

Instrukcja użytkowania

RealStar[®]

Adenovirus PCR Kit 1.0

07/2018 PL

RealStar[®]

Adenovirus PCR Kit 1.0

Do stosowania z

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)



301013



96



07 2018



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Spis treści

1.	Przeznaczenie zestawu.....	6
2.	Składniki zestawu	6
3.	Przechowywanie	6
4.	Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone.....	7
5.	Podstawowe informacje	8
6.	Opis wyrobu	9
6.1	Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym	11
6.2	Typy próbek.....	11
7.	Ostrzeżenia i środki ostrożności	12
8.	Procedura	13
8.1	Przygotowanie próbki.....	13
8.2	Przygotowanie mieszaniny master mix.....	15
8.3	Konfiguracja reakcji.....	16
9.	Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym	17
9.1	Ustawienia.....	17
9.2	Detektory fluorescencji (barwniki)	18
9.3	Profil temperatury i pomiar barwnika.....	18
10.	Analiza danych	19
10.1	Prawidłowość badań diagnostycznych.....	19
10.1.1	Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	19
10.1.2	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	19
10.1.3	Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe).....	20
10.1.4	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe).....	20
10.2	Manualna analiza	21

10.2.1	Analiza jakościowa.....	21
10.2.2	Analiza ilościowa.....	21
11.	Charakterystyka działania testu	23
11.1	Czułość analityczna	25
11.2	Swoistość analityczna	26
11.3	Zakres liniowości.....	27
11.4	Precyzja	28
11.5	Ocena diagnostyczna	29
12.	Ograniczenia.....	31
13.	Kontrola jakości	32
14.	Pomoc techniczna.....	32
15.	Literatura.....	32
16.	Znaki towarowe i zastrzeżenia	33
17.	Wyjaśnienie symboli.....	34

1. Przeznaczenie zestawu

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro*, oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla ludzkiego adenowirusa (HAdV).

2. Składniki zestawu

Kolor zakrętki	Składnik	Liczba fiolek	Objętość [µl/fiolkę]
Niebieski	Master A	8	60
Fioletowy	Master B	8	180
Zielony	Internal Control	1	1000
Czerwony	QS1-4*	4	250
Biały	Water (PCR grade)	1	500

* Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 zawiera standardy ilościowe (QS) dla czterech różnych stężeń (patrz rozdział 6. Opis wyrobu)

Internal Control (IC) = kontrola wewnętrzna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

3. Przechowywanie

- Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 jest wysyłany w suchym lodzie. Składniki zestawu powinny być dostarczone w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub próbki zostały uszkodzone podczas transportu należy skontaktować się z Altona Diagnostics GmbH w celu uzyskania pomocy.
- Po odbiorze wszystkie składniki należy przechowywać w temperaturze od -25 °C do -15 °C.
- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania odczynników Master (więcej niż dwukrotnie), ponieważ może to negatywnie wpływać to na właściwości użytkowe testu. Odczynniki powinny być zamrażane w porcjach, jeśli nie zostaną użyte na raz.

- Przechowywanie w temperaturze +2 °C do +8 °C nie powinno przekroczyć 2 godzin.
- Mieszaniny reakcyjne Master A i Master B należy chronić przed światłem.

4. Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone

- Odpowiednie urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym (patrz rozdział 6.1 Urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym)
- Odpowiedni system lub zestaw do izolacji kwasu nukleinowego (patrz rozdział 8.1 Przygotowanie próbki)
- Wirówka z rotorem na probówki reakcyjne o objętości 2 ml
- Wirówka z rotorem na mikropłytki, w przypadku używania płytek reakcyjnych z 96 studzienkami
- Wytrząsarka
- Odpowiednie płytki reakcyjne z 96 studzienkami lub probówki reakcyjne z odpowiednim zamknięciem (optycznym)
- Pipety (regulowane)
- Końcówki do pipet z filtrami do jednorazowego użytku
- Rękawiczki bezpudrowe do jednorazowego użytku

UWAGA



Należy upewnić się, że wszystkie użyte urządzenia zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i są konserwowane zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producenta.

UWAGA



Zalecane jest użycie rotora z 72 studzienkami z odpowiednimi probówkami reakcyjnymi o objętości 0,1 ml w przypadku użycia Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Podstawowe informacje

Ludzkie adenowirusy (HAdV), po raz pierwszy wyizolowane w latach 50. ubiegłego wieku z eksplantowanej tkanki jadenoidalnej, to wirusy bezotoczkowe o dwuniciowym DNA, należące do rodziny *Adenoviridae* rodzaju *Mastadenovirus*. Wirusy te są szeroko rozprzestrzenione na całym świecie i nie wykazują sezonowych wzorców zakażeń.

Wirusy HAdV są klasyfikowane w jeden z 7 gatunków: A–G. Gatunek B dzieli się na podgatunki B1 i B2. Dotychczas opisanych zostało co najmniej 56 różnych serotypów (HAdV-1 do HAdV-56). Wszystkie wirusy HAdV są przenoszone drogą bezpośredniego kontaktu, fekalno-oralną i okazjonalnie przez wodę.

Ludzkie adenowirusy wywołują wiele chorób, między innymi przeziębienia, zapalenie gardła, zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc, biegunkę, zapalenie spojówek, gorączkę, zapalenie pęcherza, wysypkę i choroby neurologiczne.

Objawy choroby zależą od preferowanego tropizmu tkankowego wirusa. Na przykład, choroby górnych dróg oddechowych są często wywoływane przez gatunki B1, C lub E, choroby oczu przez gatunki B, D lub E, za zapalenie żołądka i jelit zwykle odpowiadają gatunki A, F lub G, natomiast zakażenia nerek i dróg moczowych są zazwyczaj związane z obecnością gatunku B2.

Charakterystyka epidemiologiczna adenowirusów zależy od ich typów. W zależności od regionu, niektóre ludzkie adenowirusy mają charakter endemiczny, a zakażenia zwykle pojawiają się w dzieciństwie. Pozostałe typy wywołują sporadyczne infekcje i okazjonalne epidemie. Wszystkie wirusy HAdV są przenoszone drogą bezpośredniego kontaktu, fekalno-oralną i okazjonalnie przez wodę.

Choć większość zakażeń wirusami HAdV ustępuje samoistnie, zdarzają się przypadki poważnych zapaleń płuc u poza tym zdrowych osób. Niektóre typy wirusa HAdV mogą prowadzić do utrzymujących się, bezobjawowych zakażeń migdałków, gruczołów i jelit u zakażonych nosicieli, a rozsiewanie wirusa może trwać wiele miesięcy lub lat. Reaktywacja zakażeń utajonych u nosicieli o obniżonej odporności, takich jak pacjenci po przeszczepach, może powodować zagrażające życiu choroby rozsiane.

Wirusy HAdV są szczególnie odporne na różne warunki środowiskowe i są wysoce zakaźne, dlatego też w przypadku braku odpowiedniej kontroli zakażeń i nieprzestrzegania dobrych praktyk higienicznych, mogą występować szpitalne ogniska chorób związanych z adenowirusami, na przykład epidemiczne zapalenia rogówki i spojówki. W niektórych krajach ogniska chorób związanych z wirusem HAdV wymagają obowiązkowego raportowania na poziomie zarządów lokalnych.

6. Opis wyrobu

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro*, oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla ludzkiego adenowirusu (HAdV).

Technologia PCR w czasie rzeczywistym wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w celu amplifikacji sekwencji docelowych oraz sondy właściwe dla tych sekwencji docelowych w celu wykrycia amplifikowanego DNA. Sondy są oznakowane fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym i barwnikiem tłumiącym.

Sondy właściwe dla DNA HAdV są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla kontroli wewnętrznej (IC) jest oznakowana fluoroforem JOE™.

Użycie sond związanych z różnymi barwnikami umożliwia równoległe wykrywanie DNA właściwego dla HAdV oraz IC w odpowiadającym im kanałach detekcji urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym.

Badanie obejmuje dwa procesy w pojedynczym oznaczeniu:

- Amplifikacja PCR sekwencji docelowej DNA i kontroli wewnętrznej
- Równoczesna detekcja amplikonów PCR przez sondy oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 obejmuje:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4*
- Water (PCR grade)

* Standardy ilościowe (QS) o czterech różnych stężeniach

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

Mieszaniny reakcyjne Master A i Master B zawierają wszystkie składniki (roztwór buforowy PCR, polimerazę DNA, sól magnezu, startery i sondy) umożliwiające jak również związaną z PCR amplifikację i detekcję DNA właściwego dla HAdV oraz IC w konfiguracji pojedynczej reakcji.

Standardy ilościowe zawierają wystandaryzowane stężenia DNA właściwego dla HAdV. Standardy ilościowe mogą być używane indywidualnie jako kontrole pozytywne, lub wspólnie w celu utworzenia **krzywej wzorcowej**, do wyznaczenia stężenia DNA właściwego dla HAdV w próbce.

Standardy ilościowe mają następujące stężenia:

Standard ilościowy	Stężenie [kopie/ μ l]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 został opracowany i zwalidowany do pracy z następującymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Typy próbek

Następujące typy próbek zostały zwalidowane do użycia z zestawem RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0:

- Osocze ludzkie pobrane na EDTA

Jeśli stosuje się odpowiednią procedurę izolacji kwasu nukleinowego, zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 może być używany do pobierania dodatkowych typów próbek. Możliwość używania danej procedury izolacji kwasu nukleinowego wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

Należy uważnie zapoznać się z treścią instrukcji użytkowania przed użyciem wyrobu.

- Przed pierwszym użyciem sprawdzić wyrób i jego składniki pod kątem:
 - Integralności
 - Kompletności pod względem liczby, typu i stopnia napełnienia (patrz rozdział 2. Składniki zestawu)
 - Prawidłowych etykiet
 - Zamarznięcia w momencie dostawy
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Próbkę należy zawsze traktować jako zakaźne i/lub zagrożenie biologiczne zgodnie z procedurami bezpieczeństwa laboratorium.
- Podczas pracy z próbkami należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku, fartuch laboratoryjny i ochronę oczu.
- Unikać skażenia próbek oraz składników zestawu mikroorganizmami i nukleazami (DNaza/RNaza).
- Zawsze używać końcówek pipet jednorazowego użytku, nieskażonych DNazą/RNazą, z barierą chroniącą przed aerozolami.
- Podczas pracy ze składnikami zestawu należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku.
- Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do (i) przygotowania próbki, (ii) konfiguracji reakcji oraz (iii) amplifikacji/detekcji. Praca w laboratorium powinna przebiegać jednokierunkowo. Zawsze nosić rękawiczki jednorazowe w każdym obszarze i zmieniać je przed przejściem do innego obszaru.
- Materiały eksploatacyjne i wyposażenie należy przypisać do danego obszaru roboczego i nie przenosić ich pomiędzy poszczególnymi obszarami.

- Materiał pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od wszystkich innych składników zestawu.
- Nie otwierać płytek/probówek reakcyjnych po amplifikacji, aby uniknąć zanieczyszczenia amplikonami.
- Dodatkowe kontrole mogą wymagać oznaczenia zgodnie z wytycznymi lub wymaganiami przepisów lokalnych, stanowych i/lub federalnych lub organizacji akredytujących.
- Nie należy sterylizować probówek reakcyjnych po badaniu PCR w autoklawie, ponieważ nie zapewnia to degradacji amplifikowanego kwasu nukleinowego i wiąże się z ryzykiem skażenia obszaru laboratorium.
- Nie stosować składników zestawu po upływie ich terminu ważności.
- Utylizować odpady (próbki i testy) zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

8. Procedura

8.1 Przygotowanie próbki

Materiał startowy dla zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 stanowi wyizolowane DNA.

Jakość wyizolowanego DNA ma istotny wpływ na działanie całego systemu testowego. Należy upewnić się, czy stosowany system izolacji kwasu nukleinowego jest kompatybilny z technologią PCR w czasie rzeczywistym. Izolację kwasu nukleinowego można wykonać z użyciem następujących zestawów i systemów:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)

- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Inne systemy oraz zestawy izolacji kwasu nukleinowego mogą również być odpowiednie. Możliwość używania danej procedury izolacji kwasu nukleinowego z zestawem RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

W przypadku korzystania z procedury przygotowania próbki opartej na metodzie kolumnkowej oraz buforach płuczących zawierających alkohol etylowy, przed etapem elucji kwasu nukleinowego zalecane jest wykonanie dodatkowego etapu odwirowania przez 10 minut przy prędkości 17000 x g (~ 13000 obr./min.) z użyciem nowej probówki zbiorczej.

OSTROŻNIE



Jeśli w systemie przygotowania próbki wykorzystywane są bufony płuczące zawierające alkohol etylowy, należy upewnić się, że przed etapem elucji kwasu nukleinowego usunięte zostały wszelkie pozostałości alkoholu etylowego. Alkohol etylowy jest silnym inhibitorem badania PCR w czasie rzeczywistym.

OSTROŻNIE



Użycie nośnikowego RNA jest krytyczne dla wydajności izolacji i stabilności izolowanego kwasu nukleinowego.

Dodatkowe informacje i pomoc techniczną w zakresie obróbki wstępnej i przygotowania próbki można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

8.2 Przygotowanie mieszaniny master mix

Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki powinny być całkowicie rozmrożone, wymieszane (poprzez użycie pipety lub wytrząsanie) i krótko odwirowane.

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 zawiera heterologiczną IC, która może być stosowana jako kontrola inhibicji PCR lub jako kontrola dla procedury przygotowania próbki (izolacja kwasu nukleinowego) i jako kontrola inhibicji PCR.

- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna jest używana jako kontrola inhibicji PCR, a nie jako kontrola procedury przygotowania próbki, mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującym schematem pipetowania:

Liczba reakcji (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Kontrola wewnętrzna	1 µl	12 µl
Objętość mieszaniny master mix	21 µl	252 µl

- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna jest używana jako kontrola procedury przygotowania próbki i jako kontrola inhibicji PCR, dodaj IC podczas procedury izolacji kwasu nukleinowego.
- ▶ Niezależnie od metody/systemu stosowanego do izolacji kwasu nukleinowego, **nie należy** dodawać IC bezpośrednio do próbki. IC należy zawsze dodawać do mieszaniny próbki i buforu lizującego. Objętość dodawanego IC zawsze zależy wyłącznie od objętości eluatu. Stanowi ona 10% objętości eluatu. Na przykład, jeśli kwas nukleinowy ma być eluowany w 60 µl buforu elucyjnego lub wody, do mieszaniny próbki i buforu lizującego należy dodać 6 µl IC na próbkę.
- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna została dodana podczas procedury przygotowania próbki, mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującą procedurą schematu pipetowania:

Liczba reakcji (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Objętość mieszaniny master mix	20 µl	240 µl

OSTROŻNIE

Jeśli kontrola wewnętrzna (IC) została dodana podczas procedury przygotowania próbki, co najmniej kontrola negatywna powinna zawierać IC.

OSTROŻNIE

Niezależnie od metody/systemu stosowanego do izolowania kwasu nukleinowego, nie należy dodawać IC bezpośrednio do próbki.

8.3 Konfiguracja reakcji

- ▶ Przenieś pipetą 20 µl mieszaniny master mix do odpowiednich studzienek w 96-studzienkowej płytce optycznej lub do odpowiedniej optycznej probówki reakcyjnej.
- ▶ Dodaj 10 µl próbki (eluat z izolacji kwasu nukleinowego) lub 10 µl roztworu kontrolnego (standard ilościowy, kontrola pozytywna lub negatywna).

Konfiguracja reakcji	
Mieszanina master mix	20 µl
Próbka lub kontrola	10 µl
Objętość całkowita	30 µl

- ▶ Należy upewnić się, że dla każdego badania używana jest co najmniej jedna kontrola pozytywna (QS) oraz jedna kontrola negatywna.

- ▶ Do celów oznaczenia ilościowego, należy użyć wszystkie standardy ilościowe (QS1 do QS4).
- ▶ Dokładnie wymieszaj próbki i kontrole z mieszaniną master mix poprzez pipetowanie w górę i w dół.
- ▶ Zamknij 96-studzienkową płytkę, używając odpowiednich pokrywek lub optycznej folii do zamykania płytek oraz zamknij probówki reakcyjne, używając odpowiednich pokrywek.
- ▶ Odwiruj 96-studzienkową płytkę reakcyjną w wirówce kompatybilnej z mikroplatką przez 30 sekund z prędkością około 1000 x g (~ 3000 obr./min).

9. Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym

Szczegółowe informacje dotyczące konfiguracji i programowania różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkownika danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące programowania i używania zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

9.1 Ustawienia

- ▶ Wybierz następujące ustawienia:

Ustawienia	
Objętość reakcji	30 µl
Szybkość zmiany	Domyślna
Wzorzec pasywny	ROX™

9.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

Sekwencja docelowa	Nazwa detektora	Barwnik reporterowy	Barwnik tłumiący
DNA właściwe dla HAdV	HAdV	FAM™	(Brak)
Kontrola wewnętrzna (IC)	Internal Control	JOE™	(Brak)

9.3 Profil temperatury i pomiar barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiar barwnika:

	Etap	Liczba cykli	Pomiar	Temperatura [°C]	Czas [min:s]
Denaturacja	Utrzymywanie temperatury	1	-	95	10:00
Amplifikacja	Zmiany cykliczne	45	-	95	00:15
			tak	58	01:00

10. Analiza danych

Szczegółowe informacje dotyczące analizy danych dla określonych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkowania danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące analizy danych generowanych przez zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 dla różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

10.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

Jakościowe badanie diagnostyczne jest **prawidłowe**, jeśli zostały spełnione następujące warunki kontrolne:

ID kontroli	Kanał detekcji	
	FAM™	JOE™
Kontrola pozytywna (QS)	+	+/-*
Kontrola negatywna	-	+

* Obecność lub brak sygnału w kanale JOE™ nie jest istotna dla prawidłowości badania.

10.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

Jakościowe badanie diagnostyczne jest **nieprawidłowe**, jeśli (i) nie zostało ukończone, lub (ii) jakiegokolwiek warunki kontrolne dla **prawidłowego** badania diagnostycznego nie zostały spełnione.

W przypadku **nieprawidłowego** badania diagnostycznego, badanie należy powtórzyć z użyciem pozostałego oczyszczonego kwasu nukleinowego lub rozpocząć ponownie z użyciem pierwotnych próbek.

10.1.3 Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

Ilościowe badanie diagnostyczne jest **prawidłowe**, jeśli zostały spełnione wszystkie warunki kontrolne dla **prawidłowego jakościowego** badania diagnostycznego [patrz rozdział 10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)]. Wyniki **oznaczenia ilościowego** są **prawidłowe**, jeśli utworzona **krzywa wzorcowa** osiąga następującą wartość parametru kontrolnego:

Parametr kontrolny	Prawidłowa wartość
R^2	$\geq 0,98$

UWAGA



Nie wszystkie urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym wskazują wartość R^2 . Szczegółowe informacje można znaleźć w instrukcji obsługi danego urządzenia.

10.1.4 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

Ilościowe badanie diagnostyczne jest **nieprawidłowe**, jeśli (i) nie zostało ukończone, lub (ii) jakiegokolwiek warunki kontrolne dla **prawidłowego ilościowego** badania diagnostycznego nie zostały spełnione.

W przypadku **nieprawidłowego** badania diagnostycznego, badanie należy powtórzyć z użyciem pozostałego oczyszczonego kwasu nukleinowego lub rozpocząć ponownie z użyciem pierwotnych próbek.

10.2 Manualna analiza

10.2.1 Analiza jakościowa

Kanał detekcji		Interpretacja wyników
FAM™	JOE™	
+	+*	Wykryto DNA właściwe dla HAdV.
-	+	Nie wykryto DNA właściwego dla HAdV. Próbkę nie zawiera wykrywalnych ilości DNA właściwego dla HAdV.
-	-	Inhibicja PCR lub nieprawidłowe działanie odczynnika. Powtórzyć badanie, rozpoczynając od pierwotnej próbki, lub pobrać i wykonać badanie na nowej próbce.

* Detekcja kontroli wewnętrznej w kanale detekcji JOE™ nie jest wymagana dla wyników pozytywnych w kanale detekcji FAM™. Wysokie stężenie DNA HAdV w próbce może powodować osłabienie lub brak sygnału kontroli wewnętrznej.

10.2.2 Analiza ilościowa

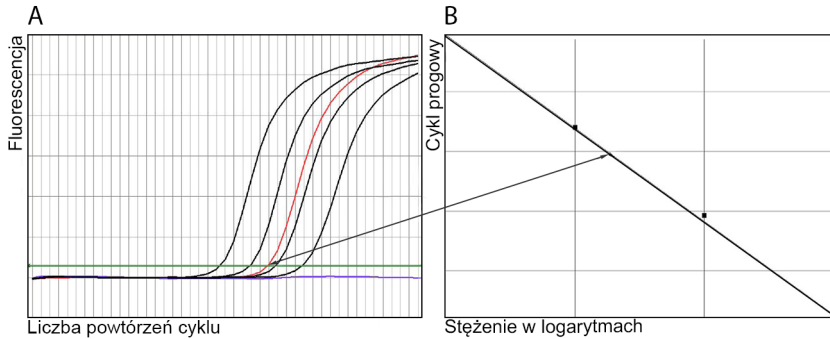
Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 obejmuje cztery standardy ilościowe (QS). W celu utworzenia **krzywej wzorcowej** dla analizy ilościowej, muszą zostać zdefiniowane jako **standardy** o odpowiednich stężeniach (patrz rozdział 6. Opis wyrobu). Użycie **standardów** o odpowiednich stężeniach pozwala na uzyskanie krzywej wzorcowej do analizy ilościowej.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

C_t = Cykl progowy
 m = Nachylenie
 N_0 = Stężenie początkowe
 b = Punkt przecięcia

Na podstawie krzywej wzorcowej można oznaczyć ilościowo próbki pozytywne o nieznanym stężeniu.

$$N_0 = 10^{(C_i - b) / m}$$



Rysunek 1: Standardy ilościowe (czarne), próbka pozytywna (czerwona) oraz negatywna (niebieska) widoczne na wykresie amplifikacji [A] oraz analiza krzywej wzorcowej [B]

UWAGA



Stężenie „Próbki” jest wskazywane w kopie/μl i dotyczy stężenia w eluacie.

W celu wyznaczenia **ładunku wirusa pierwotnej próbki**, należy użyć następującego wzoru:

$$\text{Ładunek wirusa (Próbka) [kopie/ml]} = \frac{\text{Objętość (Eluat) [\mu l]} \cdot \text{ładunek wirusa (Eluat) [kopie/\mu l]}}{\text{Objętość próbki [ml]}}$$

11. Charakterystyka działania testu

Ze względu na brak międzynarodowych standardów dla adenowirusów, charakterystyka działania ilościowego zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 została wykonana z użyciem genomowego DNA oznaczanego izolatu HAdV-2 (gatunek C), który poddano kalibracji z użyciem plazmidu oznaczonego ilościowo metodą fotometryczną, zawierającego sekwencję docelową HAdV-2 (gatunek C).

Do oceny charakterystyki działania, DNA genomowe gatunków adenowirusów A–F zostało zanalizowane przy użyciu zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0. Genomowe DNA zostało uzyskane od ATCC (American Type Culture Collection), NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) oraz z oznaczanych izolatów hodowli komórkowych. Do analizy gatunku G (serotyp HAdV-52) użyto plazmidu zawierającego odpowiednią sekwencję docelową.

Tabela 1: Analizowane gatunki i serotypy adenowirusa RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0

HAdV gatunek	HAdV serotyp	Źródło	Wyniki dla RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0
A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Pozytywny
A	HAdV-31	oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
A	HAdV-18	plazmid	Pozytywny
B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D, oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
B1	HAdV-7	plazmid	Pozytywny
B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Pozytywny
B2	HAdV-11	oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
B2	HAdV-55	plazmid	Pozytywny
C	HAdV-1	ATCC-VR-1, oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
C	HAdV-2	Materiał mający znak CE serotyp 2 adenowirusa do amplifikacji kwasu nukleinowego, oznaczany izolat z hodowli komórkowej, plazmid	Pozytywny
C	HAdV-5	ATCC-VR-5D, oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
C	HAdV-6	oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
D	HAdV-37	ATCC-VR-929D, oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
D	HAdV-19	plazmid	Pozytywny
E	HAdV-4	ATCC-VR-1572, ATCC-VR-1572D, oznaczany izolat z hodowli komórkowej	Pozytywny
F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Pozytywny
G	HAdV-52	plazmid	Pozytywny

Dodatkowo, w ramach paneli oceny efektywności QCMD2010 (Quality Control for Molecular Diagnostics) z użyciem zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 wykryto serotypy adenowirusa HAdV-1 (gatunek C), HAdV-4 (gatunek E), HAdV-34 (gatunek B) i HAdV-41 (gatunek F).

11.1 Czulość analityczna

Czulość analityczna zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 jest definiowana jako stężenie (kopie/ μ l eluatu) cząsteczek DNA właściwych dla HAdV, dla których odsetek pozytywnych wyników detekcji wynosi 95%. Czulość analityczna została wyznaczona na podstawie analizy serii rozcieńczeń genomowego DNA właściwego dla HAdV-2 (gatunek C).

Tabela 2: Wyniki PCR użyte do obliczeń czulości analitycznej w odniesieniu do detekcji DNA właściwego dla HAdV

Stężenie początkowe [kopie/ μ l]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
10,100	16	16	100
3,200	16	16	100
1,010	16	15	94
0,320	16	11	69
0,101	16	4	25
0,032	16	1	6
0,010	16	0	0
0,003	16	0	0
0,001	16	0	0

Czułość analityczna zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 została wyznaczona na podstawie analizy probit:

- Przy detekcji DNA właściwego dla adenowirusa, czułość analityczna wynosi 1,09 kopie/μl [przedział ufności 95% (CI): 0,62–3,08 kopie/μl]

11.2 Swoistość analityczna

Reaktywność krzyżowa

Swoistość analityczna zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 została oceniona na podstawie badań panelu genomowego DNA/RNA izolowanego z innych patogenów powodujących podobne objawy, co zakażenia adenowirusami, oraz badań ludzkiego genomowego DNA.

Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

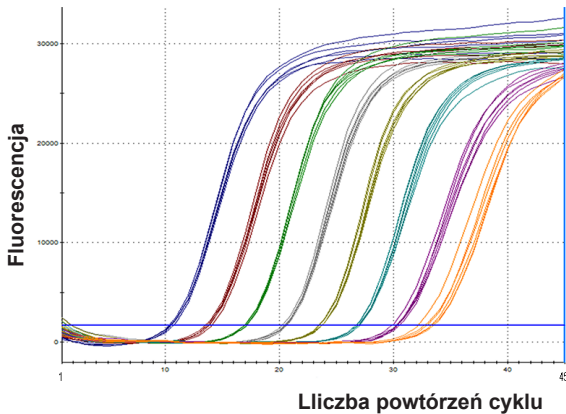
- Wirus BK
- Wirus cytomegalii
- Wirus Epsteina-Barr
- Wirus zapalenia wątroby typu A
- Wirus zapalenia wątroby typu B
- Wirus zapalenia wątroby typu C
- Wirus opryszczki pospolitej typu 1
- Wirus opryszczki pospolitej typu 2
- Ludzki wirus opryszczki typu 6A
- Ludzki wirus opryszczki typu 6B
- Ludzki wirus opryszczki typu 7
- Ludzki wirus opryszczki typu 8
- Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1
- Ludzki metapneumowirus typu A
- Ludzki metapneumowirus typu B
- Ludzki wirus paragrypy typu 1
- Ludzki wirus paragrypy typu 2
- Ludzki wirus paragrypy typu 3
- Ludzki wirus paragrypy typu 4a/b
- Ludzki parwovirus B19
- Syncytialny wirus oddechowy typu A
- Syncytialny wirus oddechowy typu B
- Wirus grypy typu A
- Wirus grypy typu B
- Wirus JC
- Rynowirus typu 16
- Wirus SV typu 40

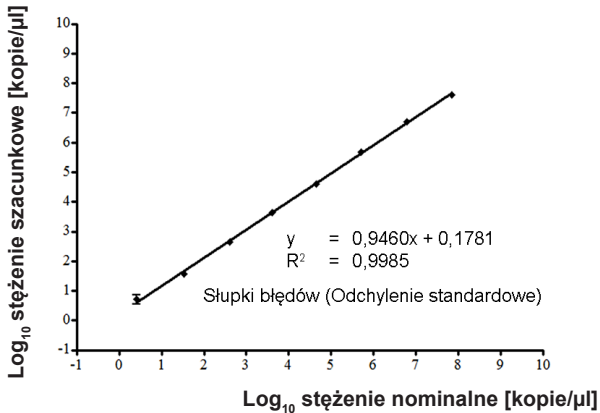
- Wirus ospy wietrznej i półpaśca
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Haemophilus influenzae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Streptococcus pyogenes*

11.3 Zakres liniowości

Zakres liniowości zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 został oceniony na podstawie analizy logarytmicznej serii rozcieńczeń oznaczanego genomowego DNA HAdV-2 (gatunek C), w zakresie stężeń od 4,00E+07 do 4,00E+00 kopii/μl. Każde rozcieńczenie badano przy użyciu 6 powtórzeń.

A



B

Rysunek 2: Krzywe amplifikacji [A] i regresja liniowa [B] analizowanej serii rozcieńczeń DNA właściwego dla HAdV

Zakres liniowości zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 obejmuje przedział co najmniej **siedmiu** rzędów wielkości.

11.4 Precyzja

Precyzja zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 została wyznaczona jako zmienność wewnątrztestowa (zmienność w ramach pojedynczego eksperymentu), zmienność międzytestowa (zmienność pomiędzy różnymi eksperymentami) oraz zmienność międzyseryjna (zmienność pomiędzy różnymi seriami produkcyjnymi). Zmienność całkowita została obliczona przez połączenie wyników 3 analiz.

Dane zmienności są wyrażone jako odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Dane są oparte na analizie ilościowej określonych stężeń genomowego DNA właściwego dla HAdV oraz wartościach cyklu progowego (C_t) dla kontroli wewnętrznej. W celu ustalenia zmienności wewnątrz- i międzytestowej oraz międzyseryjnej, przeanalizowano co najmniej 6 powtórzeń każdej próbki.

Tabela 3: Dane precyzji detekcji DNA właściwego dla HAdV

HAdV	Średnie stężenie [kopie/μl]	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	473,43	30,44	6,43
Zmienność międzytestowa	450,13	38,93	8,65
Zmienność międzyseryjna	463,55	34,98	7,55
Zmienność całkowita	451,31	37,86	8,39

Tabela 4: Dane precyzji detekcji kontroli wewnętrznej

Kontrola wewnętrzna	Średni cykl progowy (C _t)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	24,07	0,15	0,63
Zmienność międzytestowa	24,13	0,18	0,77
Zmienność międzyseryjna	24,40	0,41	1,68
Zmienność całkowita	24,30	0,34	1,40

11.5 Ocena diagnostyczna

Czułość i swoistość diagnostyczna zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 są oceniane regularnie na podstawie analizy próbek odniesienia oraz próbek diagnostycznych, badanych z użyciem metody odniesienia, tj. wewnętrznego testu PCR, DFA, hodowli typu „shell”, mikroskopii elektronowej oraz technologii Luminex.

Dotychczas badaniom poddano 223 próbki wymazów, aspiratów nosowo-gardłowych, wydzieliny oskrzelowej, stolca, moczu, osocza oraz wymazów z oczu, pobrane przez różne laboratoria w celu wyznaczenia czułości i swoistości diagnostycznej zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0.

W oparciu o metody odniesienia, spośród 223 próbek, 50 okazało się pozytywnych pod względem HAdV, natomiast 173 próbki były negatywne. 4 próbki dały wynik pozytywny dla HAdV (C_t - wartości 35,2, 36,8, 40,0, 37,9) dla zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0, które dały wynik negatywny z użyciem wewnętrznego testu PCR. Wszystkie 50 próbek o oczekiwanej zawartości DNA wirusa HAdV potwierdzono jako próbki pozytywne HAdV na podstawie analizy z użyciem zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0.

Tabela 5: Wyniki oceny czułości i swoistości diagnostycznej zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0

		RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0	
		-	+
Metoda odniesienia	-	169	4*
	+	0	50

* C_t - wartości 35,2, 36,8, 40,0, 37,9

12. Ograniczenia

- Optymalne rezultaty mogą być zapewnione wyłącznie w przypadku ścisłego przestrzegania zaleceń instrukcji użytkowania.
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Dobra praktyka laboratoryjna jest kluczowa dla prawidłowego działania testu. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie doprowadzić do zanieczyszczenia składników zestawu i konfiguracji reakcji. Wszystkie odczynniki należy monitorować pod kątem zanieczyszczenia i skażenia. Wszelkie podejrzone odczynniki należy utylizować.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnego działania testu.
- Test nie może być stosowany bezpośrednio na próbce. Przed użyciem tego testu należy zastosować odpowiednie metody izolacji kwasu nukleinowego.
- Obecność inhibitorów PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe obniżone oznaczenie ilościowe, lub fałszywie negatywne wyniki.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu HAdV objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą spowodować nieprawidłowe oznaczenie ilościowe i/lub niewykrycie obecności patogenów.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

13. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością według wytycznych Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485, każda partia zestawów RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

14. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
telefon: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Literatura

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Znaki towarowe i zastrzeżenia

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. stosowane w niniejszym dokumencie, nawet jeśli nie zostało to wyraźnie oznaczone, są traktowane jako chronione prawnie.















Zestaw RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.



Wyrób nie posiada licencji Health Canada oraz nie został dopuszczony ani zatwierdzony przez FDA.

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 Altona Diagnostics GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.

17. Wyjaśnienie symboli

Symbol	Wyjaśnienie
	Wyrób medyczny używany do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Numer partii
	Kolor zakrętki
	Numer katalogowy
	Zawartość
	Numer
	Składnik
	Global Trade Item Number
	Zapoznaj się z instrukcją użytkowania
	Zawiera ilość wystarczającą na „n” testów/reakcji (rxns)
	Limit temperatury
	Termin ważności
	Producent
	Ostrożnie: Wyróżnia instrukcje lub procedury operacyjne, których nieprzestrzeganie może stać się przyczyną obrażeń ciała lub może negatywnie wpływać na działanie wyrobu. Skontaktuj się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc.

Symbol	Wyjaśnienie
	Uwaga: Przydatne informacje dla użytkownika, które nie są kluczowe dla wykonywanego zadania.
	Wersja

Uwagi:

Uwagi:

Uwagi:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

