

Bruksanvisning

AltoStar[®] EBV PCR Kit 1.5

10/2021 NO

AltoStar[®]

EBV PCR Kit 1.5

For bruk med

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

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



AS0131543



96



10 2021



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

Innholdsfortegnelse

1.	Om denne bruksanvisningen	8
2.	Tiltent bruk	9
3.	Innhold i kit	10
4.	Oppbevaring og håndtering	11
4.1	Oppbevaring.....	11
4.2	Håndtering.....	12
4.2.1	Master A og Master B.....	12
4.2.2	Kvantifiseringsstandarder og No Template Control.....	13
5.	Produktbeskrivelse	13
5.1	Bakgrunn.....	14
5.2	Komponentbeskrivelse.....	14
5.2.1	Master A og Master B.....	14
5.2.2	Kvantifiseringsstandarder.....	14
5.2.3	No Template Control.....	15
5.3	Arbeidsflyter.....	15
5.3.1	AltoStar® Workflow (arbeidsflyt).....	15
5.3.2	Andre arbeidsflyter.....	16
5.3.2.1	Nukleinsyreekstraksjon.....	16
5.3.2.2	Real-time PCR-instrumenter.....	17
5.4	Prøver.....	17
5.4.1	Prøvetyper.....	17
5.4.2	Prøvetaking og håndtering.....	18
6.	Advarsler, forholdsregler og begrensninger	19
7.	Bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)	21

7.1	Prøvevolum	21
7.2	Prøverør	21
7.3	Prøvestrekkoder	21
7.4	Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)	22
7.5	Generelle materialer og utstyr	23
7.6	Prosedyre	24
7.6.1	Oversikt over AltoStar® Workflow (arbeidsflyt).....	24
7.6.2	Konfigurere en AltoStar® kjøring	28
7.6.3	Starte en PCR-setup-kjøring	28
7.6.3.1	Forberede reagenser for en PCR-setup-kjøring.....	29
7.6.3.2	Laste AltoStar® AM16 for en PCR-setup-kjøring	30
7.6.3.3	Under en PCR-setup-kjøring	33
7.6.4	Slutten til en PCR-setup-kjøring	33
7.6.4.1	Resultater til PCR-setup-kjøring.....	35
7.6.5	Forsegle PCR-platen	36
7.6.5.1	PCR-blandestabilitet.....	37
7.6.6	Starte en PCR-kjøring	38
7.6.6.1	Under en PCR-kjøring	39
7.6.6.2	Tildele analyser til brønngrupper	39
7.6.7	PCR-dataanalyse	42
7.6.7.1	Grunnlinjekorreksjon	44
7.6.7.2	Utelukking av uregelmessige PCR-signaler	46
7.6.7.3	Konfigurere terskelverdier	50
7.6.8	Gyldighet av PCR-resultater.....	54
7.6.8.1	Utelukking av brønner med ugyldig data.....	54
7.6.8.2	Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativt).....	57
7.6.8.3	Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvantitativt)	57
7.6.8.4	Gyldighet av prøveresultater	58

7.6.9	Eksport av PCR-resultater for automatisert resultatolkning.....	59
7.6.10	Eksport av PCR-resultater for manuell resultatolkning.....	60
7.6.10.1	Manuell resultatolkning.....	62
8.	Bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med andre real-time PCR-instrumenter enn CFX96™ Deep Well Dx System.....	64
8.1	Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med.....	64
8.2	Prosedyre	65
8.2.1	Prøvepreparasjon	65
8.2.2	Mastermix-oppsett.....	66
8.2.3	Reaksjonsoppsett.....	66
8.2.4	PCR-kjøring.....	68
8.2.4.1	Konfigurere real-time PCR-instrumentet	68
8.2.4.2	Kjøreinstillinger.....	68
8.2.5	Dataanalyse.....	69
9.	Ytelsesdata	70
9.1	Plasma.....	70
9.1.1	Analytisk sensitivitet	70
9.1.2	Analytisk spesifisitet	72
9.1.2.1	Negative prøver.....	72
9.1.2.2	Interfererende stoffer.....	72
9.1.2.3	Kryssreaktivitet.....	73
9.1.3	Lineær område	74
9.1.4	Presisjon.....	75
9.1.5	Total feilrate	77
9.1.6	Carry over.....	77
9.1.7	Klinisk ytelse.....	77
9.2	Helblod	79
9.2.1	Analytisk sensitivitet	79

9.2.2	Analytisk spesifisitet	81
9.2.2.1	Negative prøver.....	81
9.2.2.2	Interfererende stoffer.....	81
9.2.2.3	Kryssreaktivitet.....	82
9.2.3	Lineær område	83
9.2.4	Presisjon.....	84
9.2.5	Total feilrate	85
9.2.6	Carry over.....	85
9.2.7	Klinisk ytelse.....	85
10.	Avfallshåndtering.....	88
11.	Kvalitetskontroll.....	88
12.	Teknisk støtte	89
13.	Litteratur	89
14.	Varemerker og ansvarsfraskrivelse.....	90
15.	Symboler.....	91
16.	Analyseprotokoll for AltoStar® Connect programvare og informasjon for LIMS integrering	93
17.	Revisjonslogg.....	95

1. Om denne bruksanvisningen

Denne bruksanvisningen gir brukeren instruksjoner i bruken av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Kapitler 1–6 og 9–14 inneholder generell informasjon og instruksjoner som gjelder for hver av arbeidsflytene til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Kapittel 7 har instruksjoner i hvordan produktet skal brukes med AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton, heretter oppsummert som AltoStar® AM16) med AltoStar® Connect programvare (versjon 1.7.4 eller høyere, Hamilton) for automatisert PCR-setup og på CFX96™ Deep Well Dx System* (Bio-Rad, heretter oppsummert som CFX96™ DW Dx) med CFX Manager™ Dx programvare (versjon 3.1, Bio-Rad) for real-time PCR. Kapittel 8 har instruksjoner i hvordan AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 skal brukes sammen med andre metoder for nukleinsyreekstraksjon og real-time PCR-instrumenter. Henvis til de respektive bruksanvisningene i listen under for detaljert informasjon om bruk av AltoStar® AM16, AltoStar® Connect programvare, AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 og CFX96™ DW Dx:

- AltoStar® Automation System AM16 Operatørmanual IVD (Hamilton)
- AltoStar® Connect Programvare Operatørmanual IVD (Hamilton)
- Bruksanvisning til AltoStar® Purification Kit 1.5
- Bruksanvisning til AltoStar® Internal Control 1.5
- CFX96™ Dx- og CFX96™ Deep Well Dx-system, Brukerhåndbok (Bio-Rad)

* «CFX96™ Deep Well Dx System» er det nye merkenavnet til IVD-versjonen av CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

I manualen har begrepene FORSIKTIG og MERK følgende betydninger:

FORSIKTIG



Fremhever driftsinstruksjoner eller prosedyrer som, hvis de ikke følges riktig, kan føre til personskade eller negativt påvirke produktets ytelse. Kontakt altona Diagnostics teknisk støtte for assistanse.

MERK



Brukeren blir vist informasjon som er nyttig, men ikke nødvendig for å kunne utføre den aktuelle oppgaven.

Les bruksanvisningen nøye før du bruker produktet.

2. Tiltent bruk

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er en *in vitro* diagnostisk test basert på real-time PCR-teknologi til bruk i deteksjon og kvantifisering av Epstein-Barr-virus-spesifikk DNA i humant plasma og helblod. Den er tiltent brukt som hjelpemiddel til diagnose av EBV-infeksjon og overvåking av EBV-mengden i individer med EBV-infeksjon.

Resultatene som genereres av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 må tolkes i forbindelse med andre kliniske funn og laboratorieresultater.

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er ment å bli brukt av fagpersoner opplært i molekylærbiologiske metoder og *in vitro* diagnostiske prosedyrer.

3. Innhold i kit

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 består av følgende komponenter:

Tabell 1: Kitkomponenter

Korkfarge	Komponent	Antall rør	Nominelt volum [µl/rør]
Blå	Master A ¹⁾	8	60 ²⁾
Lilla	Master B ¹⁾	8	180 ³⁾
Rød	QS1 ⁴⁾	2	250
Rød	QS2 ⁴⁾	2	250
Rød	QS3 ⁴⁾	2	250
Rød	QS4 ⁴⁾	2	250
Hvit	NTC ⁵⁾	2	250

1) Inneholder biologisk materiale av animalsk opprinnelse

2) Inneholder et ekstra volum med 25 µl for å kompensere for dødvolumet til AltoStar® AM16s væskehåndtering

3) Inneholder et ekstra volum med 55 µl for å kompensere for dødvolumet til AltoStar® AM16s væskehåndtering

4) Kvantifiseringsstandard (Positive Control)

5) No Template Control (Negative Control)

FORSIKTIG



Før første gangs bruk må produktet og dets komponenter kontrolleres for mangler med tanke på antall, type og fylling. Ikke bruk et produkt som er defekt eller ufullstendig, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 inneholder nok reagenser til å utføre 96 reaksjoner i maksimalt 8 kjøring.

Produktet fraktes på tørris. Undersøk produktet og dets komponenter for følgende ved mottak og før første gangs bruk:

- integritet
- uten mangler med tanke på antall, type og fylling
- riktig merket
- utløpsdato
- frossen tilstand
- klarhet og uten partikler

Hvis én eller flere produktkomponenter ikke er i frossen tilstand ved mottak, eller hvis tilstanden til rørene ikke er i henhold til spesifikasjonene eller at de mangler, må du kontakte Altona Diagnostics teknisk støtte for assistanse (se kapittel 12. Teknisk støtte).

4. Oppbevaring og håndtering

Alle reagensene inkludert i AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er klar-til-bruk-løsninger.

4.1 Oppbevaring

Alle komponentene til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 må oppbevares i et temperaturområde mellom -25 °C til -15 °C fra tidspunktet de mottas.

FORSIKTIG



Feilaktig oppbevaring kan negativt påvirke produktets ytelse.

FORSIKTIG



Ikke bruk produkter som har passert utløpsdatoen. Bruk av produkter etter utløpsdatoen kan negativt påvirke produktets ytelse.

4.2 Håndtering

FORSIKTIG



Ikke overskrid tine-fryse-sekvensen og håndteringstiden som er angitt i bruksanvisningen. Dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

FORSIKTIG



Feilaktig håndtering av produktets komponenter og prøver kan forårsake kontaminering, som kan negativt påvirke produktets ytelse:

- Flasker eller flaskekorker må ikke byttes med hverandre.
- Oppbevar positivt og/eller mulig positivt materiale adskilt fra kitkomponenter.
- Bruk adskilte arbeidsområder for prøvepreparasjon/reaksjonsoppsett og amplifikasjon/deteksjon.
- Alltid kasser hansker etter at de har blitt brukt til håndtering av positivt og/eller potensielt positivt materiale.
- Ikke åpne PCR-platene og/eller rørene etter amplifikasjon.

FORSIKTIG



Ikke bland komponenter fra ulike kit lot-er. Bruk av andre kit lot-er kan negativt påvirke produktets ytelse.

4.2.1 Master A og Master B

Etter tining er Master A og Master B stabile i opptil fem timer i en romtemperatur opptil +30 °C.

MERK



Hvis Master A og Master B ble tint, men ikke brukt, kan de fryses ned og tines opp igjen til senere bruk. Hvis de åpnes, må lokkene kasseres og nye lokk brukes for å unngå kontaminering av reagensene.

4.2.2 Kvantifiseringsstandarder og No Template Control

1. Etter tining vil kvantifiseringsstandarder (QS-er) og No Template Control (NTC) være stabile i opptil fem timer i en temperatur opptil +30 °C.
2. Kasser lokkene til QS-er og NTC-rør etter hver bruk, og sett på nye lokk for å unngå kontaminering av reagensene.
3. Etter hver bruk skal QS-er og NTC-rør lukkes med nye lokk og deretter fryses umiddelbart.
4. Ikke overskrid følgende tine-fryse-sekvens for hver QS og NTC-rør: *Tin 1* → *Frys 1* → *Tin 2* → *Frys 2* → *Tin 3* → *Frys 3* → *Tin 4*

5. Produktbeskrivelse

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er en *in vitro* diagnostisk test til bruk i deteksjon og kvantifisering av EBV-spesifikk DNA i humant plasma og helblod.

Den er basert på real-time PCR-teknologi, ved bruk av polymerasekjedereaksjon (PCR) for amplifikasjon av EBV-spesifikke målsekvenser og målspesifikke prober med fluorescerende merking for detektering av amplifisert DNA.

I tillegg til det EBV DNA-spesifikke amplifikasjons- og deteksjonssystemet inkluderer analysen oligonukleotider for amplifikasjon og deteksjon av internkontroll (heretter forkortet til IC; AltoStar® Internal Control 1.5).

Prober som er spesifikt beregnet for EBV DNA er merket med fluoroforen FAM™. Proben som er spesifikt beregnet for IC er merket med fluoroforen (JOE™) som kan detekteres i f.eks. VIC™ kanalen.

Ved å bruke prober med sine egne unike fargestoffer blir det mulig å parallelldetektere EBV-spesifikk DNA og IC i tilhørende deteksjonskanaler på real-time PCR-instrumentet som brukes.

5.1 Bakgrunn

Epstein-Barr-virus (EBV) er et medlem av *Herpesviridae*-familien. Den består av et dobbeltrådet DNA-genom på omtrent 172 kbp, som eksisterer både i en lineær form i det modne virionet og i en sirkulær, episomal form i latente, infiserte celler. EBV infiserer primært lymfoide celler i B-linjen. EBV er unik blant *herpesvirus* fordi den har evnen til å transformere forløper og modne humane B-lymfocytter, og derved konvertere dem til lymfoblastoide linjer. EBV er den etiologiske agenten for infeksøs mononukleose. Det fleste blir smittet av viruset på et eller annet tidspunkt i løpet av livet. Barndomsinfeksjoner er stort sett asymptomatiske. EBV har vært knyttet til noen kreftformer, inkludert Burkitt-lymfom og nasofaryngealt karsinom (NPC). Viruset blir også i økende grad anerkjent som en viktig virusagent hos transplantasjonsmottakere [1,2,3].

5.2 Komponentbeskrivelse

5.2.1 Master A og Master B

Master A og Master B inneholder alle komponentene (PCR-buffer, DNA-polymerase, magnesiumsalt, primere og prober) som trengs for å utføre PCR-mediert amplifikasjon og måldeteksjon av EBV-spesifikk DNA og IC i ett og samme reaksjonsoppsett.

5.2.2 Kvantifiseringsstandarder

QS-er inneholder standardiserte konsentrasjoner av EBV-spesifikk DNA (se tabell 2). De ble kalibrert mot Verdens Helseorganisasjons internasjonale standard "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/260)" [4]. QS-ene brukes til å verifisere funksjonaliteten til EBV DNA-spesifikk amplifikasjons- og deteksjonssystem, samt for å generere en standardkurve som muliggjør kvantifisering av EBV-spesifikk DNA i en prøve.

Tabell 2: Kvantifiseringsstandarder

Kvantifiseringsstandard	Konsentrasjon [IU/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

5.2.3 No Template Control

NTC inneholder ingen EBV-spesifikk DNA, men inneholder IC-malen. NTC brukes som negativ kontroll for EBV DNA-spesifikk real-time PCR og indikerer mulig kontaminering av Master A og Master B.

5.3 Arbeidsflyter

5.3.1 AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)

AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) består av følgende IVD-produkter:

- AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- AltoStar® Connect programvare, versjon 1.7.4 eller høyere (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx-system (Bio-Rad) med CFX Manager™ Dx programvare, versjon 3.1 (Bio-Rad)

Arbeidsflyten inkluderer følgende trinn:

1. Konfigurere en AltoStar® kjøring.
2. Ekstraksjonskjøring på AltoStar® AM16 ved bruk av AltoStar® Purification Kit 1.5 og AltoStar® Internal Control 1.5.
3. PCR-setup-kjøring på AltoStar® AM16 ved bruk av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5.
4. Real-time PCR-kjøring på en CFX96™ DW Dx.

Henvis til kapittel 7. Bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) for detaljert informasjon for trinn 3 og 4 i arbeidsflyten. Alle prøvetypene og prøvevolumene som er oppgitt for bruk til AltoStar® Purification Kit 1.5, kan prosesseres samtidig på AltoStar® AM16. Hver enkelt prøve kan analyseres med så mange real-time PCR-analyser i parallell som tilgjengelig eluat tillater.

MERK



Analyser med forskjellige PCR-temperaturprofiler blir automatisk sortert i separate PCR-plater.

5.3.2 Andre arbeidsflyter

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 kan brukes med kompatible arbeidsflyter (manuell eller automatisk). Real-time PCR-instrumenter som har blitt validert til bruk med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er oppført i kapittel 5.3.2.2 Real-time PCR-instrumenter. Bruk av alternative ekstraksjonsprosedyrer må valideres av brukeren.

5.3.2.1 Nukleinsyreekstraksjon

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 kan brukes til andre systemer for nukleinsyreekstraksjon enn AltoStar® AM16. Alternative prosedyrer for nukleinsyreekstraksjon må valideres av brukeren. Henvis til kapittel 8.2.1 Prøvepreparasjon for instruksjoner i hvordan du bruker AltoStar® Internal Control 1.5 sammen med andre ekstraksjonsmetoder enn AltoStar® Purification Kit 1.5.

5.3.2.2 Real-time PCR-instrumenter

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er utviklet og validert med følgende real-time PCR-instrumenter:

- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

Bruk av real-time PCR-instrumentene oppført ovenfor (unntatt CFX96™ Deep Well Dx System) krever at konfigurering av PCR, instrument og dataanalyse må gjøres manuelt (henvis til kapitlene 8.2.2 Mastermix-oppsett til 8.2.5 Dataanalyse for mer informasjon).

5.4 Prøver

5.4.1 Prøvetyper

Følgende prøvetyper er validert for bruk med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5:

- Humant EDTA-plasma
- Humant citratplasma
- Humant EDTA helblod
- Humant helblod med sitrat

FORSIKTIG



Ikke bruk andre prøvetyper! Bruk av andre prøvetyper kan negativt påvirke produktets ytelse.

5.4.2 Prøvetaking og håndtering

Blodprøver må tas med kommersielt tilgjengelige blodprøvetakingssystemer (f.eks. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner eller tilsvarende). Rørrinnhold skal blandes rett etter prøvetaking. Blodprøvene skal fraktes som kjølevarer i en temperatur mellom +2 °C og +8 °C. Transport skal følge lokale og nasjonale bestemmelser for transport av biologisk materiale. Blod som skal brukes må ikke lagres lenger enn 48 timer i romtemperatur (+20 °C til +25 °C), tre dager ved +2 °C til +8 °C eller sju dager ved -25 °C til -15 °C.

For å generere EDTA plasma må helblod sentrifugeres i henhold til instruksjonene fra produsenten av prøvetakingssystemet innen 24 timer etter prøvetakingen. EDTA plasma som skal brukes må ikke lagres lenger enn 48 timer i romtemperatur (+20 °C til +25 °C), fem dager ved +2 °C til +8 °C eller to måneder ved -25 °C til -15 °C.

FORSIKTIG



Alltid behandle prøver som infeksiosøst og (bio-)farlig materiale i henhold til prosedyrer for sikkerhet og god laboratoriepraksis. Hvis prøvemateriale søles, må et egnet desinfeksjonsmiddel brukes. Håndter kontaminert materiale som biofarlig.

MERK



Kit-ytelsen blir ikke påvirket av prøver som har vært lagret i frosen tilstand. Når du bruker frosne prøver, må du forsikre deg om at prøvene har tint helt og at de er riktig blandet før de brukes.

6. Advarsler, forholdsregler og begrensninger

- Før første gangs bruk må produktet og dets komponenter kontrolleres for mangler med tanke på antall, type og fylling. Ikke bruk et produkt som er defekt eller ufullstendig, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Feilaktig oppbevaring kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke bruk produkter som har passert utløpsdatoen. Bruk av produkter etter utløpsdatoen kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke overskrid tine-fryse-sekvensen og håndteringstiden som er angitt i bruksanvisningen. Dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Feilaktig håndtering av produktets komponenter og prøver kan forårsake kontaminering, som kan negativt påvirke produktets ytelse:
 - Flasker eller flaskekorker må ikke byttes med hverandre.
 - Oppbevar positivt og/eller mulig positivt materiale adskilt fra kitkomponenter.
 - Bruk adskilte arbeidsområder for prøvepreparasjon/reaksjonsoppsett og amplifikasjon/deteksjon.
 - Alltid kasser hansker etter at de har blitt brukt til håndtering av positivt og/eller potensielt positivt materiale.
 - Ikke åpne PCR-platene og/eller rørene etter amplifikasjon.
- Ikke bland komponenter fra ulike kit lot-er. Bruk av andre kit lot-er kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke bruk andre prøvetyper! Bruk av andre prøvetyper kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Alltid behandle prøver som infeksiøst og (bio-)farlig materiale i henhold til prosedyrer for sikkerhet og god laboratoriepraksis. Hvis prøvemateriale søles, må et egnet desinfeksjonsmiddel brukes. Håndter kontaminert materiale som biofarlig.
- Hvis eluater oppbevares på et sted som ikke oppfyller lagringsbetingelsene, kan dette forårsake nedbrytning av EBV-målsekvensen og kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke bruk en annen analyseprotokollversjon enn den som er angitt på 2D-strekkoden i denne bruksanvisningen. Hvis feil analyseprotokollversjon brukes, kan det negativt påvirke produktets ytelse.

- Manglende sentrifugering av produktkomponentene etter tining kan forårsake kontaminering med reagensrester i lokkene og kan negativt påvirke produktets ytelse.
- For å unngå kontaminering av reagensene må rørkorker ikke brukes på nytt, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Som med alle andre diagnostester må resultater tolkes med hensyn til alle kliniske funn og laboratorieresultater.
- Tilstedeværelsen av PCR-inhibitorer (f.eks. heparin) kan forårsake falskt negative eller ugyldige resultater.
- Ikke bruk ulike Master A- og Master B-volumer for mastermix-oppsettet enn det som er angitt i denne bruksanvisningen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke overskrid lagringstiden for PCR-blandingen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke bland sammen prøver eller prøve-ID-er under PCR-setup-kjøringen eller overfør dem til PCR-instrumentet. Dette kan føre til falskt positive eller falskt negative resultater på grunn av feilaktig tildeling av analysene.
- Ikke bruk andre cycling-innstillinger enn de som er angitt i bruksanvisningen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.
- Ikke bruk andre kontrollinnstillinger for dataanalyse enn de som er oppgitt i denne bruksanvisningen, ellers kan det føre til feilaktige IVD-prøveresultater.
- Hvis prøven inneholder andre patogener enn EBV, kan konkurranse om målampifikasjon eller kryssreaktivitet forekomme, noe som kan føre til feilaktige IVD-prøveresultater.
- Kassering av farlig og biologisk avfall skal skje i samsvar med lokale og nasjonale bestemmelser for å unngå miljøforurensning.
- Potensielle mutasjoner i målområdene til EBV-genomet som er dekket av primerne og/eller probene som er i bruk, kan forårsake underkvantifisering og/eller gjøre at patogenet ikke kan detekteres.

7. Bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)

Følgende del av bruksanvisningen forklarer bruken av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 sammen med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt). AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) består av ulike IVD-produkter (AltoStar® AM16, AltoStar® Connect programvare, AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 og CFX96™ DW Dx). Detaljerte beskrivelser av hvordan disse produktene brukes finnes i den respektive bruksanvisningen.

- AltoStar® Automation System AM16 Operatørmanual IVD (Hamilton)
- AltoStar® Connect Programvare Operatørmanual IVD (Hamilton)
- Bruksanvisning til AltoStar® Purification Kit 1.5
- Bruksanvisning til AltoStar® Internal Control 1.5
- CFX96™ Dx- og CFX96™ Deep Well Dx-system, Brukerhåndbok (Bio-Rad)

7.1 Prøvevolum

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er validert for nukleinsyreekstraksjon fra et prøvevolum på 500 µl ved bruk av AltoStar® AM16. Ekstra prøvevolum må inkluderes for å kompensere for dødvolumet til prøverøret som brukes (se kapittel 7.2 Prøverør).

7.2 Prøverør

Prøverør som er egnet til bruk på AltoStar® AM16 kan kjøpes fra Altona Diagnostics (7 ml rør med kork, 82 x 13 mm, VK000010). Brukeren kan teste andre prøverør for å se om de kan brukes eller ikke. For detaljert informasjon henvis til bruksanvisningen til AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Prøvestrekkoder

Ved automatisk prøveidentifikasjon med AltoStar® AM16 må alle prøverør merkes med en egnet strekkode. For detaljert informasjon henvis til bruksanvisningen til AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)

Materiale og utstyr vist i tabell 3 må bestilles fra altona Diagnostics.

Tabell 3: Nødvendig materiale og utstyr

Materiale	Beskrivelse	Ordrenr.
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Produktpakke som består av AltoStar® Automation System AM16, AltoStar® Connect programvare (versjon 1.7.4 eller høyere) og IT-maskinvare	AM16
AltoStar® Detection	Produktpakke som består av CFX96™ Deep Well Dx System med CFX Manager™ Dx Software (versjon 3.1), en strekkodeskanner og IT-maskinvare	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Kjemisk utstyr for isolasjon og ekstraksjon av nukleinsyre til bruk med AltoStar® Automation System AM16	PK15-16/ PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Nukleinsyreekstraksjon og PCR-amplifikasjon og deteksjonskontroll	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	Plate med 96 brønner, med strekkode og hvite brønner, halvskjørt	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Forseglingsfolie for PCR-platen	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	1 000 µl filterspisser til bruk med AltoStar® Automation System AM16	VK000007
300 µl CO-RE Tips	300 µl filterspisser til bruk med AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Rør med strekkode for pooling av PCR-reagenser	VK000002
Waste Bag	Steril autoklavpose til bruk med AltoStar® Automation System AM16	VK000009
Screw Cap - red	Skrukork for QS1–QS4-rør (rød)	VK000012
Screw Cap - blue	Skrukork for Master A-rør (blå)	VK000013
Screw Cap - purple	Skrukork for Master B-rør (lilla)	VK000015
Screw Cap - white	Skrukork for NTC-rør (hvit)	VK000016

Tabell 4: Ekstra laboratoriemateriale og utstyr

Materiale	Beskrivelse	Ordrenr.
Plateforsegler	f.eks. AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	f.eks. PX1 Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Generelle materialer og utstyr

- Vortex mixer
- Engangshansker, pudderfri
- Sentrifuge til sentrifugering av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5-komponenter
- Sentrifuge til sentrifugering av PCR-plater

7.6 Prosedyre

7.6.1 Oversikt over AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)

Trinnene i AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) er oppsummert i tabell 5. Informasjon om spesifikke bruksinnstillinger til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er oppgitt i kapittel 7.6.2 Konfigurere en AltoStar® kjøring. Se bruksanvisningene til AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Connect programvare og AltoStar® AM16 for detaljerte instruksjoner for trinn 1–5.

Mer detaljert beskrivelse av trinn 6–11 finnes i kapitler 7.6.3 Starte en PCR-setupkjøring til 7.6.10 Eksport av PCR-resultater for manuell resultattolkning.

Tabell 5: Oversikt over AltoStar® Workflow (arbeidsflyt)

Trinn	Handling
1. Starte AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> • Slå på AltoStar® AM16. • Slå på datamaskin og skjerm. • Start AltoStar® Connect programvare.
2. Utføre vedlikehold	<ul style="list-style-type: none"> • I menylinjen klikker du på Application → Instrument Maintenance. <ul style="list-style-type: none"> ◦ Hvis det er tid for ukentlig vedlikehold, klikk på Start Weekly Maintenance. ◦ Hvis det er tid for daglig vedlikehold, klikk på Start Daily Maintenance. • Følg instruksjonene på skjermen for vedlikeholdsprosessen.
3. Konfigurere en AltoStar® kjøring	<ul style="list-style-type: none"> • I menylinjen klikker du på Program Run → Program Run (AltoStar® Purification). Alternativt, gå tilbake til startskjermen og klikk på Program Run-knappen. • Angi prøver eller importer fra LIMS. • Velg den følgende analysen for prøvene med mindre de allerede er importert fra LIMS. <ul style="list-style-type: none"> ◦ AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 • Klikk på Create Run-knappen i verktøylinjen for å opprette en AltoStar® kjøring.

Trinn	Handling
<p>4. Starte en ekstraksjonskjøring</p>	<ul style="list-style-type: none"> • I menylinjen klikker du på Purification → Start Purification. Alternativt, gå tilbake til startskjermen og klikk på Start Purification-knappen. • Velg ekstraksjonskjøringen som skal startes for å se prøvene som er inkludert i den valgte ekstraksjonskjøringen. • Forbered ekstraksjonsreagensene: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Forsikre deg om at ekstraksjonsreagensene som skal brukes har samme lastenummer (unntatt AltoStar® Internal Control 1.5) og at utløpsdatoen ikke er passert. ◦ Hvis presipitater kan sees i Lysis Buffer, varm den opp ($\leq +50$ °C) til de er fullstendig oppløste. ◦ Tin IC (AltoStar® Internal Control 1.5), og vortex i fem sekunder. ◦ Vortex Magnetic Beads i fem sekunder uten at lokket blir vått. • Forbered prøvene for ekstraksjonskjøringen som skal startes som beskrevet i bruksanvisningen til AltoStar® Purification Kit 1.5. • Klikk på Start Run-knappen i verktøylinjen. • Følg lastemeldingene, og last inn instrumentet. • Bekreft Loading complete-meldingen med OK eller vent i ti sekunder. <p>Systemet vil nå utføre ekstraksjonskjøringen automatisk.</p>

Trinn	Handling
<p>5. Avslutte en ekstraksjonskjøring</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sørg for at lastebrettet er tomt, og bekreft Run finished-meldingen med OK. • Følg instruksjonene i Maintenance-vinduet, og bekreft med OK. • Forsegle og lagre komponentene til AltoStar® Purification Kit 1.5 som kan gjenbrukes. <p>Eluatene i den uforseglede elueringsplaten er stabile i romtemperatur (maks. +30 °C) i opptil fire timer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hvis den tilhørende PCR-setup-kjøringen ikke startes med én gang, må elueringsplaten forsegles med en forseglingsfolie for elueringsplater og oppbevares ved +2 °C til +8 °C i opptil 24 timer. • Se resultatene til ekstraksjonskjøringen for å bekrefte prosessering for hver enkelt prøve.
<p>6. Starte en PCR-setup-kjøring</p>	<ul style="list-style-type: none"> • I menylinjen klikker du på PCR Setup → Start PCR Setup. Alternativt, gå tilbake til startskjermen og klikk på Start PCR Setup-knappen. • Velg PCR-setup-kjøringen som skal startes for å se elueringsplaten og reagensene som er inkludert i den valgte PCR-setup-kjøringen. • Forbered PCR-reagensene: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Forsikre deg om at Master-rørene og kontrollene som skal brukes er fra samme kit lot og at utløpsdatoen ikke er passert. ◦ Tin den nødvendige mengden Master- og kontrollrør, vortex en kort stund og spinn ned i en sentrifuge. • Hvis elueringsplaten er forseglet, sentrifuger i en kort stund og forsiktig fjern forseglingen. • Klikk på Start Run-knappen i verktøylinjen. • Last inn instrumentet i henhold til meldingsvinduet for lasting. • Bekreft Loading complete-meldingen med OK eller vent i ti sekunder. <p>Systemet vil nå utføre PCR-setup-kjøringen automatisk.</p>

Trinn	Handling
7. Avslutte en PCR-setup-kjøring	<ul style="list-style-type: none"> • Sørg for at lastebrettet er tomt, og bekreft Run finished-meldingen med OK. • Følg instruksjonene i Maintenance-vinduet, og bekreft med OK. • Lukk og lagre komponentene til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 som kan gjenbrukes. • Se resultatene til PCR-setup-kjøringen for å bekrefte prosessering for hver enkelt prøve.
8. Forsegle PCR-platen	<ul style="list-style-type: none"> • Forsegle PCR-platen med en PCR Plate Sealing Foil.
9. Starte en PCR-kjøring	<ul style="list-style-type: none"> • Slå på CFX96™ DW Dx og tilkoblet datamaskin og skjerm. • Start CFX Manager™ Dx-programvaren. • Åpne CFX96™ DW Dx. • Sentrifuger PCR-platen, og sett den inn i CFX96™ DW Dx. • Velg File → Open → LIMS File... fra menylinjen. • Skann strekkoden til PCR-platen med den håndholdte strekkodeskanneren. • Lukk CFX96™ DW Dx. • Klikk på Start Run-knappen for å starte PCR-kjøringen. Navngi og deretter lagre PCR-kjøringsfilen. <p>CFX96™ DW Dx vil nå utføre PCR-kjøringen automatisk.</p>
10. Separere analyser for individuell analyse	<ul style="list-style-type: none"> • Separer alle analyser i PCR-kjøringen i egne brønngupper.
11. Analysere dataene og tolke resultatene til en PCR-kjøring	<p>Individuelt for hver enkelt brønngruppe:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utfør grunnlinjekorreksjon i alle brønner for alle brukte deteksjonskanaler. • Utelukk brønner med uregelmessige PCR-signaler. • Angi terskelverdiene til alle deteksjonskanalene i henhold til kontrollene. • Utelukk brønner med ugyldige dataverdier. • Generer LIMS resultatfilen for eksport av resultater til LIMS. • Generer resultatrapporten for manuell resultattolkning.

FORSIKTIG

Hvis eluater oppbevares på et sted som ikke oppfyller lagringsbetingelsene, kan dette forårsake nedbrytning av EBV-målekvensen og kan negativt påvirke produktets ytelse.

7.6.2 Konfigurere en AltoStar® kjøring

Henvis til bruksanvisningene til AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Connect programvare og AltoStar® AM16 for detaljert informasjon om hvordan du starter en AltoStar® kjøring. Spesifikke innstillinger for bruk med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er oppgitt under:

- For kvantitative analyser skal QS1–4 og NTC velges, og for kvalitative analyser skal QS4 og NTC velges.
- Nødvendig prøvevolum er 500 µl pluss dødvolum til det respektive prøverøret (se kapitler 7.1 Prøvevolum og 7.2 Prøverør).
- Nødvendig eluatvolum for AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er 10 µl.
- Sørg for at riktig analyseprotokollversjon brukes for kjøringen. For informasjon om gjeldende protokollversjon se kapittel 16. Analyseprotokoll for AltoStar® Connect programvare og informasjon for LIMS integrering. Den respektive analyseprotokollen står i 2D-strekkoden som er der. For informasjon om ekstraksjon og import av analyseprotokoll i AltoStar® Connect programvare henvis til den respektive bruksanvisningen.

FORSIKTIG

Ikke bruk en annen analyseprotokollversjon enn den som er angitt på 2D-strekkoden i denne bruksanvisningen. Hvis feil analyseprotokollversjon brukes, kan det negativt påvirke produktets ytelse.

7.6.3 Starte en PCR-setup-kjøring

1. Velg **PCR Setup** → **Start PCR Setup** i menylinjen. Alternativt, gå tilbake til startskjermen til AltoStar® Connect programvare, og velg **Start PCR Setup**-knappen. Vinduet Start PCR Setup Run vises.

Ventende PCR-setup-kjøringer vises i tabellen Programmed PCR Setup Run på venstre side av skjermen.

2. Velg PCR-setup-kjøringen som skal startes i tabellen Programmed PCR Setup Run.
 - Prøvene som er inkludert i den valgte PCR-setup-kjøringen vises i tabellen øverst til høyre på skjermen (Samples in selected PCR Setup Run).
 - Nødvendige QS-er og kontroller for den valgte PCR-setup-kjøringen vises i tabellen midt på høyre side av skjermen (Controls in selected PCR Setup Run).
 - Antall nødvendige master-rør for den valgte PCR-setup-kjøringen vises i tabellen nederst til høyre på skjermen (Required master tubes for the selected PCR Setup Run).

MERK



Antall prioriterte prøver i en PCR-setup-kjøring vises i kolonnen **No. of prioritized Samples**. Utfør PCR-setup-kjøringer med prioriterte prøver først slik at prioriterte prøver kan prosesseres før andre prøver med lavere prioritet.

Før du klikker på **Start Run**-knappen i verktøylinjen, må du forberede de nødvendige reagensene som beskrevet i kapittel 7.6.3.1 Forberede reagenser for en PCR-setup-kjøring. Hvis den nødvendige elueringsplaten for den valgte PCR-setup-kjøringen har blitt forseglest for oppbevaring, må den prepareres som beskrevet i bruksanvisningen til AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Forberede reagenser for en PCR-setup-kjøring

1. Tin de nødvendige QS-ene, kontrollene og de nødvendige master-rørene helt i romtemperatur (maks. +30 °C).
2. Bland reagensene ved forsiktig vortex.
3. Sentrifuger rørene en kort stund for å fjerne dråpene fra lokket.

FORSIKTIG

Manglende sentrifugering av produktkomponentene etter tining kan forårsake kontaminering med reagensrester i lokkene og kan negativt påvirke produktets ytelse.

7.6.3.2 Laste AltoStar® AM16 for en PCR-setup-kjøring

Detaljert informasjon om lasteprosessen finnes i bruksanvisningen til AltoStar® AM16 og AltoStar® Connect programvare.

1. Klikk på **Start Run**-knappen i verktøylinjen på Start PCR Setup Run-skjermen for å vise Loading-vinduet.

Loading-vinduet består av en visuell representasjon av AltoStar® AM16-dekket øverst og en tabell som angir bærerne, de respektive sporene på AltoStar® AM16-dekket for hver bærer, materialet som skal lastes på hver bærer og kommentarer med hensyn til lastingen av bærerne.

MERK

For å visualisere posisjonen til en gjenstand på en bærer og posisjonen til bæreren på AltoStar® AM16-dekket må den respektive raden i tabellen i lastevinduet velges.



Posisjonen til gjenstanden og dens bærer er visualisert:

- fremhevet i rødt på den visuelle representasjonen av instrumentdekket
- på AltoStar® AM16 av blinkende lastelamper over sporene der valgt bærer må plasseres

2. Last nødvendig materiale, preparert elueringsplate og preparerte reagenser på egnede bærere.
 - Bare bytt ut **helt tomme** 1 000 µl spisstativer med **helt fulle** 1 000 µl spisstativer på spissbæreren.
 - Bare bytt ut **helt tomme** 300 µl spisstativer med **helt fulle** 300 µl spisstativer på spiss- og platebæreren.

MERK

Bytting av spisstativer som ikke er helt tomme, samt håndtering av individuelle spisser, kan interferere med den automatiske spisshåndteringen og føre til avbrutte kjøring.

- Plasser den nødvendige elueringsplaten med brønn A1 til venstre for den svarte plateposisjonen.
- Plasser en PCR-plate med brønn A1 til venstre for plateposisjonen med sølvfront.
- Last en rørbærer 24 med ett ubrukt pooling-rør for hver analyse i PCR-setup-kjøringen.
- Forsiktig skyv rørene helt ned til bunnen av bæreren, og roter rørene til rørestrekkodene er synlige gjennom bærervinduet.
- Last reagensrørbærer 32 med de nødvendige analysekomponentene for PCR-setup-kjøringen.
- Forsiktig skyv rørene helt ned til bunnen av bæreren, og roter rørene til rørestrekkodene er synlige gjennom bærervinduet.

MERK

Posisjonen til de individuelle rørene på bærerne er vilkårlig.

MERK

Volumet til innlastede komponenter kontrolleres ikke av systemet før prosessering. Et utilstrekkelig komponentvolum vil føre til at PCR-setup-kjøringen mislykkes for den berørte analysen.

MERK

Hvis en PCR-setup-kjøring startes uten at lokkene har blitt tatt av rørene, kan det hende at kjøringen avbrytes under prosesseringen.

3. Last bærerne slik at strekkoden på bæreren er rettet mot det bakovervendte lyset.

4. Sett inn fylte bærere i de respektive sporene mellom glidesperrene foran og bak på lastebrettet til de kommer i kontakt med stoppkrokene på den borteste siden av lastebrettet.

MERK



Hvis bærerne skyves forbi stoppkrokene, kan instrumentet skades og lasteprosessen forstyrres.

5. Kontroller at tip eject sheet og avfallsbeholder for spisser er i riktig stilling og at en ny avfallspose er plassert i containeren.
6. Klikk på **OK** i lastevinduet for å gå videre med lasteprosessen.

MERK



Ved å klikke på **Cancel**, avbrytes PCR-setup-kjøringen, men den kan startes på nytt igjen (henvis til kapittel 7.6.3 Starte en PCR-setup-kjøring).

AltoStar® AM16 trekker bærerne inn i instrumentet, og verifiserer strekkoden.

MERK



AltoStar® AM16 verifiserer automatisk:

- riktig type og plassering av innlastede bærere
- riktig identitet og posisjon til gjenstandene som er lastet på bærerne
- lot-kongruens til komponenter til individuelle AltoStar® analysekit
- at utløpsdato ikke er passert for alle innlastede AltoStar® analysekomponenter
- riktig plassering av tip eject sheet

Hvis noen av sjekkpunktene ikke bestod kontrollen, vil brukeren bli vist en melding som spesifiserer problemet og hva som må gjøres for å korrigere problemet. Mer informasjon om håndtering av feil finnes i bruksanvisningen til AltoStar® Connect programvare.

MERK



Hvis noen av de innlastede gjenstandene endrer posisjon etter at bæreren har blitt trukket inn i instrumentet, kan dette føre til at PCR-setup-kjøringen avbrytes og/eller forårsake skade på instrumentet.

Når alle kontrollene er bestått, vil meldingen Loading complete vises.

7. Bekreft Loading complete-meldingen ved å klikke på **OK** eller vent ti sekunder for at prosessen skal starte automatisk.

MERK



Ved å klikke på **Cancel**, avbrytes PCR-setup-kjøringen, men den kan startes på nytt igjen (henvis til kapittel 7.6.3 Starte en PCR-setup-kjøring).

PCR-setup-kjøringen starter og vil gjennomføres uten behov for brukerinteraksjon.

7.6.3.3 Under en PCR-setup-kjøring

Ingen ytterligere brukerinteraksjon er nødvendig før PCR-setup-kjøringen har fullført. Vinduet Processing Status viser status til PCR-setup-kjøringen og estimert gjenværende tid.

MERK



Hvis bæerne eller døren til AltoStar® AM16 skyves eller trekkes vekk fra sine posisjoner under en PCR-setup-kjøring, kan det hende at kjøringen avbrytes.

7.6.4 Slutten til en PCR-setup-kjøring

På slutten av PCR-setup-kjøringen vil Run finished-vinduet vises.

1. Forsikre deg om at lastebrettet er tomt.
2. Bekreft Run finished-vinduet ved å klikke på **OK**.

AltoStar® AM16 vil lesse av bærerene. Sørg for at ingenting blokkerer bærerene når de leses av.

Når de er lesset av, vil Maintenance-vinduet vises.

3. Følg instruksjonene i Maintenance-vinduet.

Tabellen i vinduet viser antallet reaksjoner i master-rørene som ikke ble brukt i PCR-setup-kjøringen.

4. Hvis en ny PCR-setup-kjøring skal startes og den nåværende innlastede elueringsplaten skal brukes igjen, kan platen forbli uforseglet på bærerposisjonen. Hvis dette **ikke** er tilfellet, må elueringsplaten forsegles og lagres. For mer informasjon henvis til bruksanvisningen til AltoStar® Purification Kit 1.5.

MERK



Eluatene i elueringsplaten er stabile i romtemperatur (maks. +30 °C) i opptil fire timer etter en fullført ekstraksjonskjøring.

5. Lukk reagensrørene med egnede ubrukte rørkorker.

FORSIKTIG



For å unngå kontaminering av reagensene må rørkorker ikke brukes på nytt, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

6. Oppbevar reagenser for gjenbruk som beskrevet i kapittel 4.2. Håndtering.
7. Kasser brukte materialer (se kapittel 10. Avfallshåndtering).
8. Bekreft Maintenance-vinduet ved å klikke på **OK**.

7.6.4.1 Resultater til PCR-setup-kjøring

Resultatene til PCR-setup-kjøringen lagres i AltoStar® Connect-programvaren.

1. Klikk på **PCR Setup** → **PCR Setup Results** i menylinjen for å åpne Results-vinduet.

Results-vinduet viser en tabell med alle prøvene som ble brukt i den siste PCR-setup-kjøringen og en **Status**-kolonne til høyre som viser om PCR-setup-kjøringen for en gitt prøve ble fullstendig gjennomført (se tabell 6).

Tabell 6: Resultater til PCR-setup-kjøring

Status	Resultat til PCR-setup-kjøring
Processed	<ul style="list-style-type: none"> • Eluatet ble prosessert i PCR-setup-kjøringen. • Den resulterende PCR-blandingen er klar til å brukes i en PCR-kjøring.
Error	<ul style="list-style-type: none"> • Eluatet ble ikke prosessert. • Den respektive PCR-blandingen blir utelukket automatisk i den følgende PCR-analysen.

2. For å se resultatene til tidligere PCR-setup-kjøringer kan du klikke på **Load**-knappen i menylinjen, velge ønsket PCR-setup-kjøring fra listen i Load Results-vinduet og deretter klikke på **OK**.

Tre resultatfiler for PCR-setup-kjøringen genereres automatisk av AltoStar® Connect-programvaren:

- en LIMS-fil (.xml) for overføring av detaljert informasjon om PCR-setup-kjøringen og resultatene til LIMS
- en rapport (.pdf) for dokumentasjonsformål som viser detaljert informasjon om PCR-setup-kjøringen og resultatene
- en cyclerfil (.plrn) for automatisk konfigurasjon av CFX96™ DW Dx

Disse filene lagres på plasseringen som er angitt i systeminnstillingene til AltoStar® Connect-programvaren.

MERK

Resultatfiler til PCR-setup-kjøringen kan genereres på nytt ved å laste inn den respektive PCR-setup-kjøringen og klikke på **Create LIMS File**-knappen for å generere LIMS-filen, **Create Report**-knappen for å generere rapporten eller **Create Bio-Rad Cycler File**-knappen for å generere cyclerfilen.

7.6.5 Forsegle PCR-platen

Når PCR-setup-kjøringen er fullført, må PCR-platen forsegles med PCR Plate Sealing Foil. Det er anbefalt å bruke AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] eller PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). Egnetheten til andre plateforseglerne enn de som anbefales må evalueres av brukeren.

Hvis én av de anbefalte plateforseglerne brukes til forseglingen, gjør du følgende:

1. Slå på plateforsegleren, og sørg for at plateadapteren ikke er i skuffen.
2. Sørg for at innstillingene til plateforsegleren er som følger:

Tabell 7: Innstillingene til plateforsegleren

Plateforsegler	Innstillinger	
	Temperatur [°C]	Tid [s]
AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3




3. Vent til angitt temperatur er nådd. Dette kan ta noen minutter.
4. Legg PCR-platen på plateadapteren til plateforsegleren.
5. Legg én PCR Plate Sealing Foil på PCR-platen slik at teksten THIS SIDE UP (DENNE SIDEN OPP) kan leses. Sørg for at alle brønnene til PCR-platen er dekket med folie og at ingen brønner skjules av teksten.

MERK

Hvis plateforsegleren brukes uten plateadapteren i skuffen, kan dette gjøre forsegleren ubrukelig. I dette tilfellet må du kontakte Altona Diagnostics teknisk støtte for assistanse (se kapittel 12. Teknisk støtte).

MERK

Hvis PCR Plate Sealing Foil eller rammen er plassert feil, kan folien feste seg på heating plate i plateforsegleren under forseglingsprosessen. Dette vil gjøre forsegleren ubrukelig. I dette tilfellet, eller hvis forseglingsstrinnet ble startet uten en PCR Plate Sealing Foil, må du la plateforsegleren kjøle seg ned til romtemperatur og kontakte Altona Diagnostics teknisk støtte for assistanse (se kapittel 12. Teknisk støtte).

6. Sett på forseglingsrammen øverst for å holde fast forseglingsfolien.
7. Åpne skuffen ved å trykke på **Operate*** / -knappen.
8. Plasser monteringen, som består av plateadapteren, PCR-platen, PCR Plate Sealing Foil og forseglingsrammen, inn i plateforsegleren, og trykk på **Operate*** / -knappen.
9. Skuffen vil automatisk lukke seg, opprettholde forseglingen i angitt tidsperiode og deretter åpne seg igjen.
10. Ta den forseglede PCR-platen og plateadapteren ut av plateforsegleren, og lukk plateforsegleren ved å trykke på **Close*** / -knappen.

* AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]

**PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 PCR-blandestabilitet

Når PCR-setup-kjøringen er fullført, vil PCR-blandingen i den forseglede PCR-platen være stabil i romtemperatur (maks. +30 °C) i opptil 30 minutter.

FORSIKTIG

Ikke overskrid lagringstiden for PCR-blandingen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

7.6.6 Starte en PCR-kjøring

PCR-kjøringen utføres på en CFX96™ DW Dx og kontrolleres av CFX Manager™ Dx-programvaren.

1. Slå på CFX96™ DW Dx og tilkoblet datamaskin og skjerm.
2. Start CFX Manager™ Dx-programvaren.
3. I menylinjen til CFX Manager™ Dx-programvaren velger du **File** → **Open** → **LIMS File...** for å åpne Open LIMS File-vinduet.
4. I Open LIMS File-vinduet må du forsikre deg om at musepekeren ligger og blinker over **File name**-feltet nederst. Hvis den ikke gjør det, klikk på **File name**-feltet.
5. Skann PCR-platens strekkode med den håndholdte strekkodeskanneren for å velge og åpne den riktige LIMS-filen automatisk. Vinduet Run Setup vises.

MERK



Alle nødvendige parametere for å starte PCR-kjøringen blir automatisk overført fra AltoStar® Connect programvare til CFX96™ DW Dx ved hjelp av cyclerfilen.

6. Klikk på **Open Lid**-knappen i Run Setup-vinduet for å åpne lokket på CFX96™ DW Dx.
7. Sentrifuger den forseglede PCR-platen i en kort stund for å forsikre deg om at all væske ligger på bunnen av brønnene.
8. Sett inn den forseglede PCR-platen i varmeblokken til CFX96™ DW Dx med brønn A1 på venstre side.
9. Lukk CFX96™ DW Dx ved å klikke på **Close Lid**-knappen i Run Setup-vinduet.
10. Start PCR-kjøringen ved å klikke på **Start Run**-knappen i Run Setup-vinduet.

7.6.6.1 Under en PCR-kjøring

Ingen brukerinteraksjon er nødvendig før PCR-kjøringen har fullført. Dialogen Run Details viser status til PCR-kjøringen og estimert gjenværende tid.

MERK



Hvis lokket til CFX96™ DW Dx åpnes under en PCR-kjøring ved å trykke på knappen foran på lokket eller ved å klikke på **Open Lid** i Run Details-vinduet, avbrytes kjøringen og alle genererte resultater går tapt.

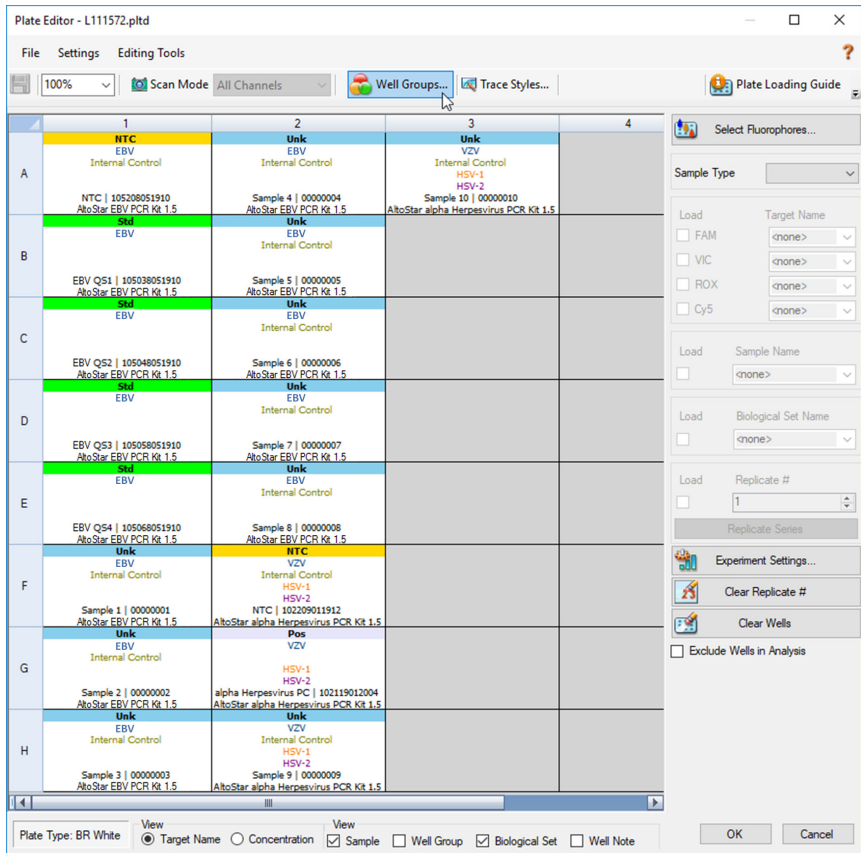
Vinduet Data Analysis vises på slutten av PCR-kjøringen, og viser amplifikasjonskurver, plateoppsettet og resultatene.

7.6.6.2 Tildele analyser til brønngrupper

AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) prosesserer én eller flere PCR-analyser samtidig på én og samme PCR-plate. Hver analyse må imidlertid analyseres separat av brukeren i henhold til bruksanvisningen for den aktuelle analysen.

For å gjøre dette må alle analysene på en PCR-plate tilordnes individuelle brønngrupper i CFX Manager™ Dx-programvaren av brukeren.

1. I Data Analysis-vinduet klikker du på **Plate Setup**-knappen i verktøylinjen og velger deretter **View/Edit Plate**. Meldingsvinduet Plate Editor vises (se figur 1).



Figur 1: Meldingsvindu Plate Editor

2. I meldingsvinduet Plate Editor klikker du på **Well Groups...** i verktøylinjen. Meldingsvinduet Well Group Manager vises (se figur 2).
3. Klikk på **Add**-knappen.
4. Skriv inn navnet til den første analysen i tekstfeltet.

5. Velg alle brønner på PCR-plateområdet som tilhører den første analysen (se figur 2). Brønner som tilhører en bestemt analyse kan identifiseres i meldingsvinduet Plate Editor med oppføringen i **Biological Set**-feltet.

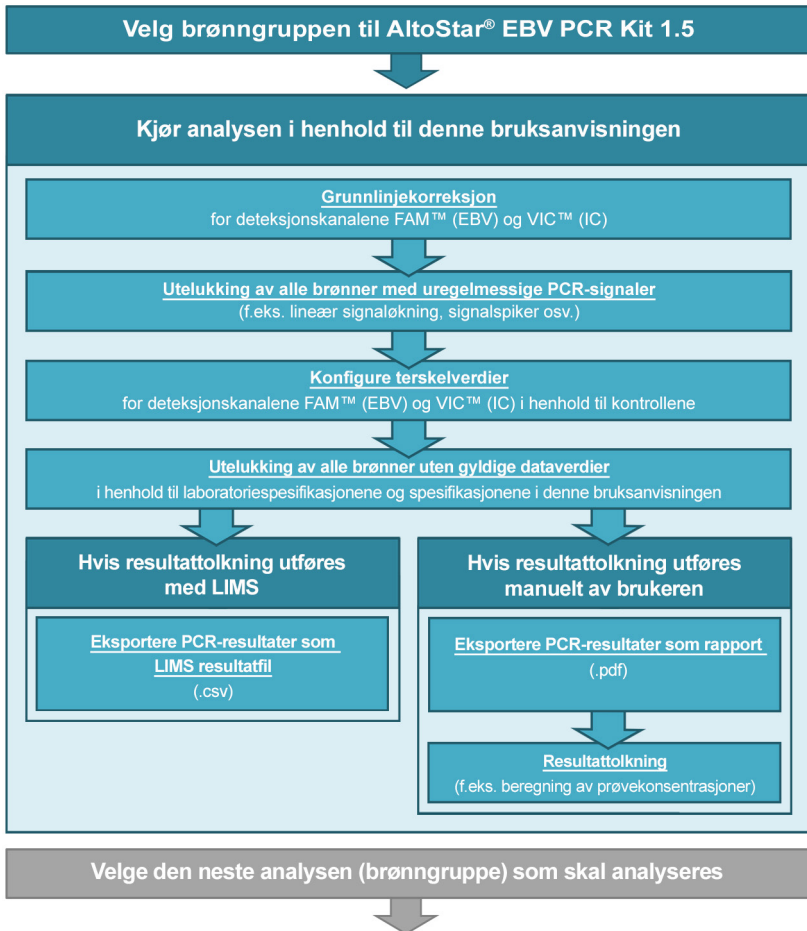
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	Unk	Unk									
B	Std	Unk										
C	Std	Unk										
D	Std	Unk										
E	Std	Unk										
F	Unk	NTC										
G	Unk	Pos										
H	Unk	Unk										

Figur 2: Meldingsvindu Well Group Manager

6. Gjenta trinn 3–5 for alle analysene på PCR-platen.
7. Bekreft tildeling av brønnggruppe ved å klikke på **OK**. Meldingsvinduet Well Group Manager lukkes.
8. Lukk meldingsvinduet Plate Editor ved å klikke på **OK**.
9. Ta i bruk endringene ved å klikke på **Yes**.

7.6.7 PCR-dataanalyse

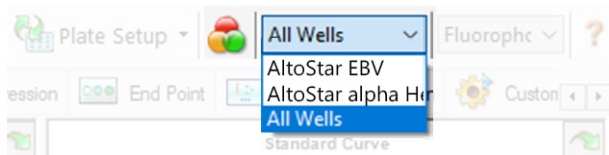
Resultatene av alle analysene (brønngupper) på PCR-platen må analyseres i sekvensen vist i figur 3.



Figur 3: PCR-dataanalyseprosess

I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen. Ikke bruk «All Wells» **Well Group**. Valget i figur 4 brukes som et generelt eksempel.

Før du analyserer resultatene må du forsikre deg om at brønnggruppen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 inkluderer alle brønnene til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 og ingen brønner fra andre analyser.



Figur 4: Well Group-knapp og nedtrekksmeny Well Group

MERK



Kombinert analyse av flere enn én analyse kan føre til feilaktige resultater.

FORSIKTIG



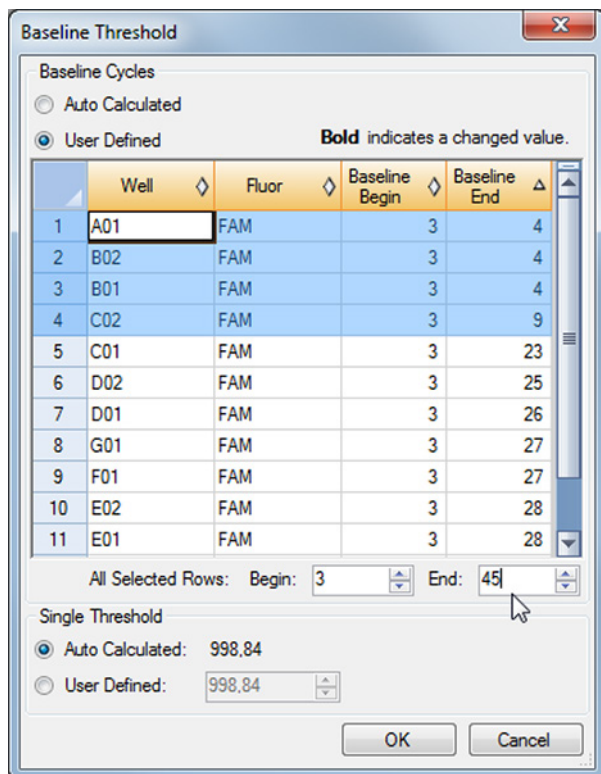
Som med alle andre diagnostetester må resultater tolkes med hensyn til alle kliniske funn og laboratorieresultater.

7.6.7.1 Grunnlinjekorreksjon

Grunnlinjeinnstillingene som brukes av CFX Manager™ Dx-programvaren må kanskje korrigeres for individuelle brønner i analysen (**Well Group**) under analyseprosessen.

1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.
2. På venstre side av Data Analysis-vinduet krysser du av kun **FAM**-avmerkingsboksen for EBV-måldeteksjonskanalen.
3. I menylinjen til Data Analysis-vinduet klikker du på **Settings** → **Baseline Threshold...** for å åpne Baseline Threshold-vinduet (se figur 5).
4. Klikk én gang på symbolet \diamond i **Baseline End**-kolonneoverskriften for å sortere tabellen etter stigende **Baseline End**-verdier.

5. Velg alle linjene som viser en **Baseline End**-verdi på 1–9 (se figur 5).



Figur 5: Baseline Threshold-vindu

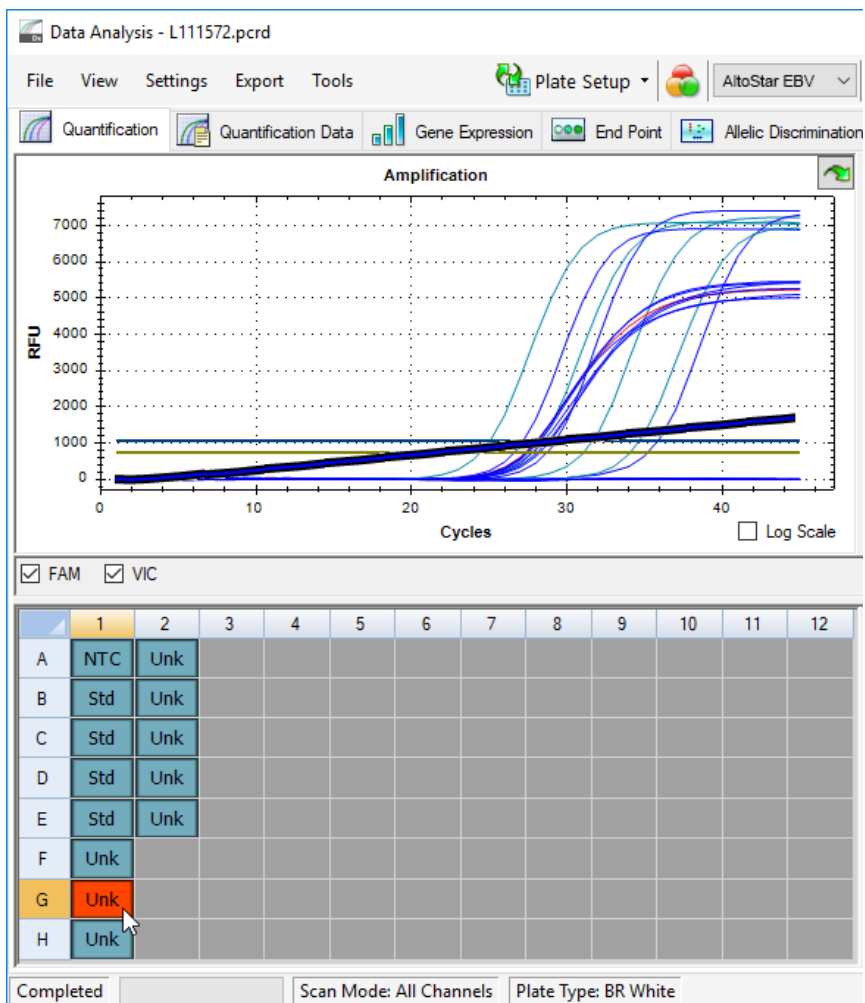
6. Sett verdien i **End**-feltet til 45 for de valgte linjene (se figur 5).
7. Bekreft innstillingene ved å klikke på **OK**.
8. På venstre side av Data Analysis-vinduet fjerner du avmerkingen i **FAM**-avmerkingsboksen, og krysser av kun **VIC**-avmerkingsboksen for IC-måldeteksjonskanalen.
9. Gjenta trinn 3–7 for deteksjonskanalen VIC™ (IC).

7.6.7.2 Utelukking av uregelmessige PCR-signaler

Gyldige resultater kan bare utledes av PCR-signaler uten signalartefakter, som kan forårsakes av urenheter eller bobler i PCR-blandingen. PCR-signaler som inneholder signalartefakter, må utelukkes av brukeren.

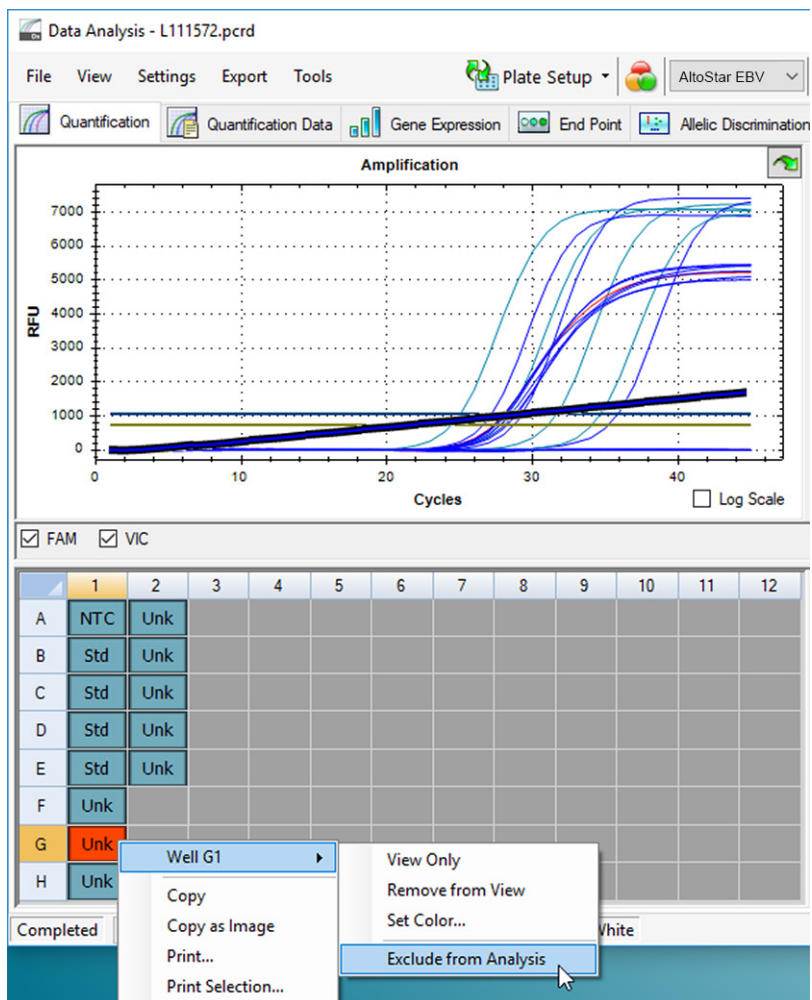
1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.

2. Identifiser brønner med uregelmessige PCR-signaler (lineær signaløkning, signalspiker osv.) i en av deteksjonskanalene FAM™ (EBV-målet) og VIC™ (IC) (se figur 6).



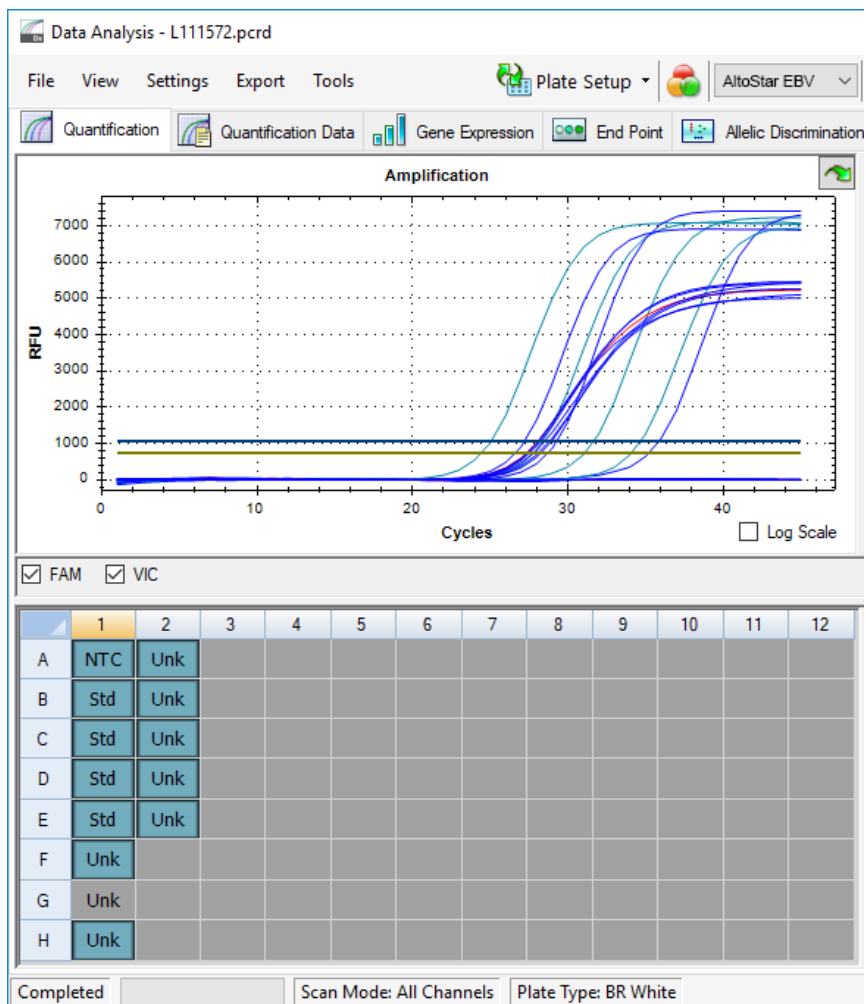
Figur 6: Data Analysis-vindu: uregelmessig PCR-signal

3. Klikk på en berørt brønn med høyre musetast, og velg **Well...** → **Exclude from Analysis** (se figur 7).



Figur 7: Data Analysis-vindu: utelukke brønn fra analyse

4. Den valgte brønnen er ekskludert fra analysen. Ingen resultater genereres for denne brønnen (se figur 8).



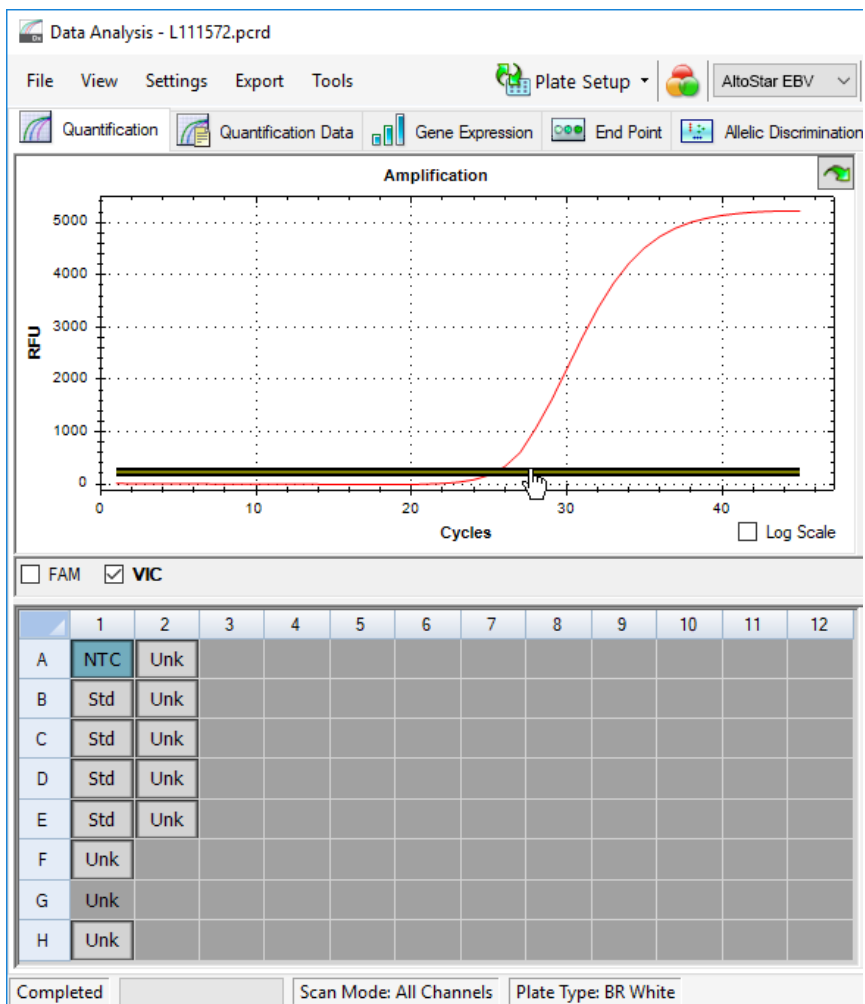
Figur 8: Data Analysis-vindu: utelatt brønn

7.6.7.3 Konfigurer terskelverdier

Terskelverdiene for deteksjonskanalene FAM™ (EBV-målet) og VIC™ (IC) må angis manuelt av brukeren i henhold til signalene fra kontrollene.

1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.

2. På venstre side av Data Analysis-vinduet krysser du av kun **VIC**-avmerkboksen for deteksjonskanalen til IC (se figur 9).



Figur 9: Data Analysis-vindu: angi VIC™ terskel

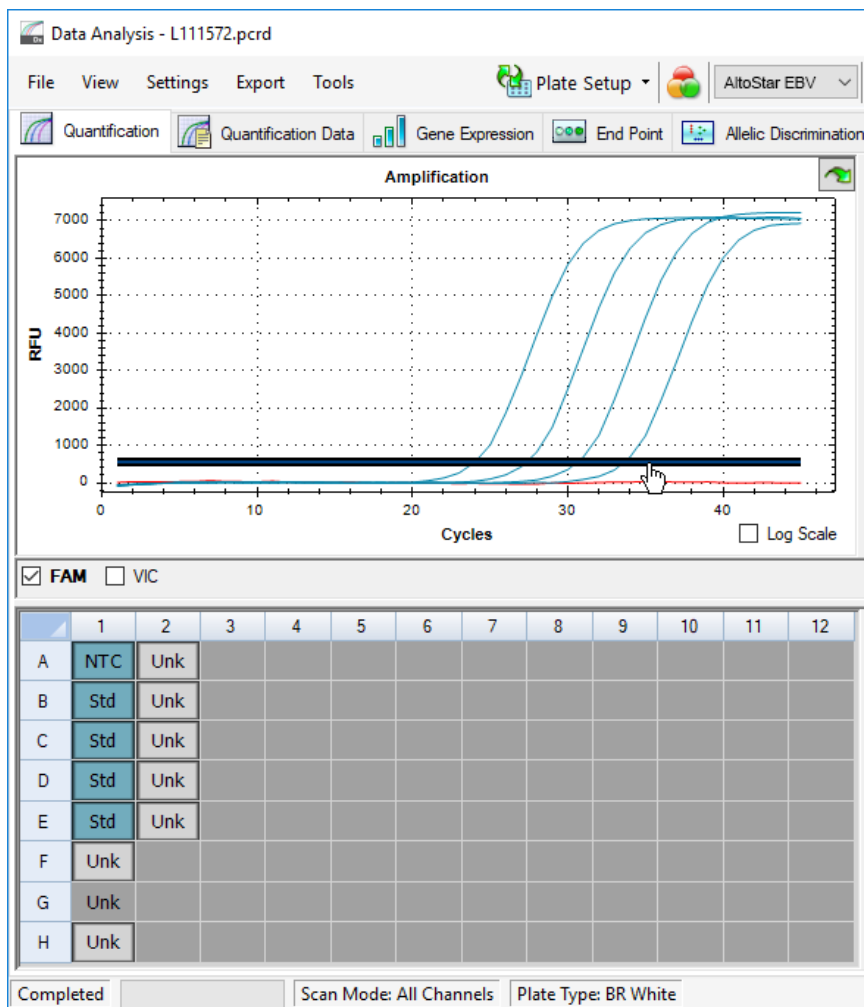
3. Velg kun NTC-brønnen i platevisningen i Data Analysis-vinduet (se figur 9).
4. Dra terskelen til det eksponerte området til NTC-signalet (se figur 9).

MERK



NTC inneholder IC-malen, som gir et IC-signal i en gyldig NTC-brønn.

5. På venstre side av Data Analysis-vinduet fjerner du avmerkingen i **VIC**-avmerkingsboksen, og krysser av **FAM**-avmerkingsboksen for deteksjonskanalen til EBV-målet (se figur 10).



Figur 10: Data Analysis-vindu: angi FAM™ terskel

6. Velg kun brønnene som inkluderer NTC og QS i platevisningen i Data Analysis-vinduet (se figur 10).
7. Dra terskelen godt over signalet til NTC og inn i det eksponerte området til QS-signalene (se figur 10).

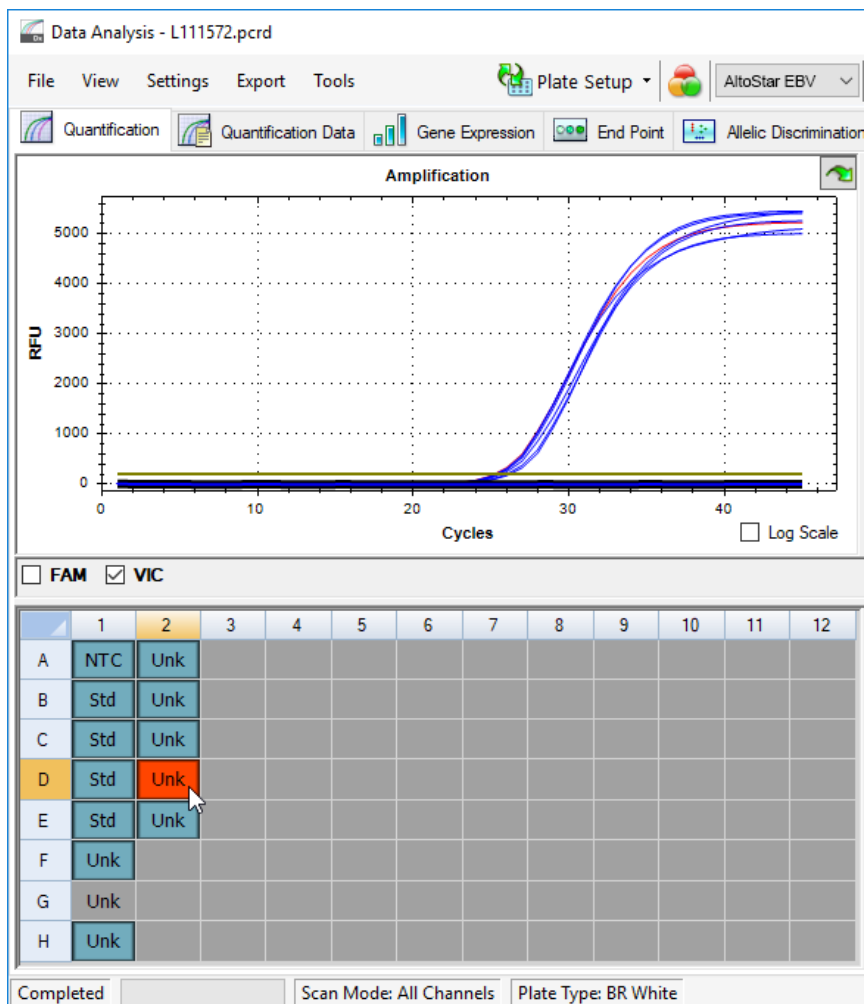
7.6.8 Gyldighet av PCR-resultater

7.6.8.1 Utelukking av brønner med ugyldig data

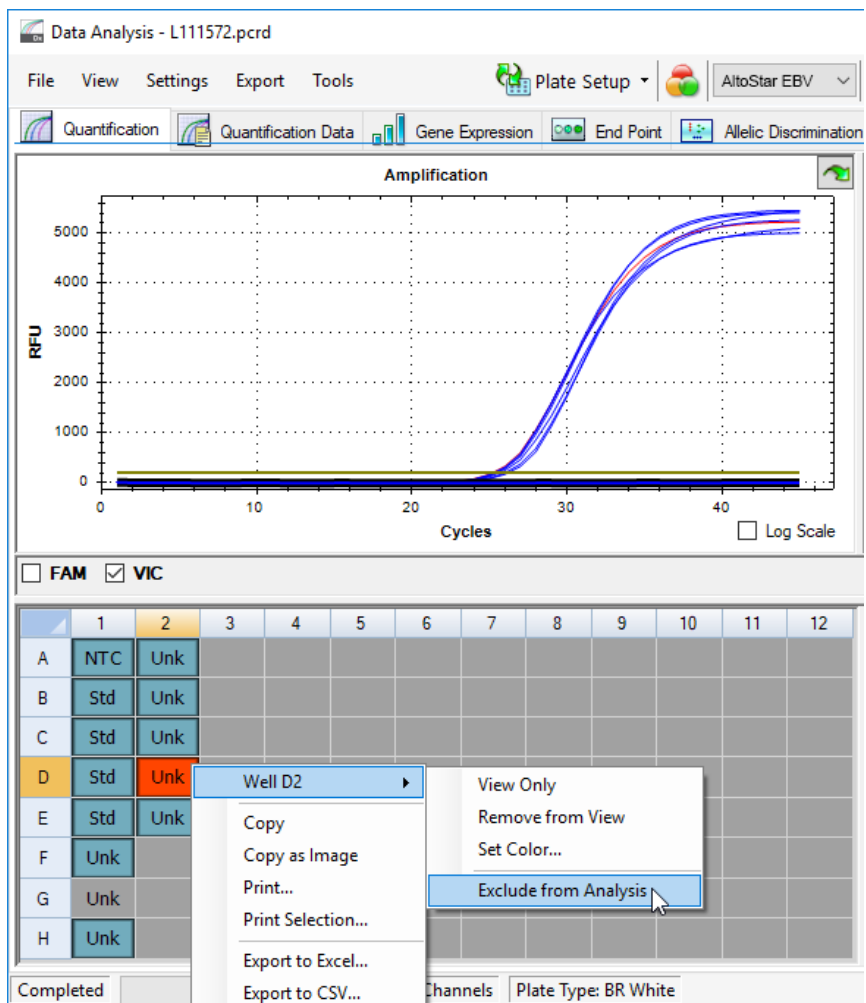
Brønner uten gyldige dataverdier må utelukkes fra brukerens genererte resultater.

1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.
2. Identifiser alle brønner med ugyldig data. En brønn regnes som ugyldig hvis en av følgende betingelser gjelder:
 - a) En fullstendig kjøring er ugyldig [se kapitler 7.6.8.2 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativt) og 7.6.8.3 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvantitativt)].
 - b) Data fra brønnen oppfyller ikke kontrollforholdene for et gyldig resultat (se kapittel 7.6.8.4 Gyldighet av prøveresultater).

3. Klikk på hver enkelt brønn som har en ugyldig dataverdi i henhold til kapitlene 7.6.8.2 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativ) til 7.6.8.4 Gyldighet av prøveresultater, og velg **Well...** → **Exclude from Analysis** (se figurene 11 og 12).



Figur 11: Data Analysis-vindu: ugyldig brønn



Figur 12: Data Analysis-vindu: utelukke ugyldig brønn fra analyse

Den valgte brønnen er ekskludert fra analysen. Ingen resultater genereres for denne brønnen.

7.6.8.2 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativt)

En kvalitativ diagnostisk PCR-kjøring er **gyldig** hvis følgende kontrollforhold er oppfylte:

Tabell 8: Kontrollforhold for en gyldig PCR-kjøring (kvalitativ)

Kontroll	Deteksjonskanal	
	FAM™ (EBV-målet)	VIC™ (IC)
QS	+	Ikke aktuelt
NTC	-	+

En kvalitativ diagnostisk PCR-kjøring er **ugyldig** hvis:

- Kjøringen ikke ble fullført.
- En av de nødvendige kontrollforholdene for en gyldig kvalitativ diagnostisk PCR-kjøring ikke er oppfylt.

Hvis det oppstår en ugyldig diagnostisk PCR-kjøring, må alle brønner utelukkes fra analysen og AltoStar® kjøringen gjentas fra de originale prøvene.

7.6.8.3 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvantitativt)

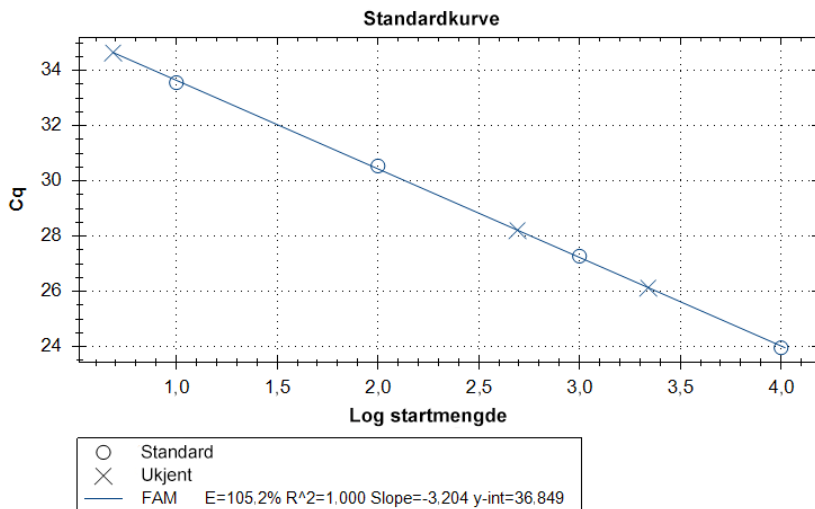
En kvantitativ diagnostisk PCR-kjøring er **gyldig** hvis følgende betingelser er oppfylte:

- Alle kontrollforholdene for en gyldig kvalitativ diagnostisk PCR-kjøring er oppfylte [se kapittel 7.6.8.2 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativt)].
- Den genererte standardkurven når følgende kontrollparameterverdi:

Tabell 9: Kontrollparameter for standardkurve

Kontrollparameter	Gyldig verdi
R kvadrert (R^2)	$\geq 0,98$

Standardkurvens kontrollparameter vises under standardkurvens diagram i Data Analysis-vinduet (se figur 13).



Figur 13: Data til standardkurve

En kvantitativ diagnostisk PCR-kjøring er **ugyldig** hvis:

- Kjøringen ikke ble fullført.
- En av de nødvendige kontrollforholdene for en gyldig kvantitativ diagnostisk PCR-kjøring ikke er oppfylt.

Hvis det oppstår en ugyldig diagnostisk PCR-kjøring, må alle brønner utelukkes fra analysen og AltoStar® kjøringen gjentas fra de originale prøvene.

7.6.8.4 Gyldighet av prøveresultater

Resultatet til en individuell prøve er **ugyldig** hvis signalene i både VIC™ (IC)-deteksjonskanalen og FAM™ (EBV-målet)-deteksjonskanalen er negative (se tabell 10). I tilfeller der prøven gir et ugyldig resultat må brønnen utelukkes fra analysen og testen gjentas fra den originale prøven, eller en ny prøve må samles inn og testes.

Tabell 10: Gyldighet av resultat

Deteksjonskanal		Gyldighet av resultat
FAM™ (EBV-mål)	VIC™ (IC)	
+	+	Gyldig resultat
+	-	Gyldig resultat*
-	+	Gyldig resultat
-	-	Ugyldig resultat

* Deteksjon av IC-en er ikke nødvendig når EBV-målet er detektert. En høy EBV DNA-belastning i prøven kan føre til redusert eller manglende IC-signal.

7.6.9 Eksport av PCR-resultater for automatisert resultattolkning

For å gjøre resultatene av PCR-kjøringen tilgjengelig på en tilkoblet LIMS for utførelse av automatisert resultattolkning må de eksporteres i form av en LIMS resultatfil (.csv).

1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.
2. Forsikre deg om at alle trinnene i analyseprosessen (henvis til kapitler 7.6.7.1 Grunnlinjekorreksjon til 7.6.8.1 Utelukking av brønner med ugyldig data) har blitt utført for brønngruppen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5.
3. I menylinjen til Data Analysis-vinduet klikker du på **Export** → **Export All Data Sheets** for å åpne Browse For Folder-vinduet.
4. I Browse For Folder-vinduet angir du plasseringen av LIMS resultatfilene som skal genereres og klikker deretter på **OK**.

MERK

LIMS integrering må implementeres i henhold til spesifikasjonene til altona Diagnostics. For informasjon om LIMS integrering se kapittel 16. Analyseprotokoll for AltoStar® Connect programvare og informasjon for LIMS integrering og/eller kontakt altona Diagnostics teknisk støtte (se kapittel 12. Teknisk støtte).

MERK

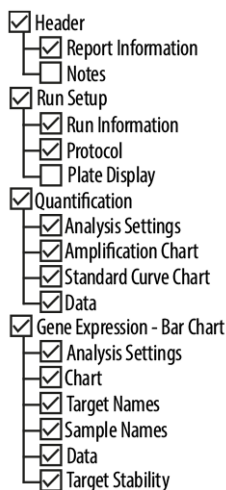
Hvis resultater fra flere enn én analyse (brønngruppe) fra en PCR-kjøring lagres i samme mappe, vil LIMS resultatfilene til den første analysen (brønngruppe) bli skrevet over av LIMS resultatfilene til den andre analysen (brønngruppe). I dette tilfellet kan LIMS resultatfilene fra den første analysen (brønngruppe) eksporteres på nytt.

7.6.10 Eksport av PCR-resultater for manuell resultattolkning

Hvis resultatene ikke sendes videre til LIMS for automatisk resultattolkning, må resultattolkningen gjøres manuelt av brukeren. I denne forbindelse må analyseresultatene til hver analyse (brønngruppe) eksporteres i form av en rapport.

1. I Data Analysis-vinduet må du velge en **Well Group** til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. Klikk på nedtrekksmenyen **Well Group** ved siden av **Well Group**-knappen (se figur 4) på verktøylinjen.
2. På venstre side av Data Analysis-vinduet krysser du av **VIC**-avmerkingsboksen samt **FAM**-avmerkingsboksen.
3. Forsikre deg om at alle trinnene i analyseprosessen (henvis til kapitler 7.6.7.1 Grunnlinjekorreksjon til 7.6.8.1 Utelukking av brønner med ugyldig data) har blitt utført for brønngruppen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5.
4. I menylinjen til Data Analysis-vinduet klikker du på **Tools** → **Reports...** for å åpne Report-vinduet.

5. Forsikre deg om at minimum det følgende innholdet er valgt for rapportgenerering i øvre venstre del av Report-vinduet (se figur 14):



Figur 14: Report-vindu

6. Velg eller fjern innholdsvalg i rapporten ved å krysse av de respektive avmerkingsboksene etter behov.
7. I menylinjen til Report-vinduet klikker du på **File** → **Save as...** for å åpne Save Report-vinduet.
8. I Save Report-vinduet angir du navnet og plasseringen til rapportfilen som skal genereres og klikker deretter på **Save**.

7.6.10.1 Manuell resultatolkning

1. Åpne rapportfilen som ble generert for brønngruppen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 (se kapittel 7.6.10 Eksport av PCR-resultater for manuell resultatolkning).
2. Henvis til Quantification Data-tabellen i rapporten (se figur 15). Tabellen består av to rader for hver **Sample** – én for **Target EBV** og én for **Target Internal Control**.

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Well Note
A01	FAM	EBV	NTC	NTC 105208051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	
A02	FAM	EBV	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B01	FAM	EBV	Std	EBV QS1 105038051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00	
B02	FAM	EBV	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	4.855E+00	0.686	4.85E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C01	FAM	EBV	Std	EBV QS2 105048051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00	
C02	FAM	EBV	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
D01	FAM	EBV	Std	EBV QS3 105058051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00	
E01	FAM	EBV	Std	EBV QS4 105068051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	1.000E+01	1.000	1.00E+01	0.00E+00	
E02	FAM	EBV	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	4.924E+02	2.692	4.92E+02	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	FAM	EBV	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	26.14	26.14	0.000	2.195E+03	3.341	2.20E+03	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	FAM	EBV	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC 105208051910	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
E02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar EBV PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml

Figur 15: Rapport: Quantification Data

Kvalitative resultater indikeres av begrepet *qualitative* i **Well Note**-kolonnen i Quantification Data-tabellen.

3. Identifiser hver rad med **Target EBV** og begrepet *qualitative* i **Well Note**-kolonnen.
4. I disse radene henviser du til **C_q**-kolonnen for resultatet til hver enkelt **Sample**.

5. Se tabell 11 for tolkning av kvalitative resultater.

Tabell 11: Kvalitative resultater: resultattolkning

Terskelsyklus (C_q) av EBV-målet	Resultattolkning
1–45	EBV-spesifikk DNA detektert.
Ikke aktuelt	Ingen EBV-spesifikk DNA detektert. Prøven inneholder ingen detekterbare mengder av EBV-spesifikk DNA.

Kvantitative resultater indikeres av *Concentration factor* i **Well Note**-kolonnen i Quantification Data-tabellen (se figur 15).

6. Identifiser hver rad med **Target EBV** og *Concentration factor* i **Well Note**-kolonnen.
7. I disse radene henviser du til **Starting Quantity (SQ)**-kolonnen for konsentrasjonen av EBV-målet målt i eluatet til hver enkel **Sample**. For å beregne resultatet for den originale pasientprøven må brukeren multiplisere **Starting Quantity (SQ)**-verdien med tilhørende *Concentration factor* (inkludert enheten).
8. Henvis til tabell 12 for tolkning av kvantitative resultater.

Tabell 12: Kvantitative resultater: resultattolkning

Starting Quantity (SQ) av EBV-målet	Resultattolkning
> 0	EBV-spesifikk DNA detektert. Multipliser Starting Quantity (SQ) -verdien med <i>Concentration factor</i> i Well Note -kolonnen (inkludert enheten) for å beregne konsentrasjonen til den originale pasientprøven.
Ikke aktuelt	Ingen EBV-spesifikk DNA detektert. Prøven inneholder ingen detekterbare mengder av EBV-spesifikk DNA.

8. Bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med andre real-time PCR-instrumenter enn CFX96™ Deep Well Dx System

I tillegg til CFX96™ DW Dx har AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 blitt validert med andre real-time PCR-instrumenter (se kapittel 5.3.2.2 Real-time PCR-instrumenter). De følgende kapitlene 8.1 Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med og 8.2 Prosedyre forklarer hvordan AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 skal brukes med disse instrumentene.

8.1 Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med

Følgende instrumenter og materialer er nødvendig:

- Generelle materialer og utstyr (se kapittel 7.5 Generelle materialer og utstyr)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
 - PCR-plater med 96 brønner og forseglingsfolie (detaljer i tabell 3)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
 - PCR-plater med 96 brønner og forseglingsfolie (detaljer i tabell 3)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
 - 0,1 ml strip-rør og lokk [STRIP Tubes 0,1 ml for Rotor-Gene® cyclers (LTF Labortechnik) eller tilsvarende]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System og ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
 - PCR-plater med 96 brønner og forseglingsfolie [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate og MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) eller tilsvarende]
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
 - PCR-plater med 96 brønner og forseglingsfolie [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white og LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) eller tilsvarende]

MERK

Det anbefales ikke å bruke andre materialer og utstyr enn det som er angitt i denne bruksanvisningen.

8.2 Prosedyre

8.2.1 Prøvepreparasjon

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble validert ved bruk av AltoStar® AM16 sammen med AltoStar® Purification Kit 1.5.

Alternative systemer og kits for nukleinsyreekstraksjon kan også være egnet. Egnetheten av prosedyren for nukleinsyreekstraksjon med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 må valideres av brukeren.

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 må brukes med en heterolog IC (AltoStar® Internal Control 1.5), som gjør det mulig å kontrollere prøvepreparasjonsprosedyren (nukleinsyreekstraksjon) og følgende PCR.

- Når andre metoder benyttes for nukleinsyreekstraksjon enn AltoStar® AM16 sammen med AltoStar® Purification Kit 1.5, må IC inkluderes i lyse-trinnet til prosedyren for nukleinsyreekstraksjon.
- IC må alltid inkluderes i prøve-/lysebuffer-blandingen.
- Volumet av IC som må tilsettes, avhenger alltid utelukkende av elueringsvolumet. Det utgjør 50 % av elusjonsvolumet. For eksempel hvis nukleinsyre skal slemmes i 60 µl elution buffer eller vann, må 30 µl IC per prøve tilsettes i prøve-/lysebuffer-blandingen.

FORSIKTIG

Hvis eluater oppbevares på et sted som ikke oppfyller lagringsbetingelsene, kan dette forårsake nedbrytning av EBV-målekvansen og kan negativt påvirke produktets ytelse.

8.2.2 Mastermix-oppsett

Alle komponentene til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 og prøvene må tines helt, blandes (med pipettering eller forsiktig vortex) og sentrifugeres før bruk. Sett opp mastermix i henhold til følgende pipetteringsplan:

Tabell 13: Pipetteringsplan (mastermix-oppsett)

Antall reaksjoner (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Mastermix-volum	20 µl	240 µl

FORSIKTIG



Ikke bruk ulike Master A- og Master B-volumer for mastermix-oppsettet enn det som er angitt i denne bruksanvisningen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

FORSIKTIG



Manglende sentrifugering av produktkomponentene etter tining kan forårsake kontaminering med reagensrester i lokkene og kan negativt påvirke produktets ytelse.

8.2.3 Reaksjonsoppsett

1. Pipetter 20 µl mastermix i hver påkrevd brønn på en egnet optisk PCR-plate med 96 brønner eller et egnet optisk reaksjonsrør.
2. Tilsett 10 µl med prøve (eluat fra nukleinsyreekstraksjon) eller 10 µl med kontroller (QS1–4 eller NTC).

Tabell 14: Pipetteringsplan (reaksjonsoppsett)

Reaksjonsoppsett	
Mastermix	20 µl
Prøve eller kontroll	10 µl
Totalt volum	30 µl

- Sørg for at QS1–4 og 1 NTC blir brukt til kvantitativ analyse. For kvalitative analyser må du sørge for å bruke minimum QS4 og 1 NTC.
- Bland sammen prøvene og kontrollene grundig med mastermixen ved å pipettere opp og ned.
- Bruk en PCR Plate Sealing Foil til å lukke PCR-platen med 96 brønner og lukk reaksjonsrørene med egnede lokk (se kapittel 8.1 Nødvendige materialer og utstyr som ikke følger med).
- Sentrifuger PCR-platen med 96 brønner i en sentrifuge med en mikrotiterplaterotor i 30 sekunder ved omtrent 1 000 x g (~ 3 000 o/min).

Når PCR-setup-kjøringen er fullført, vil PCR-blandingen være stabil i romtemperatur (maks. +30 °C) i opptil 30 minutter.

FORSIKTIG



Ikke overskrid lagringstiden for PCR-blandingen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

FORSIKTIG



Ikke bland sammen prøver eller prøve-ID-er under PCR-setup-kjøringen eller overfør dem til PCR-instrumentet. Dette kan føre til falskt positive eller falskt negative resultater på grunn av feilaktig tildeling av analysene.

8.2.4 PCR-kjøring

8.2.4.1 Konfigurere real-time PCR-instrumentet

Henvis til bruksanvisningen som fulgte med instrumentet for grunnleggende informasjon om oppsett og konfigurering av de forskjellige real-time PCR-instrumentene.

For detaljerte konfigurasjonsinstruksjoner for å bruke AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 på spesifikke real-time PCR-instrumenter, kan du kontakte altona Diagnostics teknisk støtte (se kapittel 12. Teknisk støtte).

8.2.4.2 Kjøreinnstillinger

Definer følgende grunnleggende innstillinger:

Tabell 15: Kjøreinnstillinger

Innstillinger	
Reaksjonsvolum	30 µl
Ramp rate	Standard
Passiv referanse*	ROX™

* Hvis aktuelt

Definer følgende fluorescensdetektorer (fargestoffer):

Tabell 16: Fluorescensdetektorer

Mål	Navn på detektor	Reporter	Quencher
EBV	EBV	FAM™	(Ingen)
IC	Internal Control	JOE™	(Ingen)

Definer følgende temperaturprofil og fargestoffinnhenting:

Tabell 17: Temperaturprofil og fargestoffinnhenting

	Trinn	Syklus gjentas	Innhenting	Temperatur [°C]	Tid [min:s]
Denaturering	Hold	1	-	95	02:00
Amplifikasjon	Cycling	45	-	95	00:15
			Ja	58	00:45
			-	72	00:15

FORSIKTIG



Ikke bruk andre cycling-innstillinger enn de som er angitt i bruksanvisningen, da dette kan negativt påvirke produktets ytelse.

8.2.5 Dataanalyse

Henvis til bruksanvisningen som fulgte med instrumentet for grunnleggende informasjon om dataanalyse av spesifikke real-time PCR-instrumenter.

For detaljerte instruksjoner om analyse av data generert av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 på ulike real-time PCR-instrumenter, kan du kontakte altona Diagnostics teknisk støtte (se kapittel 12. Teknisk støtte).

Kriterier for gyldighet av diagnostiske PCR-kjøringer og resultattolkning uavhengig av real-time PCR-instrumentet er beskrevet i kapitler 7.6.8.2 Gyldighet av en diagnostisk PCR-kjøring (kvalitativ) til 7.6.8.4 Gyldighet av prøveresultater, kapittel 7.6.10.1 Manuell resultattolkning og tabeller 11 og 12.

MERK



Konsentrasjonen av «prøven» vises i IU/μl og henviser til konsentrasjonen i eluatet.

For å fastslå **virusbelastningen i originalprøven** må følgende formel anvendes:

$$\text{Virusbelastning (Prøve) [IU/ml]} = \frac{\text{Volum (Eluat) [\mu l]} \cdot \text{virusbelastning (Eluat) [IU/\mu l]}}{\text{Prøvemengde [ml]}}$$

FORSIKTIG



Ikke bruk andre kontrollinnstillinger for dataanalyse enn de som er oppgitt i denne bruksanvisningen, ellers kan det føre til feilaktige IVD-prøveresultater.

FORSIKTIG



Som med alle andre diagnosetester må resultater tolkes med hensyn til alle kliniske funn og laboratorieresultater.

9. Ytelsesdata

Kvaliteten til AltoStar®-EBV PCR Kit 1.5 ble evaluert ved å bruke Verdens Helseorganisasjons internasjonale standard "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/260)" og EBV standardmateriale kalibrert mot Verdens Helseorganisasjons internasjonale standard.

9.1 Plasma

9.1.1 Analytisk sensitivitet

For å bestemme deteksjonsgrensen (LoD) ble det generert en fortyningsserie av Verdens Helseorganisasjons internasjonale standard "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/260)" i plasma fra 1,00E+03 til 1,00E+01 IU/ml ble generert.

Hver fortynning ble testet i åtte replikater i tre forskjellige kjøringene (total n = 24 per fortynning) ved bruk av kombinasjonene:

- 3 AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Purification Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Internal Control 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® AM16 instrumenter
- 3 CFX96™ DW Dx instrumenter

Data fra alle kjøringene ble kombinert og en probitanalyse ble utført for å fastslå LoD-verdien på 95 %.

Tabell 18: PCR-resultatene som brukes til beregning av den analytiske sensitiviteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5

Konsentrasjon [IU/ml]	N [total]	N [positiv]	Treffrate [%]
1,00E+03	22*	22	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	24	100
2,00E+02	24	23	96
1,50E+02	24	23	96
1,00E+02	24	19	79
5,00E+01	24	11	46
2,00E+01	24	3	13
1,00E+01	24	4	17

* 2 prøver ble ikke behandlet.

LoD til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for detektering av EBV i plasma er 195 IU/ml (95 % konfidensintervall: 143–303 IU/ml).

9.1.2 Analytisk spesifisitet

Den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 garanteres gjennom grundig utvelgelse av oligonukleotidene (primere og prober). Oligonukleotidene undersøkes i en sekvenssammenligningsanalyse der de sammenlignes med offentlig tilgjengelige sekvenser for å garantere at alle relevante EBV-genotyper blir detektert.

For å verifisere den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble følgende eksperimenter utført (se kapitler 9.1.2.1 Negative prøver til 9.1.2.3 Kryssreaktivitet).

9.1.2.1 Negative prøver

35 EBV negative plasmaprøver fra individuelle donorer ble testet med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. 34 av 35 prøver testet negativt for EBV spesifikk DNA. Alle (35 av 35) prøvene testet positivt for IC. Den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for plasmaprøver er ≥ 95 %.

9.1.2.2 Interfererende stoffer

For å evaluere innvirkningen av potensielt interfererende endogene og eksogene stoffer på ytelsen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5s ble utvalgte stoffer spiket i plasmaprøver. Disse plasmaprøvene inneholdt henholdsvis EBV i en konsentrasjon på 3 x LoD ($5,85E+02$ IU/ml), $1,00E+04$ IU/ml og ingen EBV.

Resultater innhentet for prøver med potensielt interfererende stoffer ble sammenlignet med resultater generert for plasmaprøver uten forhøyet interferent. Hver prøve ble behandlet i tre replikater.

Ingen interferens observert i prøver med forhøyede verdier av:

- Endogene stoffer
 - Bilirubin
 - Hemoglobin
 - Humant genomisk DNA
 - Humant serumalbumin
 - Triglyserider
- Eksogene stoffer
 - Azatioprin
 - Ciklosporin
 - Foscarnet
 - Ganciklovir

FORSIKTIG



Tilstedeværelsen av PCR-inhibitorer (f.eks. heparin) kan forårsake falskt negative eller ugyldige resultater.

9.1.2.3 Kryssreaktivitet

Den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med tanke på kryssreaktivitet med andre patogener enn EBV ble evaluert ved å teste:

- Virus relaterte til EBV
- Virus som forårsaker lignende symptomer som en infeksjon av EBV
- Virus som vanligvis finnes i pasienter som har en infeksjon med EBV

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 hadde ingen kryssreaktivitet med noen av de andre patogenene:

- Adenovirus (ADV)
- BK-virus (BKV)
- Cytomegalovirus (CMV)
- Hepatitt A-virus (HAV)
- Hepatitt B-virus (HBV)
- Hepatitt C-virus (HCV)
- Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
- Humant herpesvirus 6A (HHV-6A)
- Humant herpesvirus 6B (HHV-6B)
- Humant immundefektvirus 1 (HIV-1)
- JC-virus (JCV)
- Parvovirus B19
- Varicella-zoster-virus (VZV)

FORSIKTIG



Hvis prøven inneholder andre patogener enn EBV, kan konkurranse om målampifikasjon eller kryssreaktivitet forekomme, noe som kan føre til feilaktige IVD-prøveresultater.

9.1.3 Lineær område

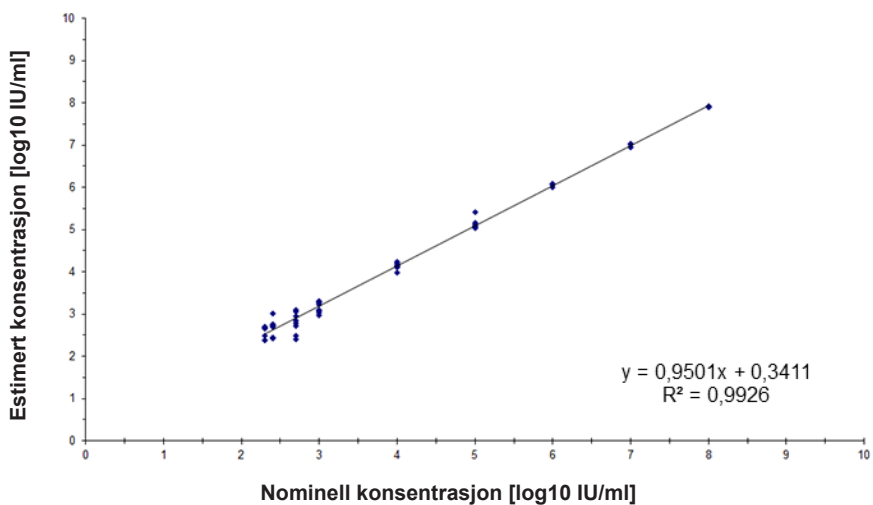
For å fastslå det lineære området til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5, ble en fortynningsserie med EBV i plasma i området $1,00E+08$ til $2,00E+02$ IU/ml testet:

- Fortynninger med en konsentrasjon mellom $1,00E+08$ og $1,00E+06$ IU/ml ble testet i fire replikater.
- Fortynninger med en konsentrasjon mellom $1,00E+05$ og $2,00E+02$ IU/ml ble testet i åtte replikater.

Analysen ble utført basert på en polynomiell regresjon.

Det lineære området til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for kvantifisering av EBV i plasma er $2,00E+02$ – $1,00E+08$ IU/ml. En grafisk representasjon av dataene er vist i figur 16.

log10 estimert konsentrasjon vs. log10 nominell konsentrasjon AltoStar® EBV PCR Kit 1.5



Figur 16: Lineær regresjonsanalyse av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med plasmaprøver

9.1.4 Presisjon

Presisjonen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble evaluert med en plate som bestod av:

- 1 EBV sterk positiv (1,00E+04 IU/ml) plasmaprøve
- 1 EBV svak positiv [1,00E+03 IU/ml (5 x nedre kvantifiseringsgrense (LLoQ))] plasmaprøve
- 1 EBV negativ plasmaprøve

Hver plateseksjon ble testet i minst fire replikater per kjøring.

Fem kjøringar ble utført på fem forskjellige dager ved bruk av kombinasjonene:

- 3 AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Purification Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Internal Control 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® AM16 instrumenter
- 3 CFX96™ DW Dx instrumenter

Repeterbarhet (variasjon mellom kjøringar), variasjon mellom lot og reproduserbarhet (total variasjon) ble fastslått basert på:

- Kvantifiseringsverdier for EBV sterk og svak positiv prøve (se tabell 19)
- Terskelsyklus (C_q^*)-verdier for IC i EBV negative prøver (se tabell 20)

* Vær oppmerksom på at det valgte begrepet C_q er det samme som betegnelsen C_t , som kan brukes av andre cyclere enn CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tabell 19: Presisjonsdata (CV % basert på log10-quantifiseringsdata) for EBV sterkt og svakt positive plasmaprøver

	EBV sterk positiv prøve (1,00E+04 IU/ml)	EBV svak positiv prøve (1,00E+03 IU/ml)
Variasjon mellom kjøringar	0,65-1,90	3,51-5,85
Variasjon mellom lot	1,33	4,05
Total variasjon	2,52	5,35

Tabell 20: Presisjonsdata (CV % basert på C_q -verdier) for IC i EBV negative plasmaprøver

	IC
Variasjon mellom kjøringar	0,07-0,18
Variasjon mellom lot	0,12
Total variasjon	0,65

9.1.5 Total feilrate

Holdbarheten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble vurdert ved å teste 30 EBV negative plasmaprøver fra individuelle donorer forhøyet med EBV til en sluttkonsentrasjon på 3 x LoD (5,85E+02 IU/ml). Alle (30 av 30) prøver ble testet positivt i den EBV-spesifikke fluorescensdeteksjonskanalen (FAM™).

9.1.6 Carry over

Carry over er hovedsakelig en arbeidsflytavhengig risiko og er uavhengig av PCR-analysen som brukes. For AltoStar® Workflow (arbeidsflyt) ble AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 brukt som et typisk eksempel. Mulig krysskontaminering gjennom carry over fra sterk positive prøver ble evaluert ved å teste vekslende parvovirus B19 sterk positive (1,00E+07 IU/ml) og negative prøver (n = 44 hver per kjøring, 2 kjøringer) med AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Ingen carry over ble observert, dvs. alle parvovirus B19 negative prøver ble testet negativt.

9.1.7 Klinisk ytelse

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble evaluert i en komparativ studie for det CE-merkede EBV R-gene® kit (bioMérieux). Retrospektivt ble 98 plasmaprøver testet parallelt med EBV R-gene® kit (bioMérieux) og AltoStar® EBV PCR Kit 1.5.

EBV R-gene® kit (bioMérieux) ble brukt i kombinasjon med NucliSENS® easyMAG® systemet (bioMérieux).

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble brukt i kombinasjon med AltoStar® Purification Kit 1.5 og AltoStar® Internal Control 1.5 på AltoStar® AM16 og CFX96™ DW Dx.

For kvalitative analyser ble alle prøver med ugyldig resultat i én eller begge analysene, samt prøver med et kvantitativt resultat under LoD-en i én eller begge analysene, utelukket.

Resultatene til de gjenværende 89 prøvene er vist i tabell 21.

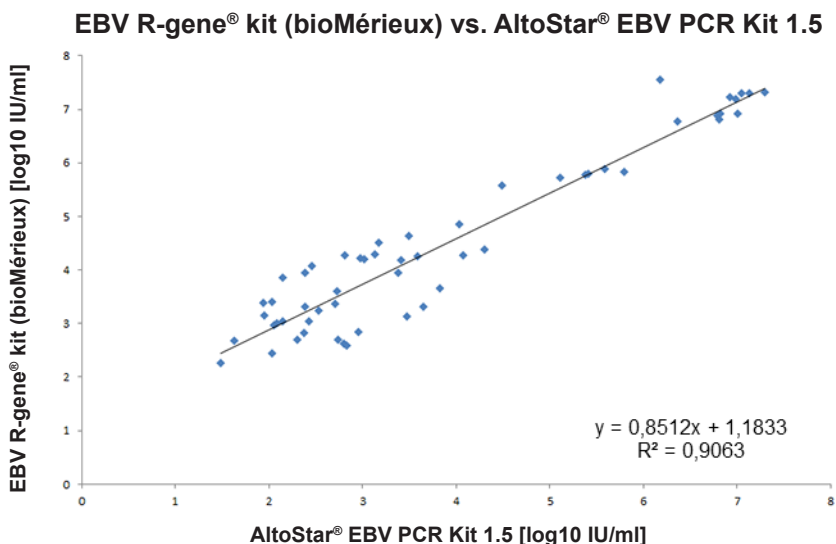
Tabell 21: Resultatene til evalueringen av diagnostisk sensitivitet og spesifisitet for EBV i plasmaprøver

		EBV R-gene® kit (bioMérieux)	
		POSITIV	NEGATIV
AltoStar® EBV PCR Kit 1.5	POSITIV	58	0
	NEGATIV	0	31

Den diagnostiske sensitiviteten og spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 sammenlignet med EBV R-gene® kit (bioMérieux) var 100 %.

For kvantitativ korrelasjon ble prøver som testet negativt i én eller begge analysene og prøver med et kvantitativt resultat under LLoQ-en i én eller begge analysene, utelukket.

Resultatene til de gjenværende 55 prøvene ble brukt til utregning av kvantitativ korrelasjon ved bruk av lineær regresjonsanalyse (se figur 17).



Figur 17: Lineær regresjonsanalyse for de oppnådde resultatene ved å bruke EBV R-gene® kit (bioMérieux) (referanse) og AltoStar® EBV PCR Kit 1.5

Det ble registrert svært god korrelasjon mellom de kvantitative resultatene innhentet med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 og EBV R-gene® kit (bioMérieux) [korrelasjonskoeffisient $R = 0,95$ ($R^2 = 0,91$)].

9.2 Helblod

9.2.1 Analytisk sensitivitet

For å bestemme LoD, ble det generert en fortyningsserie av Verdens Helseorganisasjons internasjonale standard "1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/260)" i helblod fra 1,00E+03 til 5,00E+00 IU/ml ble generert.

Hver fortynning ble testet i åtte replikater i tre forskjellige kjøringene (total n = 24 per fortynning) ved bruk av kombinasjonene:

- 3 AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Purification Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Internal Control 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® AM16 instrumenter
- 3 CFX96™ DW Dx instrumenter

Data fra alle kjøringene ble kombinert og en probitanalyse ble utført for å fastslå LoD-verdien på 95 %.

Tabell 22: PCR-resultatene som brukes til beregning av den analytiske sensitiviteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5

Konsentrasjon [IU/ml]	N [total]	N [positiv]	Treffrate [%]
1,00E+03	23*	23	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	21**	21	100
3,50E+02	24	23	96
2,00E+02	23*	22	96
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	23*	10	43
2,00E+01	24	5	21
1,00E+01	24	3	13
5,00E+00	24	3	13

* 1 prøve var ugyldig.

**3 prøver var ugyldige.

LoD til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for detektering av EBV i helblod er 320 IU/ml (95 % konfidensintervall: 213–563 IU/ml).

9.2.2 Analytisk spesifisitet

Den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 garanteres gjennom grundig utvelgelse av oligonukleotidene (primere og prober). Oligonukleotidene undersøkes i en sekvenssammenligningsanalyse der de sammenlignes med offentlig tilgjengelige sekvenser for å garantere at alle relevante EBV-genotyper blir detektert.

For å verifisere den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble følgende eksperimenter utført (se kapitler 9.2.2.1 Negative prøver til 9.2.2.3 Kryssreaktivitet).

9.2.2.1 Negative prøver

30 EBV negative helblodsprøver fra individuelle donorer ble testet med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5. 29 av 30 prøver testet negativt for EBV spesifikk DNA. Alle (30 av 30) prøvene testet positivt for IC. Den analytiske spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for helblodsprøver er $\geq 95\%$.

9.2.2.2 Interfererende stoffer

For å evaluere innvirkningen av potensielt interfererende endogene og eksogene stoffer på kvaliteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5s ble utvalgte stoffer forhøyet i helblodsprøver. Disse helblodsprøvene inneholdt henholdsvis EBV i en konsentrasjon på $3 \times \text{LoD}$ ($9,60\text{E}+02$ IU/ml), $5,00\text{E}+04$ IU/ml og ingen EBV.

Resultater innhentet for prøver med potensielt interfererende stoffer ble sammenlignet med resultater generert for helblodsprøver uten forhøyet interferent. Hver prøve ble behandlet i tre replikater.

Ingen interferens observert i prøver med forhøyede verdier av:

- Endogene stoffer
 - Bilirubin
 - Hemoglobin
 - Humant genomisk DNA
 - Humant serumalbumin
 - Triglyserider
- Eksogene stoffer
 - Azatioprin
 - Ciklosporin
 - Foscarnet
 - Ganciklovir

FORSIKTIG



Tilstedeværelsen av PCR-inhibitorer (f.eks. heparin) kan forårsake falskt negative eller ugyldige resultater.

9.2.2.3 Kryssreaktivitet

Siden de samme patogenene sannsynligvis finnes i plasma og helblod, ble ingen ytterligere patogener testet for helblod. Se kapittel 9.1.2.3 Kryssreaktivitet for evaluering av kryssreaktivitet.

FORSIKTIG



Hvis prøven inneholder andre patogener enn EBV, kan konkurranse om målampifikasjon eller kryssreaktivitet forekomme, noe som kan føre til feilaktige IVD-prøveresultater.

9.2.3 Lineær område

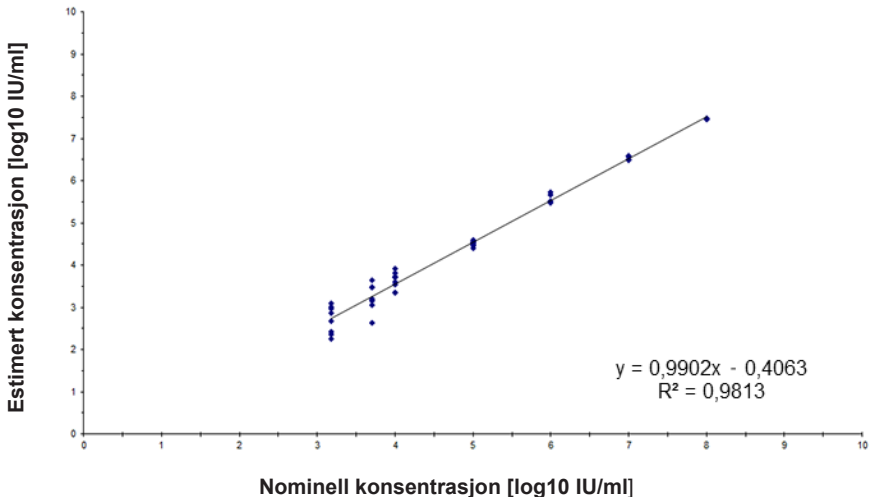
For å fastslå det lineære området til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5, ble en fortyngningsserie med EBV i helblod i området 1,00E+08 til 5,00E+02 IU/ml testet:

- Fortyngninger med en konsentrasjon mellom 1,00E+08 og 1,00E+06 IU/ml ble testet i fire replikater.
- Fortyngninger med en konsentrasjon mellom 1,00E+05 og 5,00E+02 IU/ml ble testet i åtte replikater.

Analysen ble utført basert på en polynomiell regresjon.

Lineær området til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 for kvantifisering av EBV i helblod er 1,50E+03 til 1,00E+08 IU/ml. En grafisk representasjon av dataene er vist i figur 18.

log10 estimert konsentrasjon vs. log10 nominell konsentrasjon AltoStar® EBV PCR Kit 1.5



Figur 18: Lineær regresjonsanalyse av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 med helblodsprøver

9.2.4 Presisjon

Presisjonen til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble evaluert med en plate som bestod av:

- 1 EBV sterk positiv (5,00E+04 IU/ml) helblodsprøve
- 1 EBV lav positiv [7,50E+03 IU/ml (5 x LLoQ)] helblodsprøve
- 1 EBV negativ helblodsprøve

Hver plateseksjon ble testet i minst fire replikater per kjøring.

Fem kjøring ble utført på fem forskjellige dager ved bruk av kombinasjonene:

- 3 AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Purification Kit 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® Internal Control 1.5 lot-er
- 3 AltoStar® AM16 instrumenter
- 3 CFX96™ DW Dx instrumenter

Repeterbarhet (variasjon mellom kjøring), variasjon mellom lot og reproduserbarhet (total variasjon) ble fastslått basert på:

- Kvantifiseringsverdier for EBV sterk og svak positiv prøve (se tabell 23)
- Terskelsyklus (C_q^*)-verdier for IC i EBV negative prøver (se tabell 24)

* Vær oppmerksom på at det valgte begrepet C_q er det samme som betegnelsen C_t , som kan brukes av andre cyclere enn CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tabell 23: Presisjonsdata (CV % basert på log10-quantifiseringsdata) for EBV sterkt og svakt positive helblodsprøver

	EBV sterk positiv prøve (5,00E+04 IU/ml)	EBV svak positiv prøve (7,50E+03 IU/ml)
Variasjon mellom kjøring	0,41-1,74	1,57-2,31
Variasjon mellom lot	2,13	3,82
Total variasjon	3,68	5,09

Tabell 24: Presisjonsdata (CV % basert på C_q-verdier) for IC i EBV negative helblodsprøver

	IC
Variasjon mellom kjøring	0,12-0,95
Variasjon mellom lot	1,56
Total variasjon	1,49

9.2.5 Total feilrate

Holdbarheten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble vurdert ved å teste 30 EBV negative helblodsprøver fra individuelle donorer forhøyet med EBV til en sluttkonsentrasjon på 3 x LoD (9,60E+02 IU/ml). Alle (30 av 30) prøver ble testet positivt i den EBV-spesifikke fluorescensdeteksjonskanalen (FAM™).

9.2.6 Carry over

Se kapittel 9.1.6 Carry-over.

9.2.7 Klinisk ytelse

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble evaluert i en komparativ studie for det CE-merkede EBV R-gene® kit (bioMérieux). Retrospektivt ble 97 helblodsprøver testet parallelt med EBV R-gene® kit og AltoStar® EBV PCR Kit 1.5.

EBV R-gene® kit (bioMérieux) ble brukt i kombinasjon med NucliSENS® easyMAG®-systemet (bioMérieux).

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 ble brukt i kombinasjon med AltoStar® Purification Kit 1.5 og AltoStar® Internal Control 1.5 på AltoStar® AM16 og CFX96™ DW Dx.

For kvalitative analyser ble alle prøver med ugyldig resultat i én eller begge analysene, samt prøver med et kvantitativt resultat under LoD-en i én eller begge analysene, utelukket.

Resultatene til de gjenværende 81 prøvene er vist i tabell 25.

Tabell 25: Resultatene til evalueringen av diagnostisk sensitivitet og spesifisitet for helblodsprøver

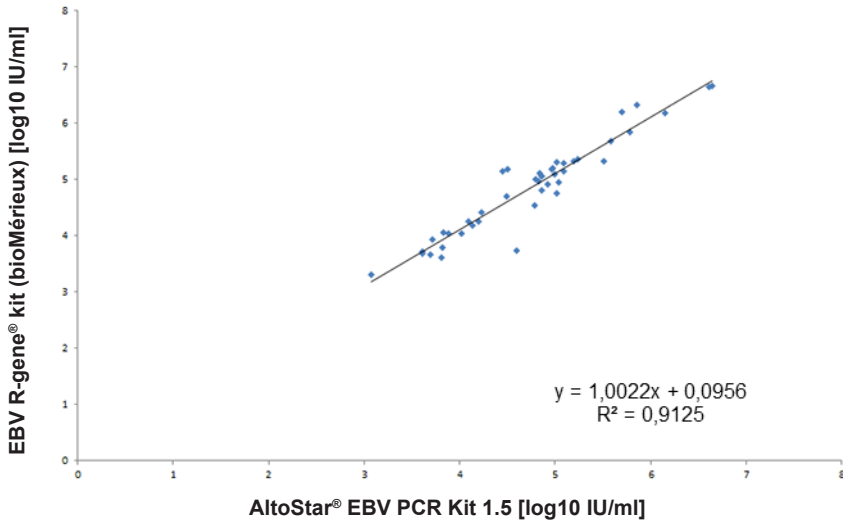
		EBV R-gene® kit (bioMérieux)	
		POSITIV	NEGATIV
AltoStar® EBV PCR Kit 1.5	POSITIV	49	0
	NEGATIV	1	31

Den diagnostiske sensitiviteten og spesifisiteten til AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 sammenlignet med EBV R-gene® kit (bioMérieux) var henholdsvis 98 % og 100 %.

For kvantitativ korrelasjon ble prøver som testet negativt i én eller begge analysene og prøver med et kvantitativt resultat under LLoQ-en i én eller begge analysene, utelukket.

Resultatene til de gjenværende 44 prøvene ble brukt til utregning av kvantitativ korrelasjon ved bruk av lineær regresjonsanalyse (se figur 19).

EBV R-gene® kit (bioMérieux) vs. AltoStar® EBV PCR Kit 1.5



Figur 19: Lineær regresjonsanalyse for de oppnådde resultatene ved å bruke EBV R-gene® kit (bioMérieux) (referanse) og AltoStar® EBV PCR Kit 1.5

Det ble registrert svært god korrelasjon mellom de kvantitative resultatene innhentet med AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 og EBV R-gene® kit (bioMérieux) [korrelasjonskoeffisient $R = 0,95$ ($R^2 = 0,91$)].

10. Avfallshåndtering

Kasser farlig og biologisk avfall i samsvar med lokale og nasjonale bestemmelser. Produktkomponentrester og avfall må ikke kasseres i kloakk, vannveier eller i jord.

FORSIKTIG



Alltid behandle prøver som infeksiosøst og (bio-)farlig materiale i henhold til prosedyrer for sikkerhet og god laboratoriepraksis. Hvis prøvemateriale søles, må et egnet desinfeksjonsmiddel brukes. Hånder kontaminert materiale som biofarlig.

FORSIKTIG



Kassering av farlig og biologisk avfall skal skje i samsvar med lokale og nasjonale bestemmelser for å unngå miljøforurensning.

MERK



PCR-platen må kasseres i en forseglet tilstand fordi PCR Plate Sealing Foil ikke kan tas av.

11. Kvalitetskontroll

I henhold til altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485-certified Quality Management System, blir hver enkelt lot på AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 testet opp mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre at alle produkter har samme kvalitet.

12. Teknisk støtte

Kontakt altona Diagnostics teknisk kundestøtte for assistanse:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**

telefon: **+49-(0)40-5480676-0**

MERK



Alle alvorlige hendelser som oppstår i forbindelse med dette produktet må rapporteres til altona Diagnostics og vedkommende myndighet i landet ditt.

13. Litteratur

- [1] Cohen, Jonathan, Powderly, William G og Steven M Opal. Infectious Diseases, 3. utg. Mosby, 2010.
- [2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. I: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6. utg., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803–1822.
- [3] Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10. utg., American Society for Microbiology, Washington. 2011.
- [4] Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD and the collaborative study 1st group Collaborative study to evaluate the proposed WHO International Standard for Epstein-Barr virus (EBV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2011; WHO/BS/11.2172.

14. Varemerker og ansvarsfraskrivelse

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); easyMAG®, NucliSENS®, R-gene® (bioMérieux); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Rotor-Gene® (QIAGEN); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, MicroAmp™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet skal, uansett om de er spesifikt merket slik eller ikke, ikke betraktes som ubeskyttede ifølge loven.
















AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 er et CE-merket diagnosekit i henhold til EU-direktiv om *in vitro* diagnostisk utstyr 98/79/EF.




Produktet er ikke lisensiert hos Health Canada og er ikke godkjent eller klarert av FDA.

Ikke tilgjengelig i alle land.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; all rights reserved.

15. Symboler

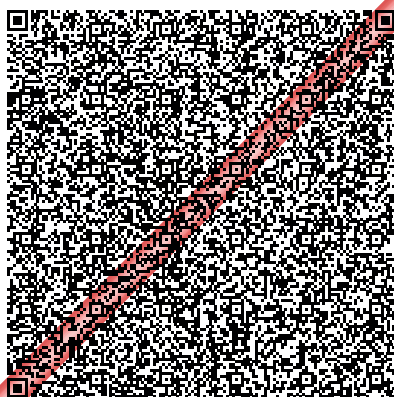
Symbol	Forklaring
	<i>In vitro</i> diagnostisk medisinsk utstyr
	Global Trade Item Number
	Batchkode
	Innhold
	Korkfarge
	Katalognummer
	Nummer
	Komponent
	Se bruksanvisning
	Inneholder nok til «n» tester/reaksjoner (rxns)
	Temperaturgrense
	Bruk innen-dato
	Produsent
	Forsiktig
	Materialnummer

Symbol	Forklaring
	Versjon
	Merk
	Inneholder biologisk materiale av animalsk opprinnelse

16. Analyseprotokoll for AltoStar® Connect programvare og informasjon for LIMS integrering

2D-strekkoden i figur 20 brukes til å installere den nyeste analyseprotokollen ved bruk av AltoStar® EBV PCR Kit 1.5 på AltoStar® AM16. Strekkoden kan bare skannes i utskriftsformat. Du kan skanne strekkoden direkte i håndboken eller skrive den ut på et eget ark. Vær oppmerksom på at størrelsen av utskriften bestemmer om strekkoden kan skannes eller ikke. Sørg for at størrelsen er skalert til 100 %. Når du skanner, pek skanneren mot den røde linjen på strekkoden. Hvis du vil ha mer informasjon om hvordan du håndterer analyseprotokoller, henvis til de respektive kapitlene i bruksanvisningen til AltoStar® Connect programvare. Se tabell 27 for informasjon om LIMS-integrering.

AltoStar® EBV PCR Kit 1.5



Protocol Version:

Checksum: ECB19903CAD0B1CF5E245F972B38A6E2B2BE94D5

1

Figur 20: Strekkode til analyseprotokoll for AltoStar® EBV PCR Kit 1.5

Tabell 26: Endringslogg for analyseprotokoll

Protokollversjon	Oppdateringer
1	Opprinnelig versjon

Tabell 27: Informasjon for LIMS integrering

Bruk	Data
Testrekkefølge (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar EBV PCR Kit 1.5
Testresultat (CFX96™ DW Dx → LIMS) enhet	IU/ml
Testresultat (CFX96™ DW Dx → LIMS) kanal 1	EBV
Testresultat (CFX96™ DW Dx → LIMS) kanal 2	Internal Control

For LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes) kan du se nettsiden til Altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) eller kontakte Altona Diagnostics teknisk støtte (se kapittel 12. Teknisk støtte).

17. Revisjonslogg

Tabell 28: Revisjonslogg

Identifikator	Utstedelses- dato [måned/år]	Endringer
MAN-AS0131540- NO-S01	10/2021	Opprinnelig utgave

side med hensikt tom

side med hensikt tom

side med hensikt tom

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

