

## Hướng dẫn sử dụng

# RealStar<sup>®</sup> Enterovirus RT-PCR Kit 1.0

03/2018 VI



# RealStar®

## Enterovirus RT-PCR Kit 1.0

Để sử dụng với

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

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

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

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

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



571013



96



03 2018



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

## Mục lục

<b>1.</b>	<b>Mục đích sử dụng .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Thành phần bộ kit .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Bảo quản .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Kiến thức khái quát.....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Mô tả sản phẩm .....</b>	<b>9</b>
6.1	Hệ thống realtime PCR .....	10
<b>7.</b>	<b>Cảnh báo và thận trọng .....</b>	<b>11</b>
<b>8.</b>	<b>Quy trình .....</b>	<b>12</b>
8.1	Chuẩn bị mẫu.....	12
8.2	Pha hóa chất phản ứng (Master Mix).....	13
8.3	Thiết lập phản ứng.....	15
<b>9.</b>	<b>Lập trình hệ thống realtime PCR .....</b>	<b>16</b>
9.1	Cài đặt.....	16
9.2	Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm).....	16
9.3	Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm .....	17
<b>10.</b>	<b>Phân tích dữ liệu.....</b>	<b>17</b>
10.1	Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán.....	18
10.1.1	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính).....	18
10.1.2	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính).....	18
10.2	Diễn giải kết quả .....	19
10.2.1	Phân tích định tính .....	19

<b>11. Đánh giá hiệu suất</b> .....	<b>19</b>
11.1 Độ nhạy phân tích .....	19
11.2 Độ đặc hiệu phân tích .....	21
11.3 Độ đúng (Precision) .....	22
<b>12. Hạn chế</b> .....	<b>23</b>
<b>13. Kiểm soát chất lượng</b> .....	<b>24</b>
<b>14. Hỗ trợ kỹ thuật</b> .....	<b>24</b>
<b>15. Tài liệu</b> .....	<b>24</b>
<b>16. Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm</b> .....	<b>25</b>
<b>17. Giải thích các ký hiệu</b> .....	<b>26</b>

## 1. Mục đích sử dụng

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* dựa trên công nghệ realtime PCR thời gian thực để phát hiện định tính RNA đặc hiệu của enterovirus và rhinovirus.

## 2. Thành phần bộ kit

Màu nắp	Thành phần	Số lọ	Thể tích [ $\mu$ l/lọ]
Xanh lam	Master A	8	60
Tím	Master B	8	180
Xanh lá cây	Internal Control	1	1000
Đỏ	Positive Control	1	250
Trắng	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

## 3. Bảo quản

- Sản phẩm RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được vận chuyển với đá khô. Các thành phần của bộ kit cần được bảo quản đông lạnh. Nếu có từ một thành phần trở lên không đông lạnh tại thời điểm nhận hoặc các ống bị hỏng trong quá trình vận chuyển, vui lòng liên hệ với Altona Diagnostics GmbH để được hỗ trợ.
- Tất cả các thành phần phải được bảo quản ở nhiệt độ -25 °C đến -15 °C tại thời điểm nhận.
- Tránh đông - rã đông hóa chất phản ứng Master Mix (nhiều hơn hai lần) vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của xét nghiệm. Các hóa chất cần được chia vào các ống nhỏ (aliquot) và bảo quản lạnh trong trường hợp chúng được sử dụng một cách không liên tục.

- Bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ +2 °C đến +8 °C trong vòng không quá 2 giờ.
- Không để hóa chất phản ứng Master A và Master B tiếp xúc với ánh sáng.

#### 4. Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp

- Hệ thống realtime PCR phù hợp (xem chương 6.1 Hệ thống realtime PCR)
- Hệ thống hoặc bộ kit tách chiết nucleic acid phù hợp (xem chương 8.1 Chuẩn bị mẫu)
- Máy ly tâm để bàn có rôto dùng cho ống 2 ml
- Máy ly tâm có rôto dùng cho đĩa microtiter, trong trường hợp sử dụng đĩa 96 giếng
- Máy vortex
- Các đĩa 96 giếng hoặc ống phản ứng phù hợp với nắp đậy (quang học) tương ứng
- Pipet (có thể điều chỉnh)
- Đầu tip có lọc (dùng một lần)
- Găng tay không bột (dùng một lần)

#### LƯU Ý

**i**

*Vui lòng đảm bảo rằng tất cả các thiết bị được sử dụng đã được cài đặt, hiệu chuẩn, kiểm tra và bảo trì theo hướng dẫn và khuyến nghị của nhà sản xuất.*

#### LƯU Ý

**i**

*Nên sử dụng rôto 72 giếng cùng với các ống phản ứng 0,1 ml thích hợp trong trường hợp sử dụng Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) hoặc Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).*

## 5. Kiến thức khái quát

Chi *Enterovirus* là một loại virus thuộc họ *picornaviridae* có bộ gen RNA chuỗi đơn dương tính gồm 7.000 - 8.500 nucleotit. Chi này gồm 12 loài khác nhau [9 loài *enterovirus* (EV) và 3 loài *rhinovirus* (RV)], trong đó loài *enterovirus* A-D và loài *rhinovirus* A-C là những tác nhân gây bệnh ở người. 9 loài *enterovirus* bao gồm 68 phân loại trong khi 3 loài *rhinovirus* có 100 phân loại đã được biết đến [1].

Tùy vào loại virus, *enterovirus* lây truyền qua đường phân-miệng (trực tiếp từ người sang người hoặc gián tiếp từ các đồ vật, nước hoặc thực phẩm bị nhiễm bẩn hàng ngày). Con đường lây truyền virus, đặc biệt là với virus *rhinovirus*, cũng có thể diễn ra thông qua dịch tiết đường hô hấp [2, 3]. Con người có thể nhiễm các loài virus *enterovirus* và *rhinovirus* trên toàn thế giới vào bất kỳ thời điểm nào trong năm. Không có mô hình dự đoán nào về thời điểm những loại virus này xuất hiện, lây truyền và bùng phát bệnh. Các triệu chứng lâm sàng phụ thuộc vào loại virus. Virus *rhinovirus* thường chỉ lây nhiễm qua đường hô hấp với các triệu chứng như cảm lạnh thông thường nhưng cũng có thể tiến triển thành bệnh nặng hơn như viêm phổi. Lây nhiễm virus *enterovirus* không gây bại liệt thường xảy ra theo mùa và thường đi kèm các triệu chứng về tim mạch và hô hấp, viêm nhiễm da và niêm mạc, nhiễm trùng sơ sinh hoặc viêm màng não và viêm não. Nhóm virus *poliovirus* liên quan chặt chẽ nhất với bệnh bại liệt, một bệnh truyền nhiễm gây tê liệt có thể dẫn đến tình trạng bất động vĩnh viễn và thường dẫn đến tử vong. Các triệu chứng lâm sàng hầu hết không cụ thể, khiến cho việc phân biệt nhiễm virus *enterovirus* với nhiễm các tác nhân lây nhiễm khác trở nên khó khăn [2, 3].

[1] Lauber C, Gorbalenya AE. 2012. Toward genetics-based virus taxonomy: comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *Journal of Virology*, vol. 86 no. 7, 3905-3915. doi:10.1128/JVI.07174-11.

[2] [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Enteroviren/Enteroviren\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/Enteroviren/Enteroviren_node.html) (access: 18.12.2017)

[3] <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/index.html> (access: 18.12.2017)



**LƯU Ý**

*Do ở góc độ phân tử thì virus RNA tiến hóa tương đối nhanh, luôn tiềm ẩn rủi ro cho bất kỳ hệ thống xét nghiệm nào dựa trên RT-PCR, trong đó sự tích lũy các đột biến theo thời gian có thể dẫn đến kết quả âm tính giả.*

## 6. Mô tả sản phẩm

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* dựa trên công nghệ realtime PCR thời gian thực để phát hiện định tính RNA đặc hiệu của enterovirus và rhinovirus.

Xét nghiệm bao gồm một hệ thống khuếch đại dị thể (nội chuẩn) để xác định chất ức chế RT-PCR tiềm năng và để xác nhận tính toàn vẹn của hóa chất trong bộ kit.

Công nghệ RT-PCR sử dụng phản ứng phiên mã ngược (RT) để chuyển RNA thành DNA mạch bổ sung (cDNA), phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các trình tự mục tiêu đặc hiệu và các đầu dò đặc hiệu mục tiêu để phát hiện DNA đã được khuếch đại. Các đầu dò được dán nhãn bằng thuốc nhuộm có gắn đầu huỳnh quang và đầu dập (quencher).

Các đầu dò đặc hiệu cho RNA của EV và/hoặc RV được đánh dấu huỳnh quang FAM™. Đầu dò đặc hiệu cho chất nội chuẩn (IC) được đánh dấu huỳnh quang JOE™.

Việc sử dụng các đầu dò mang thuốc nhuộm riêng biệt giúp phát hiện đồng thời RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV và chất nội chuẩn trong các kênh phát hiện tương ứng của hệ thống realtime PCR được sử dụng.

Xét nghiệm này bao gồm ba quá trình trong một ống nghiệm:

- Phiên mã ngược RNA của mục tiêu và chất nội chuẩn thành cDNA
- PCR khuếch đại cDNA mục tiêu và chất nội chuẩn

- Phát hiện đồng thời các sản phẩm khuếch đại PCR bằng đầu dò được đánh dấu thuốc nhuộm huỳnh quang

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 bao gồm:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

Master A và Master B chứa tất cả các thành phần (đệm PCR, phiên mã ngược, DNA polymerase, muối magiê, đoạn mồi và đầu dò) để cho phép phiên mã ngược, khuếch đại qua trung gian PCR và phát hiện RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV và chất nội chuẩn (Internal Control) trong một lần thiết lập phản ứng.

### 6.1 Hệ thống realtime PCR

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 đã được phát triển và kiểm định theo được sử dụng với các hệ thống realtime PCR sau:

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

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

## 7. Cảnh báo và thận trọng

*Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi sử dụng sản phẩm.*

- Trước khi sử dụng lần đầu, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần nhằm đảm bảo:
  - Sự nguyên vẹn
  - Đủ số lượng, loại và dung tích (xem chương 2. Thành phần bộ kit)
  - Ghi nhãn chính xác
  - Vẫn trong trạng thái đông lạnh khi đến nơi
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Mẫu bệnh phẩm phải luôn được xử lý dưới dạng mẫu truyền nhiễm và/hoặc nguy hiểm sinh học theo đúng quy trình an toàn phòng thí nghiệm.
- Đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần, áo khoác phòng thí nghiệm và kính bảo vệ mắt khi xử lý mẫu vật.
- Không để vi khuẩn và nuclease (DNase/RNase) nhiễm vào mẫu thử và các thành phần của bộ kit.
- Luôn sử dụng đầu tip dùng một lần, có lọc và không chứa DNase/RNase.
- Luôn đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần khi xử lý các bộ phận của bộ kit.
- Sử dụng các khu vực làm việc riêng và tách biệt cho các hoạt động (i) chuẩn bị mẫu; (ii) thiết lập phản ứng và (iii) khuếch đại/phát hiện. Quy trình làm việc trong phòng thí nghiệm nên tiến hành theo một hướng nhất quán. Luôn đeo găng tay dùng một lần ở từng khu vực và thay găng tay trước khi vào một khu vực khác.
- Để vật tư và dụng cụ ở các khu vực làm việc riêng biệt và không di chuyển các vật dụng này từ khu vực này sang khu vực khác.

- Bảo quản vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng dương tính tách biệt với tất cả các thành phần khác của bộ kit.
- Không mở các ống/đĩa phản ứng sau khi khuếch đại để tránh nhiễm bản các amplicon.
- Có thể sử dụng các chất kiểm chuẩn bổ sung theo hướng dẫn hoặc yêu cầu trong các quy định hoặc tổ chức kiểm định của địa phương, tiểu bang và/hoặc liên bang.
- Không hấp tiệt trùng (autoclave) các ống phản ứng sau khi thực hiện kỹ thuật PCR vì cách làm này không làm giảm nucleic acid đã khuếch đại và sẽ có nguy cơ làm nhiễm bản khu vực phòng thí nghiệm.
- Không sử dụng các thành phần của bộ kit đã hết hạn sử dụng.
- Thải bỏ mẫu và chất thải xét nghiệm theo các quy định an toàn tại địa phương.

## 8. Quy trình

### 8.1 Chuẩn bị mẫu

RNA tách chiết được là là nguyên liệu ban đầu cho RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0.

Chất lượng RNA tách chiết được có tác động lớn đến hiệu suất của toàn bộ hệ thống xét nghiệm. Nên đảm bảo hệ thống tách chiết nucleic acid tương thích với công nghệ realtime PCR. Các bộ kit và hệ thống sau đây phù hợp cho việc tách chiết nucleic acid:

- QIAamp® Viral RNA 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)

Các hệ thống và bộ kit tách chiết nucleic acid thay thế cũng có thể tương thích. Người dùng cần kiểm định tính phù hợp của quy trình tách chiết nucleic acid để sử dụng với RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0.

Nếu sử dụng quy trình chuẩn bị mẫu dạng cột ly tâm có đệm rửa chứa ethanol, thì cần thực hiện thêm bước ly tâm trong 10 phút ở tốc độ khoảng 17.000 x g (~ 13.000 rpm) (sử dụng ống thu mới) trước khi rửa giải nucleic acid.

#### THẬN TRỌNG



***Nếu hệ thống chuẩn bị mẫu của bạn đang sử dụng đệm rửa có chứa ethanol, cần loại bỏ mọi dấu vết ethanol trước khi rửa giải nucleic acid. Ethanol là chất ức chế realtime PCR mạnh.***

#### THẬN TRỌNG



***Việc sử dụng giá thể RNA là rất quan trọng đối với hiệu quả tách chiết và tính ổn định của nucleic acid tách chiết được.***

Để biết thêm thông tin và được hỗ trợ kỹ thuật về cách xử lý trước và chuẩn bị mẫu, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

## 8.2 Pha hỗn hợp phản ứng (Master Mix)

Tất cả hóa chất và mẫu phải được rã đông hoàn toàn, trộn (bằng pipet hoặc vortex nhẹ) và ly tâm trong thời gian ngắn trước khi sử dụng.

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 có chứa chất nội chuẩn (IC) dị loại, có thể được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế RT-PCR hoặc như một biện pháp kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu (tách chiết nucleic acid) và làm chất kiểm soát ức chế RT-PCR.

- ▶ Trong trường hợp IC được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế RT-PCR nhưng không phải là chất kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hỗn hợp phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Nội chuẩn	1 µl	12 µl
<b>Thể tích hỗn hợp phản ứng (Master Mix)</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ Nếu IC được sử dụng làm chất kiểm chuẩn cho quy trình chuẩn bị mẫu và như một chất kiểm soát ức chế RT-PCR, thêm IC vào quy trình tách chiết nucleic acid.
- ▶ Bất kể phương pháp/hệ thống nào được sử dụng để tách chiết nucleic acid, **không được** thêm trực tiếp IC vào bệnh phẩm. IC phải luôn được thêm vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải. Thể tích IC phải thêm vào luôn luôn và chỉ phụ thuộc vào thể tích của sản phẩm rửa giải. Thể tích này chiếm 10 % thể tích sản phẩm rửa giải. Chẳng hạn, nếu nucleic acid sẽ được rửa giải trong 60 µl dung dịch đệm rửa giải hoặc nước thì cần thêm 6 µl IC mỗi mẫu vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải.
- ▶ Trường hợp IC được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hỗn hợp phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Thể tích hỗn hợp phản ứng (Master Mix)</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**THẬN TRỌNG**

*Nếu IC (chất nội chuẩn) được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, thì chỉ ít chứng âm cần bao gồm IC.*

**THẬN TRỌNG**

*Bất kể sử dụng phương pháp/hệ thống nào để tách chiết nucleic acid, không được bổ sung trực tiếp IC vào bệnh phẩm.*

**8.3 Thiết lập phản ứng**

- ▶ Pipet 20 µl Master Mix cho vào các giếng cần sử dụng của đĩa phản ứng 96 giếng hoặc ống phản ứng có độ quang học phù hợp.
- ▶ Thêm 10 µl mẫu (sản phẩm rửa giải từ quá trình tách chiết nucleic acid) hoặc 10 µl chất kiểm chuẩn (đối chứng âm hoặc đối chứng dương).

Thiết lập phản ứng	
Hỗn hợp phản ứng	20 µl
Mẫu hoặc chất kiểm chuẩn	10 µl
<b>Tổng thể tích</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Đảm bảo sử dụng ít nhất một đối chứng dương và một đối chứng âm trong mỗi lần chạy.
- ▶ Trộn kỹ các mẫu và chất kiểm chuẩn với Master Mix bằng cách hút nhà pipet.
- ▶ Đậy đĩa phản ứng 96 giếng bằng nắp đậy thích hợp hoặc màng dán quang học và đóng các ống phản ứng bằng nắp đậy thích hợp.
- ▶ Ly tâm đĩa phản ứng 96 giếng trong máy ly tâm có rotor dành cho đĩa microtiter trong 30 giây với tốc độ khoảng 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

## 9. Lập trình hệ thống realtime PCR

Để biết thông tin cơ bản về việc cài đặt và lập trình các hệ thống realtime PCR khác, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn lập trình chi tiết liên quan đến việc sử dụng RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

### 9.1 Cài đặt

- Xác định các thông số cài đặt sau:

Cài đặt	
Thể tích phản ứng	30 µl
Tốc độ gia nhiệt	Mặc định
Tham chiếu thụ động	Không

### 9.2 Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm)

- Xác định bộ phận hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm):

Mục tiêu	Bộ phận phát hiện	Chất phát huỳnh quang (reporter)	Chất dập huỳnh quang (quencher)
RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV	EV và/hoặc RV	FAM™	(Không)
Nội chuẩn (Internal Control, IC)	IC	JOE™	(Không)



### 9.3 Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm

- Xác định chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm:

	Bước	Số chu kỳ lặp lại	Ghi nhận tín hiệu	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [phút:giây]
Phiên mã ngược	Giữ	1	-	55	20:00
Biến tính	Giữ	1	-	95	02:00
Khuếch đại	Chu kỳ	45	-	95	00:15
			Có	58	00:45
			-	72	00:15

## 10. Phân tích dữ liệu

Để biết thông tin cơ bản về phân tích dữ liệu trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng của hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn chi tiết về phân tích dữ liệu được tạo ra từ RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

## 10.1 Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán

### 10.1.1 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính)

Một lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **hợp lệ** khi thoả mãn các điều kiện kiểm soát sau:

Mã kiểm chuẩn	Kênh nhận diện	
	FAM™	JOE™
Đối chứng dương	+	+/-*
Đối chứng âm	-	+

\* Sự hiện diện hay vắng mặt của một tín hiệu trong kênh JOE™ không liên quan đến tính hợp lệ của lần chạy thử nghiệm.

### 10.1.2 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính)

Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **không hợp lệ** khi (i) quá trình chạy chưa hoàn tất hoặc (ii) không đáp ứng bất kỳ điều kiện kiểm soát nào đối với một lần chạy chẩn đoán **hợp lệ**.

Trong trường hợp lần chạy xét nghiệm chẩn đoán bị coi là **không hợp lệ**, lặp lại xét nghiệm bằng cách sử dụng nucleic acid tinh khiết còn lại hoặc bắt đầu lại từ các mẫu ban đầu.

## 10.2 Diễn giải kết quả

### 10.2.1 Phân tích định tính

Kênh nhận diện		Diễn giải kết quả
FAM™	JOE™	
+	+	Phát hiện RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV.
-	+	Không phát hiện RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV. Mẫu không chứa đủ lượng RNA đặc hiệu cho EV và/hoặc RV để có thể phát hiện.
-	-	RT-PCR bị ức chế hoặc hóa chất bị hỏng. Lặp lại xét nghiệm với mẫu ban đầu hoặc thu thập và xét nghiệm mẫu mới.

\* Việc phát hiện chất nội chuẩn (IC) trong kênh nhận diện JOE™ là không bắt buộc đối với các kết quả dương tính trong kênh nhận diện FAM™. Tải lượng EV và/hoặc RV RNA cao trong mẫu có thể làm giảm hoặc mất tín hiệu chất nội chuẩn (IC).

## 11. Đánh giá hiệu suất

Tiến hành đánh giá hiệu suất của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 bằng cách sử dụng RNA được tổng hợp *in vitro* định lượng (IVT) cũng như sử dụng bộ gen RNA từ enteroviruses và rhinoviruses.

### 11.1 Độ nhạy phân tích

Độ nhạy phân tích của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được định nghĩa là nồng độ (bản sao/μl sản phẩm rửa giải) của các phân tử RNA đặc hiệu cho enterovirus A71 và rhinovirus 72 có thể được phát hiện với tỷ lệ dương tính là 95 %. Độ nhạy phân tích được xác định bằng cách phân tích mẫu pha loãng nhiều lần của các chuỗi *in vitro* (IVT) đặc hiệu của virus enterovirus A71 và rhinovirus 72 với nồng độ đã biết trước đó.

**Bảng 2:** Kết quả RT-PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện RNA đặc hiệu cho enterovirus A71

Nồng độ đầu vào [bản sao/ $\mu$ l]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ biểu hiện [%]
31,622	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
3,162	24	23	95,8
1,000	24	17	70,8
0,316	24	7	29,2
0,100	24	4	16,7
0,032	24	0	0,0
0,010	24	0	0,0
0,003	24	1	4,2

**Bảng 3:** Kết quả RT-PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện RNA đặc hiệu cho rhinovirus 72

Nồng độ đầu vào [bản sao/ $\mu$ l]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ biểu hiện [%]
31,622	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
3,162	24	24	100,0
1,000	24	21	87,5
0,316	24	18	75,0
0,100	24	13	54,2
0,032	24	1	4,2
0,010	24	1	4,2
0,003	24	1	4,2

Độ nhạy phân tích của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được xác định bằng phân tích probit:

- Đối với việc phát hiện RNA đặc hiệu cho enterovirus A71, độ nhạy phân tích là 3,40 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95 % (CI): 2,03 - 7,68 bản sao/μl]
- Đối với việc phát hiện RNA đặc hiệu cho rhinovirus 72, độ nhạy phân tích là 1,25 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95 % (CI): 0,71 - 3,01 bản sao/μl]

## 11.2 Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được đảm bảo thông qua sự lựa chọn kỹ lưỡng các oligonucleotide (đoạn mồi và đầu dò). Các oligonucleotide được kiểm tra bằng cách phân tích so sánh trình tự với các trình tự có sẵn công khai để đảm bảo sẽ phát hiện được tất cả các kiểu gen EV và RV có liên quan.

RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 không phản ứng chéo với bất kỳ mầm bệnh nào trong số các mầm bệnh sau:

- Astrovirus
- Coronavirus 229E
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Virus adenovirus ở người
- Virus parainfluenza ở người
- Virus hợp bào hô hấp ở người
- Virus cúm A
- Virus cúm B
- Virus sởi
- Norovirus
- Virus parechovirus
- Rotavirus
- Virus viêm não do ve truyền
- Virus varicella-zoster

Độ đặc hiệu phân tích của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 trong việc phát hiện các chủng enterovirus và rhovirus khác nhau được đánh giá bằng cách phân tích bộ gen RNA được lấy từ chủng enterovirus và rhinovirus gây bệnh ở người khác nhau.

Đặc tính của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được thử nghiệm bằng cách sử dụng loài virus enterovirus và rhovirus gây bệnh ở người (các kiểu huyết thanh) sau đây:

- Enterovirus A (Enterovirus A71)
- Enterovirus B (Echovirus 11)
- Enterovirus C (Coxsackie virus A24, Poliovirus Sabin 1, 2, 3)
- Enterovirus D (Enterovirus D68)
- Rhinovirus A (Rhinovirus A16)
- Rhinovirus B (Rhinovirus 72)
- Rhinovirus C (không rõ kiểu huyết thanh)

### 11.3 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (precision) của RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 được xác định là biến động trong một lần xét nghiệm, biến động giữa các lần xét nghiệm và biến động giữa các lô sản xuất khác nhau. Biến động tổng số được tính toán bằng cách kết hợp 3 phân tích.

**Bảng 4:** Dữ liệu về độ đúng khi phát hiện RNA đặc hiệu của enterovirus A71 và rhinovirus 72

Enterovirus A71 và rhinovirus 72		Chu kỳ ngưỡng trung bình (C <sub>t</sub> )	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Biến động trong mỗi xét nghiệm	Enterovirus A71	31,68	0,18	0,57
	Rhinovirus 72	32,59	0,15	0,45
Biến động giữa các xét nghiệm	Enterovirus A71	31,24	0,08	0,26
	Rhinovirus 72	32,76	0,08	0,23
Biến động giữa các lô	Enterovirus A71	31,44	0,29	0,91
	Rhinovirus 72	32,66	0,13	0,41
Biến động tổng số	Enterovirus A71	31,38	0,25	0,79
	Rhinovirus 72	32,70	0,13	0,39

**Bảng 5:** Dữ liệu chính xác để phát hiện chất nội chuẩn

Nội chuẩn	Chu kỳ ngưỡng trung bình (C <sub>t</sub> )	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Biến động trong mỗi xét nghiệm	28,64	0,08	0,28
Biến động giữa các xét nghiệm	29,30	0,05	0,18
Biến động giữa các lô	28,96	0,34	1,16
Biến động tổng số	29,08	0,32	1,11

## 12. Hạn chế

- Cần tuân thủ nghiêm ngặt hướng dẫn sử dụng để thu được kết quả tối ưu.
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Cần phải có quy định thực hành tốt phòng thí nghiệm (GLP) để thực hiện đúng xét nghiệm này. Cần hết sức cẩn thận để bảo vệ độ tinh khiết của các thành phần trong bộ kit và các lần thiết lập phản ứng. Tất cả các hóa chất phải được giám sát chặt chẽ về tạp chất và tình trạng nhiễm chéo. Bất kỳ loại hóa chất nào nghi ngờ có vấn đề đều phải được thải bỏ.
- Cần thiết lập các quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản và xử lý mẫu thích hợp để thực hiện tối ưu xét nghiệm này.
- Xét nghiệm này không được sử dụng trực tiếp trên mẫu vật. Các phương pháp tách chiết nucleic acid thích hợp phải được tiến hành trước khi sử dụng xét nghiệm này.
- Sự xuất hiện của chất ức chế RT-PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.
- Các đột biến tiềm ẩn trong vùng mục tiêu của bộ gen EV và/hoặc RV được bao bọc bởi các đoạn mồi và/hoặc đầu dò được sử dụng trong bộ dụng cụ có thể dẫn đến việc không phát hiện được sự hiện diện của mầm bệnh.
- Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 phải được diễn giải dựa trên tất cả các phát hiện lâm sàng và kết quả xét nghiệm.

### 13. Kiểm soát chất lượng

Theo Hệ thống Quản lý Chất lượng của Altona Diagnostics GmbH được chứng nhận EN ISO 13485, mỗi lô RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 đều được kiểm tra theo các thông số kỹ thuật đã ấn định trước để đảm bảo chất lượng sản phẩm nhất quán.

### 14. Hỗ trợ kỹ thuật

Để được cung cấp dịch vụ hỗ trợ khách hàng, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi:

**Email:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**Số điện thoại:** +49-(0)40-5480676-0

### 15. Tài liệu

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

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



## 16. Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm

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).

Tên, nhãn hiệu đã đăng ký v.v. được sử dụng trong tài liệu này, ngay cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy, không thể coi là không được pháp luật bảo vệ.



RealStar® Enterovirus RT-PCR Kit 1.0 là bộ kit chẩn đoán đã được gắn nhãn CE theo chỉ thị 98/79/EC của Châu Âu về chẩn đoán *in vitro* (trong ống nghiệm).

Sản phẩm chưa được Bộ Y tế Canada cấp phép và chưa được FDA cho phép hoặc phê duyệt.

Không hiện diện ở tất cả các quốc gia.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; bảo lưu mọi quyền.

## 17. Giải thích các ký hiệu

Biểu tượng	Giải thích
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>in vitro</i>
	Mã lô
	Màu nắp
	Số catalogue
	Nội dung
	Mã số
	Thành phần
	Mã giao dịch toàn cầu của sản phẩm
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng
	Chứa đủ cho "n" xét nghiệm/phản ứng (rxns)
	Giới hạn nhiệt độ
	Hạn sử dụng
	Nhà sản xuất
	Thận trọng
	Lưu ý
	Phiên bản



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

