantation. *Clinical Microbiology Reviews.* 2013; 26(4):703-727.
9. **de la Cámara R.** CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2016; 20;8(1):e2016031.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
11. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; aktuell gültige Fassung.
12. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); aktuell gültige Fassung.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
14. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
16. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006. Metrological Traceability and Its Implementation; A Report. CLSI document EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EO05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
18. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Interference testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. **1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/162),**Merlin strain.

Kontakt Daten



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA



Hologic (Australia & New Zealand) Pty
Ltd Macquarie Park NSW 2113

Die E-Mail-Adresse und Telefonnummer des länderspezifischen technischen Kundendienstes und des Kundendienstes finden Sie auf www.hologic.com/support.

Hologic, Aptima und Panther sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Dieses Produkt ist möglicherweise durch ein oder mehrere US-amerikanische Patente geschützt (siehe www.hologic.com/patents).

© 2022 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

AW-25509-801 Rev. 002

2022-01