

## Instrukcja użytkowania

**RealStar<sup>®</sup>**

***alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0**

01/2017 PL



# RealStar<sup>®</sup>

## *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0

Do stosowania z

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT<sup>®</sup> kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

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

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

Rotor-Gene<sup>®</sup> 6000 (Corbett Research)

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

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

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



081013



96



01 2017



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

## Spis treści

<b>1.</b>	<b>Przeznaczenie zestawu.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Składniki zestawu .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Przechowywanie .....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone.....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Podstawowe informacje .....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Opis wyrobu .....</b>	<b>9</b>
6.1	Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym .....	11
6.2	Typy próbek.....	11
<b>7.</b>	<b>Ostrzeżenia i środki ostrożności .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>13</b>
8.1	Przygotowanie próbki.....	13
8.2	Przygotowanie mieszaniny master mix.....	15
8.3	Konfiguracja reakcji.....	16
<b>9.</b>	<b>Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym .....</b>	<b>17</b>
9.1	Ustawienia.....	17
9.2	Detektory fluorescencji (barwniki) .....	18
9.3	Profil temperatury i pomiar barwnika.....	18
<b>10.</b>	<b>Analiza danych .....</b>	<b>19</b>
10.1	Prawidłowość badań diagnostycznych.....	23
10.1.1	Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	23
10.1.2	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe).....	23
10.2	Manualna analiza .....	24
10.2.1	Analiza jakościowa.....	24

<b>11.</b>	<b>Charakterystyka działania testu .....</b>	<b>25</b>
11.1	Czułość analityczna .....	25
11.2	Swoistość analityczna .....	27
11.3	Precyzja .....	28
<b>12.</b>	<b>Ograniczenia.....</b>	<b>30</b>
<b>13.</b>	<b>Kontrola jakości .....</b>	<b>31</b>
<b>14.</b>	<b>Pomoc techniczna.....</b>	<b>31</b>
<b>15.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>31</b>
<b>16.</b>	<b>Znaki towarowe i zastrzeżenia .....</b>	<b>32</b>
<b>17.</b>	<b>Wyjaśnienie symboli.....</b>	<b>33</b>

## 1. Przeznaczenie zestawu

Zestaw RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro*, oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania dla wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1), wirusa opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2) i wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV) właściwego DNA.

## 2. Składniki zestawu

Kolor zakrętki	Składnik	Liczba fiolek	Objętość [µl/fiolkę]
Niebieski	Master A	8	60
Fioletowy	Master B	8	180
Zielony	Internal Control	1	1000
Czerwony	Positive Control VZV	1	250
Żółty	Positive Control HSV-1	1	250
Pomarańczowy	Positive Control HSV-2	1	250
Biały	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Positive Control = kontrola pozytywna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

### 3. Przechowywanie

- Zestaw RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 jest wysyłany w suchym lodzie. Składniki zestawu powinny być dostarczone w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub próbówki 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
- Wirówka z rotorem na próbki reakcyjne o objętości 2 ml
- Wirówka z rotorem na mikro płytki, w przypadku używania płytek reakcyjnych z 96 studzienkami
- Wyrząsarka
- 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

*Herpesviridae* (herpeswirusy) to duża rodzina wirusów DNA, które wywołują choroby u zwierząt, w tym ludzi. Wszystkie wirusy z rodziny *Herpesviridae* składają się z względnie dużych, dwuniciowych i liniowych genomów DNA. Wirusy *Herpesviridae* replikują się w jądrze komórkowym – replikacja DNA wirusowego oraz transkrypcja genów wirusowych przebiegają w jądrze zakażonych komórek. W zależności od charakteru patogeniczności, komórek gospodarza i replikacji, wirusy *herpesviridae* dzielą się na trzy grupy: *alpha*-, *beta*- i *gammaherpesviridae*. *Alphaherpesviridae* (wirusy herpes typu alfa) charakteryzują się krótszymi cyklami replikacji, dużą szybkością niszczenia komórek gospodarza oraz zdolnością do replikacji w wielu różnych tkankach. Podstawową właściwością tych wirusów jest zdolność do stworzenia dożywotnej infekcji utajonej w obwodowym układzie nerwowym gospodarza. Do grupy wirusów herpes typu alfa należą: ludzki wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV 1), wirus opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2) i wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV).

## 6. Opis wyrobu

Zestaw RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro*, oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania dla wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1), wirusa opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2) i wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VZV).właściwego DNA. Test zawiera heterologiczny system amplifikacji (kontrola wewnętrzna) umożliwiający identyfikację ewentualnej inhibicji PCR oraz weryfikację integralności odczynników wchodzących w skład zestawu.

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

Sondy właściwe dla DNA HSV-1 są oznakowane fluoroforem ROX™, sondy właściwe dla DNA HSV-2 są oznakowane fluoroforem Cy®5, natomiast sondy właściwe dla DNA VZV są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla IC jest oznakowana fluoroforem JOE™.

Użycie sond związanych z różnymi barwnikami umożliwia równoległe wykrywanie DNA właściwego dla HSV-1, DNA właściwego dla HSV-2, DNA właściwego dla VZV oraz IC w odpowiadającym im kanałach detekcji urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym.

Badanie obejmuje dwa procesy w pojedynczym oznaczeniu:

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

Zestaw RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 obejmuje:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control HSV-1
- Positive Control HSV-2
- Positive Control VZV
- Water (PCR grade)

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Positive Control = kontrola pozytywna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

Mieszanki reakcyjne Master A i Master B zawierają wszystkie składniki (roztwór buforowy PCR, polimerazę DNA, sól magnezu, startery i sondy) umożliwiające jak również związaną z PCR amplifikację i detekcję DNA właściwego dla HSV-1, DNA właściwego dla HSV-2, DNA właściwego dla VZV oraz IC w konfiguracji pojedynczej reakcji.

## 6.1 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

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

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

## 6.2 Typy próbek

Następujące typy próbek zostały zwalidowane do użycia z zestawem RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0:

- Wymazy z ludzkich zmian skórnych i błon śluzowych
- Płyn mózgowo-rdzeniowy ludzki

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

## 7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

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

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

## 8. Procedura

### 8.1 Przygotowanie próbki

Materiał startowy dla zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 stanowi wyizolowane DNA.

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

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

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

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

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

### OSTROŻNIE



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

### OSTROŻNIE



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

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

## 8.2 Przygotowanie mieszaniny master mix

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

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

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

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

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

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

**OSTROŻNIE**

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

**OSTROŻNIE**

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

**8.3 Konfiguracja reakcji**

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

Konfiguracja reakcji	
Mieszanina master mix	20 µl
Próbka lub kontrola	10 µl
<b>Objętość całkowita</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Upewnij się, że dla każdego badania używana jest każda kontrola pozytywna i co najmniej jedna kontrola negatywna.



- ▶ 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 próbówki 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® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

### 9.1 Ustawienia

- ▶ Wybierz następujące ustawienia:

Ustawienia	
Objętość reakcji	30 µl
Szybkość zmiany	Domyślna
Wzorzec pasywny	Brak

## 9.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

Sekwencja docelowa	Nazwa detektora	Barwnik reporterowy	Barwnik tłumiący
HSV-1 właściwe dla DNA	HSV-1	ROX™	(Brak)
HSV-2 właściwe dla DNA	HSV-2	Cy®5	(Brak)
VZV właściwe dla DNA	VZV	FAM™	(Brak)
Kontrola wewnętrzna (IC)	IC	JOE™	(Brak)

## 9.3 Profil temperatury i pomiar barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiaru barwnika:

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

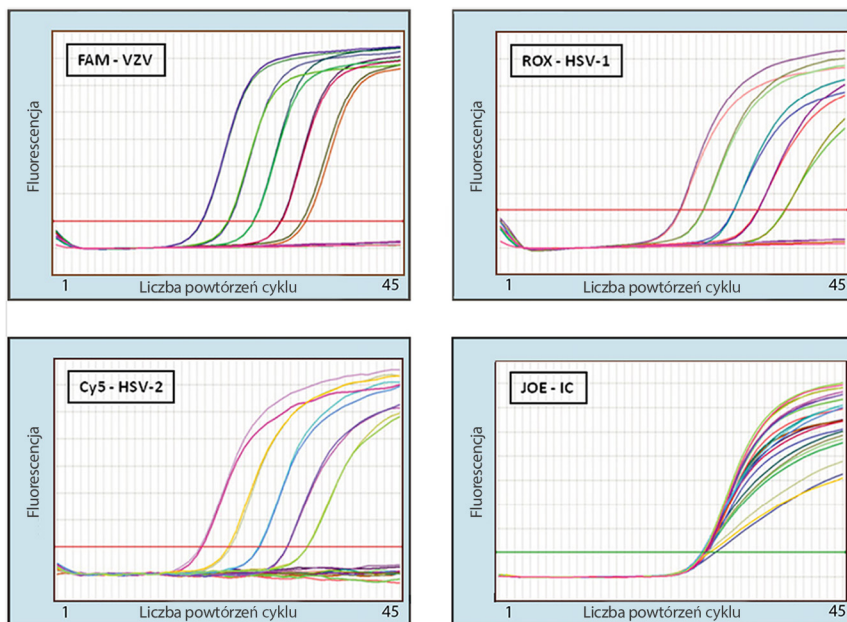
## 10. Analiza danych

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

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

**Analiza danych z użyciem ABI Prism® 7500 SDS lub 7500 Fast SDS (Applied Biosystems), m2000rt (Abbott Diagnostics), VERSANT® kPCR System (Siemens Healthcare) lub Mx3005P™ QPCR System (Stratagene):**

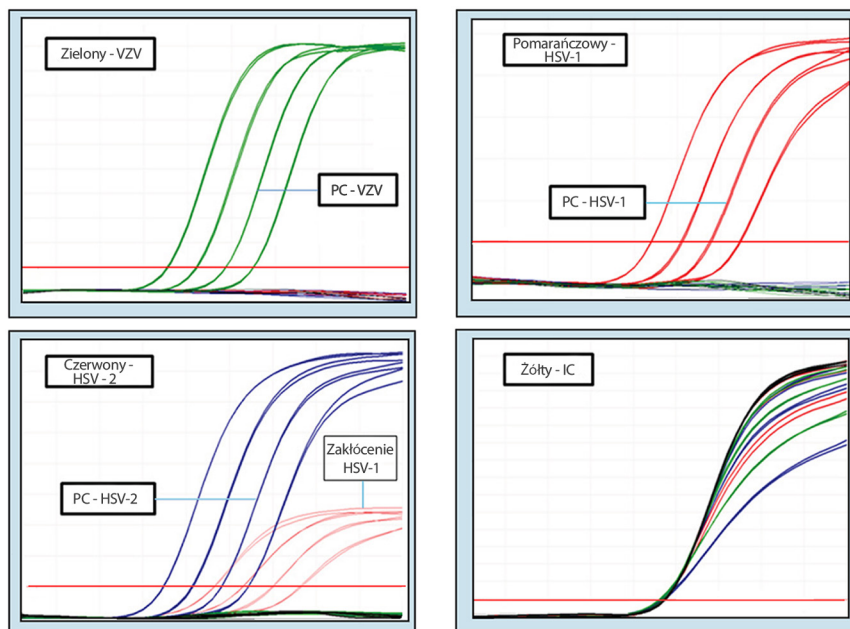
W przypadku użycia jednego z tych systemów PCR w czasie rzeczywistym, nie występują wzajemne zakłócenia pomiędzy różnymi kanałami detekcji, jeśli zainstalowano odpowiednie pliki kalibracji czystych barwników (plik Pure Spectra Component) oraz tła (plik Background Component). Tym samym, sygnał właściwy dla **VZV** DNA występuje wyłącznie w kanale detekcji FAM™, sygnał właściwy dla **HSV-1** DNA występuje wyłącznie w kanale detekcji ROX™, sygnał właściwy dla **HSV-2** DNA występuje wyłącznie w kanale detekcji Cy®5, natomiast sygnały kontroli wewnętrznej występują wyłącznie w kanale detekcji JOE™ (patrz rysunek 1).



**Rysunek 1:** Seria rozcieńczeń DNA właściwego dla VZV, HSV-1 i HSV-2 w zakresie stężeń od 1 kopii/ $\mu$ l do  $1,00E+04$  kopii/ $\mu$ l. Próbkę poddano analizie z użyciem zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 w systemie ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). Próbkę pozytywną dla DNA właściwego dla VZV generują sygnały w kanale detekcji FAM™, próbki pozytywne dla DNA właściwego dla HSV-1 generują sygnały w kanale detekcji ROX™, natomiast próbki pozytywne dla DNA właściwego dla HSV-2 generują sygnały w kanale detekcji Cy®5. Kontrola wewnętrzna (IC) generuje sygnały w kanale detekcji JOE™.

**Analiza danych z użyciem Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN):**

W przypadku użycia Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) mogą występować nieznaczne wzajemne zakłócenia pomiędzy kanałami detekcji barwnika pomarańczowego (ROX™) oraz czerwonego (Cy®5). Tym samym, sygnał właściwy dla VZV DNA występuje wyłącznie w kanale detekcji barwnika zielonego (FAM™), sygnał właściwy dla HSV-2 DNA występuje wyłącznie w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5), natomiast sygnały kontroli wewnętrznej występują wyłącznie w kanale detekcji barwnika żółtego (JOE™) (patrz rysunek 2). Sygnał właściwy dla HSV-1 DNA może występować nie tylko w kanale detekcji barwnika pomarańczowego (ROX™), ale również generować nieznaczne sygnały zakłóceń w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5). Sygnał zakłóceń zawsze będzie słabszy (niższa fluorescencja), niż sygnał generowany przez DNA właściwe dla HSV-2. Dlatego też zalecana jest analiza próbek w porównaniu do kontroli pozytywnych dla VZV, HSV-1 i HSV-2 (patrz rysunek 2). Wszelkie pytania dotyczące analizy danych z użyciem urządzenia Rotor-Gene Instrument można kierować do działu pomocy technicznej.



**Rysunek 2:** Seria rozcieńczeń DNA właściwego dla VZV, HSV-1, i HSV-2 w zakresie stężeń od 10 kopii/ $\mu$ l do 1,00E+04 kopii/ $\mu$ l. Próbkę poddano analizie z użyciem zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 i urządzenia Rotor-Gene® 6000 Instrument (Corbett-Research). Próbkę pozytywną DNA właściwego dla VZV generują sygnały wyłącznie w kanale detekcji barwnika zielonego (FAM™), próbki pozytywne DNA właściwego dla HSV-2 generują sygnały wyłącznie w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5), natomiast kontrola wewnętrzna generuje sygnały wyłącznie w kanale detekcji barwnika żółtego (JOE™). Próbkę pozytywną DNA właściwego dla HSV-1 mogą generować sygnały nie tylko w kanale detekcji barwnika pomarańczowego (ROX™), ale również nieznaczne sygnały zakłóceń w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5). Sygnał zakłóceń zawsze będzie słabszy (niższa fluorescencja), niż sygnał generowany przez próbki pozytywne DNA właściwego dla HSV-2.

## 10.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

### 10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

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

ID kontroli	Kanał detekcji			
	ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™
Kontrola pozytywna HSV-1	+	- <sup>1</sup>	-	+/- <sup>*</sup>
Kontrola pozytywna HSV-2	-	+	-	+/- <sup>*</sup>
Kontrola pozytywna VZV	-	-	+	+/- <sup>*</sup>
Kontrola negatywna	-	-	-	+

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

<sup>1</sup> Sygnały zakłóceń mogą występować w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5) w przypadku użycia Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

### 10.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (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.

## 10.2 Manualna analiza

### 10.2.1 Analiza jakościowa

Kanał detekcji				Interpretacja wyników
ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™	
+	- <sup>1</sup>	-	+ <sup>*</sup>	Wykryto DNA właściwe dla HSV-1.
-	+	-	+ <sup>*</sup>	Wykryto DNA właściwe dla HSV-2.
-	-	+	+ <sup>*</sup>	Wykryto DNA właściwe dla VZV.
-	-	-	+	Nie wykryto DNA właściwego dla HSV-1, HSV-2 ani VZV. Próbkę nie zawiera wykrywalnych ilości DNA właściwego dla HSV-1, HSV-2 i VZV.
-	-	-	-	Inhibicja PCR lub nieprawidłowe działanie odczynnika. Powtórzyć badanie, rozpoczynając od pierwotnej próbki, lub pobrać i wykonać badanie na nowej próbce.

\* Detekcja kontroli wewnętrznej w kanale detekcji JOE™ nie jest wymagana dla wyników pozytywnych w kanale detekcji ROX™, w kanale detekcji Cy®5 lub w kanale detekcji FAM™. Wysokie stężenie DNA sekwencji docelowej w próbce może powodować osłabienie lub brak sygnału kontroli wewnętrznej.

<sup>1</sup> Sygnały zakłóceń mogą występować w kanale detekcji barwnika czerwonego (Cy®5) w przypadku użycia Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).



## 11. Charakterystyka działania testu

Charakterystykę działania zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 wykonano z użyciem określonej ilości DNA właściwego dla VZV (szczep ELLEN VZV; numer ATCC®: VR-1367), DNA właściwego dla HSV-1 (numer ATCC®: VR-1493) i DNA właściwego dla HSV-2 (numer ATCC®: VR-540).

### 11.1 Czulość analityczna

Czulość analityczna zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 jest definiowana jako stężenie (kopie/μl eluatu) cząsteczek DNA właściwych dla VZV, HSV-1 i HSV-2, dla których odsetek pozytywnych wyników detekcji wynosi 95%. Czulość analityczna została wyznaczona na podstawie analizy serii rozcieńczeń DNA właściwego dla VZV, DNA właściwego dla HSV-1 i DNA właściwego dla HSV-2 o znanych stężeniach.

**Tabela 1:** Wyniki PCR użyte do obliczeń czulości analitycznej w odniesieniu do detekcji DNA właściwego dla HSV-1

Stężenie początkowe [kopie/μl]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	11	92
0,100	12	8	67
0,032	12	2	17
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0

**Tabela 2:** Wyniki PCR użyte do obliczeń czułości analitycznej w odniesieniu do detekcji DNA właściwego dla HSV-2

Stężenie początkowe [kopie/ $\mu$ l]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
10,000	12	12	100
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	10	83
0,100	12	3	25
0,032	12	1	8
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0

**Tabela 3:** Wyniki PCR użyte do obliczeń czułości analitycznej w odniesieniu do detekcji DNA właściwego dla VZV

Stężenie początkowe [kopie/ $\mu$ l]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
3,162	17	17	100
1,000	18	18	100
0,316	18	18	100
0,100	18	17	94
0,032	18	7	39
0,010	18	6	33
0,003	18	1	6
0,001	12	0	0

Czułość analityczna zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 została wyznaczona na podstawie analizy probit:

- Przy detekcji VZV właściwego dla DNA, czułość analityczna wynosi 0,2 kopie/μl eluatu [przedział ufności 95% (CI): 0,1–1,5 kopie/μl]
- Przy detekcji HSV-1 właściwego dla DNA, czułość analityczna wynosi 0,46 kopie/μl eluatu [przedział ufności 95% (CI): 0,23–1,8 kopie/μl].
- Przy detekcji HSV-2 właściwego dla DNA, czułość analityczna wynosi 1,00 kopie/μl eluatu [przedział ufności 95% (CI): 0,5–4,1 kopie/μl]

## 11.2 Swistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 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 HSV-1, HSV-2 i VZV.

Swoistość analityczna zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 została wykonana przez testy panelu genomowego DNA/RNA wyizolowanego z wirusów opryszczki oraz innych patogenów występujących w znacznym stężeniu u pacjentów o obniżonej odporności.

Zestaw RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Wirus BK
- Wirus cytomegalii
- Wirus Epsteina-Barr
- Wirus zapalenia wątroby typu B
- Wirus zapalenia wątroby typu C
- Ludzki wirus opryszczki typu 6A
- Ludzki wirus opryszczki typu 6B
- Ludzki wirus opryszczki typu 7
- Ludzki wirus opryszczki typu 8
- Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1
- Ludzki parwowirus B19
- Wirus JC

### 11.3 Precyzja

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

Dane zmienności są wyrażone w postaci odchylenia standardowego i współczynnika zmienności. Dane są oparte na analizie ilościowej określonych stężeń genomowego właściwego dla HSV-1, HSV-2 i VZV oraz DNA wartościach cyklu progowego ( $C_t$ ) dla kontroli wewnętrznej. W celu ustalenia zmienności wewnątrz- i międzytestowej oraz międzyseryjnej, przeanalizowano co najmniej 6 powtórzeń każdej próbki.

**Tabela 4:** Dane precyzji detekcji HSV-1 właściwego dla DNA

HSV-1	Średnie stężenie (kopie/ $\mu$ l)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	96,0	4,7	4,9
Zmienność międzytestowa	96,2	5,8	6,0
Zmienność międzyseryjna	96,0	4,8	5,0
Zmienność całkowita	96,1	5,5	5,7

**Tabela 5:** Dane precyzji detekcji HSV-2 właściwego dla DNA

HSV-2	Średnie stężenie (kopie/μl)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	91,5	7,3	7,9
Zmienność międzytestowa	95,3	7,8	8,2
Zmienność międzyseryjna	89,9	8,2	9,1
Zmienność całkowita	92,9	8,7	9,4

**Tabela 6:** Dane precyzji detekcji VZV właściwego dla DNA

VZV	Średnie stężenie (kopie/μl)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	86,3	4,0	4,6
Zmienność międzytestowa	92,8	8,2	8,9
Zmienność międzyseryjna	89,4	4,2	4,7
Zmienność całkowita	92,6	6,8	7,3

**Tabela 7:** Dane precyzji detekcji kontroli wewnętrznej

Kontrola wewnętrzna	Średni cykl progowy (C <sub>t</sub> )	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnątrztestowa	24,55	0,02	0,10
Zmienność międzytestowa	24,55	0,05	0,19
Zmienność międzyseryjna	24,58	0,06	0,24
Zmienność całkowita	24,57	0,06	0,23

## 12. Ograniczenia

- Optymalne rezultaty mogą być zapewnione wyłącznie w przypadku ścisłego przestrzegania zaleceń instrukcji użytkowania.
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Dobra praktyka laboratoryjna jest kluczowa dla prawidłowego działania testu. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie doprowadzić do zanieczyszczenia składników zestawu i konfiguracji reakcji. Wszystkie odczynniki należy monitorować pod kątem zanieczyszczenia i skażenia. Wszelkie podejrzone odczynniki należy utylizować.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnego działania testu.
- Test nie może być stosowany bezpośrednio na próbce. Przed użyciem tego testu należy zastosować odpowiednie metody izolacji kwasu nukleinowego.
- Obecność inhibitorów PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu HSV-1, HSV-2 i/lub VZV objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą spowodować niewykrycie obecności patogenów.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

### 13. Kontrola jakości

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

### 14. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej:

**e-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto: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. 10<sup>th</sup> 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); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, 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® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.















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



Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 Altona Diagnostics GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.



## 17. Wyjaśnienie symboli

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

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



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

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

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

