

Instrukcja użytkowania

RealStar[®] **HEV RT-PCR Kit 2.0**

07/2017 PL

RealStar[®]

HEV RT-PCR Kit 2.0

Do stosowania z

Mx 3005P[™] QPCR System (Stratagene)

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

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

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

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

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)



272013



96



07 2017



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

Spis treści

1.	Przeznaczenie zestawu.....	6
2.	Składniki zestawu	6
3.	Przechowywanie	7
4.	Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone.....	8
5.	Podstawowe informacje	9
6.	Opis wyrobu	10
6.1	Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym	12
7.	Ostrzeżenia i środki ostrożności	12
8.	Procedura	14
8.1	Przygotowanie próbki.....	14
8.2	Przygotowanie mieszaniny master mix.....	15
8.3	Konfiguracja reakcji.....	17
9.	Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym	18
9.1	Ustawienia.....	18
9.2	Detektory fluorescencji (barwniki)	19
9.3	Profil temperatury i pomiar barwnika.....	19
10.	Analiza danych	20
10.1	Prawidłowość badań diagnostycznych.....	20
10.1.1	Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	20
10.1.2	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	20
10.1.3	Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe).....	21
10.1.4	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe).....	21
10.2	Manualna analiza	22
10.2.1	Analiza jakościowa.....	22

10.2.2 Analiza ilościowa	22
11. Charakterystyka działania testu	24
11.1 Czułość analityczna	24
11.2 Swoistość analityczna	25
11.3 Zakres liniowości	26
11.4 Precyzja	27
12. Ograniczenia.....	28
13. Kontrola jakości	29
14. Pomoc techniczna.....	29
15. Literatura.....	29
16. Znaki towarowe i zastrzeżenia	30
17. Wyjaśnienie symboli.....	31

1. Przeznaczenie zestawu

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego RNA właściwego dla wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV).

2. Składniki zestawu

Kolor zakrętki	Składnik	Liczba fiolek	Objętość [μ l/fiolkę]
Niebieski	Master A	8	60
Fioletowy	Master B	8	240
Zielony	Internal Control	1	1000
Czerwony	QS1-4*	4	550
Biały	Water (PCR grade)	1	500

* Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 zawiera standardy ilościowe (QS) dla czterech różnych stężeń (patrz rozdział 6. Opis wyrobu)

3. Przechowywanie

- Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 jest wysyłany w suchym lodzie. Składniki zestawu powinny być dostarczone w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub próbki zostały uszkodzone podczas transportu należy skontaktować się z Altona Diagnostics GmbH w celu uzyskania pomocy.
- Po odbiorze wszystkie składniki należy przechowywać w temperaturze od -25 °C do -15 °C.
- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania odczynników Master (więcej niż dwukrotnie), ponieważ może to negatywnie wpływać to na właściwości użytkowe testu. Odczynniki powinny być zamrażane w porcjach, jeśli nie zostaną użyte na raz.
- Przechowywanie w temperaturze +2 °C do +8 °C nie powinno przekroczyć 2 godzin.
- Mieszanki reakcyjne Master A i Master B należy chronić przed światłem.

4. Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone

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

UWAGA



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

UWAGA



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

5. Podstawowe informacje

Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV) posiada jednoniciowy wirus genom RNA o długości około 7,5 tysięcy zasad. Jest to jedyny przedstawiciel gatunku *Hepevirus* z rodziny *Hepeviridae*. Wirion składa się z bezotoczkowego ikozaedralnego kapsydu o średnicy około 33 nm.

Zakażenia wirusem HEV stanowią istotny problem dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że wirusem zakażonych jest 2,3 miliarda osób na całym świecie. Wirus HEV jest odpowiedzialny za prawie 50% przypadków ostrego wirusowego zapalenia wątroby w krajach rozwijających się Azji, Afryki i Ameryki Łacińskiej. Ostre zakażenia dotyczą głównie osób dorosłych w wieku od 15 do 40 lat i mają zwykle przebieg łagodny. Natomiast śmiertelność jest szczególnie wysoka (na poziomie od 10% do 40%) u kobiet w ciąży. Przewlekłe zakażenia HEV są obserwowane u osób o obniżonej odporności. Badania w obszarach endemicznych wykazują wysoką seroprewalencję wahającą się w zakresie od 15% do 60%.

Wirus HEV dzieli się na cztery genotypy, a te z kolei na liczne podtypy. Genotypy 1 i 2 wirusa HEV mają charakter hiperendemiczny w Azji i Afryce, gdzie powodują wybuchy ognisk chorobowych i sporadyczne ostre przypadki zapalenia wątroby, natomiast genotyp 3 wirusa HEV występuje głównie w krajach rozwiniętych, gdzie rozpoznaje się sporadyczne przypadki ostrego zapalenia wątroby.

UWAGA



Względnie szybka ewolucja molekularna wirusów RNA wiąże się z ryzykiem akumulacji mutacji w czasie, co może prowadzić do fałszywie negatywnych wyników dla jakiegokolwiek systemu testowania opartego na technologii RT-PCR.

6. Opis wyrobu

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego RNA właściwego dla wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV).

Test zawiera heterologiczny system amplifikacji (kontrola wewnętrzna) umożliwiającą identyfikację ewentualnej inhibicji RT-PCR oraz weryfikację integralności odczynników wchodzących w skład zestawu.

Technologia RT-PCR w czasie rzeczywistym wykorzystuje reakcję odwrotnej transkryptazy (RT) w celu przepisania RNA na komplementarny DNA (cDNA), reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w celu amplifikacji sekwencji docelowych oraz sondy właściwe dla tych sekwencji docelowych w celu wykrycia amplifikowanego DNA. Sondy są oznakowane fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym i barwnikiem tłumiącym.

Sondy właściwe dla RNA HEV są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla IC jest oznakowana fluoroforem JOE™.

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

Badanie obejmuje trzy procesy w pojedynczym oznaczeniu:

- Odwrotna transkrypcja RNA sekwencji docelowej i kontroli wewnętrznej do cDNA
- Amplifikacja PCR cDNA sekwencji docelowej i kontroli wewnętrznej
- Równoczesna detekcja amplikonów PCR przez sondy oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 obejmuje:

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

* Standardy ilościowe (QS) o czterech różnych stężeniach

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

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

Standardy ilościowe zawierają znormalizowane stężenia RNA właściwego dla HEV. Standardy ilościowe zostały skalibrowane w stosunku do pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla testów opartych na technice amplifikacji kwasu nukleinowego wirusa zapalenia wątroby typu E [„1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays (PEI code 6329/10)“]. Standardy ilościowe mogą być stosowane indywidualnie jako kontrole pozytywne lub łącznie w celu utworzenia **krzywej wzorcowej**, która z kolei może być użyta do wyznaczenia stężenia RNA właściwego dla HEV w próbce.

Standardy ilościowe mają następujące stężenia:

Standard ilościowy	Stężenie [IU/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 został opracowany i zwalidowany do pracy z następującymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym:

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

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

- Przed pierwszym użyciem sprawdzić wyrób i jego składniki pod kątem:
 - Integralności
 - Kompletności pod względem liczby, typu i stopnia napełnienia (patrz rozdział 2. Składniki zestawu)
 - Prawidłowych etykiet
 - Zamarznięcia w momencie dostawy
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Próbkę należy zawsze traktować jako zakaźne i/lub zagrożenie biologiczne zgodnie z procedurami bezpieczeństwa laboratorium.
- Podczas pracy z próbkami należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku, fartuch laboratoryjny i ochronę oczu.

- Unikać skażenia próbek oraz składników zestawu mikroorganizmami i nukleazami (DNaza/RNaza).
- Zawsze używać końcówek pipet jednorazowego użytku, nieskażonych DNazą/RNazą, z barierą chroniącą przed aerozolami.
- Podczas pracy ze składnikami zestawu należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku.
- Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do (i) przygotowania próbki, (ii) konfiguracji reakcji oraz (iii) amplifikacji/detekcji. Praca w laboratorium powinna przebiegać jednokierunkowo. Zawsze nosić rękawiczki jednorazowe w każdym obszarze i zmieniać je przed przejściem do innego obszaru.
- Materiały eksploatacyjne i wyposażenie należy przypisać do danego obszaru roboczego i nie przenosić ich pomiędzy poszczególnymi obszarami.
- Materiał pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od wszystkich innych składników zestawu.
- Nie otwierać płytek/probówek reakcyjnych po amplifikacji, aby uniknąć zanieczyszczenia amplikonami.
- Dodatkowe kontrole mogą wymagać oznaczenia zgodnie z wytycznymi lub wymaganiami przepisów lokalnych, stanowych i/lub federalnych lub organizacji akredytujących.
- Nie należy sterylizować probówek reakcyjnych po badaniu PCR w autoklawie, ponieważ nie zapewnia to degradacji amplifikowanego kwasu nukleinowego i wiąże się z ryzykiem skażenia obszaru laboratorium.
- Nie stosować składników zestawu po upływie ich terminu ważności.
- Utylizować odpady (próbki i testy) zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

8. Procedura

8.1 Przygotowanie próbki

Materiał startowy dla zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 stanowi wyizolowane RNA.

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

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Inne systemy oraz zestawy izolacji kwasu nukleinowego mogą również być odpowiednie. Możliwość używania danej procedury izolacji kwasu nukleinowego z zestawem RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

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

OSTROŻNIE

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

OSTROŻNIE

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

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

8.2 Przygotowanie mieszaniny master mix

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

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 zawiera heterologiczną IC, która może być stosowana jako kontrola inhibicji RT-PCR lub jako kontrola dla procedury przygotowania próbki (izolacja kwasu nukleinowego) i jako kontrola inhibicji RT-PCR.

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

Liczba reakcji (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	20 µl	240 µl
Kontrola wewnętrzna	2,5 µl	30 µl
Objętość mieszaniny master mix	27,5 µl	330 µl

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

Liczba reakcji (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	20 µl	240 µl
Objętość mieszaniny master mix	25 µl	300 µl

OSTROŻNIE

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

OSTROŻNIE

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

8.3 Konfiguracja reakcji

- ▶ Przenieś pipetą 25 µl mieszaniny master mix do odpowiednich studzienek w 96-studzienkowej płytce optycznej lub do odpowiedniej optycznej probówki reakcyjnej.
- ▶ Dodaj 25 µl próbki (eluat z izolacji kwasu nukleinowego) lub 25 µl roztworu kontrolnego (standard ilościowy, kontrola pozytywna lub negatywna).

Konfiguracja reakcji	
Mieszanina master mix	25 µl
Próbka lub kontrola	25 µl
Objętość całkowita	50 µl

- ▶ Należy upewnić się, że dla każdego badania używana jest co najmniej jedna kontrola pozytywna (QS) oraz jedna kontrola negatywna.
- ▶ Do celów oznaczenia ilościowego, należy użyć wszystkie (QS1 do QS4).
- ▶ Dokładnie wymieszaj próbki i kontrole z mieszaniną master mix poprzez pipetowanie w górę i w dół.
- ▶ Zamknij 96-studzienkową płytkę, używając odpowiednich pokrywek lub optycznej folii do zamykania płytek oraz zamknij probówki reakcyjne, używając odpowiednich pokrywek.

- ▶ Odwiruj 96-studzienkową płytkę reakcyjną w wirówce kompatybilnej z mikroplótką przez 30 sekund z prędkością około 1000 x g (~ 3000 obr./min).

9. Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym

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

Szczegółowe instrukcje dotyczące programowania i używania zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

9.1 Ustawienia

- ▶ Wybierz następujące ustawienia:

Ustawienia	
Objętość reakcji	50 µl
Szybkość zmiany	Domyślna
Wzorzec pasywny	ROX™

9.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

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

9.3 Profil temperatury i pomiar barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiar barwnika:

	Etap	Liczba cykli	Pomiar	Temperatura [°C]	Czas [min:s]
Odrotna transkrypcja	Utrzymywanie temperatury	1	-	55	20:00
Denaturacja	Utrzymywanie temperatury	1	-	95	02:00
Amplifikacja	Zmiany cykliczne	45	-	95	00:15
			Tak	55	00:45
			-	72	00:15

10. Analiza danych

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

Szczegółowe instrukcje dotyczące analizy danych generowanych przez zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 dla różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

10.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

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

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

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

10.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

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

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

10.1.3 Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

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

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

UWAGA



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

10.1.4 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

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

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

10.2 Manualna analiza

10.2.1 Analiza jakościowa

Kanał detekcji		Analiza wyników
FAM™	JOE™	
+	+*	Wykryto RNA właściwe dla HEV.
-	+	Nie wykryto RNA właściwego dla HEV. Próbkę nie zawiera wykrywalnych ilości RNA właściwego dla HEV.
-	-	Inhibicja RT-PCR lub nieprawidłowe działanie odczynnika. Powtórzyć oznaczenie rozpoczynając od pierwotnej próbki lub pobrać i wykonać oznaczenie na nowej próbce.

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

10.2.2 Analiza ilościowa

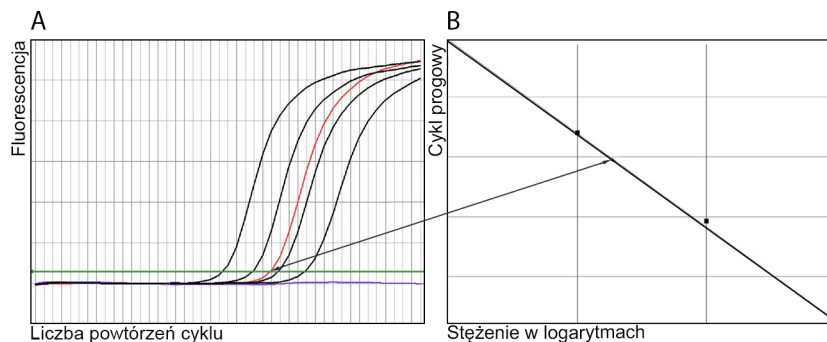
Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 obejmuje cztery standardy ilościowe (QS). W celu utworzenia **krzywej wzorcowej** dla analizy ilościowej, muszą zostać zdefiniowane jako **standardy** o odpowiednich stężeniach (patrz rozdział 6. Opis wyrobu). Użycie **standardów** o odpowiednich stężeniach pozwala na uzyskanie krzywej wzorcowej do analizy ilościowej.

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

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

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

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



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

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

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

UWAGA



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

11. Charakterystyka działania testu

Ocena charakterystyki działania zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 została wykonana z użyciem pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla testów opartych na technice amplifikacji kwasu nukleinowego wirusa zapalenia wątroby typu E [„1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays (PEI code 6329/10)“].

11.1 Czułość analityczna

Czułość analityczna (granica wykrywalności: LoD) zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 jest definiowana jako stężenie (IU/ μ l eluatu) cząsteczek RNA właściwych dla HEV, dla których odsetek pozytywnych wyników detekcji wynosi 95%. Czułość analityczna została wyznaczona na podstawie serii rozcieńczeń pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla testów opartych na technice amplifikacji kwasu nukleinowego wirusa zapalenia wątroby typu E [„1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays (PEI code 6329/10)“].

Tabela 2: Wyniki RT-PCR użyte do obliczeń czułości analitycznej w odniesieniu do detekcji RNA właściwego dla HEV

Stężenie początkowe [IU/ μ l]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	24	100
0,100	24	22	92
0,0316	24	9	38
0,010	24	4	17
0,003	24	2	8

Czułość analityczna zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 została wyznaczona na podstawie analizy probit:

- Przy detekcji RNA właściwego dla HEV, czułość analityczna wynosi 0,20 IU/μl [przedział ufności 95% (CI): 0,12–0,45 IU/μl]

11.2 Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 jest zapewniona poprzez precyzyjny wybór oligonukleotydów (starterów i sond). Oligonukleotydy zostały sprawdzone metodą analizy porównania sekwencji wobec sekwencji dostępnych publicznie w celu zapewnienia wykrywania wszystkich istotnych genotypów HEV.

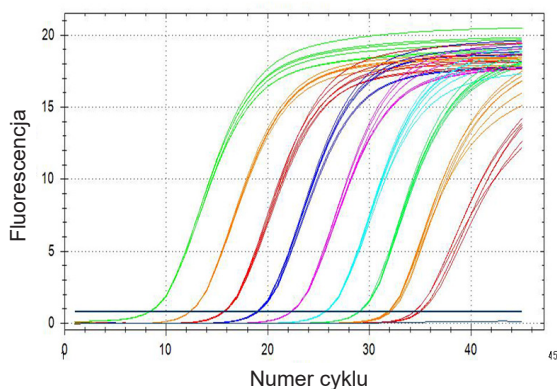
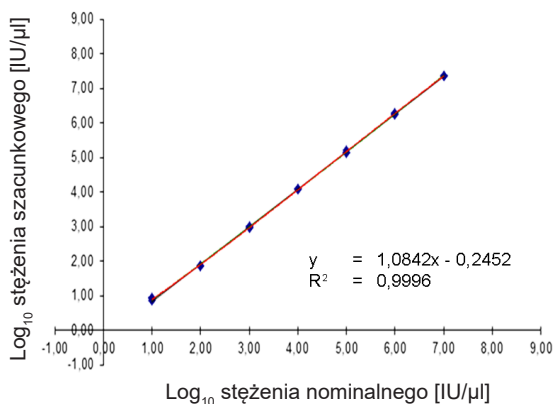
Swoistość analityczna zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 została oceniona przez testy panelu genomowego RNA/DNA wyizolowanego z wirusów spokrewnionych z HEV oraz innych patogenów powodujących objawy zbliżone do HEV.

Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Wirus Epsteina-Barr
- Wirus zapalenia wątroby typu A
- Wirus zapalenia wątroby typu B
- Wirus zapalenia wątroby typu C
- Ludzki parwowirus typu B19
- Wirus cytomegalii
- Wirus opryszczki pospolitej typu 1
- Wirus opryszczki pospolitej typu 2
- Wirus ospy wietrznej i półpaśca
- Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1

11.3 Zakres liniowości

Zakres liniowości zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 został oceniony na podstawie analizy logarytmicznej serii rozcieńczeń RNA właściwego dla HEV w zakresie stężeń od $1E+08$ do $1E+00$ IU/ μ l. Analizie poddano co najmniej 6 powtórzeń na rozcieńczenie.

A**B**

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

Zakres liniowości zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 wyniósł $1E+01$ do $1E+07$ IU/ μ l.

11.4 Precyzja

Precyzja zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 została wyznaczona jako zmienność wewnątrztestowa (zmienność w ramach pojedynczego eksperymentu), zmienność międzytestowa (zmienność pomiędzy różnymi eksperymentami) oraz zmienność międzyseryjna (zmienność pomiędzy różnymi seriami produkcyjnymi). Zmienność całkowita została obliczona przez połączenie wyników 3 analiz.

Dane zmienności są wyrażone w postaci odchylenia standardowego i współczynnika zmienności. Dane są oparte na analizie ilościowej określonych stężeń RNA właściwego dla HEV i wartości cyklu progowego (C_t) dla kontroli wewnętrznej. W celu ustalenia zmienności wewnątrz- i międzytestowej oraz międzyseryjnej, przeanalizowano co najmniej 6 powtórzeń każdej próbki.

Tabela 3: Dane precyzji detekcji RNA właściwego dla HEV

HEV	Średnie stężenie [IU/ μ l]	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	5,18	0,43	8,28
Zmienność międzytestowa	6,06	0,35	5,70
Zmienność międzyseryjna	5,62	0,56	10,02
Zmienność całkowita	5,77	0,56	9,68

Tabela 4: Dane precyzji detekcji kontroli wewnętrznej

IC	Średni cykl progowy (C_t)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	30,55	0,05	0,16
Zmienność międzytestowa	30,38	0,07	0,23
Zmienność międzyseryjna	30,47	0,11	0,37
Zmienność całkowita	30,44	0,10	0,33

12. Ograniczenia

- Optymalne rezultaty mogą być zapewnione wyłącznie w przypadku ścisłego przestrzegania zaleceń instrukcji użytkowania.
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Dobra praktyka laboratoryjna jest kluczowa dla prawidłowego działania testu. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie doprowadzić do zanieczyszczenia składników zestawu i konfiguracji reakcji. Wszystkie odczynniki należy monitorować pod kątem zanieczyszczenia i skażenia. Wszelkie podejrzone odczynniki należy utylizować.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnego działania testu.
- Test nie może być stosowany bezpośrednio na próbce. Przed użyciem tego testu należy zastosować odpowiednie metody izolacji kwasu nukleinowego.
- Obecność inhibitorów RT-PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe obniżone oznaczenie ilościowe, lub fałszywie negatywne wyniki.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu HEV objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą spowodować nieprawidłowe oznaczenie ilościowe i/lub niewykrycie obecności patogenów.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

13. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością według wytycznych Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485, każda partia zestawów RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

14. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej:

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

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

15. Literatura

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

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

16. Znaki towarowe i zastrzeżenia

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

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















Zestaw RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.



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

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.

17. Wyjaśnienie symboli

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

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

Uwagi:

Uwagi:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

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

www.altona-diagnostics.com

