

# Gebrauchsanweisung

## AltoStar<sup>®</sup> HAV RT-PCR Kit 1.5

12/2025 DE



# AltoStar<sup>®</sup>

## HAV RT-PCR Kit 1.5

Zur Verwendung mit

ABI Prism<sup>®</sup> 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96<sup>™</sup> Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96<sup>™</sup> Dx System (Bio-Rad)

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche)

QuantStudio<sup>™</sup> 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

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



AS0241543



96



12 2025



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg • Germany

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Über diese Gebrauchsanweisung .....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Zweckbestimmung .....</b>	<b>9</b>
<b>3.</b>	<b>Kitkomponenten .....</b>	<b>10</b>
3.1	Reagenzien .....	10
3.2	AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin .....	11
<b>4.</b>	<b>Lagerung und Handhabung .....</b>	<b>11</b>
4.1	Lagerung .....	11
4.2	Handhabung .....	12
4.2.1	Master A und Master B .....	13
4.2.2	Positive Control (Positivkontrolle) und No Template Control (Negativkontrolle) .....	13
<b>5.</b>	<b>Produktbeschreibung .....</b>	<b>14</b>
5.1	Hintergrundinformationen .....	14
5.2	Beschreibung der Reagenzien .....	15
5.2.1	Master A und Master B .....	15
5.2.2	Positive Control (Positivkontrolle).....	16
5.2.3	No Template Control (Negativkontrolle).....	16
5.3	Workflows .....	16
5.3.1	AltoStar® Workflow .....	16
5.3.2	Andere Workflows .....	17
5.4	Proben .....	18
5.4.1	Probenarten.....	18
5.4.2	Probenentnahme und -handhabung.....	18
<b>6.</b>	<b>Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen .....</b>	<b>19</b>

<b>7.</b>	<b>Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit dem AltoStar® Workflow .....</b>	<b>22</b>
7.1	Probenvolumen .....	22
7.2	Probenröhrchen.....	22
7.3	Proben-Barcodes.....	23
7.4	Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör für den AltoStar® Workflow.....	23
7.5	Allgemeine Materialien und Geräte .....	24
7.6	Verfahren .....	25
7.6.1	Übersicht über den AltoStar® Workflow .....	25
7.6.2	Programmierung eines AltoStar® Laufs .....	31
7.6.3	Starten eines PCR-Setup-Laufs .....	31
7.6.3.1	Vorbereiten von Reagenzien für einen PCR-Setup-Lauf .....	32
7.6.3.2	Beladen des AltoStar® AM16 für einen PCR-Setup-Lauf.....	33
7.6.3.3	Während des PCR-Setup-Laufs.....	37
7.6.4	Fertigstellung des PCR-Setup-Laufs .....	37
7.6.4.1	Ergebnisse des PCR-Setup-Laufs .....	38
7.6.5	Versiegelung der PCR-Platte.....	40
7.6.5.1	Stabilität des PCR-Mix .....	41
7.6.6	Starten eines PCR-Laufs.....	42
7.6.6.1	Während des PCR-Laufs .....	43
7.6.7	PCR-Datenanalyse unter Verwendung der CFX Manager™ Dx Software .....	44
7.6.7.1	Zuordnung von Assays zu Well-Gruppen.....	45
7.6.7.2	Baseline-Korrektur.....	49
7.6.7.3	Ausschluss irregulärer PCR-Signale.....	51
7.6.7.4	Festlegen von Schwellenwerten.....	55
7.6.8	Gültigkeit von PCR-Ergebnissen .....	59
7.6.8.1	Ausschluss von Wells mit ungültigen Daten.....	59

7.6.8.2	Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe .....	62
7.6.8.3	Gültigkeit der Ergebnisse für eine Probe.....	62
7.6.9	Export von PCR-Ergebnissen zur Ergebnisinterpretation durch LIMS .....	63
7.6.10	Export von PCR-Ergebnissen zur manuellen Ergebnisinterpretation .....	64
7.6.10.1	Manuelle Interpretation der Ergebnisse .....	65
7.6.11	PCR-Datenanalyse und automatisierte Ergebnisinterpretation unter Verwendung von FastFinder .....	67
<b>8.</b>	<b>Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit anderen Real-Time-PCR-Geräten als dem CFX96™ Deep Well Dx System .....</b>	<b>68</b>
8.1	Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör .....	69
8.2	Verfahren .....	70
8.2.1	Probenvorbereitung .....	70
8.2.2	Master Mix Ansatz .....	70
8.2.3	Reaktionsansatz .....	71
8.2.4	PCR-Lauf .....	72
8.2.4.1	Programmierung des Real-Time-PCR-Gerätes .....	72
8.2.4.2	Einstellungen für den Lauf .....	73
8.2.5	Datenanalyse .....	74
<b>9.</b>	<b>Leistungsdaten .....</b>	<b>75</b>
9.1	Plasma .....	75
9.1.1	Analytische Sensitivität .....	75
9.1.2	Analytische Spezifität .....	76
9.1.2.1	Negativproben .....	77
9.1.2.2	Störende Substanzen .....	77
9.1.2.3	Kreuzreaktionen .....	78
9.1.3	Reaktivität .....	79

9.1.4	Präzision.....	79
9.1.5	Gesamtausfallrate .....	82
9.1.6	Verschleppung.....	83
9.1.7	Klinische Leistungsdaten.....	83
<b>10.</b>	<b>Entsorgung .....</b>	<b>85</b>
<b>11.</b>	<b>Qualitätskontrolle.....</b>	<b>85</b>
<b>12.</b>	<b>Technischer Support .....</b>	<b>86</b>
<b>13.</b>	<b>Sicherheits- und Leistungsbericht.....</b>	<b>86</b>
<b>14.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>86</b>
<b>15.</b>	<b>Handelsmarken und Haftungsausschlüsse.....</b>	<b>87</b>
<b>16.</b>	<b>Symbole .....</b>	<b>88</b>
<b>17.</b>	<b>Assay-Protokoll für die AltoStar® Connect software und Informationen zur LIMS-Integration .....</b>	<b>90</b>
<b>18.</b>	<b>Änderungshistorie .....</b>	<b>92</b>

## 1. Über diese Gebrauchsanweisung

Diese Gebrauchsanweisung dient zur Anleitung des Benutzers bei der Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Kapitel 1–6 und 9–14 enthalten allgemeine Informationen und Anweisungen, die für alle in Verbindung mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 verwendeten Workflows gelten. Kapitel 7 gibt Anweisungen zur Verwendung des Produkts in Verbindung mit dem AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton; nachfolgend abgekürzt als AltoStar® AM16) und der AltoStar® Connect software (Version 1.7.4 oder höher, Hamilton) für das automatisierte PCR-Setup sowie mit dem CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad, nachfolgend abgekürzt als CFX96™ DW Dx) und der CFX Manager™ Dx Software (Version 3.1, Bio-Rad) für die Real-Time-PCR. Kapitel 8 gibt Anweisungen zur Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit anderen Real-Time-PCR-Geräten. Detaillierte Informationen zur Verwendung des AltoStar® AM16, der AltoStar® Connect software, des AltoStar® Purification Kit 1.5, der AltoStar® Internal Control 1.5 und des CFX96™ DW Dx finden Sie in den nachstehend aufgeführten Gebrauchsanweisungen:

- AltoStar® Automation System AM16 Handbuch IVD (Hamilton)
- AltoStar® Connect software Handbuch IVD (Hamilton)
- Gebrauchsanweisung AltoStar® Purification Kit 1.5
- Gebrauchsanweisung AltoStar® Internal Control 1.5
- CFX96™ Dx und CFX96™ Deep Well Dx Systeme Bedienungsanleitung (Bio-Rad)

In diesem Handbuch ist den Begriffen VORSICHT und HINWEIS durchgängig folgende Bedeutung zugeordnet:

#### VORSICHT



Hebt Anweisungen und Verfahren hervor, deren Nichtbefolgung oder fehlerhafte Umsetzung zu Verletzungen führen und/oder die Funktion des Produkts beeinträchtigen kann. Wenden Sie sich an den technischen Support von altona Diagnostics, falls Sie Hilfe benötigen.

#### HINWEIS



Dieses Symbol steht neben Informationen, die für den Benutzer nützlich, für die Ausübung der Funktion jedoch nicht essenziell sind.

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor Verwendung des Produkts sorgfältig durch.

## 2. Zweckbestimmung

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist ein in-vitro-diagnostischer Test auf Basis der Real-Time-PCR-Technologie für den qualitativen Nachweis von Hepatitis-A-Virus (HAV)-spezifischer RNA (Genotypen I–III) in humanem EDTA- und Citrat-Plasma. Es ist als Hilfsmittel für die Diagnose einer HAV-Infektion vorgesehen.

Die mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 generierten Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden interpretiert werden.

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist für die Verwendung durch professionelle Nutzer bestimmt, die in molekularbiologischen Techniken und in-vitro-diagnostischen Verfahren geschult sind.

### 3. Kitkomponenten

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 besteht aus einer Box mit Reagenzien und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin.

#### 3.1 Reagenzien

Die Kit-Box AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 enthält die folgenden Komponenten:

**Tabelle 1:** Kitkomponenten

Deckelfarbe	Komponente	Anzahl Röhrchen	Nominalvolumen [µl/Röhrchen]
Blau	Master A <sup>1)</sup>	8	60 <sup>2)</sup>
Violett	Master B <sup>1)</sup>	8	180 <sup>3)</sup>
Rot	PC <sup>4)</sup>	2	250
Weiß	NTC <sup>5)</sup>	2	250

<sup>1)</sup> Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

<sup>2)</sup> Enthält ein zusätzliches Volumen von 25 µl, um das Totvolumen für das Liquid Handling des AltoStar® AM16 auszugleichen

<sup>3)</sup> Enthält ein zusätzliches Volumen von 55 µl, um das Totvolumen für das Liquid Handling des AltoStar® AM16 auszugleichen

<sup>4)</sup> Positive Control (Positivkontrolle)

<sup>5)</sup> No Template Control (Negativkontrolle)

#### VORSICHT



Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor der ersten Verwendung auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllvolumina. Benutzen Sie kein beschädigtes oder unvollständiges Produkt, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 enthält ausreichende Mengen an Reagenzien, um 96 Reaktionen in maximal 8 Läufen auszuführen.

Die Kit-Box wird auf Trockeneis verschickt. Überprüfen Sie die Kit-Box und seine Komponenten sofort nach Erhalt und vor der ersten Verwendung auf folgende Punkte:

- Intaktheit
- Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllvolumina
- Korrekte Kennzeichnung
- Verfallsdatum
- Gefrorenen Zustand
- Klarheit und Abwesenheit von Partikeln

Sollten eine oder mehrere Komponenten bei Erhalt nicht gefroren sein, Gefäße beschädigt sein oder fehlen, kontaktieren Sie den technischen Support von Altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

### **3.2 AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin**

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin Version 1.0 kann optional in Verbindung mit der FastFinder Standalone Software zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation verwendet werden. Es wird nicht mit den AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Reagenzien mitgeliefert und muss separat als Teil des AltoStar® Automated Analysis Package (Bestellnr. VK000045) bestellt werden.

## **4. Lagerung und Handhabung**

Alle im AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 enthaltenen Komponenten sind gebrauchsfertige Lösungen.

### **4.1 Lagerung**

Alle Reagenzien des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 sind sofort ab Erhalt bei -25 °C bis -15 °C aufzubewahren.

**VORSICHT**



Unsachgemäße Lagerung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

**VORSICHT**



Verwenden Sie keine Produkte über ihr Verfallsdatum hinaus. Bei Verwendung abgelaufener Produkte kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigt sein.

## 4.2 Handhabung

**VORSICHT**



Überschreiten Sie weder die Anzahl der in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Auftau-/Einfrierzyklen noch die angegebene Handhabungsdauer, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

**VORSICHT**



Die unsachgemäße Handhabung von Produktkomponenten und Proben kann zu Kontaminationen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen:

- Vertauschen Sie nicht die Deckel von Reaktionsgefäßen und Flaschen.
- Lagern Sie positives und/oder potentiell positives Material getrennt von den Kitkomponenten.
- Nutzen Sie getrennte Arbeitsbereiche zur Probenvorbereitung, für den Reaktionsansatz und zur Amplifikation/Detektion.
- Entsorgen Sie nach der Handhabung von positivem und/oder potentiell positivem Material grundsätzlich Ihre Handschuhe.
- Öffnen Sie nach Abschluss der Amplifikation grundsätzlich keine PCR-Platten und/oder -Röhrchen.

#### VORSICHT



Vermischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen Kit-Lots. Die Verwendung von verschiedenen Kit-Lots kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

### 4.2.1 Master A und Master B

Nach dem Auftauen sind Master A und Master B 5 Stunden lang bei bis zu +30 °C stabil.

#### HINWEIS



Wurden Master A und Master B aufgetaut aber nicht benutzt, können sie erneut eingefroren und für spätere Läufe noch ein weiteres Mal aufgetaut werden. Entsorgen Sie die Röhrchendeckel nach dem Öffnen und nutzen Sie zum Verschließen neue Deckel, um Kontaminationen der Reagenzien zu vermeiden.

### 4.2.2 Positive Control (Positivkontrolle) und No Template Control (Negativkontrolle)

1. Nach dem Auftauen sind die Positive Control (PC, Positivkontrolle) und die No Template Control (NTC, Negativkontrolle) 5 Stunden lang bei bis zu +30 °C stabil.
2. Entsorgen Sie die Deckel der PC- und NTC-Röhrchen nach jeder Verwendung und verwenden Sie neue Deckel, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.
3. Schließen Sie nach Verwendung der PC und NTC die zugehörigen Röhrchen mit neuen Deckeln und frieren Sie sie sofort ein.
4. Überschreiten Sie für jedes PC- und NTC-Röhrchen nicht die folgende Anzahl an Auftau-/Einfrierzyklen: *Auftauen 1 → Einfrieren 1 → Auftauen 2 → Einfrieren 2 → Auftauen 3 → Einfrieren 3 → Auftauen 4*

## 5. Produktbeschreibung

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist ein in-vitro-diagnostischer Test für den qualitativen Nachweis von HAV-spezifischer RNA in humanem EDTA- und Citrat-Plasma.

Es basiert auf der Real-Time-RT-PCR-Technologie und nutzt die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT), um die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuwandeln, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der HAV-spezifischen Zielsequenzen sowie fluoreszenzmarkierte, zielsequenzspezifische Sonden für den Nachweis der vervielfältigten DNA.

Zusätzlich zu den HAV-RNA spezifischen Amplifikations- und Nachweissystemen, die auf die Region gs1, gp1, gp2 (3C/3D-Verbindungsregion des Polyproteins) des viralen Genoms abzielen, enthält der Assay Oligonukleotide für die Amplifikation und den Nachweis der internen Kontrolle (AltoStar® Internal Control 1.5; im Folgenden als IC abgekürzt).

Die für HAV-RNA spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor FAM™ markiert. Die für die IC spezifische Sonde ist mit einem Fluorophor (JOE™) markiert, das z. B. im VIC™ Kanal nachweisbar ist.

Durch die Verwendung unterschiedlich markierter Sonden wird die gleichzeitige Detektion von HAV-spezifischer RNA sowie der IC in den entsprechenden Detektionskanälen des verwendeten Real-Time-PCR-Geräts ermöglicht.

### 5.1 Hintergrundinformationen

Das Hepatitis-A-Virus (HAV) ist eines von 5 Hepatitis-Viren, von denen bekannt ist, dass sie Menschen infizieren. Es gehört zur Familie der *Picornaviridae* und zur Gattung *Hepatovirus*. Die Viruspartikel sind ikosaedrisch und unbehüllt, und das Genom besteht aus linearer Einzelstrang-RNA (ssRNA) in Positivstrangorientierung. Insgesamt beträgt die Länge des HAV-Genoms etwa 7,5 Kilobasen (kb).

HAV wird in erster Linie auf fäkal-oralem Weg durch Kontakt oder Schmierinfektion übertragen. Es wird vor allem über kontaminiertes Trinkwasser und kontaminierte Speisen (zum Beispiel beim Verzehr von Meeresfrüchten) verbreitet sowie durch engen Kontakt mit bereits infizierten Personen. Das Virus ist weltweit verbreitet. In Entwicklungsländern besteht ein hohes Infektionsrisiko für nahezu alle Individuen, und nahezu alle hatten im Verlauf ihrer Kindheit Kontakt mit HAV. In industriell weiter entwickelten Regionen, etwa in Europa und Nordamerika, ist das Infektionsrisiko sehr viel geringer, da höhere Hygienestandards umgesetzt werden. Nach einer HAV-Infektion besteht eine bleibende Immunität.

Die ersten Symptome treten 14–28 Tage nach der Infektion auf. Zu den typischen Symptomen gehören Fieber, Unwohlsein, Appetitverlust, Durchfall, Übelkeit, dunkel gefärbter Urin und Gelbsucht. Bei infizierten Kindern treten häufig keine oder nur schwache Symptome auf. Bei Erwachsenen hingegen sind häufig (starke) Symptome festzustellen. Die allgemeine Sterblichkeitsrate ist gering und Infektionen mit HAV ziehen keine chronischen Erkrankungen der Leber nach sich. Therapeutische Behandlungen von HAV-Infektionen sind nicht bekannt, aber eine vorbeugende Impfung ist möglich [1,2].

## **5.2 Beschreibung der Reagenzien**

### **5.2.1 Master A und Master B**

Master A und Master B enthalten alle Komponenten (PCR-Puffer, reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, Magnesiumsalz, Primer und Sonden), die für die reverse Transkription sowie für die PCR-vermittelte Amplifikation und die Detektion der Zielsequenz von HAV-spezifischer RNA sowie der IC in einem Reaktionsansatz erforderlich sind.

## 5.2.2 Positive Control (Positivkontrolle)

Die PC enthält standardisierte Konzentrationen an HAV-spezifischer RNA. Sie wurde anhand des WHO-Standards „3<sup>rd</sup> WHO International Standard for Hepatitis A Virus VL For Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276)“ kalibriert. Die PC wird verwendet, um die Funktion der für HAV spezifischen Amplifikations- und Detektionssysteme zu verifizieren, die im AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 enthalten sind.

## 5.2.3 No Template Control (Negativkontrolle)

Die NTC enthält keine HAV-spezifische RNA, aber das Template für die IC. Die NTC wird als Negativkontrolle in der für HAV-RNA spezifischen Real-Time-RT-PCR verwendet und zeigt eine mögliche Kontamination von Master A und Master B an.

## 5.3 Workflows

### 5.3.1 AltoStar® Workflow

Der AltoStar® Workflow umfasst die folgenden Produkte:

- AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- AltoStar® Connect software Version 1.7.4 oder höher (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) mit CFX Manager™ Dx Software Version 3.1 (Bio-Rad)
- *Optional:* FastFinder Standalone Version 1.0 oder höher (UgenTec NV) und AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation. Die gültige Assay Plugin Version ist in Kapitel 3.2 AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin angegeben.

Der Workflow umfasst die folgenden Schritte:

1. Programmierung eines AltoStar® Laufs.
2. Aufreinigungslauf auf dem AltoStar® AM16 unter Verwendung des AltoStar® Purification Kit 1.5 und der AltoStar® Internal Control 1.5.
3. RT-PCR-Setup-Lauf auf dem AltoStar® AM16 unter Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

#### 4. Real-Time-RT-PCR-Lauf auf einem CFX96™ DW Dx.

Weitere Informationen zu den Schritten 3 und 4 des Workflows finden Sie in Kapitel 7. Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit dem AltoStar® Workflow. Alle Probenarten und Probenvolumina, die für die Verwendung mit dem AltoStar® Purification Kit 1.5 spezifiziert sind, können gleichzeitig auf dem AltoStar® AM16 verarbeitet werden. Jede Probe kann mit so vielen Real-Time-PCR-Assays parallel analysiert werden, wie es das verfügbare Eluat erlaubt.

### HINWEIS



Assays mit unterschiedlichen PCR-Temperaturprofilen werden automatisch auf separate PCR-Platten sortiert.

### 5.3.2 Andere Workflows

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 kann in Verbindung mit kompatiblen Workflows verwendet werden. Die folgenden Real-Time-PCR-Geräte und Softwareprogramme wurden für die Verwendung mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 validiert:

- ABI Prism® 7500 SDS und 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Dx System und CFX Manager™ Dx Software Version 3.1 (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System und CFX Manager™ Dx Software Version 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II und LightCycler® 480 Software Version 1.5.1 (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System und QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform und Rotor-Gene® Q Software Version 2.3.1 (QIAGEN)

Wird eines der vorab aufgeführten Real-Time-PCR-Geräte (außer dem CFX96™ Deep Well Dx System) verwendet, so müssen das PCR-Setup, die Programmierung des Geräts und die Datenanalyse manuell durchgeführt werden (detaillierte Informationen hierzu finden Sie in den Kapiteln 8.2.2 Master Mix Ansatz bis 8.2.5 Datenanalyse).

## 5.4 Proben

### 5.4.1 Probenarten

Die folgenden Probenarten sind für die Verwendung in Verbindung mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 validiert:

- Humanes EDTA-Plasma
- Humanes Citrat-Plasma

#### VORSICHT



Dieser Test ist nur zur Verwendung mit humanem EDTA- und Citrat-Plasma validiert worden. Die Verwendung anderer Probenarten kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

### 5.4.2 Probenentnahme und -handhabung

Blut muss mit handelsüblichen Standardblutentnahmesystemen abgenommen werden (z. B. von Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner oder vergleichbaren Herstellern). Der Inhalt der Röhrchen ist unmittelbar nach der Probenentnahme zu durchmischen. Die Blutproben sind bei +2 °C bis +8 °C gekühlt zu transportieren. Der Transport ist in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften für den Transport biologischer Materialien durchzuführen.

Für die Gewinnung von EDTA- oder Citrat-Plasma ist Vollblut gemäß den Anweisungen des Herstellers für das Entnahmesystem innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme zu zentrifugieren. EDTA- oder Citrat-Plasma sollte bis zu seiner Verwendung als Probenmaterial nicht länger als 48 Stunden bei Raumtemperatur (+20 °C bis +25 °C), nicht länger als 5 Tage bei +2 °C bis +8 °C und nicht länger als 2 Monate bei -25 °C bis -15 °C aufbewahrt werden.

#### VORSICHT



Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

#### VORSICHT



Unsachgemäße Probenentnahme, Versand, Lagerung oder Vorbereitung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

#### HINWEIS



Die gefrorene Lagerung der Proben beeinträchtigt nicht die Produktleistung. Vergewissern Sie sich bei Verwendung von gefrorenen Proben als Ausgangsmaterial, dass diese vor Gebrauch vollständig aufgetaut und ausreichend durchmischt sind.

## 6. Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen

- Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor der ersten Verwendung auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllvolumina. Benutzen Sie kein beschädigtes oder unvollständiges Produkt, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Unsachgemäße Lagerung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Verwenden Sie keine Produkte über ihr Verfallsdatum hinaus. Bei Verwendung abgelaufener Produkte kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigt sein.
- Überschreiten Sie weder die Anzahl der in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Auftau-/Einfrierzyklen noch die angegebene Handhabungsdauer, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Die unsachgemäße Handhabung von Produktkomponenten und Proben kann zu Kontaminationen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen:

- Vertauschen Sie nicht die Deckel von Reaktionsgefäßen und Flaschen.
  - Lagern Sie positives und/oder potentiell positives Material getrennt von den Kitkomponenten.
  - Nutzen Sie getrennte Arbeitsbereiche zur Probenvorbereitung, für den Reaktionsansatz und zur Amplifikation/Detektion.
  - Entsorgen Sie nach der Handhabung von positivem und/oder potentiell positivem Material grundsätzlich Ihre Handschuhe.
  - Öffnen Sie nach Abschluss der Amplifikation grundsätzlich keine PCR-Platten und/oder -Röhrchen.
- 
- Vermischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen Kit-Lots. Die Verwendung von verschiedenen Kit-Lots kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
  - Dieser Test ist nur zur Verwendung mit humanem EDTA- und Citrat-Plasma validiert worden. Die Verwendung anderer Probenarten kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
  - Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.
  - Unsachgemäße Probenentnahme, Versand, Lagerung oder Vorbereitung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
  - Die Lagerung der Eluate unter falschen Bedingungen kann zum Abbau der HAV-Zielsequenz führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
  - Verwenden Sie keine andere Version des Assay-Protokolls als jene, die auf dem 2D-Barcode in dieser Gebrauchsanweisung angegeben ist. Die Verwendung einer falschen Version des Assay-Protokolls kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
  - Werden die Produktkomponenten nach dem Auftauen nicht oder nicht ausreichend zentrifugiert, kann es zu einer Kontamination der Komponenten mit Reagenzienrückständen am Deckel kommen, was die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
  - Verwenden Sie die Deckel der Röhrchen nicht mehr als einmal, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

- Wie bei jedem diagnostischen Test sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.
- Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren (z. B. Heparin) kann zu falschnegativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Verwenden Sie für den Master Mix Ansatz keine anderen Volumina an Master A und Master B als in dieser Gebrauchsanweisung angegeben. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Überschreiten Sie nicht die maximale Aufbewahrungszeit für den PCR-Mix. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Vertauschen Sie während des PCR-Setups oder des Transfers in das PCR-Instrument keine Proben oder Proben-IDs. Dies kann zu falschpositiven oder falschnegativen Ergebnissen durch inkorrekte Zuordnung der Proben führen.
- Verwenden Sie keine anderen PCR-Bedingungen als in dieser Gebrauchsanweisung angegeben. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Verwenden Sie für die Datenanalyse keine Kontroll-Einstellungen, die von den Angaben in dieser Gebrauchsanweisung abweichen, da dies zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führen kann.
- Sollten die Proben andere Erreger als HAV enthalten, kann es zu Kreuzreaktionen oder zu einer Konkurrenzreaktion zu Ungunsten der Amplifikation der Zielsequenz kommen, was zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führt.
- Die Entsorgung gefährlicher und biologischer Abfälle muss in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften erfolgen, um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden.
- Möglicherweise auftretende Mutationen in den Zielregionen des HAV-Genoms, die durch in diesem Kit verwendete Primer und/oder Sonden abgedeckt werden, können dazu führen, dass der Erreger trotz Vorhandenseins nicht detektiert wird.
- Dieses Produkt ist nicht für den Nachweis von HAV in Blut, Blutbestandteilen, Zellen, Geweben, Organen oder deren Derivaten bestimmt, um deren Eignung zur Transfusion, Transplantation oder Zellverabreichungen zu beurteilen.

## 7. Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit dem AltoStar® Workflow

Im nachfolgenden Teil dieser Gebrauchsanweisung ist die Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit dem AltoStar® Workflow beschrieben. Der AltoStar® Workflow umfasst verschiedene Produkte [AltoStar® AM16, AltoStar® Connect software, AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5, CFX96™ DW Dx, FastFinder Standalone und AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation (optional)]. Die Verwendung dieser Produkte ist in den jeweiligen Gebrauchsanweisungen genauer beschrieben.

- AltoStar® Automation System AM16 Handbuch IVD (Hamilton)
- AltoStar® Connect software Handbuch IVD (Hamilton)
- Gebrauchsanweisung AltoStar® Purification Kit 1.5
- Gebrauchsanweisung AltoStar® Internal Control 1.5
- CFX96™ Dx und CFX96™ Deep Well Dx Systeme Bedienungsanleitung (Bio-Rad)
- Gebrauchsanweisung FastFinder Standalone (UgenTec NV)

### 7.1 Probenvolumen

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist für die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus einem Probenvolumen von 500 µl bei Verwendung des AltoStar® AM16 validiert. Zur Berücksichtigung des Totvolumens des verwendeten Probenröhrchens ist ein erhöhtes Probenvolumen vorzusehen (siehe Kapitel 7.2 Probenröhrchen).

### 7.2 Probenröhrchen

Geeignete Probenröhrchen zur Verwendung mit dem AltoStar® AM16 sind bei altona Diagnostics erhältlich (7-ml-Röhrchen mit Deckel, 82 x 13 mm, VK000010). Andere Probenröhrchen können durch den Benutzer auf ihre Eignung geprüft werden. Genauere Informationen hierzu finden Sie in der Gebrauchsanweisung des AltoStar® Purification Kit 1.5.

### 7.3 Proben-Barcodes

Zur automatisierten Probenerkennung durch den AltoStar® AM16 müssen alle Probenröhrchen mit einem geeigneten Barcode gekennzeichnet sein. Genauere Informationen hierzu finden Sie in der Gebrauchsanweisung des AltoStar® Purification Kit 1.5.

### 7.4 Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör für den AltoStar® Workflow

Das in Tabelle 2 angegebene Zubehör muss bei altona Diagnostics bestellt werden.

**Tabelle 2:** Erforderliche Materialien und Geräte

Material	Beschreibung	Bestellnr.
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Produktpaket aus dem AltoStar® Automation System AM16, der AltoStar® Connect software (Version 1.7.4 oder höher) und IT-Hardware	AM16
AltoStar® Detection	Produktpaket aus dem CFX96™ Deep Well Dx System mit der CFX Manager™ Dx Software (Version 3.1), einem Barcode-Scanner und IT-Hardware	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Chemie für die Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren zur Verwendung in Verbindung mit dem AltoStar® Automation System AM16	PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Kontrolle für die Extraktion, PCR-Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren	IC15-46
AltoStar® Automated Analysis Package	Personal Computer mit installierter FastFinder Standalone Software (Version 1.0 oder höher) und Assay Plugin Paket zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation	VK000045
PCR Plate	96-Well-Platte (semi-skirted) mit Barcode und weißen Wells	VK000005

Material	Beschreibung	Bestellnr.
PCR Plate Sealing Foil	Versiegelungsfolie für die PCR-Platte	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	1.000-µl-Filterspitzen zur Verwendung in Verbindung mit dem AltoStar® Automation System AM16	VK000007
300 µl CO-RE Tips	300-µl-Filterspitzen zur Verwendung in Verbindung mit dem AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Röhrchen mit Barcode zum Mischen von PCR-Reagenzien	VK000002
Waste Bag	Autoklavierbarer Sterilbeutel zur Verwendung in Verbindung mit dem AltoStar® Automation System AM16	VK000009
Screw Cap - red	Schraubdeckel für PC Röhrchen (rot)	VK000012
Screw Cap - blue	Schraubdeckel für Master A Röhrchen (blau)	VK000013
Screw Cap - purple	Schraubdeckel für Master B Röhrchen (violett)	VK000015
Screw Cap - white	Schraubdeckel für NTC Röhrchen (weiß)	VK000016

**Tabelle 3:** Zusätzliche Labormaterialien und -geräte

Material	Beschreibung	Bestellnr.
Plattenversiegler	z. B. AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	z. B. PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

## 7.5 Allgemeine Materialien und Geräte

- Labormixer (Vortex)
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- Zentrifuge zum Abzentrifugieren der AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Komponenten
- Zentrifuge zum Abzentrifugieren der PCR-Platten

## 7.6 Verfahren

### 7.6.1 Übersicht über den AltoStar® Workflow

Alle Schritte des vollständigen AltoStar® Workflows sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Informationen zu den spezifischen Einstellungen bei Verwendung in Kombination mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 finden Sie in Kapitel 7.6.2 Programmierung eines AltoStar® Laufs. Detaillierte Anweisungen zu den Schritten 1–5 finden Sie in der Gebrauchsanweisung des AltoStar® Purification Kit 1.5, der AltoStar® Connect software und des AltoStar® AM16.

Schritte 6–9 sind in den Kapiteln 7.6.3 Starten eines PCR-Setup-Laufs bis 7.6.6 Starten eines PCR-Laufs genauer beschrieben.

Die Schritte 10 und 11 unterscheiden sich bei der manuellen und automatisierten Ergebnisinterpretation. Weitere Details zur manuellen Ergebnisinterpretation finden Sie in den Kapiteln 7.6.7 PCR-Datenanalyse unter Verwendung der CFX Manager™ Dx Software bis 7.6.10 Export von PCR-Ergebnissen zur manuellen Ergebnisinterpretation. Die Schritte zur optionalen Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation mit FastFinder sind in Kapitel 7.6.11 PCR-Datenanalyse und automatisierte Ergebnisinterpretation unter Verwendung von FastFinder näher beschrieben.

**Tabelle 4:** Übersicht über den AltoStar® Workflow

Schritt	Handlung
1. Starten des AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schalten Sie den AltoStar® AM16 ein.</li> <li>• Schalten Sie den Computer und den Monitor ein.</li> <li>• Starten Sie die AltoStar® Connect software.</li> </ul>
2. Ausführen von Wartungsläufen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>Application</b> → <b>Instrument Maintenance</b> (Anwendung → Gerätewartung). <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Wenn die wöchentliche Wartung fällig ist, klicken Sie auf <b>Start Weekly Maintenance</b> (Wöchentliche Wartung starten).</li> <li>◦ Wenn die tägliche Wartung fällig ist, klicken Sie auf <b>Start Daily Maintenance</b> (Tägliche Wartung starten).</li> </ul> </li> <li>• Befolgen Sie die Bildschirmanweisungen für den Wartungsprozess.</li> </ul>
3. Programmierung eines AltoStar® Laufs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>Program Run</b> → <b>Program Run (AltoStar® Purification)</b> [Lauf programmieren → Lauf programmieren (AltoStar® Aufreinigung)]. Wechseln Sie alternativ zurück auf den Startbildschirm und klicken Sie auf die Schaltfläche <b>Program Run</b> (Lauf programmieren).</li> <li>• Geben Sie die Proben ein oder importieren Sie sie aus dem LIMS.</li> <li>• Wählen Sie folgenden Assay für die Proben aus, wenn er nicht bereits aus dem LIMS importiert wurde: <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5</li> </ul> </li> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf die Schaltfläche <b>Create Run</b> (Lauf erstellen), um den AltoStar® Lauf zu erstellen.</li> </ul>

Schritt	Handlung
<p>4. Starten eines Aufreinigungs- laufs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>Purification</b> → <b>Start Purification</b> (Aufreinigung → Aufreinigung starten). Wechseln Sie alternativ zurück auf den Startbildschirm und klicken Sie auf die Schaltfläche <b>Start Purification</b> (Aufreinigung starten).</li> <li>• Wählen Sie den Aufreinigungslauf aus, den Sie starten möchten, um die Proben anzuzeigen, die zu dem ausgewählten Aufreinigungslauf gehören.</li> <li>• Bereiten Sie die Aufreinigungsreagenzien vor:             <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Vergewissern Sie sich, dass die zu verwendenden Aufreinigungsreagenzien dieselbe Beladungsnummer aufweisen (Ausnahme: AltoStar® Internal Control 1.5) und dass sie nicht abgelaufen sind.</li> <li>◦ Sind im Lysepuffer Ausfällungen zu erkennen, erhitzen Sie ihn leicht (<math>\leq +50</math> °C), bis sie vollständig aufgelöst sind.</li> <li>◦ Lassen Sie die IC (AltoStar® Internal Control 1.5) auftauen und vortexen Sie sie für 5 Sekunden.</li> <li>◦ Vortexen Sie die Magnetic Beads für 5 Sekunden. Achten Sie dabei darauf, dass der Deckel nicht feucht wird.</li> </ul> </li> <li>• Bereiten Sie die Proben für den Aufreinigungslauf vor, den Sie starten möchten. Gehen Sie dabei vor, wie in der Gebrauchsanweisung für das AltoStar® Purification Kit 1.5 beschrieben.</li> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>Start Run</b> (Lauf starten).</li> <li>• Lassen Sie sich von den Dialogfenstern Loading (Laden) leiten und beladen Sie das Gerät entsprechend.</li> <li>• Bestätigen Sie die Meldung Loading complete (Beladung abgeschlossen) mit <b>OK</b> oder warten Sie 10 Sekunden.</li> </ul> <p>Das System führt den Aufreinigungslauf nun automatisch aus.</p>

Schritt	Handlung
<p><b>5. Beenden des Aufreinigungs-laufs</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergewissern Sie sich, dass die Beladungsplattform leer ist, und bestätigen Sie das Dialogfenster Run finished (Lauf beendet) mit <b>OK</b>.</li> <li>• Befolgen Sie die Anweisungen im Dialogfenster Maintenance (Wartung) und bestätigen Sie mit <b>OK</b>.</li> <li>• Versiegeln und lagern Sie die Komponenten des AltoStar® Purification Kit 1.5, die wiederverwendet werden können.</li> </ul> <p>Die Eluate sind in den unversiegelten Eluatplatten bei Raumtemperatur (maximal +30 °C) bis zu 4 Stunden lang stabil.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wird der zugehörige PCR-Setup-Lauf nicht direkt im Anschluss gestartet, versiegeln Sie die Eluatplatte mit Eluatplatten-Versiegelungsfolie und lagern Sie sie für bis zu 24 Stunden bei +2 °C bis +8 °C.</li> <li>• Lassen Sie sich die Aufreinigungslaufergebnisse anzeigen, um sich von der erfolgreichen Verarbeitung aller Proben zu überzeugen.</li> </ul>
<p><b>6. Starten eines PCR-Setup-Laufs</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>PCR Setup</b> → <b>Start PCR Setup</b> (PCR-Setup → PCR-Setup starten). Wechseln Sie alternativ zurück auf den Startbildschirm und klicken Sie auf die Schaltfläche <b>Start PCR Setup</b> (PCR-Setup starten).</li> <li>• Wählen Sie den zu startenden PCR-Setup-Lauf aus, um die Eluatplatte und Reagenzien aus dem ausgewählten PCR-Setup-Lauf anzuzeigen.</li> <li>• Bereiten Sie die PCR-Reagenzien vor:             <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Vergewissern Sie sich, dass die zu verwendenden Master und Kontrollen aus demselben Kit-Lot stammen und nicht abgelaufen sind.</li> <li>◦ Tauen Sie die erforderliche Anzahl an Master- und Kontroll-Röhrchen auf, vortexen Sie sie kurz und zentrifugieren Sie sie ab.</li> </ul> </li> <li>• Wenn die Eluatplatte versiegelt ist, zentrifugieren Sie die Platte kurz ab und entsiegeln Sie sie vorsichtig.</li> <li>• Klicken Sie in der Menüleiste auf <b>Start Run</b> (Lauf starten).</li> <li>• Lassen Sie sich von dem Dialogfenster Loading (Laden) leiten und beladen Sie das Gerät entsprechend.</li> <li>• Bestätigen Sie die Meldung Loading complete (Beladung abgeschlossen) mit <b>OK</b> oder warten Sie 10 Sekunden.</li> </ul> <p>Das System führt den PCR-Setup-Lauf nun automatisch aus.</p>

Schritt	Handlung
7. Beenden des PCR-Setup-Laufs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergewissern Sie sich, dass die Beladungsplattform leer ist, und bestätigen Sie das Dialogfenster Run finished (Lauf beendet) mit <b>OK</b>.</li> <li>• Befolgen Sie die Anweisungen im Dialogfenster Maintenance (Wartung) und bestätigen Sie mit <b>OK</b>.</li> <li>• Verschließen und lagern Sie die Komponenten des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5, die wiederverwendet werden können.</li> <li>• Lassen Sie sich die Ergebnisse des PCR-Setup-Laufs anzeigen, um sich von der erfolgreichen Verarbeitung aller Proben zu überzeugen.</li> </ul>
8. Versiegeln der PCR-Platte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Versiegeln Sie die PCR-Platte mit PCR-Plattenversiegelungsfolie.</li> </ul>
9. Starten des PCR-Laufs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schalten Sie den CFX96™ DW Dx, den verbundenen Computer und den Monitor ein.</li> <li>• Starten Sie die CFX Manager™ Dx Software.</li> <li>• Öffnen Sie den CFX96™ DW Dx.</li> <li>• Zentrifugieren Sie die PCR-Platte ab und setzen Sie sie in den CFX96™ DW Dx ein.</li> <li>• Wählen Sie in der Menüleiste <b>File</b> → <b>Open</b> → <b>LIMS File...</b> (Datei → Öffnen → LIMS-Datei...).</li> <li>• Scannen Sie den Barcode der PCR-Platte mit dem Hand-Barcodescanner.</li> <li>• Schließen Sie den CFX96™ DW Dx.</li> <li>• Klicken Sie auf die Schaltfläche <b>Start Run</b> (Lauf starten), um den PCR-Lauf zu starten. Benennen und speichern Sie die Datei für den PCR-Lauf.</li> </ul> <p>Der CFX96™ DW Dx führt den PCR-Lauf nun automatisch aus.</p>

Schritt	Handlung	
Schritt	Handlung zur Datenanalyse und Berichterstellung mit der CFX Manager™ Dx Software für die anschließende manuelle Ergebnisinterpretation oder die Ergebnisinterpretation durch das LIMS	Handlung zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation unter Verwendung von FastFinder
10. Aufteilen der Assays zur individuellen Analyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teilen Sie alle Assays innerhalb des PCR-Laufs in getrennte Well-Gruppen auf.</li> </ul>	Nicht erforderlich.
11. Analysieren der Daten und Interpretieren der Ergebnisse des PCR-Laufs	<p>Gehen Sie für jede Well-Gruppe separat wie folgt vor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nehmen Sie bei allen Wells Baseline-Korrekturen für alle verwendeten Detektionskanäle vor.</li> <li>Schließen Sie Wells mit irregulären PCR-Signalen aus.</li> <li>Legen Sie die Schwellenwerte für alle Detektionskanäle entsprechend den Kontrollen fest.</li> <li>Schließen Sie Wells mit ungültigen Daten aus.</li> <li>Generieren Sie die LIMS-Ergebnisdatei für den Export der Ergebnisse in das LIMS.</li> <li>Generieren Sie den Ergebnisbericht für die manuelle Ergebnisinterpretation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verwenden Sie FastFinder Standalone und das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin für die Datenanalyse und die automatisierte Ergebnisinterpretation.</li> </ul>

**VORSICHT**



Die Lagerung der Eluate unter falschen Bedingungen kann zum Abbau der HAV-Zielsequenz führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

## 7.6.2 Programmierung eines AltoStar® Laufs

Detaillierte Anweisungen für das Starten eines AltoStar® Laufs finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für das AltoStar® Purification Kit 1.5, die AltoStar® Connect software und den AltoStar® AM16. Die spezifischen Einstellungen für die Verwendung in Kombination mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 sind nachfolgend aufgeführt:

- PC und NTC werden ausgewählt.
- Das erforderliche Probenvolumen beträgt 500 µl zuzüglich des Totvolumens des jeweiligen Probenröhrchens (siehe Kapitel 7.1 Probenvolumen und 7.2 Probenröhrchen).
- Das erforderliche Eluat-Volumen für das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 beträgt 10 µl.
- Achten Sie darauf, dass die korrekte Version des Assay-Protokolls für den Lauf verwendet wird. Informationen zu der aktuellen Version des Protokolls finden Sie in Kapitel 17. Assay-Protokoll für die AltoStar® Connect software und Informationen zur LIMS-Integration. Das jeweilige Assay-Protokoll ist in dem dort dargestellten 2D-Barcode verschlüsselt. Informationen zum Import des Aufreinigungs- und des Assay-Protokolls in die AltoStar® Connect software finden Sie in der entsprechenden Gebrauchsanweisung.

### VORSICHT



Verwenden Sie keine andere Version des Assay-Protokolls als jene, die auf dem 2D-Barcode in dieser Gebrauchsanweisung angegeben ist. Die Verwendung einer falschen Version des Assay-Protokolls kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

## 7.6.3 Starten eines PCR-Setup-Laufs

1. Wählen Sie in der Menüleiste **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (PCR-Setup → PCR-Setup starten) aus. Rufen Sie alternativ erneut den Startbildschirm der AltoStar® Connect software auf und klicken Sie auf die Schaltfläche **Start PCR Setup** (PCR-Setup starten). Der Bildschirm Start PCR Setup Run (PCR-Setup-Lauf starten) wird angezeigt.

Die programmierten PCR-Setup-Läufe werden in der Tabelle Programmed PCR Setup Runs (Programmierte PCR-Setup-Läufe) auf der linken Seite des Bildschirms angezeigt.

2. Wählen Sie den zu startenden PCR-Setup-Lauf in der Tabelle Programmed PCR Setup Runs (Programmierte PCR-Setup-Läufe) aus.
  - Die in dem ausgewählten PCR-Setup-Run enthaltenen Proben werden in der Tabelle oben auf der rechten Seite des Bildschirms angezeigt [Samples in selected PCR Setup Run (Proben im ausgewählten PCR-Setup-Lauf)].
  - Die für den ausgewählten PCR-Setup-Lauf erforderlichen Kontrollen werden in der Tabelle rechts mittig auf dem Bildschirm angezeigt [Controls in selected PCR Setup Run (Kontrollen im ausgewählten PCR-Setup-Lauf)].
  - Die Anzahl der erforderlichen Master-Röhrchen für den ausgewählten PCR-Setup-Lauf wird in der Tabelle rechts unten auf dem Bildschirm angezeigt [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Benötigte Master-Röhrchen für das ausgewählte PCR-Setup)].

#### HINWEIS



Die Anzahl der priorisierten Proben in einem PCR-Setup-Lauf wird in der Spalte **No. of prioritized Samples** (Anzahl priorisierter Proben) angezeigt. Führen Sie PCR-Setup-Läufe mit priorisierten Proben zuerst aus, um eine schnellstmögliche Verarbeitung priorisierter Proben zu erreichen.

Bevor Sie in der Menüleiste auf die Schaltfläche **Start Run** (Lauf starten) klicken, müssen Sie die erforderlichen Reagenzien vorbereiten, wie im Kapitel 7.6.3.1 Vorbereiten von Reagenzien für einen PCR-Setup-Lauf beschrieben. Wurde die Eluatplatte für den ausgewählten PCR-Setup-Lauf zur Lagerung versiegelt, bereiten Sie diese, wie in der Gebrauchsanweisung für das AltoStar® Purification Kit 1.5 beschrieben, vor.

#### 7.6.3.1 Vorbereiten von Reagenzien für einen PCR-Setup-Lauf

1. Tauen Sie die erforderlichen Kontrollen und die benötigte Anzahl an Master-Röhrchen bei Raumtemperatur (max. +30 °C) vollständig auf.
2. Durchmischen Sie die Proben durch leichtes Vortexen.

3. Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz ab, um etwaige Tropfen aus dem Deckel zu entfernen.

#### VORSICHT



Werden die Produktkomponenten nach dem Auftauen nicht oder nicht ausreichend zentrifugiert, kann es zu einer Kontamination der Komponenten mit Reagenzienrückständen am Deckel kommen, was die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

### 7.6.3.2 Beladen des AltoStar® AM16 für einen PCR-Setup-Lauf

Detaillierte Informationen zum Beladungsprozess finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für den AltoStar® AM16 und die AltoStar® Connect software.

1. Klicken Sie in der Menüleiste des Bildschirms Start PCR Setup Run (PCR-Setup-Lauf starten) auf die Schaltfläche **Start Run** (Lauf starten), um das Dialogfenster Loading (Laden) anzuzeigen.

Im Dialogfenster Loading (Laden) werden eine Visualisierung des Decks des AltoStar® AM16 im oberen Bereich und eine Tabelle mit den Trägern, den jeweiligen Spuren für die einzelnen Träger auf dem Deck des AltoStar® AM16, dem auf die einzelnen Träger zu ladenden Material und Kommentaren bezüglich der Tr gerbeladung angezeigt.

#### HINWEIS



Wählen Sie zur Visualisierung der Position eines Elements auf dem Träger und der Position des Trägers auf dem Deck des AltoStar® AM16 die entsprechende Tabellenzeile im Dialogfenster Loading (Laden) aus.

Die Position des Elements und seines Trägers wird wie folgt visualisiert:

- Hervorhebung in Rot in der Visualisierung des Ger tedecks
- Auf dem AltoStar® AM16 durch blinkende Beladungslichter über der Spur, auf der der ausgewählte Träger zu platzieren ist

2. Beladen Sie die jeweils geeigneten Träger mit dem erforderlichen Material, der vorbereiteten Eluatplatte und den vorbereiteten Reagenzien.

- Tauschen Sie nur **vollständig leere** 1.000- $\mu$ l-Spitzenracks gegen **vollständig befüllte** 1.000- $\mu$ l-Spitzenracks auf dem Spitzenträger aus.
- Tauschen Sie nur **vollständig leere** 300- $\mu$ l-Spitzenracks gegen **vollständig befüllte** 300- $\mu$ l-Spitzenracks auf dem Spitzen- und Plattenträger aus.

#### HINWEIS



Das Austauschen von Spitzenracks, die nicht vollständig leer sind, sowie das Austauschen einzelner Spitzen kann zu Problemen bei der automatischen Spitzenverwaltung und somit zu Laufabbrüchen führen.

- Platzieren Sie die erforderliche Eluatplatte so, dass sich Well A1 auf der linken Seite der schwarzen Plattenposition befindet.
- Platzieren Sie eine PCR-Platte so, dass sich Well A1 auf der linken Seite der Plattenposition mit der silbernen Front befindet.
- Beladen Sie für jeden Assay des PCR-Setup-Laufs einen Röhrenträger 24 mit einem ungebrauchten Mischröhrchen.
- Drücken Sie die Röhrchen auf dem Träger vorsichtig bis zum Trägerboden nach unten und drehen Sie die Röhrchen so, dass die Röhrchenbarcodes durch das Trägerfenster sichtbar sind.
- Beladen Sie den Reagenzröhrenträger 32 mit den Assay-Komponenten, die für den PCR-Setup-Lauf benötigt werden.
- Drücken Sie die Röhrchen auf dem Träger vorsichtig bis zum Trägerboden nach unten und drehen Sie die Röhrchen so, dass die Röhrchenbarcodes durch das Trägerfenster sichtbar sind.

#### HINWEIS



Die Reihenfolge der einzelnen Röhrchen in den Trägern ist beliebig.

#### HINWEIS



Das Volumen der geladenen Komponenten wird vor der Verarbeitung nicht durch das System überprüft. Nicht ausreichende Komponenten-Volumina verhindern ein erfolgreiches PCR-Setup für den betroffenen Assay.

#### HINWEIS



Wird ein PCR-Setup-Lauf gestartet, während sich die Deckel noch auf den Röhrchen befinden, kann dies zum Abbruch des Laufs während der Verarbeitung führen.

3. Beladen Sie die Träger so, dass sich der Träger-Barcode auf der Rückseite rechts befindet.
4. Setzen Sie die beladenen Träger in die entsprechenden Spuren zwischen dem vorderen und dem hinteren Gleitblock der Beladungsplattform ein und positionieren Sie sie so, dass sie die Stopphaken an der anderen Seite der Beladungsplattform berühren.

#### HINWEIS



Werden die Träger über die Stopphaken hinaus geschoben, kann das Gerät beschädigt und der Beladungsprozess beeinträchtigt werden.

5. Achten Sie darauf, dass sich Spitzenabwurfblech und Spitzenabfallbehälter an der richtigen Position befinden und dass der Behälter mit einem neuen Abfallbeutel versehen ist.
6. Klicken Sie im Dialogfenster Loading (Laden) auf **OK**, um mit dem Beladungsprozess fortzufahren.

#### HINWEIS



Wenn Sie auf **Cancel** (Abbrechen) klicken, wird der PCR-Setup-Lauf abgebrochen, kann aber erneut gestartet werden (siehe Kapitel 7.6.3 Starten eines PCR-Setup-Laufs).

Der AltoStar® AM16 zieht die Träger in das Gerät ein und führt eine Barcode-Verifizierung durch.

## HINWEIS

Das AltoStar® AM16 verifiziert automatisch folgende Punkte:



- Den korrekten Typ und die korrekte Position der geladenen Träger
- Die korrekte Identität und Position der geladenen Elemente auf den Trägern
- Die Lotübereinstimmung der Komponenten der einzelnen AltoStar® Assay Kits
- Dass keine der geladenen AltoStar® Assay-Komponenten abgelaufen sind
- Die korrekte Position des Spitzenabwurfblechs

Kommt es bei einer dieser Überprüfungen zu einem Fehler, wird dem Benutzer eine Fehlermeldung mit einer genauen Problembeschreibung und entsprechenden Abhilfemaßnahmen angezeigt. Weitere Informationen zum Umgang mit Fehlern finden Sie in der Gebrauchsanweisung der AltoStar® Connect software.

## HINWEIS



Werden die Positionen von Komponenten nach dem Einzug des Trägers in das Gerät geändert, kann es zum Abbruch des PCR-Setup-Laufs und/oder zu Schäden am Gerät kommen.

Wenn alle Überprüfungen abgeschlossen sind, wird das Dialogfeld Loading complete (Beladung abgeschlossen) angezeigt.

7. Bestätigen Sie das Dialogfeld Loading complete (Beladung abgeschlossen), indem Sie auf **OK** klicken oder warten Sie 10 Sekunden auf den automatischen Start des Prozesses.

## HINWEIS



Wenn Sie auf **Cancel** (Abbrechen) klicken, wird der PCR-Setup-Lauf abgebrochen, kann aber erneut gestartet werden (siehe Kapitel 7.6.3 Starten eines PCR-Setup-Laufs).

Der PCR-Setup-Lauf wird gestartet und ohne Benutzerinteraktion durchgeführt.

### 7.6.3.3 Während des PCR-Setup-Laufs

Bis zum Abschluss des PCR-Setup-Laufs sind keine weiteren Benutzerinteraktionen erforderlich. Der Bildschirm Processing Status (Prozess-Status) wird angezeigt. Dort werden der Status des PCR-Setup-Laufs sowie die geschätzte verbleibende Dauer angegeben.

#### HINWEIS



Schieben oder Ziehen an den Trägern oder an der Tür des AltoStar® AM16 während eines PCR-Setup-Laufs kann zum Abbruch des Laufs führen.

### 7.6.4 Fertigstellung des PCR-Setup-Laufs

Nach Abschluss des PCR-Setup-Laufs wird das Dialogfenster Run finished (Lauf beendet) angezeigt.

1. Stellen Sie sicher, dass die Beladungsplattform leer ist.
2. Bestätigen Sie das Dialogfenster Run finished (Lauf beendet), indem Sie auf **OK** klicken.

Die Träger werden vom AltoStar® AM16 entladen. Achten Sie darauf, das Gerät beim Entladen der Träger nicht zu behindern.

Nach dem Entladen wird das Dialogfenster Maintenance (Wartung) angezeigt.

3. Befolgen Sie die Anweisungen im Dialogfenster Maintenance (Wartung).

In der Tabelle des Dialogfensters wird die Anzahl der Reaktionen in den Master-Röhrchen angezeigt, die nicht im PCR-Setup-Lauf verwendet wurden.

4. Wird nun direkt ein weiterer PCR-Setup-Lauf mit der derzeit geladenen Eluatplatte gestartet, kann die Eluatplatte unversiegelt in der Trägerposition bleiben. Ist dies **nicht** der Fall, so versiegeln Sie die Eluatplatte und lagern Sie sie ein. Weiterführende Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung des AltoStar® Purification Kit 1.5.

## HINWEIS



Die Eluate in der Eluatplatte sind bei Raumtemperatur (max. +30 °C) nach Abschluss des Aufreinigungslaufs bis zu 4 Stunden lang stabil.

5. Verschließen Sie Reagenzröhrchen mit geeigneten unbenutzten Deckeln.

## VORSICHT



Verwenden Sie die Deckel der Röhrchen nicht mehr als einmal, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

6. Bewahren Sie Reagenzien zur Wiederverwendung gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.2 Handhabung auf.
7. Entsorgen Sie die gebrauchten Materialien (siehe Kapitel 10. Entsorgung).
8. Bestätigen Sie das Dialogfenster Maintenance (Wartung) mit einem Klick auf **OK**.

### 7.6.4.1 Ergebnisse des PCR-Setup-Laufs

Die Ergebnisse des PCR-Setup-Laufs werden in der AltoStar® Connect software gespeichert.

1. Klicken Sie in der Menüleiste auf **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (PCR-Setup → PCR-Setup-Ergebnisse), um den Ergebnisbildschirm aufzurufen.

Auf dem Bildschirm Results (Ergebnis) wird eine Tabelle mit allen Proben angezeigt, die im letzten PCR-Setup-Lauf verwendet wurden sowie eine Spalte **Status** (Status) auf der rechten Seite, der zu entnehmen ist, ob das PCR-Setup für eine bestimmte Probe vollständig durchgeführt wurde (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Ergebnisse des PCR-Setup-Laufs

Status (Status)	Ergebnis des PCR-Setup-Laufs
Processed (Verarbeitet)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Eluat wurde im PCR-Setup-Lauf erfolgreich verarbeitet.</li> <li>• Der resultierende RT-PCR-Mix kann direkt für einen PCR-Lauf verwendet werden.</li> </ul>
Error (Fehler)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Eluat wurde nicht erfolgreich verarbeitet.</li> <li>• Der betreffende RT-PCR-Mix wird in der nachfolgenden PCR-Analyse automatisch ausgelassen.</li> </ul>

2. Klicken Sie zum Anzeigen der Ergebnisse vorheriger PCR-Setup-Läufe in der Menüleiste auf die Schaltfläche **Load** (Laden), wählen Sie den gewünschten PCR-Setup-Lauf aus der Liste im angezeigten Dialogfenster Load Results (Ergebnisse laden) aus und klicken Sie auf **OK**.

Die AltoStar® Connect software generiert automatisch 3 Ergebnisdateien des PCR-Setup-Laufs:

- Eine LIMS-Datei (.XML), um detaillierte Informationen zum PCR-Setup-Lauf einschließlich der Ergebnisse an das LIMS weiterzuleiten
- Ein Bericht (.PDF) mit detaillierten Informationen zum PCR-Setup-Lauf einschließlich der Ergebnisse zu Dokumentationszwecken
- Eine Cyclus-Datei (.PLRN) zur automatischen Programmierung des CFX96™ DW Dx

Diese Dateien werden am in den Systemeinstellungen angegebenen Speicherort der AltoStar® Connect software abgelegt.

## HINWEIS



Die Ergebnisdateien von PCR-Setup-Läufen können erneut generiert werden, indem Sie den entsprechenden PCR-Setup-Lauf laden und auf die Schaltfläche **Create LIMS File** (LIMS-Datei erstellen) klicken, um die LIMS-Datei zu erstellen, auf **Create Report** (Report erstellen), um den Bericht zu erstellen und auf **Create Bio-Rad Cyclus File** (Bio-Rad Cyclusdatei erstellen), um die Cyclus-Datei zu erstellen.

### 7.6.5 Versiegelung der PCR-Platte

Nach Abschluss des PCR-Setup-Laufs muss die PCR-Platte mit PCR-Plattenversiegelungsfolie versiegelt werden. Es wird empfohlen, den AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] oder den PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) zu verwenden. Die Eignung anderer als der empfohlenen Plattenversiegler muss vom Benutzer evaluiert werden.

Gehen Sie bei Verwendung eines der empfohlenen Plattenversiegler wie folgt vor:

1. Schalten Sie den Plattenversiegler ein und vergewissern Sie sich, dass sich der Plattenadapter nicht in dem Schubfach befindet.
2. Vergewissern Sie sich, dass am Plattenversiegler folgende Einstellungen vorgenommen wurden:

**Tabelle 6:** Einstellungen des Plattenversieglers

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

3. Warten Sie, bis die eingestellte Temperatur erreicht ist. Dies kann einige Minuten dauern.
4. Platzieren Sie die PCR-Platte auf dem Plattenadapter des Plattenversieglers.
5. Legen Sie die PCR-Plattenversiegelungsfolie so auf die PCR-Platte, dass der Aufdruck 'THIS SIDE UP' (diese Seite nach oben) zu lesen ist. Achten Sie darauf, dass alle Wells der PCR-Platte mit Folie bedeckt sind und dass kein Well durch den Schriftzug verdeckt ist.

## HINWEIS






Wird der Plattenversiegler bedient, ohne dass sich der Plattenadapter im Schubfach befindet, kann dies dazu führen, dass der Versiegler nicht mehr funktioniert. Kontaktieren Sie in diesem Fall den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

## HINWEIS



Wenn die PCR-Plattenversiegelungsfolie oder der Rahmen nicht ordnungsgemäß platziert wurden, bleibt die Folie beim Versiegeln möglicherweise an der Heizplatte innerhalb des Plattenversieglers haften. Dies führt dazu, dass der Versiegler nicht mehr funktioniert. Lassen Sie in diesem Fall, oder falls der Versiegelungsschritt ohne PCR-Plattenversiegelungsfolie eingeleitet wurde, den Plattenversiegler auf Raumtemperatur herunterkühlen und kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

6. Befestigen Sie den Versiegelungsrahmen auf der Oberseite, um die Versiegelungsfolie nach unten zu drücken.
7. Öffnen Sie das Schubfach, indem Sie die Schaltfläche **Operate** (Bedienen)\*/ \*\* drücken.
8. Platzieren Sie den Zusammenbau bestehend aus dem Plattenadapter, der PCR-Platte, der PCR-Plattenversiegelungsfolie und dem Versiegelungsrahmen im Plattenversiegler und drücken Sie auf die Schaltfläche **Operate** (Bedienen)\*/ \*\*.
9. Das Schubfach schließt sich automatisch, führt den Versiegelungsschritt über den eingestellten Zeitraum aus und öffnet sich automatisch wieder.
10. Nehmen Sie die versiegelte PCR-Platte und den Plattenadapter aus dem Plattenversiegler und schließen Sie den Plattenversiegler, indem Sie auf die Schaltfläche **Close** (Schließen)\*/ \*\* drücken.

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

\*\*PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

### 7.6.5.1 Stabilität des PCR-Mix

Nach Abschluss des PCR-Setup-Laufs bleibt der RT-PCR-Mix in der versiegelten PCR-Platte bei Raumtemperatur (max. +30 °C) noch 30 Minuten stabil.

## VORSICHT



Überschreiten Sie nicht die maximale Aufbewahrungszeit für den PCR-Mix. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

### 7.6.6 Starten eines PCR-Laufs

Der PCR-Lauf wird auf einem CFX96™ DW Dx durchgeführt und von der CFX Manager™ Dx Software gesteuert.

1. Schalten Sie den CFX96™ DW Dx, den verbundenen Computer und den Monitor ein.
2. Starten Sie die CFX Manager™ Dx Software.
3. Wählen Sie in der Menüleiste der CFX Manager™ Dx Software **File** → **Open** → **LIMS File...** (Datei → Öffnen → LIMS-Datei...) aus, um das Dialogfenster Open LIMS File (LIMS-Datei öffnen) zu öffnen.
4. Vergewissern Sie sich im Dialogfenster Open LIMS File (LIMS-Datei öffnen), dass der Cursor unten auf dem Bildschirm in dem Feld **File name** (Dateiname) blinkt. Ist dies nicht der Fall, klicken Sie in das Feld **File name** (Dateiname).
5. Scannen Sie den PCR-Platten-Barcode mit dem Hand-Barcodescanner, um die richtige LIMS-Datei automatisch auszuwählen und zu öffnen. Das Dialogfenster Run Setup (Lauf-Setup) wird angezeigt.

## HINWEIS



Alle für den Start des PCR-Laufs erforderlichen Parameter werden unter Verwendung der Cycler-Datei automatisch von der AltoStar® Connect software an den CFX96™ DW Dx übertragen.

6. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Open Lid** (Deckel öffnen) im Dialogfenster Run Setup (Lauf-Setup), um den Deckel des CFX96™ DW Dx zu öffnen.
7. Zentrifugieren Sie die versiegelte PCR-Platte kurz ab, um sicherzustellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der Wells befindet.
8. Setzen Sie die versiegelte PCR-Platte in den Heizblock des CFX96™ DW Dx ein. Dabei weist Well A1 zur linken Seite.

9. Schließen Sie den CFX96™ DW Dx per Klick auf die Schaltfläche **Close Lid** (Deckel schließen) im Dialogfenster Run Setup (Lauf-Setup).
10. Starten Sie den PCR-Lauf, indem Sie auf die Schaltfläche **Start Run** (Lauf starten) im Dialogfenster Run Setup (Lauf-Setup) klicken.

### 7.6.6.1 Während des PCR-Laufs

Bis zum Abschluss des PCR-Laufs sind keine Benutzerinteraktionen erforderlich. Das Dialogfenster Run Details (Laufdetails) wird angezeigt. Dort werden der Status des PCR-Laufs sowie die geschätzte verbleibende Dauer angegeben.

#### HINWEIS



Wird der Deckel des CFX96™ DW Dx durch Bedienung der entsprechenden Taste auf der Deckelvorderseite oder durch Klicken auf die Schaltfläche **Open Lid** (Deckel öffnen) im Dialogfenster Run Details (Laufdetails) während eines PCR-Laufs geöffnet, wird der Lauf abgebrochen und alle Ergebnisse sind damit ungültig.

Nach Abschluss des PCR-Laufs wird das Fenster Data Analysis (Datenanalyse) angezeigt, in dem die Amplifikationskurven, das Platten-Layout und die Ergebnisse dargestellt sind.

## 7.6.7 PCR-Datenanalyse unter Verwendung der CFX Manager™ Dx Software

Die Ergebnisse aller Assays (Well-Gruppen) auf der PCR-Platte sind in der in Abbildung 1 dargestellten Reihenfolge zu analysieren.

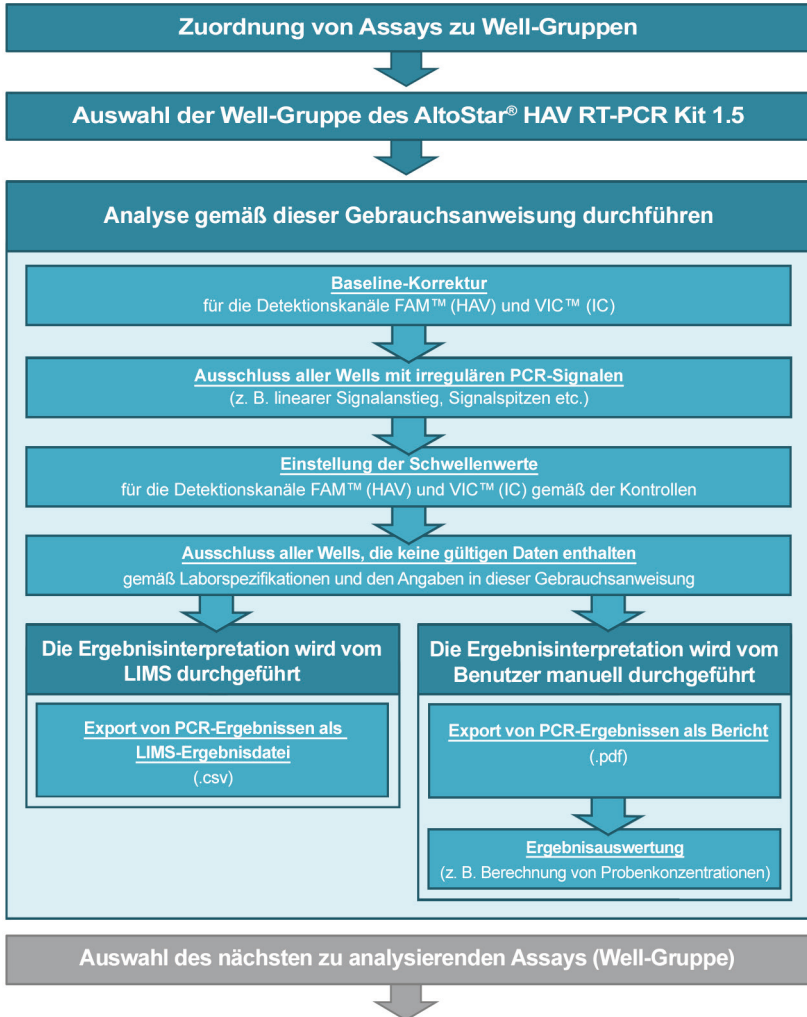


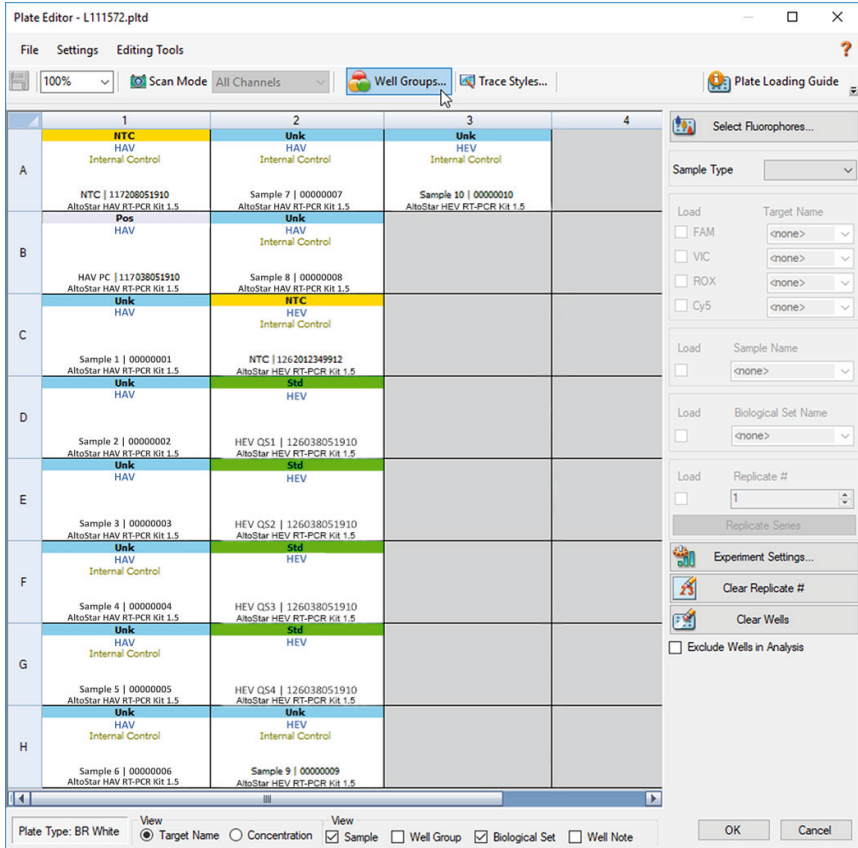
Abb. 1: PCR-Datenanalyseprozess unter Verwendung der CFX Manager™ Dx Software

### 7.6.7.1 Zuordnung von Assays zu Well-Gruppen

Im AltoStar® Workflow werden ein bis mehrere PCR-Assays gleichzeitig auf einer PCR-Platte verarbeitet. Jeder Assay muss jedoch durch den Benutzer entsprechend der Gebrauchsanweisung für den jeweiligen Assay separat analysiert werden.

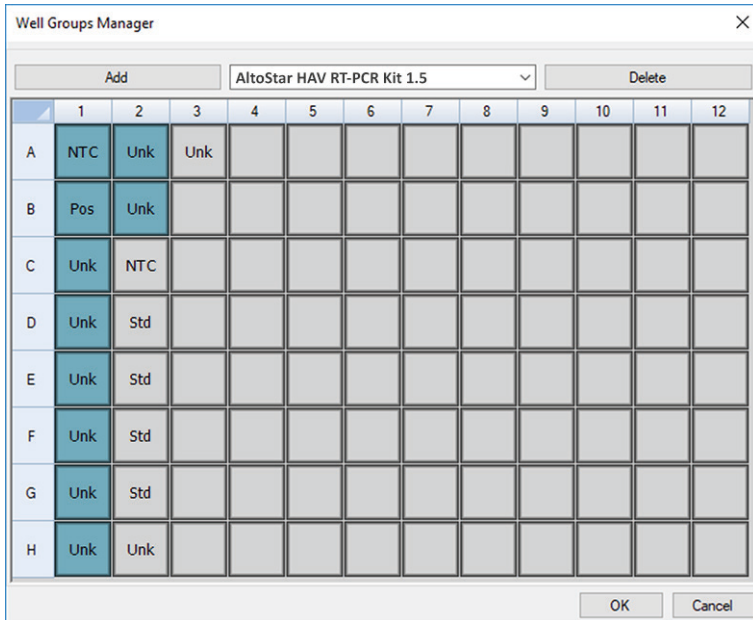
Daher muss der Benutzer alle Assays auf einer PCR-Platte in der CFX Manager™ Dx Software separaten Well-Gruppen zuordnen.

1. Klicken Sie im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) auf die Schaltfläche **Plate Setup** (Platten-Setup) in der Menüleiste und wählen Sie **View/Edit Plate** (Platte anzeigen/bearbeiten) aus. Das Dialogfenster Plate Editor (Platten-Editor) wird angezeigt (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2:** Dialogfenster Plate Editor (Platten-Editor)

2. Klicken Sie im Dialogfenster Plate Editor (Platten-Editor) auf **Well Groups...** (Well-Gruppen...) in der Menüleiste. Das Dialogfenster Well Groups Manager (Well-Gruppen-Manager) wird angezeigt (siehe Abbildung 3).
3. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Add** (Hinzufügen).
4. Geben Sie den Namen des ersten Assays in das Textfeld ein.
5. Wählen Sie alle Wells im Bereich der PCR-Platte aus, die zum ersten Assay gehören (siehe Abbildung 3). Die Wells, die zu einem bestimmten Assay gehören, lassen sich im Dialogfenster Plate Editor (Platten-Editor) anhand des Eintrags im Feld **Biological Set** (biologische Gruppe) ermitteln.

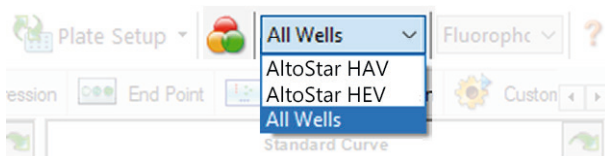


**Abb. 3:** Dialogfenster Well Groups Manager (Well-Gruppen-Manager)

6. Wiederholen Sie die Schritte 3–5 für alle Assays auf der PCR-Platte.
7. Bestätigen Sie die Zuweisung der Well-Gruppe, indem Sie auf **OK** klicken. Das Dialogfenster Well Groups Manager (Well-Gruppen-Manager) wird geschlossen.
8. Schließen Sie das Dialogfenster Plate Editor (Platten-Editor), indem Sie auf **OK** klicken.
9. Bestätigen Sie die Übernahme der Änderungen mit einem Klick auf **Yes** (Ja).

Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste. Verwenden Sie nicht die „All Wells“ (Alle Wells) **Well Group** (Well-Gruppe). Die Auswahl in Abbildung 4 wird als allgemeine Beispielansicht verwendet.

Achten Sie vor dem Analysieren der Ergebnisse darauf, dass die Well-Gruppe des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 alle Wells des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 enthält und keine Wells von anderen Assays.



**Abb. 4:** Schaltfläche und Dropdown-Menü Well Group (Well-Gruppe)

## HINWEIS



Die zusammengefasste Analyse von mehr als einem Assay kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

## VORSICHT



Wie bei jedem diagnostischen Test sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.

### 7.6.7.2 Baseline-Korrektur

Die von der CFX Manager™ Dx Software verwendeten Baseline-Einstellungen müssen eventuell für einzelne Wells des Assays [**Well Group** (Well-Gruppe)], die Gegenstand der Analyse sind, korrigiert werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.
2. Setzen Sie links im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) nur im Kontrollkästchen neben **FAM** für den Detektionskanal der HAV-Zielsequenz ein Häkchen.
3. Klicken Sie in der Menüleiste des Fensters Data Analysis (Datenanalyse) auf **Settings** → **Baseline Threshold...** (Einstellungen → Baseline-Schwellenwert...), um das Dialogfenster Baseline Threshold (Baseline-Schwellenwert) zu öffnen (siehe Abbildung 5).
4. Klicken Sie einmal auf das Symbol  $\diamond$  in der Überschrift der Spalte **Baseline End** (Baseline-Ende), um die Tabelle nach aufsteigenden **Baseline End** (Baseline-Ende) Werten zu ordnen.

5. Wählen Sie alle Zeilen mit einem **Baseline End** (Baseline-Ende) Wert zwischen 1 und 9 aus (siehe Abbildung 5).

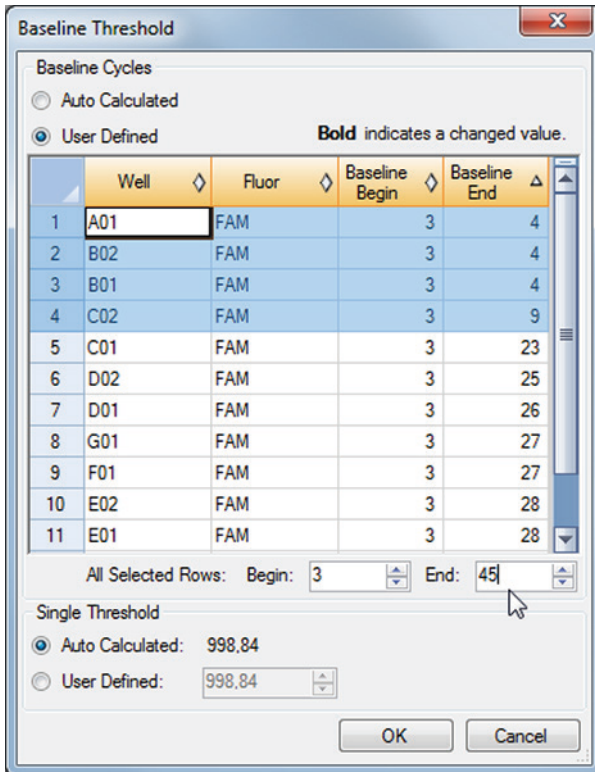


Abb. 5: Dialogfenster Baseline Threshold (Baseline-Schwellenwert)

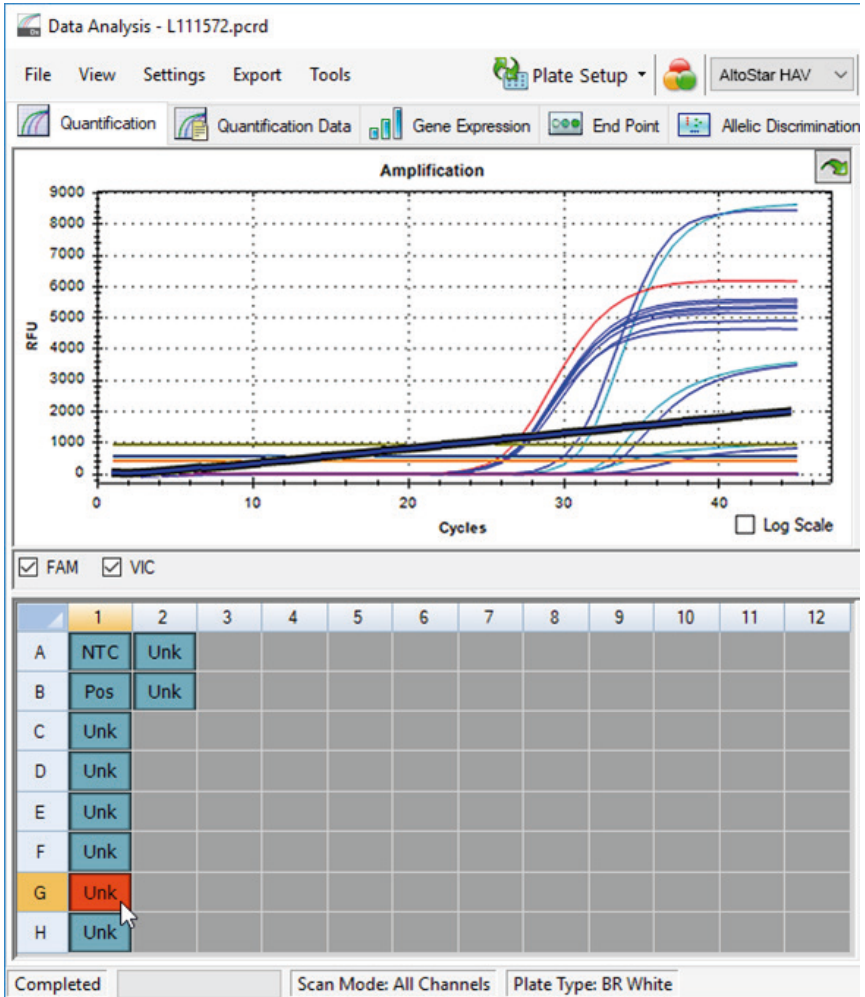
6. Setzen Sie den Wert im Feld **End:** (Ende:) für die ausgewählten Zeilen auf 45 (siehe Abbildung 5).
7. Bestätigen Sie die Einstellungen, indem Sie auf **OK** klicken.
8. Entfernen Sie links im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) das Häkchen aus dem Kontrollkästchen für **FAM** und setzen Sie nur das Häkchen in dem Kontrollkästchen neben **VIC** für den Ziel-Detektionskanal der IC.
9. Wiederholen Sie die Schritte 3–7 für den Detektionskanal VIC™ (IC).

### 7.6.7.3 Ausschluss irregulärer PCR-Signale

Gültige Ergebnisse können nur aus PCR-Signalen abgeleitet werden, die frei von Signalartefakten sind. Solche Artefakte können beispielsweise durch Kontamination oder Bläschen im RT-PCR-Mix verursacht werden. PCR-Signale, die Signalartefakte enthalten, müssen vom Nutzer ausgeschlossen werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.

- Identifizieren Sie Wells mit irregulären PCR-Signalen (lineare Signalzunahme, Signalspitzen usw.) in den Detektionskanälen FAM™ (HAV-Zielsequenz) und VIC™ (IC) (siehe Abbildung 6).



**Abb. 6:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): irreguläres PCR-Signal

3. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf jedes der betroffenen Wells und wählen Sie **Well...** → **Exclude from Analysis** (Well... → Von der Analyse ausschließen) (siehe Abbildung 7).

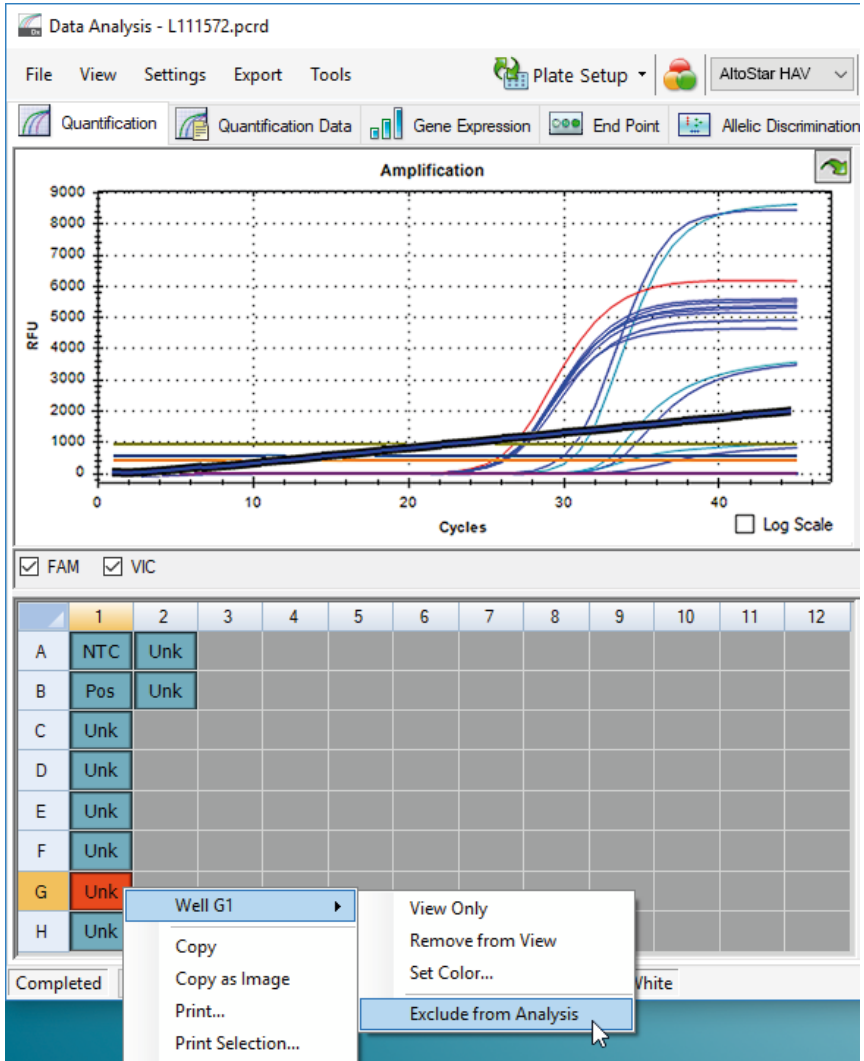
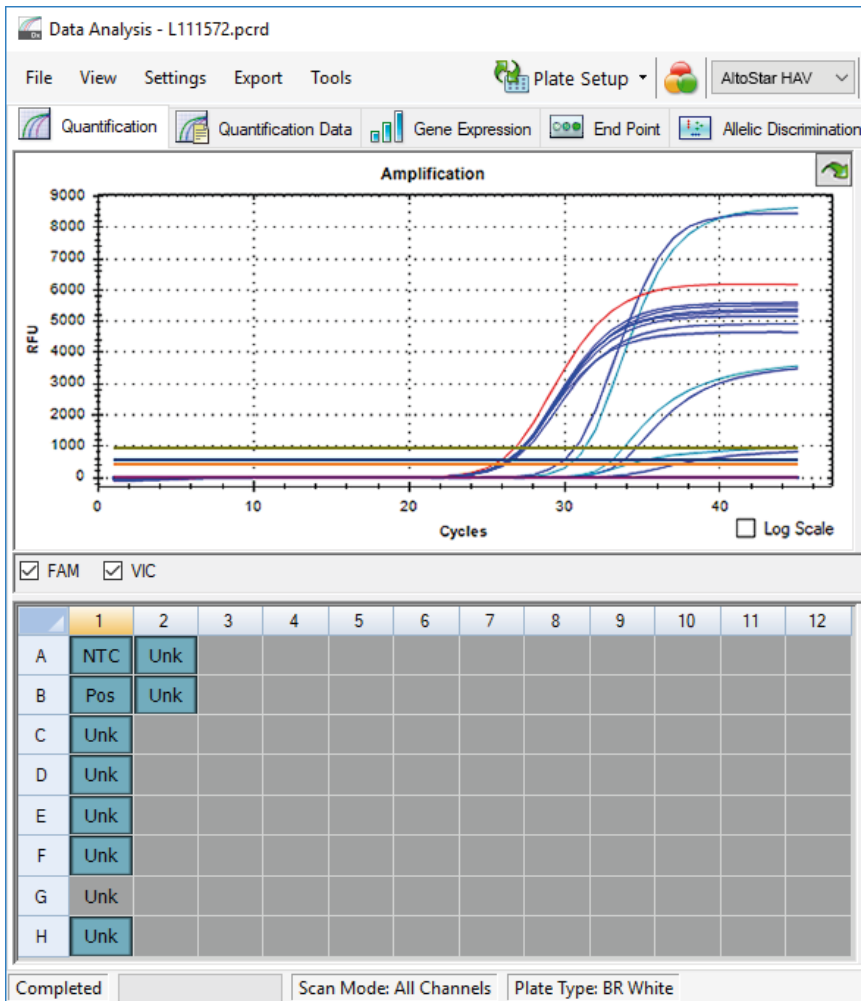


Abb. 7: Fenster Data Analysis (Datenanalyse): Well von der Analyse ausschließen

4. Das ausgewählte Well wird von der Analyse ausgeschlossen. Für dieses Well werden keine Ergebnisse generiert (siehe Abbildung 8).



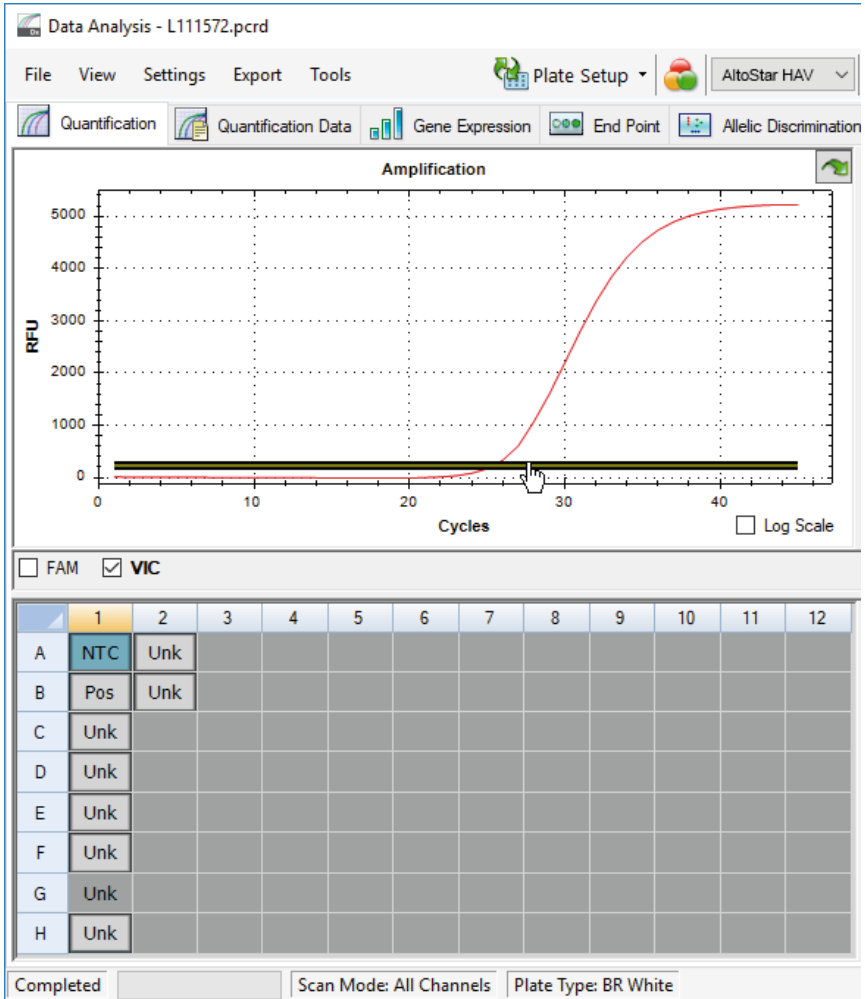
**Abb. 8:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): ausgeschlossenes Well

#### 7.6.7.4 Festlegen von Schwellenwerten

Die Schwellenwerte für den Detektionskanal FAM™ (HAV-Zielsequenz) und den Detektionskanal VIC™ (IC) müssen durch den Benutzer entsprechend den Signalen der Kontrollen manuell eingegeben werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.

- Setzen Sie links im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) nur im Kontrollkästchen neben **VIC** für den Detektionskanal der IC ein Häkchen (siehe Abbildung 9).



**Abb. 9:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): Festlegen des VIC™ Schwellenwerts

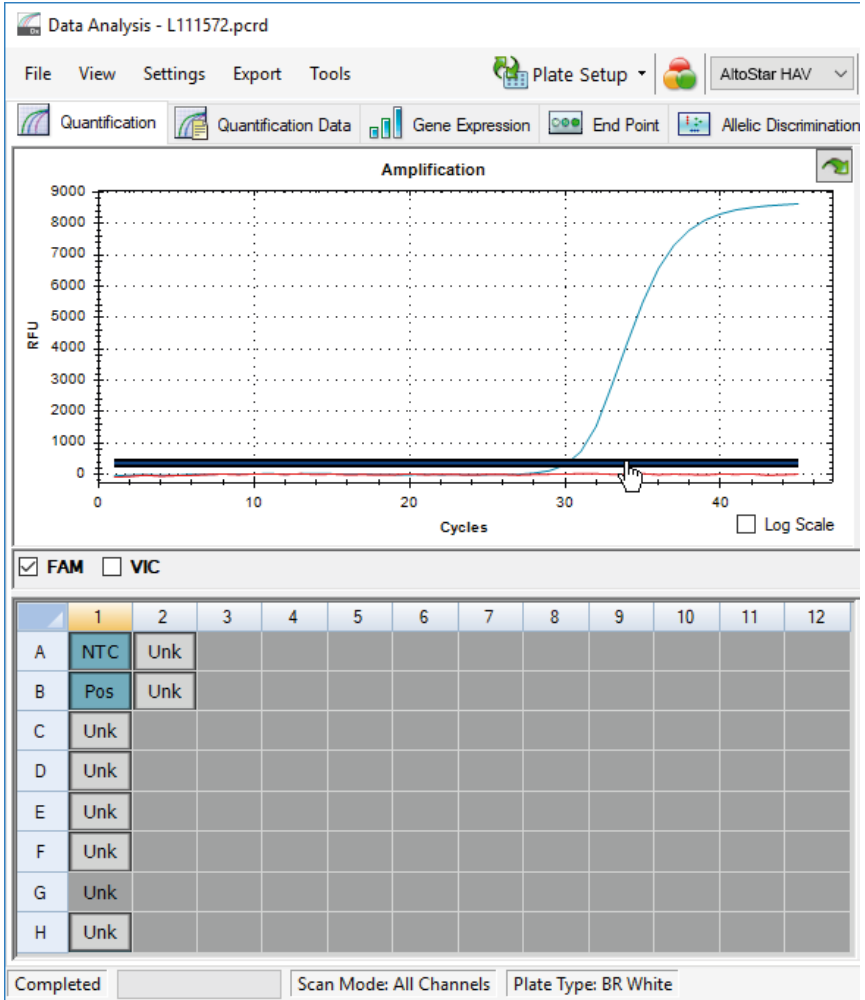
3. Wählen Sie in der Platten-Ansicht des Fensters Data Analysis (Datenanalyse) nur das Well für die NTC aus (siehe Abbildung 9).
4. Ziehen Sie den Schwellenwert in den Exponentialbereich des NTC-Signals (siehe Abbildung 9).

#### HINWEIS



Die NTC enthält das IC-Template, das ein IC-Signal in einem gültigen NTC-Well auslöst.

5. Entfernen Sie links im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) das Häkchen aus dem Kontrollkästchen neben **VIC** und setzen Sie das Häkchen im Kontrollkästchen neben **FAM** für den Detektionskanal der HAV-Zielsequenz (siehe Abbildung 10).



**Abb. 10:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): Festlegen des FAM™ Schwellenwerts

- Wählen Sie nur die Wells mit der NTC und der PC in der Platten-Ansicht des Fensters Data Analysis (Datenanalyse) aus (siehe Abbildung 10).
- Ziehen Sie den Schwellenwert deutlich über das Signal der NTC hinaus in den exponentiellen Bereich des Signals der PC (siehe Abbildung 10).

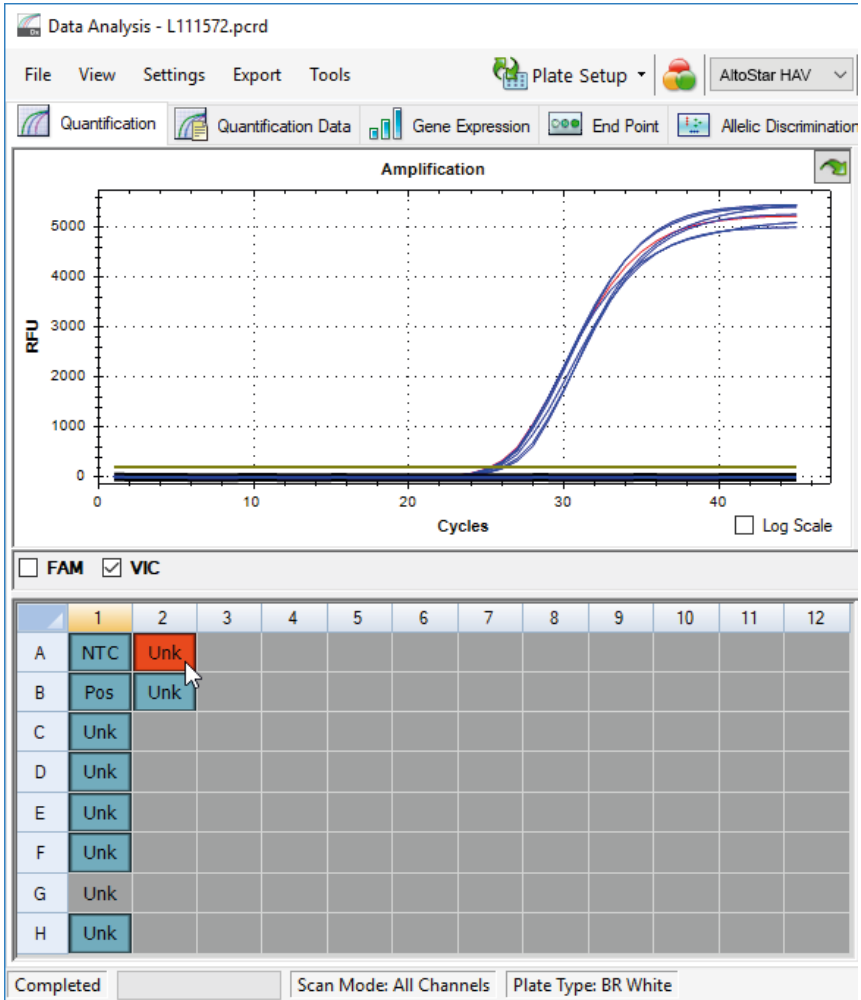
## 7.6.8 Gültigkeit von PCR-Ergebnissen

### 7.6.8.1 Ausschluss von Wells mit ungültigen Daten

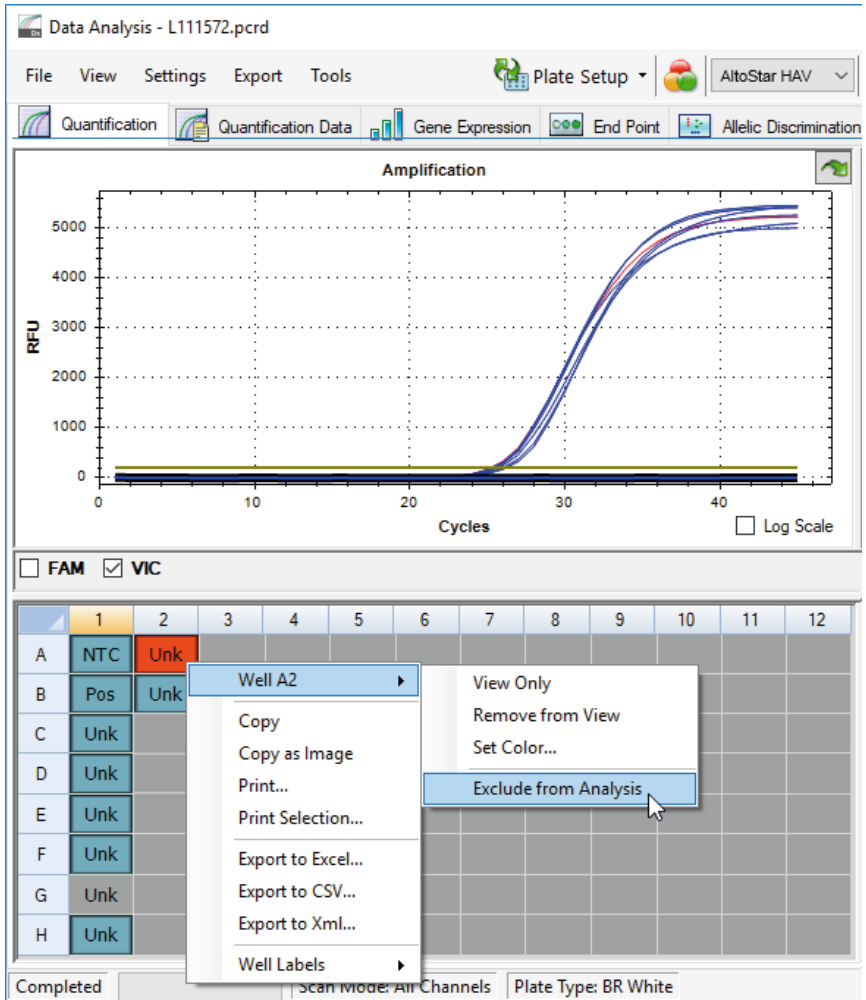
Wells, die keine gültigen Daten enthalten, müssen durch den Benutzer von der Generierung der Ergebnisse ausgeschlossen werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.
2. Identifizieren Sie alle Wells mit ungültigen Daten. Ein Well ist ungültig, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen zutrifft:
  - a) Der gesamte Lauf ist ungültig (siehe Kapitel 7.6.8.2 Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe).
  - b) Die Daten für das Well erfüllen nicht die Kontrollbedingungen für ein gültiges Ergebnis (siehe Kapitel 7.6.8.3 Gültigkeit der Ergebnisse für eine Probe).

- Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf jedes Well, das ungültige Daten gemäß den Kapiteln 7.6.8.2 Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe bis 7.6.8.3 Gültigkeit der Ergebnisse für eine Probe enthält und wählen Sie **Well...** → **Exclude from Analysis** (Well... → Von der Analyse ausschließen) (siehe Abbildungen 11 und 12).



**Abb. 11:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): ungültiges Well



**Abb. 12:** Fenster Data Analysis (Datenanalyse): ungültiges Well von der Analyse ausschließen

Das ausgewählte Well wird von der Analyse ausgeschlossen. Für dieses Well werden keine Ergebnisse generiert.

### 7.6.8.2 Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe

Ein diagnostischer PCR-Lauf ist **gültig**, wenn die folgenden Kontrollbedingungen erfüllt sind:

**Tabelle 7:** Kontrollbedingungen für einen gültigen PCR-Lauf

Kontrolle	Detektionskanal	
	FAM™ (HAV-Zielequenz)	VIC™ (IC)
PC	+	Nicht anwendbar
NTC	-	+

Ein diagnostischer PCR-Lauf ist **ungültig**, wenn:

- Der Lauf nicht abgeschlossen wurde.
- Mindestens eine der Kontrollbedingungen für einen gültigen diagnostischen PCR-Lauf nicht erfüllt ist.

Schließen Sie bei einem ungültigen diagnostischen PCR-Lauf alle Wells von der Analyse aus und wiederholen Sie den AltoStar® Lauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben.

### 7.6.8.3 Gültigkeit der Ergebnisse für eine Probe

Das Ergebnis für eine spezifische Probe ist **ungültig**, wenn die Signale sowohl im Detektionskanal VIC™ (IC) als auch im Detektionskanal FAM™ (HAV-Zielsequenz) negativ sind (siehe Tabelle 8). Tritt ein ungültiges Ergebnis für eine Probe auf, schließen Sie das Well von der Analyse aus und wiederholen Sie den Test mit der ursprünglichen Probe oder entnehmen Sie eine neue Probe und testen Sie diese.

**Tabelle 8:** Gültigkeit des Ergebnisses

Detektionskanal		Gültigkeit des Ergebnisses
FAM™ (HAV-Zielsequenz)	VIC™ (IC)	
+	+	Gültiges Ergebnis
+	-	Gültiges Ergebnis*
-	+	Gültiges Ergebnis
-	-	<b>Ungültiges Ergebnis</b>

\* Eine Detektion der IC ist nicht erforderlich, wenn die HAV-Zielsequenz detektiert wird. Eine hohe Konzentration an HAV-RNA kann zu einem reduzierten oder ausbleibenden Signal der IC führen.

### 7.6.9 Export von PCR-Ergebnissen zur Ergebnisinterpretation durch LIMS

Um die Ergebnisse eines PCR-Laufs einem verbundenen LIMS zur Ergebnisinterpretation durch LIMS zur Verfügung zu stellen, müssen diese als LIMS-Ergebnisdatei (.CSV) exportiert werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.
2. Vergewissern Sie sich, dass alle Schritte des Analyseprozesses (siehe Kapitel 7.6.7.2 Baseline-Korrektur bis 7.6.8.1 Ausschluss von Wells mit ungültigen Daten) für die Well-Gruppe des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 abgeschlossen wurden.
3. Klicken Sie in der Menüleiste des Fensters Data Analysis (Datenanalyse) auf **Export** → **Export All Data Sheets** (Exportieren → Alle Datenblätter exportieren), um das Dialogfenster Browse For Folder (Ordner suchen) zu öffnen.
4. Geben Sie im Dialogfenster Browse For Folder (Ordner suchen) den Speicherort für die zu generierenden LIMS-Ergebnisdateien an und klicken Sie auf **OK**.

**HINWEIS**

Die LIMS-Integration muss gemäß den Spezifikationen von Altona Diagnostics umgesetzt werden. Informationen zur LIMS-Integration finden Sie in Kapitel 17. Assay-Protokoll für die AltoStar® Connect software und Informationen zur LIMS-Integration und/oder kontaktieren Sie den technischen Support von Altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

**HINWEIS**

Werden die Ergebnisse von mehr als einem Assay (Well-Gruppe) aus einem PCR-Lauf in demselben Ordner gespeichert, so werden die LIMS-Ergebnisdateien des ersten Assays (der ersten Well-Gruppe) mit den LIMS-Ergebnisdateien des zweiten Assays (der zweiten Well-Gruppe) überschrieben. In diesem Fall können die LIMS-Ergebnisdateien des ersten Assays (der ersten Well-Gruppe) erneut exportiert werden.

### 7.6.10 Export von PCR-Ergebnissen zur manuellen Ergebnisinterpretation

Wenn die Ergebnisse nicht zur Ergebnisinterpretation durch LIMS an ein LIMS weitergeleitet werden, muss die Ergebnisinterpretation manuell durch den Benutzer vorgenommen werden. Zu diesem Zweck müssen die Analyseergebnisse für jeden Assay (jede Well-Gruppe) in Form eines Berichts exportiert werden.

1. Achten Sie darauf, im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) die **Well Group** (Well-Gruppe) des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auszuwählen. Klicken Sie dazu auf das Dropdown-Menü **Well Group** (Well-Gruppe) rechts neben der Schaltfläche **Well Group** (Well-Gruppe) (siehe Abbildung 4) in der Menüleiste.
2. Setzen Sie links im Fenster Data Analysis (Datenanalyse) Häkchen in den Kontrollkästchen für **VIC** und **FAM**.
3. Vergewissern Sie sich, dass alle Schritte des Analyseprozesses (siehe Kapitel 7.6.7.2 Baseline-Korrektur bis 7.6.8.1 Ausschluss von Wells mit ungültigen Daten) für die Well-Gruppe des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 abgeschlossen wurden.
4. Klicken Sie in der Menüleiste des Fensters Data Analysis (Datenanalyse) auf **Tools** → **Reports...** (Tools → Berichte...), um das Dialogfenster Report (Bericht) zu öffnen.

5. Achten Sie darauf, dass oben links im Dialogfenster Report (Bericht) mindestens die folgenden Inhalte ausgewählt sind (siehe Abbildung 13):

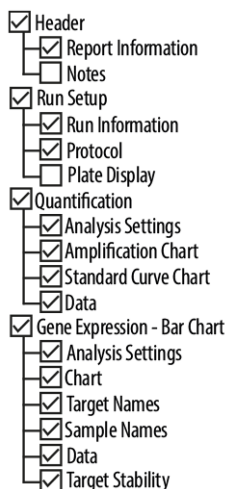


Abb. 13: Dialogfenster Report (Bericht)

6. Wählen Sie weitere Inhalte für den Bericht aus oder ab, indem Sie die entsprechenden Kontrollkästchen aktivieren oder deaktivieren.
7. Klicken Sie in der Menüleiste des Dialogfensters Report (Bericht) auf **File** → **Save As...** (Datei → Speichern unter...), um das Dialogfenster Save Report (Bericht speichern) zu öffnen.
8. Geben Sie im Dialogfenster Save Report (Bericht speichern) den Namen und den Speicherort der zu generierenden Berichtsdatei an und klicken Sie auf **Save** (Speichern).

### 7.6.10.1 Manuelle Interpretation der Ergebnisse

1. Öffnen Sie die Berichtsdatei, die für die Well-Gruppe des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 generiert wurde (siehe Kapitel 7.6.10 Export von PCR-Ergebnissen zur manuellen Ergebnisinterpretation).
2. Beachten Sie die Tabelle Quantification Data (Quantifizierungsdaten) im Bericht (siehe Abbildung 14). Die Tabelle enthält 2 Zeilen für jedes **Sample** (Probe) – eine für das **Target** (Zielsequenz) *HAV* und eine für das **Target** (Zielsequenz) *Internal Control* (Interne Kontrolle).

## Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Well Note
A01	FAM	HAV	NTC	NTC   117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
A02	FAM	HAV	Unkn	Sample 7   00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.44	35.44	0.000	qualitative
B01	FAM	HAV	Pos Ctrl	HAV PC   117111022206	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	31.37	31.37	0.000	
B02	FAM	HAV	Unkn	Sample 8   00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.08	35.08	0.000	qualitative
C01	FAM	HAV	Unkn	Sample 1   00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.33	36.33	0.000	qualitative
D01	FAM	HAV	Unkn	Sample 2   00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.57	36.57	0.000	qualitative
E01	FAM	HAV	Unkn	Sample 3   00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.26	34.26	0.000	qualitative
F01	FAM	HAV	Unkn	Sample 4   00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.39	35.39	0.000	qualitative
G01	FAM	HAV	Unkn	Sample 5   00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.96	35.96	0.000	qualitative
H01	FAM	HAV	Unkn	Sample 6   00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.93	34.93	0.000	qualitative
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC   117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	28.77	28.77	0.000	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 7   00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.43	29.43	0.000	qualitative
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8   00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.54	29.54	0.000	qualitative
C01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1   00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.22	29.22	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 2   00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
E01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3   00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.50	29.50	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4   00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
G01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5   00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.27	29.27	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6   00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.67	29.67	0.000	qualitative

Abb. 14: Bericht: Quantification Data (Quantifizierungsdaten)

Qualitative Ergebnisse werden mit dem Begriff *qualitative* (qualitativ) in der Spalte **Well Note** (Well-Hinweis) der Tabelle Quantification Data (Quantifizierungsdaten) gekennzeichnet.

- Identifizieren Sie alle Zeilen mit dem **Target** (Zielsequenz) *HAV* und dem Begriff *qualitative* (qualitativ) in der Spalte **Well Note** (Well-Hinweis).
- In diesen Zeilen finden Sie in der Spalte **C<sub>q</sub>** das Ergebnis des jeweiligen **Sample** (Probe).
- Entnehmen Sie der Tabelle 9, wie die Ergebnisse zu interpretieren sind.

Tabelle 9: Ergebnisinterpretation

Schwellenwertzyklus (C <sub>q</sub> ) für die HAV-Zielsequenz	Ergebnisinterpretation
1–45	HAV-spezifische RNA erkannt.
N/A	Keine HAV-spezifische RNA erkannt. Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen von HAV-spezifischer RNA.

## 7.6.11 PCR-Datenanalyse und automatisierte Ergebnisinterpretation unter Verwendung von FastFinder

Optional kann die PCR-Datenanalyse und automatisierte Ergebnisinterpretation mit FastFinder Standalone und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin durchgeführt werden. Die gültige Assay Plugin Version ist in Kapitel 3.2 AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin aufgeführt.

Genauere Informationen zu FastFinder Standalone finden Sie in der jeweiligen Gebrauchsanweisung.

### HINWEIS



Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin ist als Unterstützung für die Interpretation der mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auf dem CFX96™ DW Dx generierten Ergebnisse gedacht. Alle mit dem Assay Plugin erzeugten Ergebnisse müssen von einem menschlichen Benutzer auf ihre Gültigkeit und Korrektheit überprüft werden.

1. Starten Sie die FastFinder Standalone Anwendung auf dem AltoStar® Automated Analysis PC.
2. Geben Sie Ihre Benutzerdaten und Ihr Passwort ein, um sich anzumelden. Der Startbildschirm wird angezeigt. Sie haben Zugriff auf alle offenen und autorisierten Analysen.
3. Klicken Sie auf **Create new analysis** (Neue Analyse erstellen).
4. Suchen Sie die zu analysierende Datei und wählen Sie sie durch Anklicken von **Open** (Öffnen) aus. Es werden nur Dateien mit der Endung .PCRD unterstützt. Die Datei wird hochgeladen und analysiert. Nach Abschluss der Analyse wird **Ready for review** (Bereit zur Überprüfung) angezeigt.

### HINWEIS



Es wird dringend empfohlen, nur eine Datei mit PCR-Daten (.PCRD) auf einmal zu analysieren, anstatt mehrere PCR-Läufe in Batches zu analysieren.

5. Klicken Sie auf den PCR-Lauf, um den Überprüfungsprozess zu starten.

- Überprüfen Sie die Kontrollen und beheben Sie etwaige Fehlermeldungen auf der Grundlage der Warnung für einzelne Proben.

#### HINWEIS



Stellen Sie sicher, dass nicht auflösbare Proben als nicht eindeutig eingestuft werden und dass die Proben erneut extrahiert und getestet werden.

- Autorisieren Sie die Analyse oder starten Sie sie erneut.

Nachdem Sie auf **Authorize** (Autorisieren) geklickt haben, wird die Analyse automatisch als Datei mit der Endung .CSV heruntergeladen. PDFs können von autorisierten Analysen heruntergeladen werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Actions** (Aktionen) in der oberen rechten Ecke und wählen Sie **Generate PDF Export** (PDF-Export erstellen) aus. Gehen Sie über dasselbe Menü zu **Downloads** (Downloads), um die Datei zu öffnen.

## 8. Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit anderen Real-Time-PCR-Geräten als dem CFX96™ Deep Well Dx System

Neben dem CFX96™ DW Dx wurde das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 mit weiteren Real-Time-PCR-Geräten validiert (siehe Kapitel 5.3.2 Andere Workflows). In den nachfolgenden Kapiteln 8.1 Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör und 8.2 Verfahren wird beschrieben, wie das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit diesen Geräten zu verwenden ist.

## 8.1 Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör

Folgende Geräte, Software und Materialien werden benötigt:

- Allgemeine Materialien und Geräte (siehe Kapitel 7.5 Allgemeine Materialien und Geräte)
- CFX96™ Deep Well Dx System und CFX Manager™ Dx Software Version 3.1 (Bio-Rad)
  - 96-Well-PCR-Platten und Versiegelungsfolie (detaillierte Angaben in Tabelle 2)
- CFX96™ Dx System und CFX Manager™ Dx Software Version 3.1 (Bio-Rad)
  - 96-Well-PCR-Platten und Versiegelungsfolie (detaillierte Angaben in Tabelle 2)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform und Rotor-Gene® Q Software Version 2.3.1 (QIAGEN)
  - 0,1-ml-Strip-Tubes mit Deckeln [STRIP Tubes 0,1 ml für Rotor-Gene® Cycler (LTF Labortechnik) oder vergleichbares Material]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System und QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 und ABI Prism® 7500 SDS und 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)
  - 96-Well-PCR-Platten und Versiegelungsfolie [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate und MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) oder vergleichbares Material]
- LightCycler® 480 Instrument II und LightCycler® 480 Software Version 1.5.1 (Roche)
  - 96-Well-PCR-Platten und Versiegelungsfolie [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white und LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) oder vergleichbares Material]

### HINWEIS



Es wird nicht empfohlen, andere Materialien oder Geräte zu verwenden, als in dieser Gebrauchsanweisung angegeben.

## 8.2 Verfahren

### 8.2.1 Probenvorbereitung

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde unter Verwendung des AltoStar® AM16 in Kombination mit dem AltoStar® Purification Kit 1.5 validiert.

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 muss in Verbindung mit einer heterologen IC (AltoStar® Internal Control 1.5) verwendet werden, anhand dessen sich auch das Verfahren zur Probenvorbereitung (Nukleinsäure-Extraktion) und die nachfolgende RT-PCR kontrollieren lassen.

Das Volumen an IC, das dem Proben-/Lysepuffer-Gemisch zugesetzt wird, hängt von dem jeweiligen Elutionsvolumen ab. Es beträgt immer 50 % des Elutionsvolumens.

#### VORSICHT



Die Lagerung der Eluate unter falschen Bedingungen kann zum Abbau der HAV-Zielsequenz führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

### 8.2.2 Master Mix Ansatz

Alle Komponenten des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 und alle Proben müssen vollständig aufgetaut, gemischt (durch Auf- und Abpipettieren oder vorsichtiges Vortexen) und vor der Verwendung kurz zentrifugiert werden. Setzen Sie den Master Mix entsprechend dem folgenden Pipettierschema an:

**Tabelle 10:** Pipettierschema (Master Mix Ansatz)

Anzahl der Reaktionen (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Master Mix Volumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**VORSICHT**



Verwenden Sie für den Master Mix Ansatz keine anderen Volumina an Master A und Master B als in dieser Gebrauchsanweisung angegeben. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

**VORSICHT**



Werden die Produktkomponenten nach dem Auftauen nicht oder nicht ausreichend zentrifugiert, kann es zu einer Kontamination der Komponenten mit Reagenzienrückständen am Deckel kommen, was die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

### 8.2.3 Reaktionsansatz

1. Pipettieren Sie 20 µl des Master Mix in jedes erforderliche Well einer geeigneten optisch klaren 96-Well-PCR-Platte oder eines geeigneten optisch klaren Reaktionsröhrchens.
2. Fügen Sie jeweils 10 µl der Probe (Eluat aus der Nukleinsäure-Extraktion) oder 10 µl der Kontrollen (PC oder NTC) hinzu.

**Tabelle 11:** Pipettierschema (Reaktionsansatz)

Reaktionsansatz	
Master Mix	20 µl
Probe oder Kontrolle	10 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30 µl</b>

3. Achten Sie darauf, dass mindestens 1 PC und 1 NTC pro Lauf verwendet wird.
4. Mischen Sie die Proben und die Kontrollen gründlich mit dem Master Mix, indem Sie auf- und abpipettieren.
5. Verschließen Sie die 96-Well-PCR-Platte mit PCR-Plattenversiegelungsfolie und die Reaktionsröhrchen mit passenden Deckeln (siehe Kapitel 8.1 Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör).
6. Zentrifugieren Sie die 96-Well-PCR-Platte in einer Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten 30 Sekunden lang bei etwa 1.000 x g (ca. 3.000 UPM).

Die NTC enthält immer das IC-Template in der richtigen Konzentration.

Nach Abschluss des PCR-Setups bleibt der PCR-Mix bei Raumtemperatur (max. +30 °C) noch 30 Minuten stabil.

#### VORSICHT



Überschreiten Sie nicht die maximale Aufbewahrungszeit für den PCR-Mix. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

#### VORSICHT



Vertauschen Sie während des PCR-Setups oder des Transfers in das PCR-Instrument keine Proben oder Proben-IDs. Dies kann zu falschpositiven oder falschnegativen Ergebnissen durch inkorrekte Zuordnung der Proben führen.

## 8.2.4 PCR-Lauf

### 8.2.4.1 Programmierung des Real-Time-PCR-Gerätes

Grundlegende Informationen zur Einrichtung und Programmierung der unterschiedlichen Real-Time-PCR-Geräte finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Geräts.

Für detaillierte Anweisungen zur Programmierung bezüglich der Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Verbindung mit verschiedenen Real-Time-PCR-Geräten kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

### 8.2.4.2 Einstellungen für den Lauf

Geben Sie die folgenden Grundeinstellungen ein:

**Tabelle 12:** Einstellungen für den Lauf

Einstellungen	
Reaktionsvolumen	30 µl
Heizrate	Default
Passive Referenz*	ROX™

\* Falls erforderlich

Geben Sie die folgenden Fluoreszenz-Detektionskanäle (Farbstoffe) ein:

**Tabelle 13:** Fluoreszenz-Detektionskanäle

Zielsequenz	Detektorname	Reporter	Quencher
HAV	HAV	FAM™	(Ohne)
IC	Internal Control	JOE™	(Ohne)

Geben Sie Informationen zum Temperaturprofil und zur Fluoreszenzmessung wie folgt ein:

**Tabelle 14:** Temperaturprofil und Fluoreszenzmessung

	Phase	Wiederholungen	Messung	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Reverse Transkription	Halten	1	-	55	20:00
Denaturierung	Halten	1	-	95	02:00
Amplifikation	Cycling	45	-	95	00:15
			Ja	55	00:45
			-	72	00:15

**VORSICHT**



Verwenden Sie keine anderen PCR-Bedingungen als in dieser Gebrauchsanweisung angegeben. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

## 8.2.5 Datenanalyse

Grundlegende Informationen zur Datenanalyse auf den einzelnen Real-Time-PCR-Geräten finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Real-Time-PCR-Geräts.

Detaillierte Anweisungen zur Analyse der mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 an den einzelnen Real-Time-PCR-Geräten generierten Daten erhalten Sie auf Anfrage beim technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

Die Kriterien für die Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe sowie für die Ergebnisinterpretation, unabhängig von dem verwendeten Real-Time-PCR-Gerät, sind in den Kapiteln 7.6.8.2 Gültigkeit diagnostischer PCR-Läufe bis 7.6.8.3 Gültigkeit der Ergebnisse für eine Probe, in Kapitel 7.6.10.1 Manuelle Interpretation der Ergebnisse sowie in Tabelle 9 beschrieben.

**VORSICHT**



Verwenden Sie für die Datenanalyse keine Kontroll-Einstellungen, die von den Angaben in dieser Gebrauchsanweisung abweichen, da dies zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führen kann.

**VORSICHT**



Wie bei jedem diagnostischen Test sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.

## 9. Leistungsdaten

Die Leistung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde unter Verwendung der WHO-Standards „2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques“ (NIBSC code: 00/562 und 15/276) und anhand von HAV-Standardmaterial, das mithilfe des internationalen WHO-Standards kalibriert wurde, evaluiert.

Die Leistungsdaten wurden mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 unter Verwendung des AltoStar® Workflows gewonnen. Eine vergleichbare Leistung hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Präzision wurde für die anderen Real-Time-PCR-Geräte nachgewiesen, siehe Kapitel 5.3.2 Andere Workflows.

### 9.1 Plasma

#### 9.1.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) wurde eine Verdünnungsreihe des WHO-Standards „3<sup>rd</sup> WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276)“ in Plasma in einem Konzentrationsbereich von 1,00E+02 bis 2,50E-01 IU/ml generiert.

Für jede Verdünnung wurden 8 Replikate in 3 separaten Läufen getestet (Gesamtanzahl n = 24 je Verdünnung), wofür Kombinationen aus folgenden Produkten eingesetzt wurden:

- 3 Lots AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 AltoStar® AM16 Geräte
- 3 CFX96™ DW Dx Geräte

Die Daten aus sämtlichen Läufen wurden zusammengeführt und einer Probit-Analyse unterzogen, um den LoD-Wert von 95 % zu bestimmen.

**Tabelle 15:** PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

Konzentration [IU/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	24	100
2,50E+01	24	24	100
1,00E+01	24	24	100
5,00E+00	24	23	96
2,50E+00	24	16	67
1,00E+00	24	12	50
5,00E-01	24	4	17
2,50E-01	24	3	13

Die LoD des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 für den Nachweis von HAV in Plasma beträgt 6,31 IU/ml (95 % Konfidenzintervall: 4,17–11,99 IU/ml).

### 9.1.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist durch die sorgfältige Auswahl der Oligonukleotide (Primer und Sonden) gesichert. Die Oligonukleotide wurden per Sequenzabgleich gegen die veröffentlichten Sequenzen überprüft, um sicherzustellen, dass alle relevanten HAV-Genotypen detektiert werden.

Zur Überprüfung der analytischen Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 9.1.2.1 Negativproben bis 9.1.2.3 Kreuzreaktionen).

### 9.1.2.1 Negativproben

35 HAV-negative Plasmaproben von Einzelspendern wurden mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 überprüft. Alle (35 von 35) Proben waren negativ für HAV-spezifische RNA und positiv für die IC. Die analytische Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 für Plasmaproben ist  $\geq 95\%$ .

### 9.1.2.2 Störende Substanzen

Zur Bewertung des Einflusses potentiell störender endogener Substanzen auf die Leistung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurden Plasmaproben mit ausgewählten Substanzen angereichert. Diese Plasmaproben enthielten HAV in einer Konzentration von  $3 \times \text{LoD}$  ( $1,90\text{E}+01$  IU/ml), bzw. kein HAV.

Die Ergebnisse für Proben mit potentiell störenden Substanzen wurden mit den Ergebnissen für Plasmaproben verglichen, die nicht mit einer störenden Substanz angereichert wurden. Jede Probe wurde in 3 Replikaten verarbeitet.

Keine Beeinträchtigungen wurden bei Proben mit erhöhten Konzentrationen folgender Substanzen festgestellt:

- Endogene Substanzen
  - Bilirubin
  - Hämoglobin
  - Menschliche genomische DNA
  - Humanes Serumalbumin
  - Triglyceride

#### VORSICHT



Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren (z. B. Heparin) kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.

### 9.1.2.3 Kreuzreaktionen

Die analytische Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Bezug auf Kreuzreaktionen mit anderen Erregern als HAV wurde durch Tests mit folgenden Erregern ermittelt:

- Viren mit Verwandtschaft zu HAV
- Viren, die vergleichbare Symptome hervorrufen wie eine Infektion mit HAV
- Viren, deren Vorhandensein im Organismus von Patienten mit einer HAV-Infektion wahrscheinlich ist

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 zeigte keine Kreuzreaktionen mit den folgenden Erregern:

- Coxsackievirus A3
- Cytomegalievirus (CMV)
- Enterovirus 71
- Epstein-Barr-Virus (EBV)
- Hepatitis-B-Virus (HBV)
- Hepatitis-C-Virus (HCV)
- Hepatitis-E-Virus (HEV)
- Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1)
- Herpes-Simplex-Virus 2 (HSV-2)
- Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1)
- Parvovirus B19
- Rubellavirus
- Rubulavirus (RuV)
- Varicella-Zoster-Virus (VZV)
- Gelbfieberevirus

#### VORSICHT



Sollten die Proben andere Erreger als HAV enthalten, kann es zu Kreuzreaktionen oder zu einer Konkurrenzreaktion zu Ungunsten der Amplifikation der Zielsequenz kommen, was zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führt.

### 9.1.3 Reaktivität

Die Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 in Bezug auf den Nachweis der HAV-Genotypen wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sichergestellt. Zur Verifizierung, dass das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 den Nachweis anderer HAV-Genotypen als HAV 1a [2<sup>nd</sup> WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 00/562)] und 1b [3<sup>rd</sup> WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 15/276)] zulässt, wurden HAV 2a und 3a mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 getestet. HAV 2a und 3a wurden mit dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 positiv nachgewiesen.

#### VORSICHT



Möglicherweise auftretende Mutationen in den Zielregionen des HAV-Genoms, die durch in diesem Kit verwendete Primer und/oder Sonden abgedeckt werden, können dazu führen, dass der Erreger trotz Vorhandenseins nicht detektiert wird.

### 9.1.4 Präzision

Die Präzision des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde anhand eines Panels folgender Proben ermittelt:

- 1 hochpositive HAV-Plasmaprobe (3,15E+02 IU/ml)
- 1 schwach positive HAV-Plasmaprobe [1,90E+01 IU/ml (3 x LoD)]
- 1 HAV-negative Plasmaprobe

Die Daten wurden bestimmt auf Basis der:

- Werte des Schwellenwertzyklus ( $C_q^*$ ) für die hochpositive HAV-Probe
- Werte des Schwellenwertzyklus ( $C_q^*$ ) für die IC in der negativen HAV-Probe

\* Bitte beachten Sie, dass der gewählte Term  $C_q$  mit der Bezeichnung  $C_t$  äquivalent ist, die unter Umständen in anderen Cyclern als dem CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) verwendet wird.

Die Wiederholbarkeitsdaten wurden gemäß den Empfehlungen der CLSI-Richtlinie EP05-A3 („Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition“) [3] generiert. Jedes Panelmitglied wurde in 2 Läufen pro Tag über 20 Tage von einem Benutzer in doppelter Ausführung wie folgt getestet:

- 1 Lot AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 1 Lot AltoStar® Purification Kit 1.5
- 1 Lot AltoStar® Internal Control 1.5
- 1 AltoStar® AM16 Gerät
- 1 CFX96™ DW Dx Gerät

In Tabelle 16 werden die Schätzungen der Wiederholbarkeit und Präzision innerhalb des Labors sowohl als Standardabweichung (SD) als auch als Variationskoeffizient (CV %) angegeben, auf Basis der  $C_q$ -Werte, die für die hochpositive HAV-Probe und für die IC in der HAV-negativen Probe ermittelt wurden. Die dargestellten Präzisionsdaten wurden durch die manuelle Analyse der Daten mit der CFX Manager™ Dx Software und unter Verwendung der automatisierten Ergebnisinterpretation von FastFinder Standalone und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin erhalten.

**Tabelle 16:** Wiederholbarkeit und Präzision innerhalb des Labors für das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Wiederholbarkeit		Präzision innerhalb des Labors	
CFX Manager™ Dx Software					
Probe	Mittelwert (C <sub>q</sub> -Werte)	SD (C <sub>q</sub> -Werte)	CV %	SD (C <sub>q</sub> -Werte)	CV %
Hochpositiv	30,27	0,11	0,36	0,13	0,42
Negativ	29,37	0,10	0,35	0,14	0,47
AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin					
Probe	Mittelwert (C <sub>q</sub> -Werte)	SD (C <sub>q</sub> -Werte)	CV %	SD (C <sub>q</sub> -Werte)	CV %
Hochpositiv	28,29	0,12	0,44	0,32	1,12
Negativ	27,84	0,13	0,46	0,36	1,30

Alle bei 3 x LoD (schwach positive Proben) getesteten Proben wurden als positiv erkannt und alle negativen Proben ergaben mit der CFX Manager™ Dx Software und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin ein negatives Ergebnis.

Zur Reproduzierbarkeit wurde jedes Panelmitglied in 6 Replikaten in 3 Läufen von 3 Benutzern unter Verwendung von getestet:

- 3 Lots AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 AltoStar® AM16 Geräte
- 3 CFX96™ DW Dx Geräte

In Tabelle 17 werden die Schätzungen der Reproduzierbarkeit sowohl als Standardabweichung (SD) als auch als Variationskoeffizient (CV %) angegeben, auf Basis der  $C_q$ -Werte, die für die hochpositive HAV-Probe und für die IC in der HAV-negativen Probe ermittelt wurden. Die dargestellten Präzisionsdaten wurden durch die manuelle Analyse der Daten mit der CFX Manager™ Dx Software und unter Verwendung der automatisierten Ergebnisinterpretation von FastFinder Standalone und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin erhalten.

**Tabelle 17:** Reproduzierbarkeit für das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Reproduzierbarkeit	
CFX Manager™ Dx Software			
Probe	Mittelwert ( $C_q$ -Werte)	SD ( $C_q$ -Werte)	CV %
Hochpositiv	30,53	0,26	0,85
Negativ	29,57	0,19	0,66
AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin			
Probe	Mittelwert ( $C_q$ -Werte)	SD ( $C_q$ -Werte)	CV %
Hochpositiv	28,37	0,17	0,61
Negativ	27,30	0,17	0,63

Alle bei 3 x LoD (schwach positive Proben) getesteten Proben wurden als positiv erkannt und alle negativen Proben ergaben mit der CFX Manager™ Dx Software und dem AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin ein negatives Ergebnis.

### 9.1.5 Gesamtausfallrate

Die Robustheit des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde durch das Testen von 33 HAV-negativen Plasmaproben von Einzelspendern, angereichert mit HAV bis zu einer Endkonzentration von 3 x LoD ( $1,90E+01$  IU/ml), bewertet. Alle (33 von 33) Proben wurden im HAV-spezifischen Fluoreszenzdetektionskanal (FAM™) positiv getestet.

### 9.1.6 Verschleppung

Verschleppung ist in erster Linie ein Workflow-abhängiges Risiko und unabhängig vom verwendeten PCR-Assay. Für den AltoStar® Workflow wurde das AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 als exemplarisches Modell eingesetzt. Eine mögliche Kreuzkontamination durch Verschleppung von hochpositiven Proben wurde evaluiert, indem abwechselnd hochpositive (1,00E+07 IU/ml) und negative Parvovirus-B19-Proben (n = 44 pro Lauf; 5 Läufe) mit dem AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 getestet wurden. Es konnte keine Verschleppung beobachtet werden, d. h. alle Negativkontrollen für Parvovirus B19 wurden negativ getestet.

### 9.1.7 Klinische Leistungsdaten

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde in einer Vergleichsstudie mit dem CE-gekennzeichneten AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) evaluiert. Nachträglich wurden 145 humane Plasmaproben parallel getestet:

Das AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) wurde in Kombination mit dem NucliSENS® easyMAG instrument (bioMérieux) und dem RotorGene® 6000 (QIAGEN) bzw. dem Mx3000P instrument (Agilent) verwendet.

Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 wurde in Kombination mit dem AltoStar® Purification Kit 1.5 und der AltoStar® Internal Control 1.5 auf dem AltoStar® AM16 und auf dem CFX96™ DW Dx eingesetzt.

Für die qualitative Analyse wurden alle Proben mit einem ungültigen Ergebnis bei mindestens einem der beiden Assays ausgeschlossen.

Die Ergebnisse für die 139 verbleibenden Proben sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18:** Testergebnisse zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität für HAV in Plasmaproben

		AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.)	
		POSITIV	NEGATIV
AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5	POSITIV	68	2
	NEGATIV	0	69

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 betragen im Vergleich zu dem AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx s.r.o.) 100 % bzw. 97 %.

## 10. Entsorgung

Entsorgen Sie gefährliche und biologische Abfälle in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften. Überschüssige Produktkomponenten und Abfälle dürfen nicht ins Abwasser, in Wasserläufe oder ins Erdreich gelangen.

### VORSICHT



Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

### VORSICHT



Die Entsorgung gefährlicher und biologischer Abfälle muss in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften erfolgen, um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden.

### HINWEIS



Die PCR-Platte muss in versiegelter Form entsorgt werden, da die PCR-Plattenversiegelungsfolie nicht entfernt werden kann.

## 11. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem nach EN ISO 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von altona Diagnostic GmbH wird jedes Lot des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auf eine Reihe festgelegter Spezifikationen hin getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

## 12. Technischer Support

Zur Inanspruchnahme von Kundenbetreuung kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics:

**E-Mail:**            **support@altona-diagnostics.com**

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

### HINWEIS



Alle gravierenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt müssen altona Diagnostics und den zuständigen Behörden Ihres Landes gemeldet werden.

## 13. Sicherheits- und Leistungsbericht

Der für das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 erstellte Sicherheits- und Leistungsbericht kann in der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte (EUDAMED) eingesehen werden: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

## 14. Literatur

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 10<sup>th</sup> Edition. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. *Infectious Diseases*, Third Edition. Mosby, 2010.
- [3] CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

## 15. Handelsmarken und Haftungsausschlüsse

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

Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, nicht als gesetzlich ungeschützt anzusehen.













Das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 ist ein CE-markiertes Produkt gemäß der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.









Das Produkt ist weder bei Health Canada noch bei der FDA registriert oder zugelassen.

Nicht in allen Ländern verfügbar.

© 2025 altona Diagnostics GmbH; alle Rechte vorbehalten.

## 16. Symbole

Symbol	Erklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Global Trade Item Number
	Chargennummer
	Inhalt
	Deckelfarbe
	Produktnummer
	Nummer
	Komponente
	Materialnummer
	Versionsnummer
	Version
	Gebrauchsanweisung beachten

Symbol	Erklärung
	Enthält ausreichend Reagenzien für „n“ Tests/Reaktionen (rxns)
	Lagertemperatur
	Verwendbar bis
	Hersteller
	Herstellungsdatum
	Vorsicht
	Hinweis
	Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

## 17. Assay-Protokoll für die AltoStar® Connect software und Informationen zur LIMS-Integration

Der 2D-Barcode in Abbildung 15 ist für die Installation des aktuellsten Assay-Protokolls für die Verwendung des AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 auf dem AltoStar® AM16 zu verwenden. Der Barcode kann nur in ausgedruckter Form gescannt werden. Sie können den Barcode direkt aus dem Handbuch scannen oder ihn auf einem separaten Blatt ausdrucken. Bitte beachten Sie, dass sich die Größe des Ausdrucks darauf auswirkt, wie gut sich der Barcode scannen lässt. Achten Sie darauf, die Größe auf 100 % zu skalieren. Richten Sie den Scanner an der roten Linie auf dem Barcode aus. Details zur Verwaltung der Assay-Protokolle finden Sie im entsprechenden Kapitel der Gebrauchsanweisung für die AltoStar® Connect Software. Informationen zur LIMS-Integration finden Sie in Tabelle 20.

AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5



**Protocol Version:**

**1**

Checksum: C326507A464335D02618D2794862824FFF75E7DB

**Abb. 15:** Assay-Protokoll-Barcode für das AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

**Tabelle 19:** Changelog für das Assay-Protokoll

Protokollversion	Aktualisierungen
1	Erste Version

**Tabelle 20:** Informationen für die LIMS-Integration

Verwendung	Daten
Testauftrag (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5
Testergebnis (CFX96™ DW Dx → LIMS) Einheit	N/A
Testergebnis (CFX96™ DW Dx → LIMS) Kanal 1	HAV
Testergebnis (CFX96™ DW Dx → LIMS) Kanal 2	Internal Control

Informationen und Support zu LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes) finden Sie auf der Website der altona Diagnostics GmbH ([www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)) oder kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 12. Technischer Support).

## 18. Änderungshistorie

**Tabelle 21:** Änderungshistorie

Kennung	Datum der Ausgabe [Monat/Jahr]	Änderungen
MAN-AS0241540-DE-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapitel 1: Entfernung des Textabschnitts „Methoden zur Nukleinsäure-Extraktion und“</li> <li>• Kapitel 2, 5, 5.4.2: Spezifikation der Probenarten</li> <li>• Kapitel 3: Umbenennung des Kapitels in „Kitkomponenten“</li> <li>• Kapitel „3.1 Reagenzien“ mit dem Inhalt des früheren Kapitels 3 hinzugefügt</li> <li>• Kapitel „3.2 AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 Assay Plugin“ hinzugefügt</li> <li>• Kapitel 5: Aufnahme der Zielregion</li> <li>• Kapitel 5.2: Umbenennung des Kapitels in „Beschreibung der Reagenzien“</li> <li>• Kapitel 5.3.1, 7, 7.4, 7.6.1, 7.6.11: Aufnahme von FastFinder zur Datenanalyse und automatisierten Ergebnisinterpretation (optional)</li> <li>• Kapitel 5.3.2: Aufnahme von Inhalten aus dem früheren Kapitel 5.3.2.2</li> <li>• Kapitel 5.3.2, 8.1: Aufnahme von Software-Versionen</li> <li>• Entfernung von Kapitel 5.3.2.1 und 5.3.2.2</li> <li>• Kapitel 5.4.2, 6: Aufnahme von Warnungen</li> <li>• Kapitel 8.2.1: Entfernung der Beschreibung der Vorgehensweise für andere Methoden zur Nukleinsäure-Extraktion als mit dem AltoStar® AM16</li> <li>• Kapitel 9: Hinzufügen von Informationen zu Leistungsdaten anderer Real-Time-PCR-Geräte</li> <li>• Kapitel 9.1.4: Ersetzung von Präzisionsdaten auf Basis von 5 Läufen mit Präzisionsdaten, die gemäß der CLSI-Richtlinie EP05-A3 generiert wurden</li> </ul>

Kennung	Datum der Ausgabe [Monat/Jahr]	Änderungen
MAN-AS0241540-DE-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapitel „13. Sicherheits- und Leistungsbericht“ hinzugefügt</li> <li>• Kapitel 14: Aufnahme der Referenz zur CLSI-Richtlinie EP05-A3</li> <li>• Kapitel 15: Ersetzung von „In-vitro-Diagnostikrichtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates“ durch „Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika“</li> <li>• Redaktionelle Änderungen</li> </ul>

**Seite absichtlich frei gelassen**



altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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