

Instrukcja użytkowania

AltoStar[®] HBV PCR Kit 1.5

10/2021 PL

AltoStar[®]

HBV PCR Kit 1.5

Do stosowania z

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)



AS0201513



96



10 2021



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

Spis treści

1.	Informacje na temat instrukcji użytkowania.....	7
2.	Przeznaczenie zestawu.....	8
3.	Zawartość zestawu	9
4.	Przechowywanie i zastosowanie	10
4.1	Przechowywanie.....	10
4.2	Zastosowanie	11
4.2.1	Mieszanki reakcyjne Master A i Master B.....	11
4.2.2	Standardy ilościowe i No Template Control (kontrola negatywna)	12
5.	Opis wyrobu	12
5.1	Podstawowe informacje.....	13
5.2	Opis składników zestawu	14
5.2.1	Mieszanki reakcyjne Master A i Master B.....	14
5.2.2	Standardy ilościowe.....	14
5.2.3	No Template Control (kontrola negatywna)	15
5.3	Zautomatyzowana procedura badania AltoStar® Workflow	15
5.4	Materiał do badań.....	16
5.4.1	Rodzaje materiału do badań.....	16
5.4.2	Pobieranie i postępowanie z pobranym materiałem.....	16
6.	Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia	18
7.	Korzystanie z zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z zautomatyzowaną procedurą badania AltoStar® Workflow.....	20
7.1	Objętość próbki.....	20
7.2	Probówki.....	21
7.3	Kody kreskowe próbek	21
7.4	Materiały i urządzenia wymagane, ale nie dołączone	21

7.5	Podstawowe materiały i wyposażenie	23
7.6	Procedura	23
7.6.1	Opis zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow.....	23
7.6.2	Programowanie badania AltoStar®	29
7.6.3	Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR.....	30
7.6.3.1	Przygotowanie odczynników do konfiguracji płytki do PCR	31
7.6.3.2	Przygotowanie systemu AltoStar® AM16 do konfiguracji płytki do PCR.....	31
7.6.3.3	Postępowanie podczas konfiguracji płytki do PCR	35
7.6.4	Zakończenie konfiguracji płytki do PCR	35
7.6.4.1	Wyniki konfiguracji płytki do PCR.....	36
7.6.5	Zamykanie płytki do PCR	38
7.6.5.1	Stabilność mieszaniny PCR	39
7.6.6	Rozpoczęcie badania PCR.....	40
7.6.6.1	Postępowanie podczas badania PCR.....	41
7.6.6.2	Przyporządkowanie testów do grup studzienek reakcyjnych	41
7.6.7	Analiza wyników PCR.....	44
7.6.7.1	Korekta linii bazowej.....	46
7.6.7.2	Wykluczenie nieregularnych sygnałów PCR.....	48
7.6.7.3	Ustawienie wartości progowych	52
7.6.8	Prawidłowość wyników badania PCR.....	56
7.6.8.1	Wykluczenie studzienek reakcyjnych zawierających nieprawidłowe dane.....	56
7.6.8.2	Prawidłowość badania diagnostycznego PCR.....	59
7.6.8.3	Prawidłowość wyników dla danej próbki	60
7.6.9	Eksport wyników badania PCR do automatycznej analizy	61
7.6.10	Eksport wyników badania PCR do manualnej analizy.....	62
7.6.10.1	Manualna analiza	64
8.	Charakterystyka działania testu	65

8.1	Osocze	65
8.1.1	Czułość analityczna	65
8.1.2	Swoistość analityczna	67
8.1.2.1	Próbki negatywne	68
8.1.2.2	Substancje interferujące	68
8.1.2.3	Reaktywność krzyżowa	69
8.1.3	Zakres liniowości	71
8.1.4	Precyzja	72
8.1.5	Całkowity odsetek nieudanych	74
8.1.6	Efekt przeniesienia	74
8.1.7	Parametry kliniczne	74
9.	Utylizacja.....	77
10.	Kontrola jakości	77
11.	Pomoc techniczna.....	78
12.	Literatura.....	78
13.	Znaki towarowe i zastrzeżenia	79
14.	Symbole	80
15.	Protokół testu dla oprogramowania AltoStar® Connect i informacje na temat integracji z systemem LIMS	82
16.	Historia zmian.....	84

1. Informacje na temat instrukcji użytkowania

Niniejsza instrukcja użytkowania zawiera informacje na temat używania zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z systemem AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton; w dalszej części instrukcji określanym jako system AltoStar® AM16), oprogramowaniem AltoStar® Connect (wersja 1.7.4 lub wyższa, Hamilton) dla automatycznych badań PCR oraz urządzeniem CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad, w dalszej części instrukcji określanym jako urządzenie CFX96™ DW Dx) z oprogramowaniem CFX Manager™ Dx (wersja 3.1, Bio-Rad) dla badań PCR w czasie rzeczywistym. Szczegółowe informacje na temat używania systemu AltoStar® AM16, oprogramowania AltoStar® Connect, zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 oraz urządzenia CFX96™ DW Dx, znajdują się w odpowiednich instrukcjach obsługi:

- Instrukcja obsługi systemu do diagnostyki IVD AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- Instrukcja obsługi oprogramowania AltoStar® Connect IVD (Hamilton)
- Instrukcja użytkowania AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instrukcja użytkowania AltoStar® Internal Control 1.5
- Systemy CFX96™ Dx i CFX96™ Deep Well Dx Instrukcja obsługi (Bio-Rad)

W niniejszej instrukcji, terminy OSTROŻNIE i UWAGA mają następujące znaczenie:

OSTROŻNIE



Instrukcje lub procedury operacyjne, których nieprzestrzeganie może stać się przyczyną obrażeń ciała lub negatywnie wpływać na działanie wyrobu. Skontaktuj się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc.

UWAGA



Przydatne informacje dla użytkownika, które nie są kluczowe dla wykonywanego zadania.

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

2. Przeznaczenie zestawu

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 to test diagnostyczny *in vitro*, oparty na technologii do wykonywania badań PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) (genotyp A do H) w osoczu ludzkim z EDTA. Zestaw jest zaprojektowany do użytku z systemem CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) w połączeniu z systemem AltoStar® Automation System AM16, zestawem AltoStar® Purification Kit 1.5 i kontrolą wewnętrzną AltoStar® Internal Control 1.5.

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 jest przeznaczony do monitorowania ładunku wirusa u osób z infekcją HBV.

Wyniki wygenerowane przez zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 muszą być interpretowane w połączeniu z innymi danymi klinicznymi i laboratoryjnymi.

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 jest przeznaczony do użycia przez osoby wykwalifikowane, przeszkolone w technikach biologii molekularnej oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.

3. Zawartość zestawu

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 obejmuje następujące składniki:

Tabela 1: Składniki zestawu

Kolor zakrętki	Składnik	Liczba próbek	Objętość nominalna [μl/probówkę]
Niebieski	Master A ¹⁾	8	240 ²⁾
Fioletowy	Master B ¹⁾	8	300 ³⁾
Czerwony	QS1 ⁴⁾	2	550
Czerwony	QS2 ⁴⁾	2	550
Czerwony	QS3 ⁴⁾	2	550
Czerwony	QS4 ⁴⁾	2	550
Biały	NTC ⁵⁾	2	550

¹⁾ Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego

²⁾ Zawiera dodatkową objętość 40 μl w celu kompensacji martwej objętości w systemie AltoStar® AM16

³⁾ Zawiera dodatkową objętość 52 μl w celu kompensacji martwej objętości w systemie AltoStar® AM16

⁴⁾ Standardy ilościowe (kontrola pozytywna)

⁵⁾ No Template Control (kontrola negatywna)

OSTROŻNIE



Przed pierwszym użyciem sprawdź kompletność zestawu i jego składników, jak również numer, typ i stopień napełnienia. Nie używaj wadliwego lub niekompletnego wyrobu, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 zawiera wystarczającą liczbę odczynników, na wykonanie 96 reakcji przy liczbie badań nieprzekraczającej 8.

Zestaw jest transportowany w suchym lodzie. Po odbiorze i przed pierwszym użyciem, sprawdź zestaw i jego składniki:

- Integralność
- Kompletność, numer, typ i stopień napełnienia
- Prawdliwość etykiet
- Termin ważności
- Stopień zamrożenia
- Przejrzystość i brak zanieczyszczeń

W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy, jeśli próbki zostały uszkodzone podczas transportu lub występują ich braki, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics (patrz rozdział 11. Pomoc techniczna).

4. Przechowywanie i zastosowanie

Wszystkie odczynniki dołączone do zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 stanowią roztwory gotowe do użycia.

4.1 Przechowywanie

Wszystkie składniki zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 po dostawie powinny być przechowywane w temperaturze od -25 °C do -15 °C.

OSTROŻNIE



Nieprawidłowe warunki przechowywania mogą negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

OSTROŻNIE



Nie używaj wyrobów po terminie ważności. Użycie elementów zestawu po terminie ważności może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

4.2 Zastosowanie

OSTROŻNIE



Nie należy przekraczać liczby cykli zamrażania/rozmarzania oraz czasów przetwarzania podanych w niniejszej instrukcji użytkowania, ponieważ mogą one negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

OSTROŻNIE



Nieprawidłowe stosowanie składników zestawu i próbek może stać się przyczyną kontaminacji i negatywnie wpływać na działanie wyrobu:

- Nie zamieniać zakrętek do fiolek lub butelek.
- Materiał, dla którego stwierdzono wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od składników zestawu.
- Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do przygotowania próbki/konfiguracji reakcji oraz amplifikacji/detekcji.
- Zawsze używać rękawiczki po kontakcie z materiałem, którego test dał wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny.
- Nie otwierać płytek do PCR po amplifikacji.

OSTROŻNIE



Nie mieszać składników zestawu pochodzących z różnych numerów partii. Użycie różnych numerów partii zestawów może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

4.2.1 Mieszanki reakcyjne Master A i Master B

Po rozmrożeniu, mieszanki reakcyjne Master A i Master B zachowują stabilność przez 5 godzin w temperaturze do +30 °C.

UWAGA



Jeśli mieszanki reakcyjne Master A i Master B zostały rozmrożone i niewykorzystane, mogą być one zamrożone i rozmrożone ponownie do użycia podczas kolejnych badań. Po otwarciu, należy zutylizować dotychczasowe zakrętki i użyć nowych zakrętek, aby uniknąć kontaminacji odczytników.

4.2.2 Standardy ilościowe i No Template Control (kontrola negatywna)

1. Po rozmrożeniu, standardy ilościowe (QS) oraz No Template Control (NTC, kontrola negatywna) zachowują stabilność przez 5 godzin w temperaturze do +30 °C.
2. Używać zakrętki probówek QS i NTC po każdym użyciu i używać nowych zakrętek, aby uniknąć kontaminacji odczynników.
3. Po użyciu zamknąć probówki QS i NTC nowymi zakrętkami i natychmiast zamrozić.
4. Nie przekraczać liczby cykli zamrażania-rozmrażania dla probówek QS i NTC: *Rozmrażanie 1* → *Zamrażanie 1* → *Rozmrażanie 2* → *Zamrażanie 2* → *Rozmrażanie 3* → *Zamrażanie 3* → *Rozmrażanie 4*

5. Opis wyrobu

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 to test diagnostyczny *in vitro* służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla HBV w osoczu ludzkim z EDTA.

Jest on oparty na technologii do wykonywania badań PCR w czasie rzeczywistym, wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w celu amplifikacji sekwencji docelowych właściwych dla HBV oraz oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym sondy właściwe dla sekwencji docelowej, umożliwiające detekcję amplifikowanego DNA.

Poza systemem detekcji i amplifikacji DNA właściwego dla HBV, test zawiera również oligonukleotydy umożliwiające amplifikację i detekcję kontroli wewnętrznej (w dalszej części instrukcji określanej jako IC; AltoStar® Internal Control 1.5).

Sondy właściwe dla DNA HBV są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla IC jest oznakowana fluoroforem JOE™ wykrywanym w kanale VIC™.

Użycie sond związanych z różnymi barwnikami umożliwia równoległe wykrywanie HBV właściwego dla DNA oraz IC w danych kanałach detekcji stosowanego urządzenia CFX96™ DW Dx.

5.1 Podstawowe informacje

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) wywołuje chorobę – zapalenie wątroby typu B. Wirus zapalenia wątroby typu B jest wyjątkowy wśród ludzkich wirusowych czynników chorobotwórczych, ponieważ jest wirusem DNA, który replikuje się za pośrednictwem RNA, a tym samym należy do wirusów DNA i RNA o odwrotnej transkrypcji. HBV należy do rodziny wirusów *Hepadnaviridae* zawierającej genotypy A–H [1,2].

Struktura genomowa HBV jest zarówno zwarta jak i złożona, ze zdolnością do kodowania 7 różnych białek przy użyciu zaledwie 3,2 kb. Białka te to białko polimerazy (gen Pol); antygen rdzeniowy (HBcAg) i antygen e (HBeAg); duże, średnie i małe białka antygeny powierzchniowego (gen S); oraz białko X (gen X) [2].

HBV jest przenoszony przez krew lub inne płyny ustrojowe i może przetrwać poza organizmem przez co najmniej 7 dni. Najczęstsze rodzaje transmisji to transmisja okołoporodowa z matki na dziecko lub transmisja pozioma między dziećmi w wieku do 5 lat.

Źródłem zakażenia są również narzędzia chirurgiczne, igły do tatuażu czy maszyny do golenia, które są zanieczyszczone krwią [3].

Wirus może być oznaczony po 30–60 dniach od zakażenia i może utrzymywać się w organizmie. U osoby zakażonej może dojść do rozwoju przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. Objawy mogą obejmować od zażółcenia skóry i oczu (żółtaczkę) i ciemnego moczu do skrajnego zmęczenia, nudności, wymiotów i bólów brzucha, które mogą trwać przez kilka tygodni, jednakże przebieg może być również bezobjawowy. Najgorszym scenariuszem jest rozwój ostrego lub przewlekłego zapalenia wątroby, z progresją do marskości wątroby lub raka wątrobowokomórkowego (HCC) [3].

Póki co nie ma możliwości wyleczenia HBV typu B. Dostępne są jednak leki do leczenia objawowego i możliwe jest spowolnienie progresji marskości wątroby. Pomimo szczepień, zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B są nadal bardzo częste na całym świecie. Wirusowe zapalenie wątroby typu B pozostaje globalnym problemem zdrowotnym – około 240 milionów ludzi cierpi na przewlekłe zakażenie HBV, a liczba zgonów związanych z HBV wynosi 887 000 rocznie (liczby ponownie rosną od 2015 roku) [3].

Częstość występowania wirusa zapalenia wątroby typu B jest najwyższa w krajach zachodniego Pacyfiku i Afryki, gdzie zakażonych jest odpowiednio 6,2% i 6,1% dorosłej populacji. Zakażenia występują również we wskazanych przez WHO regionach, takich jak wschodnia część Morza Śródziemnego, Azja Południowo-Wschodnia, Europa i obie Ameryki [3].

Z tego też powodu istnieje duże zapotrzebowanie na badania na obecność wirusowego zapalenia wątroby typu B jako ważnego elementu wszystkich działań w zakresie profilaktyki i leczenia. W przypadku masowych badań przesiewowych zasadnicze znaczenie ma szybkie i dokładne wykrycie HBV. Założenia te spełniają charakteryzujące się wysoką czułością zestawy PCR do wykrywania HBV w czasie rzeczywistym.

5.2 Opis składników zestawu

5.2.1 Mieszanie reakcyjne Master A i Master B

Mieszanki reakcyjne Master A i Master B zawierają wszystkie składniki (roztwór buforowy PCR, polimerazę DNA, sól magnezu, startery i sondy) umożliwiające amplifikację oraz wykrycie sekwencji docelowej DNA właściwej dla HBV oraz IC w pojedynczej konfiguracji reakcji.

5.2.2 Standardy ilościowe

QS zawierają wystandaryzowane stężenia DNA właściwego dla HBV (patrz tabela 2). Zostały one skalibrowane względem 4th WHO International Standard for HBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 10/266, genotyp A2). QS są stosowane do weryfikowania funkcjonalności systemu detekcji i amplifikacji DNA właściwego dla HBV, jak również do wyznaczenia krzywej wzorcowej, która umożliwia oznaczenie ilościowe DNA właściwego dla HBV w próbce.

Tabela 2: Standardy ilościowe

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

5.2.3 No Template Control (kontrola negatywna)

NTC nie zawiera DNA właściwego dla HBV, natomiast zawiera matrycę IC. NTC jest stosowana jako kontrola negatywna podczas analizy PCR w czasie rzeczywistym DNA właściwego dla HBV oraz wskazuje ewentualną kontaminację mieszaniny reakcyjnej Master A i Master B.

5.3 Zautomatyzowana procedura badania AltoStar® Workflow

Zautomatyzowana procedura badania AltoStar® Workflow obejmuje następujące wyroby do IVD:

- System AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- Oprogramowanie AltoStar® Connect w wersji 1.7.4 lub nowszej (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) z oprogramowaniem CFX Manager™ Dx w wersji 3.1 (Bio-Rad)

Procedura wykonywania badań obejmuje następujące kroki:

1. Programowanie badania AltoStar®.
2. Seria oczyszczania w systemie AltoStar® AM16 z użyciem zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5 oraz AltoStar® Internal Control 1.5.
3. Konfiguracja płytki do PCR wykonana w systemie AltoStar® AM16 z użyciem zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5.
4. Badanie PCR w czasie rzeczywistym na urządzeniu CFX96™ DW Dx.

Szczegółowe informacje o kroku 3 i 4 procedury wykonywania badań znajdują się w rozdziale 7. Korzystanie z zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z zautomatyzowaną procedurą badania AltoStar® Workflow. Wszystkie typy próbek i objętości próbek kompatybilne z zestawem AltoStar® Purification Kit 1.5 mogą być przetwarzane równocześnie w systemie AltoStar® AM16. Każdą próbkę można analizować równoległe z taką liczbą testów PCR w czasie rzeczywistym, na jaką pozwala ilość dostępnego eluatu.

UWAGA



Testy, dla których wymagane są różne profile temperaturowe analizy PCR są automatycznie sortowane do oddzielnych płytek do PCR.

5.4 Materiał do badań

5.4.1 Rodzaje materiału do badań

Następujący rodzaj materiału do badań jest zwalidowany z zestawem AltoStar® HBV PCR Kit 1.5:

- Osocze ludzkie pobrane na EDTA

OSTROŻNIE



Nie używaj innych rodzajów materiału do badań! Użycie innych rodzajów materiału do badań może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

5.4.2 Pobieranie i postępowanie z pobranym materiałem

Krew należy pobrać z użyciem dostępnych w sprzedaży standardowych systemów pobierania krwi (np. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner lub równoważny). Zawartość probówek należy wymieszać bezpośrednio po pobraniu próbki. Próbkę krwi należy transportować w temperaturze od +2 °C do +8 °C zgodnie z przepisami lokalnymi i krajowymi dotyczącymi transportu materiału biologicznego.

Podczas przygotowywania osocza z EDTA, krew pełną należy odwirować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta systemu pobierania próbek w przeciągu 24 godzin od pobrania. Przed użyciem, osocze z EDTA można przechowywać nie dłużej niż 48 godzin w temperaturze pokojowej (od +20 °C do +25 °C), 5 dni w temperaturze od +2 °C do +8 °C lub 2 miesiące w temperaturze od -25 °C do -15 °C.

OSTROŻNIE



Próbki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.

UWAGA



Przechowywanie zamrożonych próbek nie wpływa na działanie zestawu. W przypadku użycia próbek zamrożonych należy upewnić się, że próbki są całkowicie rozmrożone i prawidłowo wymieszane przed użyciem.

6. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia

- Przed pierwszym użyciem sprawdź kompletność zestawu i jego składników, jak również numer, typ i stopień napełnienia. Nie używaj wadliwego lub niekompletnego wyrobu, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nieprawidłowe warunki przechowywania mogą negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie używaj wyrobów po terminie ważności. Użycie elementów zestawu po terminie ważności może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie należy przekraczać liczby cykli zamrażania/rozmarzania oraz czasów przetwarzania podanych w niniejszej instrukcji użytkowania, ponieważ mogą one negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nieprawidłowe stosowanie składników zestawu i próbek może stać się przyczyną kontaminacji i negatywnie wpływać na działanie wyrobu:
 - Nie zamieniać zakrętek do fiolek lub butelek.
 - Materiał, dla którego stwierdzono wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od składników zestawu.
 - Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do przygotowania próbki/konfiguracji reakcji oraz amplifikacji/detekcji.
 - Zawsze utylizować rękawiczki po kontakcie z materiałem, którego test dał wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny.
 - Nie otwierać płytek do PCR po amplifikacji.
- Nie mieszać składników zestawu pochodzących z różnych numerów partii. Użycie różnych numerów partii zestawów może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie używaj innych rodzajów materiału do badań! Użycie innych rodzajów materiału do badań może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Próbkę należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.
- Przechowywanie eluatów w nieprawidłowych warunkach może stać się przyczyną degradacji sekwencji docelowej HBV i może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

- Nie należy używać wersji protokołu testu innego, niż wskazany na kodzie kreskowym 2D w niniejszej instrukcji użytkowania. Użycie nieprawidłowej wersji protokołu testu może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Brak odwirowania składników zestawu po rozmrożeniu może spowodować kontaminację pozostałościami odczynników na zakrętkach i negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie używaj ponownie zakrętek do probówek, aby uniknąć kontaminacji odczynników, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.
- Obecność inhibitorów PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.
- Nie należy przekraczać czasu przechowywania mieszaniny PCR, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- W przypadku próbki zawierającej patogeny inne niż HBV, może występować konkurencja z amplifikowaną sekwencją docelową lub reaktywność krzyżowa, powodujące nieprawidłowe wyniki IVD.
- Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi, aby uniknąć skażenia środowiska.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu HBV objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą powodować nieprawidłowe oznaczenie ilościowe i/lub niewykrycie obecności patogenu.

7. Korzystanie z zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z zautomatyzowaną procedurą badania AltoStar® Workflow

W tej części instrukcji użytkownika opisane zostało użycie zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z zautomatyzowaną procedurą badania AltoStar® Workflow. Zautomatyzowana procedura badania AltoStar® Workflow obejmuje wykorzystanie różnych wyrobów przeznaczonych do IVD (System AltoStar® AM16, oprogramowanie AltoStar® Connect, zestaw AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 oraz urządzenie CFX96™ DW Dx). Szczegółowe informacje na temat sposobu używania tych wyrobów znajdują się w odpowiednich instrukcjach obsługi i użytkownika.

- Instrukcja obsługi systemu do diagnostyki IVD AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- Instrukcja obsługi oprogramowania AltoStar® Connect IVD (Hamilton)
- Instrukcja użytkownika AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instrukcja użytkownika AltoStar® Internal Control 1.5
- Systemy CFX96™ Dx i CFX96™ Deep Well Dx Instrukcja obsługi (Bio-Rad)

7.1 Objętość próbki

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 jest zwalidowany do badania próbek kwasu nukleinowego oczyszczonych z 1000 µl próbki wyjściowej w systemie AltoStar® AM16. Należy uwzględnić dodatkową objętości próbki ze względu na martwą objętość stosowanej probówki (patrz rozdział 7.2 Probówki).

UWAGA



W jednej serii oczyszczania można jednocześnie przetwarzać do 48 próbek o objętości 1000 µl.

7.2 Probówki

Probówki kompatybilne z systemem AltoStar® AM16 można zakupić w firmie altona Diagnostics (probówka 7 ml z zakrętką, 82 x 13 mm, VK000010). Możliwość stosowania innych probówek wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika. Szczegółowe informacje znajdują się w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Kody kreskowe próbek

W celu automatycznej identyfikacji próbek przez system AltoStar® AM16, wszystkie probówki muszą być oznakowane odpowiednim kodem kreskowym. Szczegółowe informacje znajdują się w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Materiały i urządzenia wymagane, ale nie dołączone

Materiały i urządzenia podane w tabeli 3 należy zamówić w firmie altona Diagnostics.

Tabela 3: Wymagane materiały i urządzenia

Material	Opis	Numer katalogowy
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Zestaw wyrobów obejmujący system AltoStar® Automation System AM16, oprogramowanie AltoStar® Connect (wersja 1.7.4 lub nowsza) oraz wyposażenie IT	AM16
AltoStar® Detection	Zestaw wyrobów obejmujący urządzenie CFX96™ Deep Well Dx System z oprogramowaniem CFX Manager™ Dx (wersja 3.1), skaner kodów kreskowych oraz wyposażenie IT	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Zestaw odczynników do izolowania i oczyszczania kwasu nukleinowego do użycia z systemem AltoStar® Automation System AM16	PK15-16/ PK15-46

Material	Opis	Numer katalogowy
AltoStar® Internal Control 1.5	Kontrola izolacji kwasu nukleinowego oraz amplifikacji i detekcji PCR	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	96-studzienkowa płytką z niską ramką boczną, z kodem kreskowym i białymi studzienkami reakcyjnymi	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Folia do zamykania płytek do PCR	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Końcówki z filtrem 1000 µl do użycia z systemem AltoStar® Automation System AM16	VK000007
300 µl CO-RE Tips	Końcówki z filtrem 300 µl do użycia z systemem AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Probówki z kodem kreskowym do łączenia odczynników PCR	VK000002
Waste Bag	Sterylny woreczek, z możliwością sterylizacji w autoklawie, do użycia z systemem AltoStar® Automation System AM16	VK000009
Screw Cap - red	Zakrętka na probówce z QS1–QS4 (czerwony)	VK000012
Screw Cap - blue	Zakrętka na probówce z mieszaniną reakcyjną Master A (niebieski)	VK000013
Screw Cap - purple	Zakrętka na probówce z mieszaniną reakcyjną Master B (fioletowy)	VK000015
Screw Cap - white	Zakrętka na probówce z NTC (biały)	VK000016

Tabela 4: Dodatkowe materiały i urządzenia laboratoryjne

Material	Opis	Numer katalogowy
Urządzenie do zamykania płytek	np. AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	np. PX1 Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Podstawowe materiały i wyposażenie

- Wytrząsarka
- Rękawiczki bezpudrowe do jednorazowego użytku
- Wirówka do odwirowania składników zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5
- Wirówka do odwirowania płytek do PCR

7.6 Procedura

7.6.1 Opis zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow

Etapy analizy dla zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow zostały przedstawione w tabeli 5. Informacje na temat szczegółowych ustawień do użycia z zestawem AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 są podane w rozdziale 7.6.2 Programowanie badania AltoStar®. Szczegółowe instrukcje dla etapów 1–5 znajdują się w instrukcji użytkownika zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5, oprogramowania AltoStar® Connect oraz systemu AltoStar® AM16.

Kroki 6–11 zostały opisane szczegółowo w rozdziałach 7.6.3 Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR do 7.6.10 Eksport wyników badania PCR do manualnej analizy.

Tabela 5: Przegląd zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow

Krok	Działanie
1. Uruchom system AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> • Włącz zasilanie systemu AltoStar® AM16. • Włącz zasilanie komputera i monitora. • Uruchom oprogramowanie AltoStar® Connect.
2. Wykonaj konserwację	<ul style="list-style-type: none"> • Na pasku menu kliknij opcję Application → Instrument Maintenance (Aplikacja → Konserwacja urządzenia). <ul style="list-style-type: none"> ◦ Jeśli wymagana jest konserwacja cotygodniowa, kliknij opcję Start Weekly Maintenance (Rozpocznij konserwację cotygodniową). ◦ Jeśli wymagana jest konserwacja codzienna, kliknij opcję Start Daily Maintenance (Rozpocznij konserwację codzienną). • Postępuj zgodnie z instrukcjami konserwacji wyświetlanymi na ekranie.
3. Zaprogramuj serię testów AltoStar®	<ul style="list-style-type: none"> • Na pasku menu kliknij Program Run → Program Run (AltoStar® Purification) [Programuj serię → Programuj serię (AltoStar® Purification)]. Możesz również wrócić do ekranu początkowego i kliknąć przycisk Program Run (Programuj serię). • Wprowadź próbki lub importuj dane z systemu LIMS. • Wybierz następujące testy dla próbek, jeśli nie zostały one wcześniej zaimportowane z systemu LIMS: <ul style="list-style-type: none"> ◦ AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 • Kliknij przycisk Create Run (Utwórz serię) na pasku narzędzi, aby utworzyć serię AltoStar®.

Krok	Działanie
4. Rozpocznij serię oczyszczania	<ul style="list-style-type: none"> • Na pasku menu kliknij opcję Purification → Start Purification (Oczyszczanie → Rozpocznij oczyszczanie). Możesz również wrócić do ekranu początkowego i kliknąć przycisk Start Purification (Rozpocznij oczyszczanie). • Wybierz serię oczyszczania, która ma być rozpoczęta, aby wyświetlić próbki uwzględnione w wybranej serii oczyszczania. • Przygotuj odczynniki do oczyszczania: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Upewnij się, że stosowane odczynniki do oczyszczania mają taki sam numer załadunkowy (za wyjątkiem AltoStar® Internal Control 1.5) oraz nie został przekroczony ich termin ważności. ◦ Jeśli w Lysis Buffer (Bufor lizujący) widoczne są osady, należy go ogrzać ($\leq +50$ °C) do momentu ich całkowitego rozpuszczenia. ◦ Poczekaj do rozmrożenia IC (AltoStar® Internal Control 1.5) oraz wytrząsaj przez 5 sekund. ◦ Wytrząsaj Magnetic Beads (Kulki magnetyczne) przez 5 sekund bez zwilżania zakrętki. • Przygotuj próbki do serii oczyszczania zgodnie z opisem podanym w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5. • Kliknij przycisk Start Run (Rozpocznij badanie) na pasku narzędzi. • Postępuj zgodnie z informacjami podanymi w oknach dialogowych załadunek i załaduj urządzenie zgodnie z procedurą. • Zatwierdź okno dialogowe Loading complete (Załadunek zakończony) wybierając OK lub zaczekaj 10 sekund. <p>System automatycznie rozpocznie serię oczyszczania.</p>

Krok	Działanie
5. Zakończ serię oczyszczania	<ul style="list-style-type: none">Upewnij się, że tacka załadunkowa jest pusta i naciśnij przycisk OK, aby zamknąć okno dialogowe Run finished (Badanie zakończone).Postępuj zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi w oknie dialogowym Maintenance (Konserwacja) i kliknij przycisk OK, aby potwierdzić.Zamknij i przechowuj składniki zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5, nadające się do ponownego wykorzystania. <p>Eluaty w otwartej płytce z eluatem zachowują stabilność w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) przez 4 godziny.</p> <ul style="list-style-type: none">Jeśli dana konfiguracja płytki do PCR nie zostanie wykonana natychmiast, zamknij płytkę z eluatem z użyciem folii do zamykania płytek z eluatem i przechowuj w temperaturze od +2 °C do +8 °C przez okres nieprzekraczający 24 godzin.Przejrzyj wyniki serii oczyszczania, aby potwierdzić, że wszystkie próbki zostały prawidłowo przetworzone.

Krok	Działanie
<p>6. Rozpocznij konfigurację płytki do PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Na pasku menu kliknij PCR Setup → Start PCR Setup (Konfiguracja płytki do PCR → Rozpocznij konfigurację płytki do PCR). Możesz również wrócić do ekranu początkowego i kliknąć przycisk Start PCR Setup (Rozpocznij konfigurację płytki do PCR). • Wybierz konfigurację płytki do PCR, która ma zostać wykonana, aby wyświetlić płytkę z eluatem i odczynniki uwzględnione w wybranej konfiguracji płytki do PCR. • Przygotuj odczynniki PCR: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Upewnij się, że mieszaniny reakcyjne master i kontrole są z tego samego numeru partii zestawu, a ich termin ważności nie został przekroczony. ◦ Odczekaj do rozmrożenia wymaganej liczby probówek z mieszaniną reakcyjną master i kontrolami, krótko wytrząsaj i odwiruj w wirówce. • Jeśli płytka z eluatem jest zamknięta, odwiruj ją krótko i ostrożnie otwórz. • Kliknij przycisk Start Run (Rozpocznij badanie) na pasku narzędzi. • Postępuj zgodnie z informacjami podanymi w oknie dialogowym Loading (Załadunek) i załaduj urządzenie zgodnie z procedurą. • Zatwierdź okno dialogowe Loading complete (Załadunek zakończony) wybierając OK lub zaczekaj 10 sekund. <p>System automatycznie rozpocznie konfigurację płytki do PCR.</p>
<p>7. Zakończ konfigurację płytki do PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Upewnij się, że tacka załadunkowa jest pusta i naciśnij przycisk OK, aby zamknąć okno dialogowe Run finished (Badanie zakończone). • Postępuj zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi w oknie dialogowym Maintenance (Konserwacja) i kliknij przycisk OK, aby potwierdzić. • Zamknij i przechowuj składniki zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5, nadające się do ponownego wykorzystania. • Przejrzyj wyniki konfiguracji płytki do PCR, aby potwierdzić, że wszystkie próbki zostały prawidłowo przetworzone.

Krok	Działanie
8. Zamknij płytkę do PCR	<ul style="list-style-type: none"> Zamknij płytkę do PCR folią do zamykania płytek do PCR.
9. Rozpocznij badanie PCR	<ul style="list-style-type: none"> Włącz zasilanie urządzenia CFX96™ DW Dx oraz podłączonego komputera i monitora. Uruchom oprogramowanie CFX Manager™ Dx. Otwórz urządzenie CFX96™ DW Dx. Odwróć płytkę do PCR i włóż ją do urządzenia CFX96™ DW Dx. Na pasku menu wybierz polecenie File → Open → LIMS File... (Plik → Otwórz → Plik LIMS...). Zeskanuj kod kreskowy płytki do PCR za pomocą ręcznego skanera kodów kreskowych. Zamknij urządzenie CFX96™ DW Dx. Kliknij przycisk Start Run (Rozpocznij badanie), aby rozpocząć badanie PCR. Podaj nazwę i zapisz plik badania PCR. <p>Urządzenie CFX96™ DW Dx automatycznie wykona badanie PCR.</p>
10. Przygotuj testy do indywidualnej analizy	<ul style="list-style-type: none"> Przygotuj wszystkie testy w badaniu PCR do indywidualnych studzienek reakcyjnych.
11. Przeanalizuj dane i zinterpretuj wyniki badania PCR	<p>Odrębnie dla każdej grupy studzienek reakcyjnych:</p> <ul style="list-style-type: none"> Wykonaj korektę linii bazowej we wszystkich studzienkach reakcyjnych dla wszystkich stosowanych kanałów detekcji. Wyklucz wszystkie studzienki reakcyjne z nieregularnymi sygnałami PCR. Ustaw wartości progowe dla wszystkich kanałów detekcji zgodnie z kontrolami. Wyklucz wszystkie studzienki reakcyjne zawierające nieprawidłowe dane. Utwórz plik wyników LIMS, aby wyeksportować wyniki do systemu LIMS. Utwórz raport z wynikami do manualnej interpretacji wyników.

OSTROŻNIE

Przechowywanie eluatów w nieprawidłowych warunkach może stać się przyczyną degradacji sekwencji docelowej HBV i może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

7.6.2 Programowanie badania AltoStar®

Szczegółowe informacje na temat sposobu wykonywania badań AltoStar® znajdują się w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5, oprogramowania AltoStar® Connect oraz systemu AltoStar® AM16. Szczegółowe ustawienia dla zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 zostały podane poniżej:

- Dla oznaczeń ilościowych wybierane są QS1–4 i NTC, natomiast do oznaczeń jakościowych wybierane są QS4 i NTC.
- Wymagana objętość próbki wynosi 1000 µl plus objętość martwa odpowiedniej probówki (patrz rozdział 7.1 Objętość próbki i 7.2 Probówki).
- Wymagana objętość eluatu dla zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 wynosi 45 µl.
- Upewnij się, że stosowana jest prawidłowa wersja protokołu testu. Informacje na temat aktualnej wersji protokołu znajdują się w rozdziale 15. Protokół testu dla oprogramowania AltoStar® Connect i informacje na temat integracji z systemem LIMS. Dany protokół testu jest zakodowany w postaci kodu kreskowego 2D przedstawionego poniżej. Informacje na temat oczyszczania i importowania protokołu testu do oprogramowania AltoStar® Connect znajdują się w odpowiedniej instrukcji użytkowania.

OSTROŻNIE

Nie należy używać wersji protokołu testu innego, niż wskazany na kodzie kreskowym 2D w niniejszej instrukcji użytkowania. Użycie nieprawidłowej wersji protokołu testu może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

7.6.3 Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR

1. Kliknij **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Konfiguracja płytki do PCR → Rozpocznij konfigurację płytki do PCR) na pasku menu. Możesz również wrócić do ekranu początkowego oprogramowania AltoStar® Connect i nacisnąć przycisk **Start PCR Setup** (Rozpocznij konfigurację płytki do PCR). Wyświetlany jest ekran Start PCR Setup Run (Rozpocznij konfigurację płytki do PCR).

Badania oczekujące na wykonanie konfiguracji płytki do PCR są podane w tabeli Programmed PCR Setup Runs (Zaprogramowane konfiguracje płytki do PCR) po lewej stronie ekranu.

2. Wybierz z tabeli Programmed PCR Setup Runs (Zaprogramowane konfiguracje płytki do PCR) protokół PCR, który ma zostać wykonany.
 - Próbki włączone do wybranej konfiguracji płytki do PCR są wyświetlane w tabeli w prawym górnym rogu ekranu [Samples in selected PCR Setup Run (Próbki w wybranej konfiguracji płytki do PCR)].
 - QS i kontrole wymagane dla wybranej konfiguracji płytki do PCR są widoczne w tabeli na środku po prawej stronie ekranu [Controls in selected PCR Setup Run (Kontrole w wybranej konfiguracji płytki do PCR)].
 - Liczba probówek z mieszaniną reakcyjną master wymagana dla wybranej konfiguracji płytki do PCR jest widoczna w tabeli na dole po prawej stronie ekranu [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Wymagane probówki z mieszaniną reakcyjną master dla wybranej konfiguracji płytki do PCR)].

UWAGA



Liczba priorytetowych próbek w konfiguracji płytki do PCR jest widoczna w kolumnie **No. of prioritized Samples** (Liczba priorytetowych próbek). Wykonaj konfigurację płytki do PCR na priorytetowych próbkach jako pierwszą, aby przyspieszyć przetwarzanie priorytetowych próbek.

Przed kliknięciem przycisku **Start Run** (Rozpocznij badanie) na pasku narzędzi, przygotuj wymagane odczynniki zgodnie z opisem w rozdziale 7.6.3.1 Przygotowanie odczynników do konfiguracji płytki do PCR. Jeśli płytka z eluatem wymagana dla konfiguracji płytki do PCR została zamknięta w celu przechowywania, należy ją przygotować zgodnie z instrukcjami użytkownika zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Przygotowanie odczynników do konfiguracji płytki do PCR

1. Pozostaw do całkowitego rozmrożenia wymagane QS, kontrole i wymaganą liczbę probówek z mieszaniną reakcyjną master w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C).
2. Wymieszaj odczynniki przez delikatne wytrząsanie.
3. Odwiruj krótko probówki, aby usunąć krople z zakrętki.

OSTROŻNIE



Brak odwirowania składników zestawu po rozmrożeniu może spowodować kontaminację pozostałościami odczynników na zakrętkach i negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

7.6.3.2 Przygotowanie systemu AltoStar® AM16 do konfiguracji płytki do PCR

Szczegółowe informacje na temat procesu przygotowania systemu AltoStar® AM16 znajdują się w instrukcji użytkowania systemu AltoStar® AM16 oraz oprogramowania AltoStar® Connect.

1. Kliknij przycisk **Start Run** (Rozpocznij badanie) na pasku narzędzi na ekranie Start PCR Setup Run (Rozpocznij konfigurację płytki do PCR), aby wyświetlić okno dialogowe Loading (Załadunek).

Okno dialogowe Loading (Załadunek) składa się w górnej części z graficznej prezentacji obszaru roboczego AltoStar® AM16, tabeli przedstawiającej potrzebne statywy i sposób ich umieszczenia w odpowiednich miejscach obszaru roboczego systemu AltoStar® AM16, materiał który ma zostać umieszczony w każdym ze statywów oraz uwagi dotyczące załadunku statywów.

UWAGA

W celu wizualizacji pozycji elementu na statywie oraz pozycji statywu na obszarze roboczym systemu AltoStar® AM16 wybierz odpowiedni wiersz w tabeli w oknie dialogowym Loading (Załadunek).



Pozycje elementu i statywu są przedstawione w postaci wizualnej:

- Wyróżnione kolorem czerwonym na schemacie graficznym obszaru roboczego urządzenia
- Na systemie AltoStar® AM16 za pomocą migających kontrolki załadunku nad obszarem, w którym ma być wstawiony wybrany statyw

2. Załaduj wymagany materiał, przygotowane płytki z eluatem i przygotowane odczynniki na odpowiednie statywy.

- Wymieniaj wyłącznie **całkowicie puste** zestawy końcówek 1000 µl na **całkowicie pełne** zestawy końcówek 1000 µl na statywie końcówek.
- Wymieniaj wyłącznie **całkowicie puste** zestawy końcówek 300 µl na **całkowicie pełne** zestawy końcówek 300 µl na statywie końcówek i płytek.

UWAGA

Wymiana zestawów końcówek, które nie są całkowicie puste, jak również manipulowanie pojedynczymi końcówkami może zakłócać automatyczne zarządzanie końcówkami i spowodować anulowanie badania.

- Wstaw płytkę z eluatem w taki sposób, aby studzienka A1 znalazła się po lewej stronie czarnej pozycji płytki.
- Wstaw płytkę do PCR w taki sposób, aby studzienka A1 znalazła się w pozycji po lewej stronie srebrnej przedniej pozycji płytki.
- Załaduj statyw na 24 probówki z jedną wolną probówką zbiorczą dla każdego testu w konfiguracji płytki do PCR.
- Ostrożnie dociśnij probówki do dna statywu i obróć je tak, aby ich kody kreskowe były widoczne przez okienko statywu.
- Załaduj statyw na 32 probówki komponentami wymaganymi do badania PCR potrzebnymi do konfiguracji płytki PCR.
- Ostrożnie dociśnij probówki do dna statywu i obróć je tak, aby ich kody kreskowe były widoczne przez okienko statywu.

UWAGA

Pozycja pojedynczych probówek na statywie jest dowolna.

UWAGA

Objętość załadowanych składników nie jest sprawdzana przez system przed przetwarzaniem. Nieprawidłowa objętość składnika uniemożliwi prawidłowe wykonanie badania PCR.

UWAGA

Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR z założonymi zakrętkami probówek może spowodować anulowanie badania.

3. Załaduj statywy w taki sposób, aby kod kreskowy statywu znajdował się na jego tylnej części po prawej stronie.
4. Ustaw wypełnione statywy w odpowiednich prowadnicach pomiędzy przednimi i tylnymi bloczkami przesuwnej tacki załadunkowej do momentu, gdy zetkną się one z haczykami ograniczającymi po przeciwnej stronie tacki załadunkowej.

UWAGA

Wsuwanie statywów za haczyki ograniczające może spowodować uszkodzenie urządzenia i wpływać na proces załadunku.

5. Sprawdź, czy tacka do zrzutu końcówek i pojemnik na zużyte końcówki są ustawione w prawidłowym położeniu, a w pojemniku umieszczony jest nowy woreczek na odpady.
6. Kliknij przycisk **OK** w oknie dialogowym Loading (Załadunek), aby kontynuować proces załadunku.

UWAGA

Kliknij przycisk **Cancel** (Anuluj), aby anulować konfigurację płytki do PCR. Badanie może być uruchomione ponownie (patrz rozdział 7.6.3 Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR).

System AltoStar® AM16 pobiera statywy do wnętrza urządzenia i weryfikuje kody kreskowe.

UWAGA

System AltoStar® AM16 automatycznie weryfikuje:



- Prawidłowy typ i lokalizację załadowanych statywów
- Prawidłową identyfikację i pozycję elementów załadowanych na statywy
- Zgodność partii składników indywidualnych zestawów AltoStar®
- Termin ważności załadowanych składników zestawów AltoStar®
- Prawidłowe ustawienie tacki do zrzutu końcówek

W razie nieprawidłowych rezultatów weryfikacji, wyświetlany jest komunikat z opisem problemu oraz instrukcje dotyczące jego rozwiązania. Szczegółowe informacje na temat rozwiązywania problemów znajdują się w instrukcji użytkownika oprogramowania AltoStar® Connect.

UWAGA



Zmiana pozycji jakichkolwiek elementów po umieszczeniu statywu w urządzeniu może spowodować anulowanie konfiguracji płytki do PCR i/lub uszkodzenie urządzenia.

Po zakończeniu weryfikacji wyświetlane jest okno dialogowe Loading complete (Załadunek zakończony).

7. Zatwierdź okno dialogowe Loading complete (Załadunek zakończony) wybierając **OK** lub zaczekaj 10 sekund do automatycznego uruchomienia procesu.

UWAGA



Kliknij przycisk **Cancel** (Anuluj), aby anulować konfigurację płytki do PCR. Badanie może być uruchomione ponownie (patrz rozdział 7.6.3 Rozpoczęcie konfiguracji płytki do PCR).

Konfiguracja płytki do PCR zostanie uruchomiona i wykonana bez udziału użytkownika.

7.6.3.3 Postępowanie podczas konfiguracji płytki do PCR

Nie są wymagane żadne działania użytkownika do momentu zakończenia konfiguracji płytki do PCR. Wyświetlany jest ekran Processing Status (Stan przetwarzania), na którym wyświetlany jest stan konfiguracji płytki do PCR oraz szacunkowy pozostały czas.

UWAGA



Popchnięcie lub pociągnięcie statywów lub drzwiczek systemu AltoStar® AM16 podczas konfiguracji płytki do PCR może spowodować anulowanie badania.

7.6.4 Zakończenie konfiguracji płytki do PCR

Po zakończeniu konfiguracji płytki do PCR wyświetlane jest okno dialogowe Run finished (Badanie zakończone).

1. Upewnij się, że taca załadunkowa jest pusta.
2. Kliknij przycisk **OK**, aby zamknąć okno dialogowe Run finished (Badanie zakończone).

System AltoStar® AM16 wyłącza wszystkie statywy. Nie należy blokować obszaru wyładunku statywów.

Po wyładunku wyświetlane jest okno dialogowe Maintenance (Konserwacja).

3. Należy postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi w oknie dialogowym Maintenance (Konserwacja).

W oknie dialogowym, w tabeli wyświetlana jest liczba reakcji w probówkach z mieszaniną reakcyjną master, które nie zostały użyte w konfiguracji płytki do PCR.

4. Jeśli ma być rozpoczęta kolejna konfiguracja płytki do PCR, w której wykorzystywana ma być ta sama płytka z eluatem, płytkę można pozostawić otwartą w tym samym położeniu na statywie. W **innym** przypadku, płytkę z eluatem należy zamknąć i przechowywać w odpowiednim miejscu. Szczegółowe informacje znajdują się w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5.

UWAGA



Eluaty na płytce z eluatem zachowują stabilność w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) przez 4 godziny po zakończeniu serii oczyszczania.

5. Zamknąć probówki z odczynnikami odpowiednimi nowymi zakrętkami.

OSTROŻNIE



Nie należy używać ponownie zakrętek do probówek, aby uniknąć kontaminacji odczynników, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

6. Odczynniki można przechowywać do ponownego wykorzystania zgodnie z instrukcjami w rozdziale 4.2 Zastosowanie.
7. Należy utylizować wszystkie zużyte materiały (patrz rozdział 9. Utylizacja).
8. Kliknij przycisk **OK**, aby zamknąć okno dialogowe Maintenance (Konserwacja).

7.6.4.1 Wyniki konfiguracji płytki do PCR

Wyniki konfiguracji płytki do PCR są zapisywane w oprogramowaniu AltoStar® Connect.

1. Kliknij **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Konfiguracja płytki do PCR → Wyniki konfiguracji płytki do PCR) na pasku menu, aby przejść do ekranu Results (Wyniki).

Na ekranie Results (Wyniki) widoczna jest tabela ze wszystkimi próbkami użytymi podczas ostatniej konfiguracji płytki do PCR oraz kolumna **Status** (Stan) po prawej stronie, w której widoczna jest informacja, czy proces konfiguracji płytki do PCR dla danej próbki został ukończony (patrz tabela 6).

Tabela 6: Wyniki konfiguracji płytki do PCR

Status (Stan)	Wynik konfiguracji płytki do PCR
Processed (Przetworzono)	<ul style="list-style-type: none"> • Eluat został pomyślnie wykorzystany podczas konfiguracji płytki do PCR. • Otrzymana mieszanina PCR jest gotowa do użycia podczas badania PCR.
Error (Błąd)	<ul style="list-style-type: none"> • Wykorzystanie/Przetwarzanie eluatu nie powiodło się. • Dana mieszanina PCR zostanie automatycznie pominięta podczas następującego testu PCR.

2. Aby wyświetlić wyniki poprzednich konfiguracji płytek do PCR, kliknij przycisk **Load** (Wczytaj) na pasku menu, wybierz wymaganą konfigurację płytek do PCR z listy w oknie dialogowym Load Results (Wczytaj wyniki) i kliknij przycisk **OK**.

Oprogramowanie AltoStar® Connect generuje automatycznie 3 pliki z wynikami konfiguracji płytki do PCR:

- Plik LIMS file (.xml) zawiera szczegółowe informacje na temat wyników konfiguracji płytki do PCR wraz z wynikami do systemu LIMS
- Plik raportu (.pdf) zawiera szczegółowe informacje na temat wyników konfiguracji płytki do PCR wraz z wynikami do celów dokumentacji
- Plik cyklera (.plrn) przeznaczony jest do automatycznego programowania urządzenia CFX96™ DW Dx

Pliki te są zapisywane w lokalizacji podanej w ustawieniach systemu w oprogramowaniu AltoStar® Connect.

UWAGA



Pliki z wynikami konfiguracji płytki do PCR mogą być wygenerowane ponownie przez wczytanie odpowiedniej konfiguracji płytki do PCR i kliknięcie przycisku **Create LIMS File** (Utwórz plik LIMS) w celu utworzenia pliku LIMS, przycisku **Create Report** (Utwórz raport) w celu utworzenia pliku raportu lub przycisku **Create Bio-Rad Cycler File** (Utwórz plik cyklera Bio-Rad) w celu utworzenia pliku cyklera.

7.6.5 Zamykanie płytki do PCR

Po zakończeniu konfiguracji płytki do PCR, płytkę do PCR należy zamknąć folią do zamykania płytek do PCR. Zalecane jest użycie urządzenia AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] lub PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). Możliwość stosowania urządzeń do zamykania płytek innych niż zalecane wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

W przypadku użycia jednego z zalecanych urządzeń do zamykania płytek:

1. Włącz urządzenie do zamykania płytek i upewnij się, że adapter płytki nie jest umieszczony w szufladzie.
2. Upewnij się, że wybrano następujące ustawienia urządzenia do zamykania płytek:

Tabela 7: Ustawienia urządzenia do zamykania płytek

Urządzenie do zamykania płytek	Ustawienia	
	Temperatura [°C]	Czas [s]
AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Odczekaj do osiągnięcia ustawionej temperatury. Może to trwać kilka minut.
4. Umieść płytkę do PCR na adapterze płytki urządzenia do zamykania płytek.
5. Umieść folię do zamykania płytek do PCR nadrukiem „THIS SIDE UP” w widocznym miejscu u góry. Upewnij się, że wszystkie studzienki reakcyjne płytki do PCR są zakryte folią i żadna studzienka nie jest zasłonięta napisem.

UWAGA

Obsługa urządzenia do zamykania płytek bez adaptera płytki w szufladzie może uniemożliwić prawidłowe działanie urządzenia do zamykania płytek. Skontaktuj się z działem pomocy technicznej altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc (patrz rozdział 11. Pomoc techniczna).

UWAGA

W przypadku nieprawidłowego ułożenia folii do zamykania płytek do PCR lub ramki, folia może przylec do płyty grzejnej urządzenia do zamykania płytek. Może to uniemożliwić prawidłowe działanie urządzenia do zamykania płytek. W takim przypadku, lub jeśli płytki zostały zamknięte bez użycia folii do zamykania płytek, należy odczekać do obniżenia się temperatury urządzenia do zamykania płytek i skontaktować się z działem pomocy technicznej altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc (patrz rozdział 11. Pomoc techniczna).

6. Zamocuj w górnej części ramkę zamykającą, która przytrzymuje folię do zamykania płytek.
7. Naciśnij przycisk **Operate** (Uruchom)*/ **, aby otworzyć szufladę.
8. Umieść zestaw składający się z adaptera płytki, płytki do PCR, folii do zamykania płytek do PCR oraz ramki zamykającej w urządzeniu do zamykania płytek i naciśnij przycisk **Operate** (Uruchom)*/ **.
9. Szuflada zamyka się automatycznie, przez ustawiony czas płytka jest zamykana, a następnie szuflada otwiera się automatycznie.
10. Wyjmij zamkniętą płytkę do PCR oraz adapter płytki z urządzenia do zamykania płytek i naciśnij przycisk **Close** (Zamknij)*/ **, aby zamknąć urządzenie do zamykania płytek.

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

**PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 Stabilność mieszaniny PCR

Po zakończeniu konfiguracji płytki do PCR, mieszanina PCR w zamkniętej płytce do PCR zachowuje stabilność w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) przez 30 minut.

OSTROŻNIE

Nie należy przekraczać czasu przechowywania mieszaniny PCR, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

7.6.6 Rozpoczęcie badania PCR

Badanie PCR jest wykonywane na urządzeniu CFX96™ DW Dx pod kontrolą oprogramowania CFX Manager™ Dx.

1. Włącz zasilanie urządzenia CFX96™ DW Dx, podłączonego komputera i monitora.
2. Uruchom oprogramowanie CFX Manager™ Dx.
3. Na pasku menu oprogramowania CFX Manager™ Dx wybierz **File** → **Open** → **LIMS File...** (Plik → Otwórz → Plik LIMS...), aby otworzyć okno dialogowe Open LIMS File (Otwórz plik LIMS).
4. W oknie dialogowym Open LIMS File (Otwórz plik LIMS) upewnij się, że kursor w polu **File name** (Nazwa pliku) w dolnej części okna miga. W innym przypadku kliknij pole **File name** (Nazwa pliku).
5. Zeskanuj kod kreskowy płytki do PCR za pomocą ręcznego skanera kodów kreskowych, aby automatycznie wybrać i otworzyć prawidłowy plik LIMS. Wyświetlane jest okno dialogowe Run Setup (Konfiguracja badania).

UWAGA

Wszystkie parametry wymagane do rozpoczęcia badania PCR są przenoszone automatycznie z oprogramowania AltoStar® Connect do urządzenia CFX96™ DW Dx w postaci pliku cyklera.

6. Kliknij przycisk **Open Lid** (Otwórz pokrywę) w oknie dialogowym Run Setup (Konfiguracja badania), aby otworzyć pokrywę urządzenia CFX96™ DW Dx.
7. Odwiruj krótko zamkniętą płytkę do PCR, aby upewnić się, że cała zawartość znajduje się na dnie studzienek reakcyjnych.
8. Włóż zamkniętą płytkę do PCR do bloku grzejnego urządzenia CFX96™ DW Dx w taki sposób, aby studzienka A1 znalazła się po lewej stronie.

9. Zamknij urządzenie CFX96™ DW Dx klikając przycisk **Close Lid** (Zamknij pokrywę) w oknie dialogowym Run Setup (Konfiguracja badania).
10. Rozpocznij badanie PCR klikając **Start Run** (Rozpocznij badanie) w oknie dialogowym Run Setup (Konfiguracja badania).

7.6.6.1 Postępowanie podczas badania PCR

Nie są wymagane żadne działania użytkownika do momentu zakończenia badania PCR. Wyświetlane jest okno dialogowe Run Details (Szczegóły badania), w którym widoczny jest stan badania PCR oraz szacunkowy pozostały czas.

UWAGA



Otwarcie pokrywy urządzenia CFX96™ DW Dx podczas wykonywania badania PCR przez naciśnięcie przycisku z przodu pokrywy lub kliknięcie przycisku **Open Lid** (Otwórz pokrywę) w oknie dialogowym Run Details (Szczegóły badania) spowoduje anulowanie badania i unieważnienie wszystkich wyników.

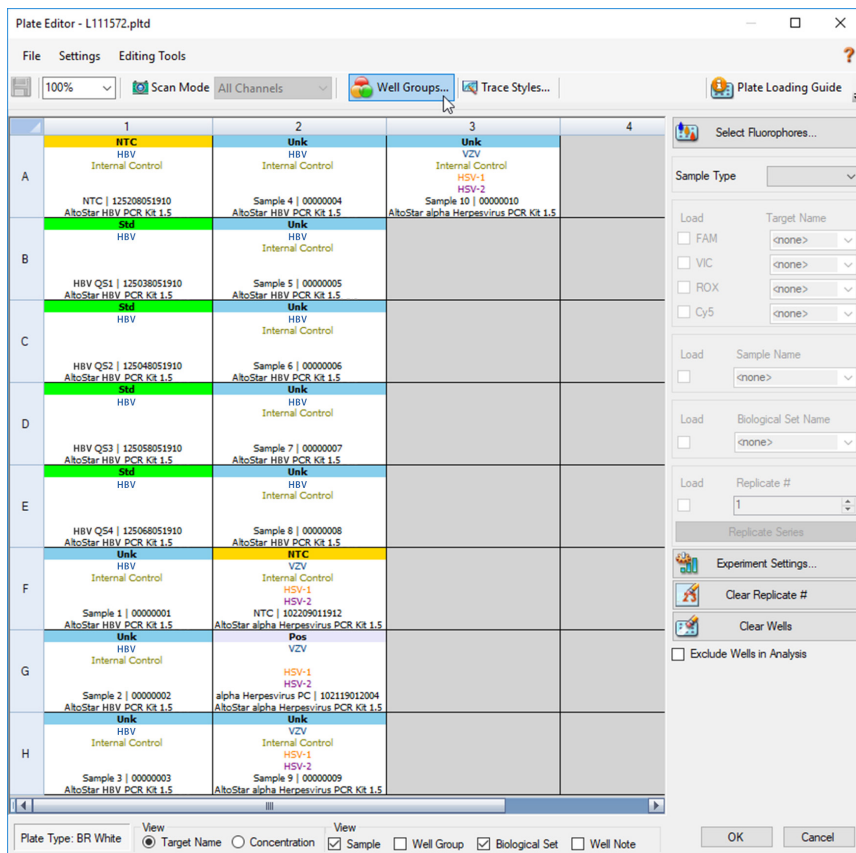
Po zakończeniu badania PCR wyświetlane jest okno Data Analysis (Analiza danych), w którym widoczne są krzywe amplifikacji, układ płytki i wyniki.

7.6.6.2 Przyporządkowanie testów do grup studzienek reakcyjnych

Zautomatyzowana procedura badania AltoStar® Workflow obejmuje przetwarzanie jednego lub kilku testów równocześnie na jednej płytce PCR. Każdy test wymaga indywidualnej analizy przez użytkownika zgodnie z instrukcjami użytkownika danego testu.

W tym celu, wszystkie testy na płytce PCR powinny być przyporządkowane przez użytkownika do poszczególnych grup studzienek reakcyjnych w oprogramowaniu CFX Manager™ Dx.

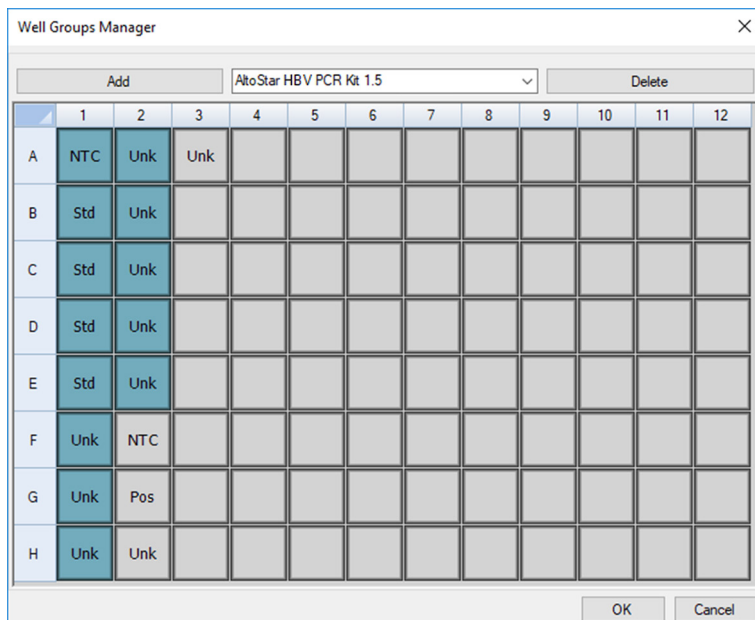
1. W oknie Data Analysis (Analiza danych), na pasku narzędzi kliknij przycisk **Plate Setup** (Konfiguracja płytki) i wybierz polecenie **View/Edit Plate** (Podgląd/Edycja płytki). Wyświetlone zostanie okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytki) (patrz rysunek 1).



Rysunek 1: Okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytki)

2. W oknie dialogowym Plate Editor (Edytor płytki), na pasku narzędzi kliknij opcję **Well Groups...** (Grupy studzienek reakcyjnych...). Wyświetlone zostanie okno dialogowe Well Groups Manager (Menedżer grup studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 2).
3. Kliknij przycisk **Add** (Dodaj).
4. Wprowadź nazwę pierwszego oznaczenia w polu tekstowym.

- Wybierz wszystkie studzienki reakcyjne w obszarze płytki do PCR, które należą do pierwszego testu (patrz rysunek 2). Studzienki reakcyjne przyporządkowane do indywidualnego testu można zidentyfikować w oknie dialogowym Plate Editor (Edytor płytki) na podstawie wpisu w polu **Biological Set** (Zestaw biologiczny).

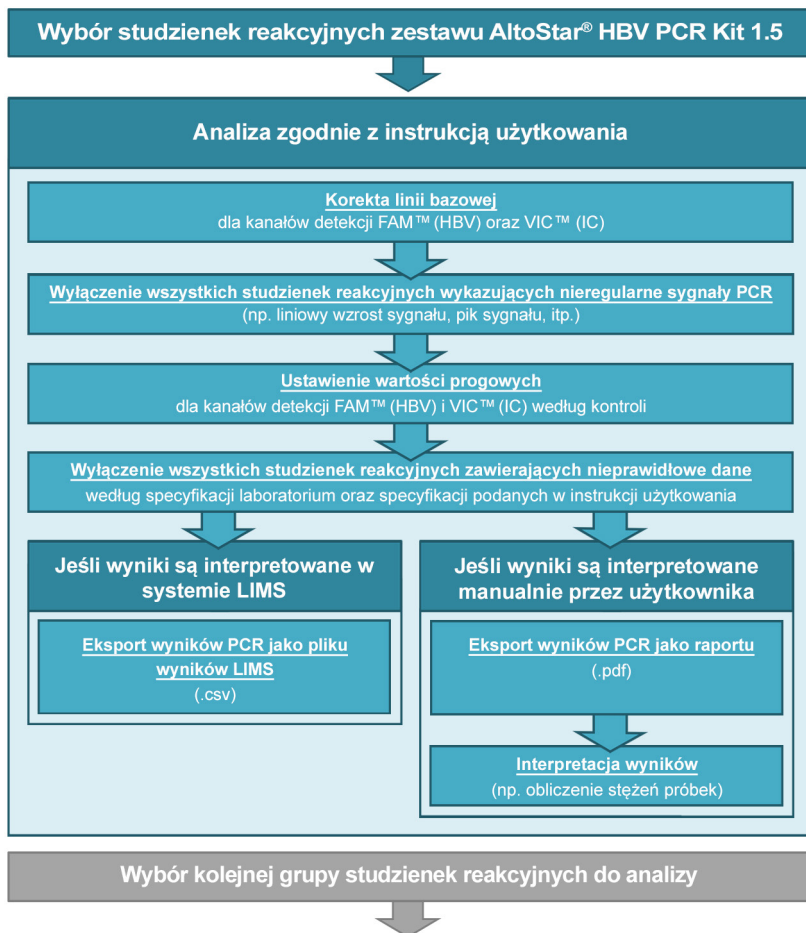


Rysunek 2: Okno dialogowe Well Groups Manager (Menedżer grup studzienek reakcyjnych)

- Powtórz kroki od 3 do 5 dla wszystkich oznaczeń na płytce do PCR.
- Kliknij przycisk **OK**, aby potwierdzić przyporządkowanie grupy studzienek reakcyjnych. Okno dialogowe Well Groups Manager (Menedżer grup studzienek reakcyjnych) jest zamykane.
- Kliknij przycisk **OK**, aby zamknąć okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytki).
- Kliknij przycisk **Yes** (Tak), aby potwierdzić wprowadzone zmiany.

7.6.7 Analiza wyników PCR

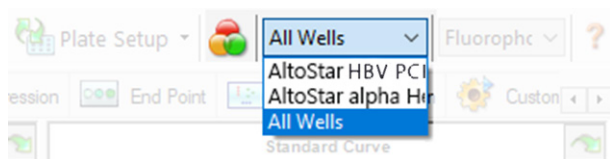
Wyniki wszystkich oznaczeń (grupy studzienek reakcyjnych) na płytce do PCR wymagają analizy w kolejności przedstawionej na rysunku 3.



Rysunek 3: Proces analizy wyników PCR

W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi, kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4). Nie wybieraj opcji „All Wells” (Wszystkie studzienki reakcyjne) dla **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych). Ustawienia wybrane na rysunku 4 są przykładowe.

Przed analizą wyników upewnij się, że grupa studzienek reakcyjnych zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 obejmuje wszystkie grupy studzienek reakcyjnych zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 oraz nie obejmuje żadnych studzienek reakcyjnych pochodzących z innych testów.



Rysunek 4: Przycisk Well Group (Grupa studzienek reakcyjnych) i menu rozwijane Well Group (Grupa studzienek reakcyjnych)

UWAGA



Jednoczesna analiza więcej niż jednego oznaczenia może powodować nieprawidłowe wyniki.

OSTROŻNIE



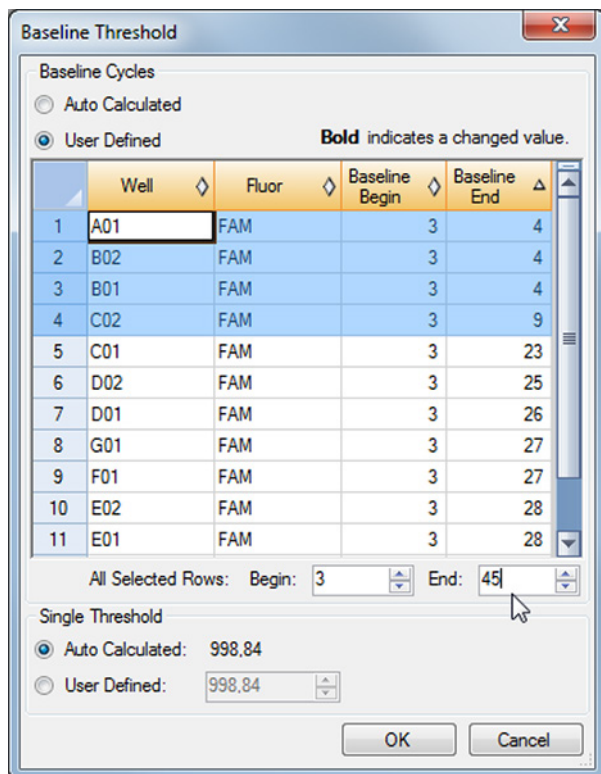
Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

7.6.7.1 Korekta linii bazowej

Ustawienia linii bazowej w oprogramowaniu CFX Manager™ Dx mogą wymagać korekty dla indywidualnych studzienek reakcyjnych [**Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych)] poddawanych analizie.

1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4).
2. Po lewej stronie okna Data Analysis (Analiza danych) zaznacz pole wyboru **FAM** dla kanału detekcji sekwencji docelowej HBV.
3. Na pasku menu w oknie Data Analysis (Analiza danych) kliknij **Settings** → **Baseline Threshold...** (Ustawienia → Wartość progowa linii bazowej...), aby otworzyć okno dialogowe Baseline Threshold (Wartość progowa linii bazowej) (patrz rysunek 5).
4. Kliknij symbol \diamond w nagłówku kolumny **Baseline End** (Koniec linii bazowej), aby posortować tabelę według rosnących wartości **Baseline End** (Koniec linii bazowej).

- Wybierz wszystkie wiersze, dla których wartość **Baseline End** (Koniec linii bazowej) zawiera się w zakresie od 1 do 9 (patrz rysunek 5).



Rysunek 5: Okno dialogowe Baseline Threshold (Wartość progowa linii bazowej)

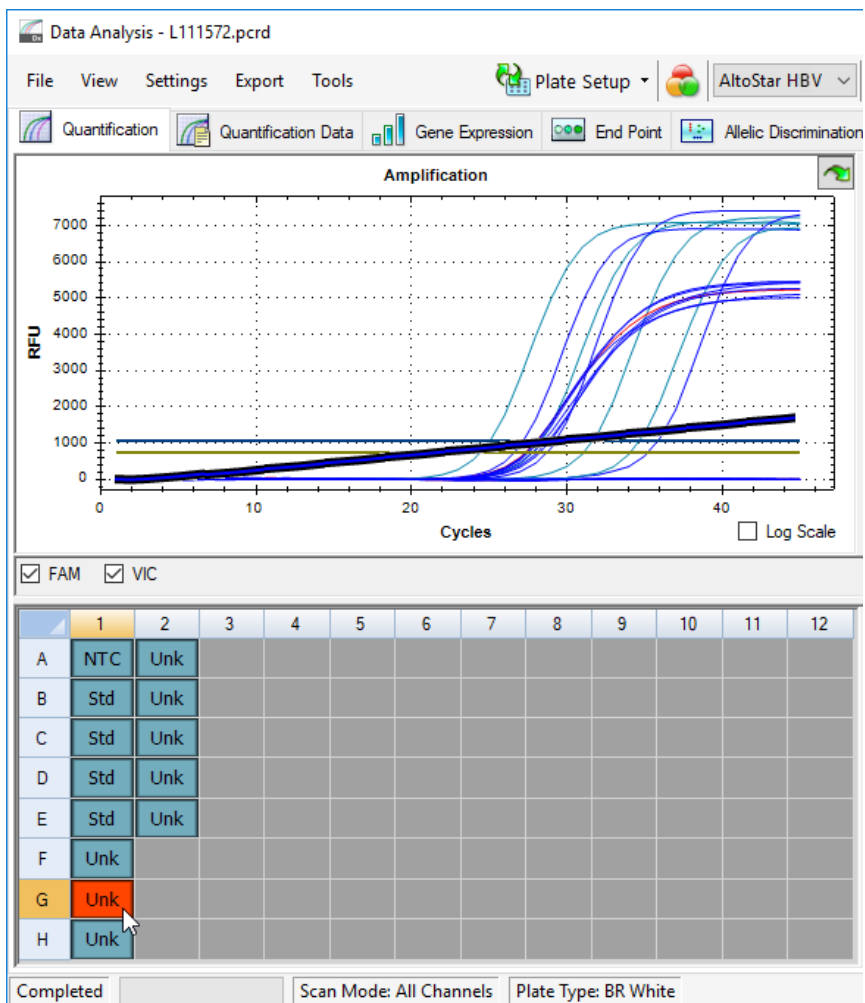
- Wprowadź wartość 45 w polu **End:** (Koniec:) dla wybranych wierszy (patrz rysunek 5).
- Kliknij przycisk **OK**, aby potwierdzić.
- Po lewej stronie okna Data Analysis (Analiza danych) odznacz pole wyboru **FAM** i zaznacz pole wyboru **VIC** dla kanału detekcji IC sekwencji docelowej.
- Powtórz kroki od 3 do 7 dla kanału detekcji VIC™ (IC).

7.6.7.2 Wykluczenie nieregularnych sygnałów PCR

Prawidłowe wyniki mogą być uzyskane wyłącznie na podstawie sygnałów PCR, które nie zawierają artefaktów spowodowanych na przykład zanieczyszczeniami lub pęcherzykami powietrza w mieszaninie PCR. Sygnały PCR zawierające artefakty powinny być wykluczone z analizy przez użytkownika.

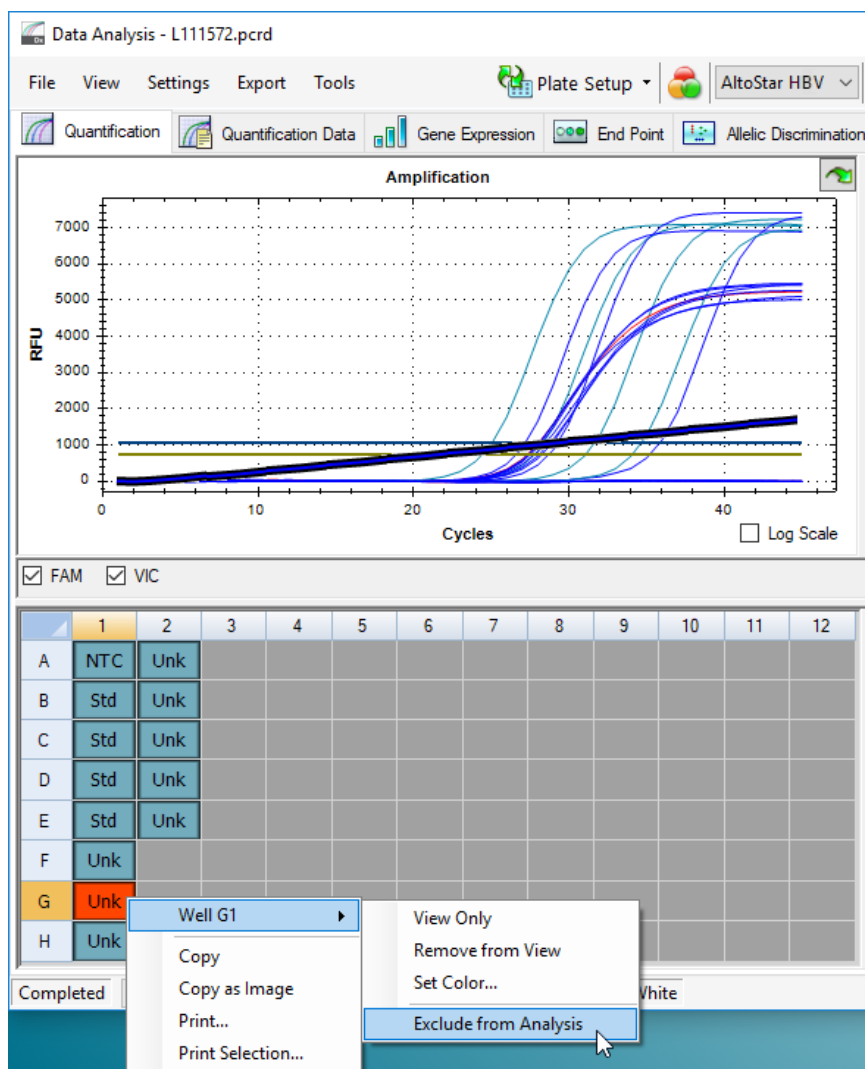
1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) na pasku narzędzi (patrz rysunek 4).

2. Zidentyfikuj studzienki reakcyjne o nieregularnych sygnałach PCR (liniowy wzrost sygnału, piki sygnału itp.) dla któregośkolwiek z kanałów detekcji FAM™ (sekwencja docelowa HBV) oraz VIC™ (IC) (patrz rysunek 6).



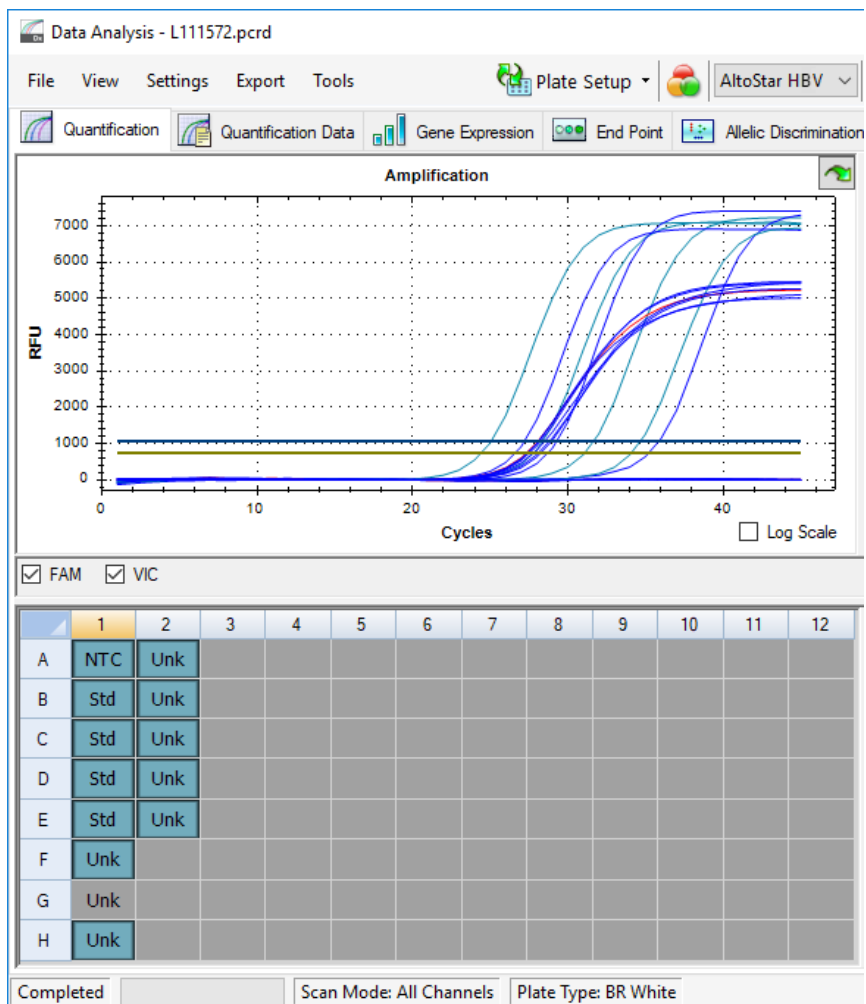
Rysunek 6: Okno Data Analysis (Analiza danych): nieregularny sygnał PCR

3. Kliknij wymagane studzienki reakcyjne prawym przyciskiem myszki i wybierz **Well...** → **Exclude from Analysis** (Studzienka reakcyjna... → Wyklucz z analizy) (patrz rysunek 7).



Rysunek 7: Okno Data Analysis (Analiza danych): wyklucz studzienki reakcyjne z analizy

4. Wybrana studzienka reakcyjna jest wykluczana z analizy. Dla tej studzienki reakcyjnej nie będą generowane żadne wyniki (patrz rysunek 8).



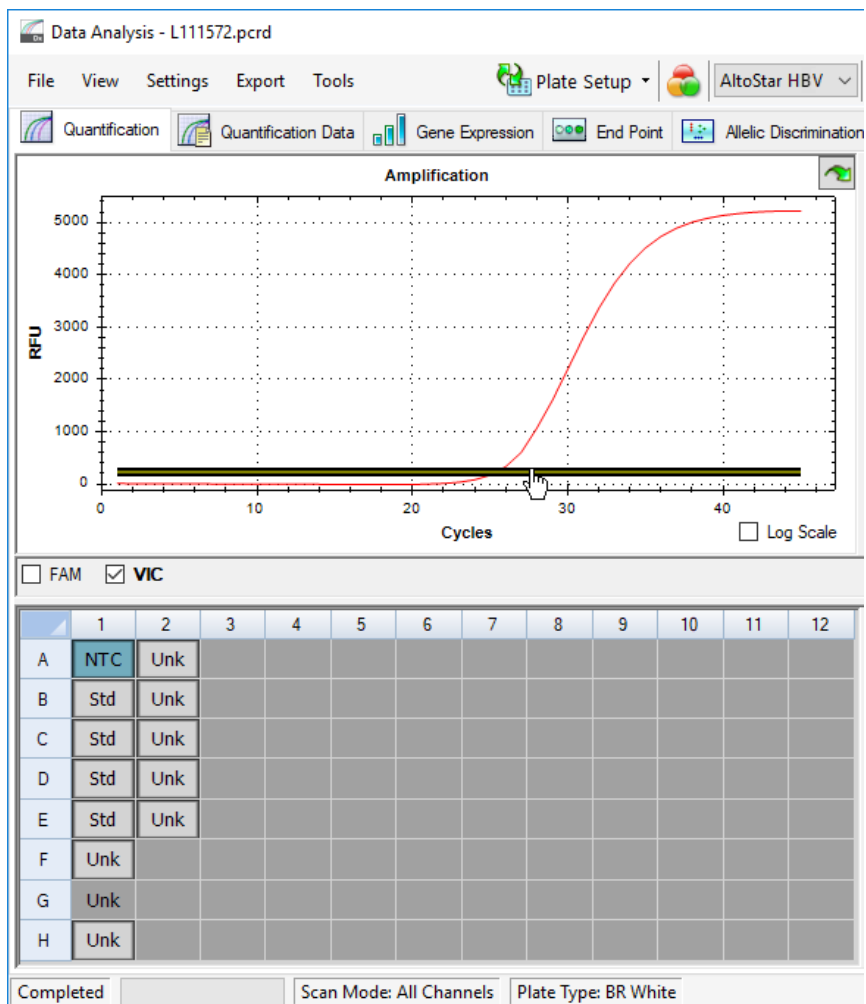
Rysunek 8: Okno Data Analysis (Analiza danych): wykluczona studzienka reakcyjna

7.6.7.3 Ustawienie wartości progowych

Wartości progowe dla kanałów detekcji FAM™ (sekwencja docelowa HBV) oraz VIC™ (IC) muszą być ustawione manualnie przez użytkownika zgodnie z sygnałami kontroli.

1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4).

2. Po lewej stronie okna Data Analysis (Analiza danych) zaznacz wyłącznie pole wyboru **VIC** dla kanału detekcji IC (patrz rysunek 9).



Rysunek 9: Okno Data Analysis (Analiza danych): ustawienie wartości progowej VIC™

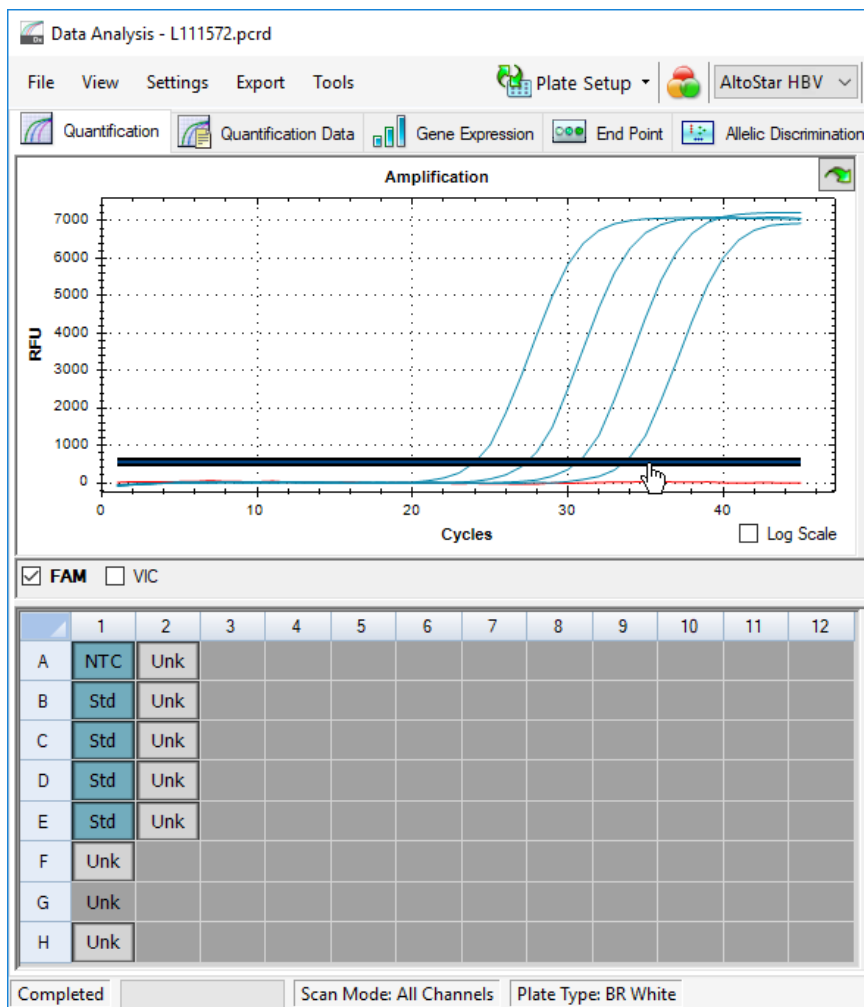
3. Wybierz wyłącznie studzienki reakcyjne NTC w widoku płytki w oknie Data Analysis (Analiza danych) (patrz rysunek 9).
4. Przeciągnij wartość progową do obszaru wykładniczego wzrostu sygnału NTC (patrz rysunek 9).

UWAGA



NTC zawiera matrycę IC, która generuje sygnał IC danej studzienki reakcyjnej NTC.

5. Po lewej stronie okna Data Analysis (Analiza danych) odznacz pole wyboru **VIC** i zaznacz pole wyboru **FAM** dla kanału detekcji sekwencji docelowej HBV (patrz rysunek 10).



Rysunek 10: Okno Data Analysis (Analiza danych): ustawienie wartości progowej FAM™

- Wybierz wyłącznie studzienki reakcyjne zawierające NTC oraz QS w widoku płytki w oknie Data Analysis (Analiza danych) (patrz rysunek 10).
- Przeciwnij wartość progową powyżej wartości sygnału NTC do obszaru wykładniczego wzrostu sygnału QS (patrz rysunek 10).

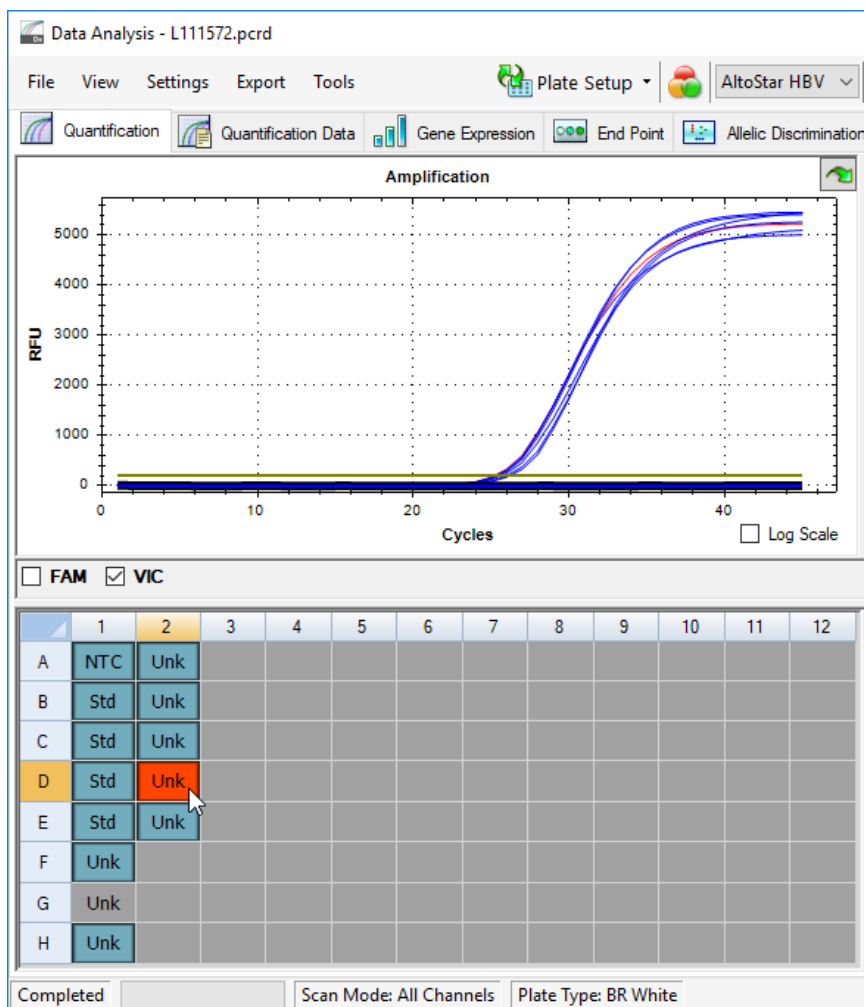
7.6.8 Prawidłowość wyników badania PCR

7.6.8.1 Wykluczenie studzienek reakcyjnych zawierających nieprawidłowe dane

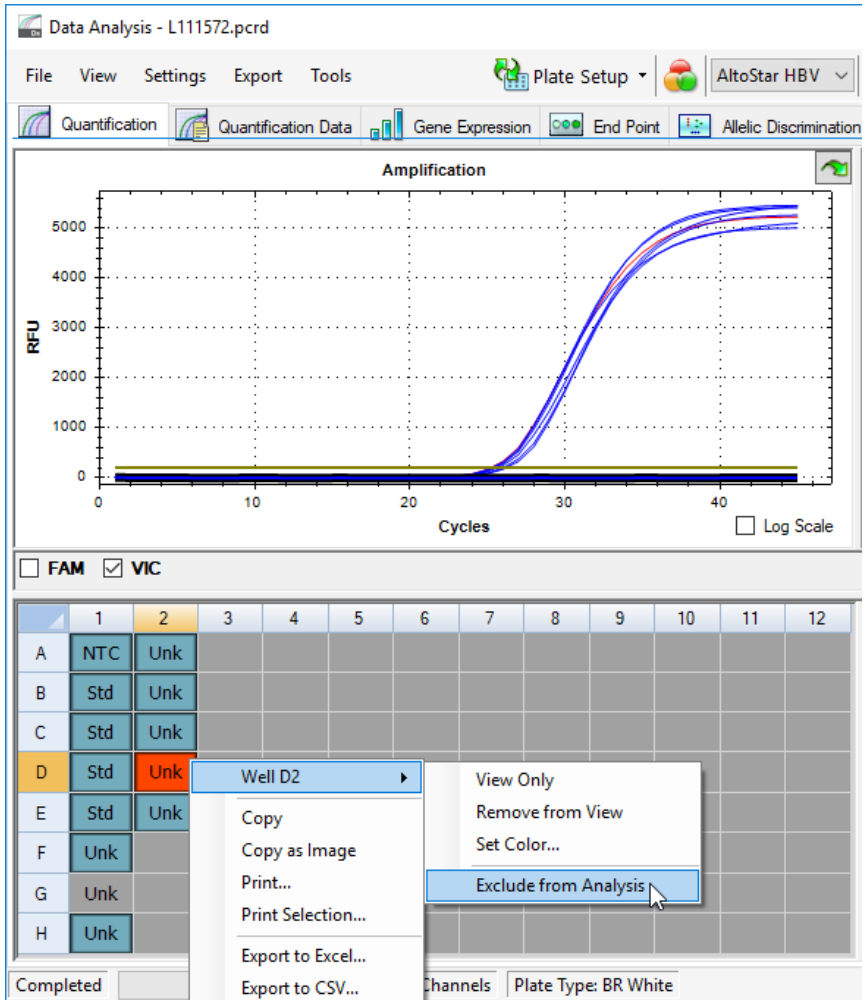
Studzienki reakcyjne, dla których nie są dostępne prawidłowe dane powinny być przez użytkownika wykluczone z generowania wyników.

1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4).
2. Zidentyfikuj wszystkie studzienki reakcyjne zawierające nieprawidłowe dane. Studzienka reakcyjna jest nieprawidłowa, jeśli spełniony jest dowolny z poniższych warunków:
 - a) Cała seria badań jest nieprawidłowa (patrz rozdział 7.6.8.2 Prawidłowość badania diagnostycznego PCR).
 - b) Dane studzienki reakcyjne nie spełniają warunków kontrolnych dla prawidłowego wyniku (patrz rozdział 7.6.8.3 Prawidłowość wyników dla danej próbki).

3. Kliknij prawym przyciskiem myszki na wszystkie studzienki reakcyjne zawierające nieprawidłowe dane według rozdziałów 7.6.8.2 Prawdliwość badania diagnostycznego PCR do 7.6.8.3 Prawdliwość wyników dla danej próbki i wybierz polecenie **Well...** → **Exclude from Analysis** (Studzienka reakcyjna... → Wyklucz z analizy) (patrz rysunek 11 i 12).



Rysunek 11: Okno Data Analysis (Analiza danych): nieprawidłowa studzienka reakcyjna



Rysunek 12: Okno Data Analysis (Analiza danych): wyklucz nieprawidłową studzienkę reakcyjną z analizy

Wybrana studzienka reakcyjna jest wykluczona z analizy. Dla danej studzienki reakcyjnej nie będą generowane żadne wyniki.

7.6.8.2 Prawdliwość badania diagnostycznego PCR

Diagnostyczne badanie PCR jest **prawidłowe**, jeśli:

a) spełnione zostały następujące warunki kontrolne:

Tabela 8: Warunki kontrolne dla prawidłowego badania PCR

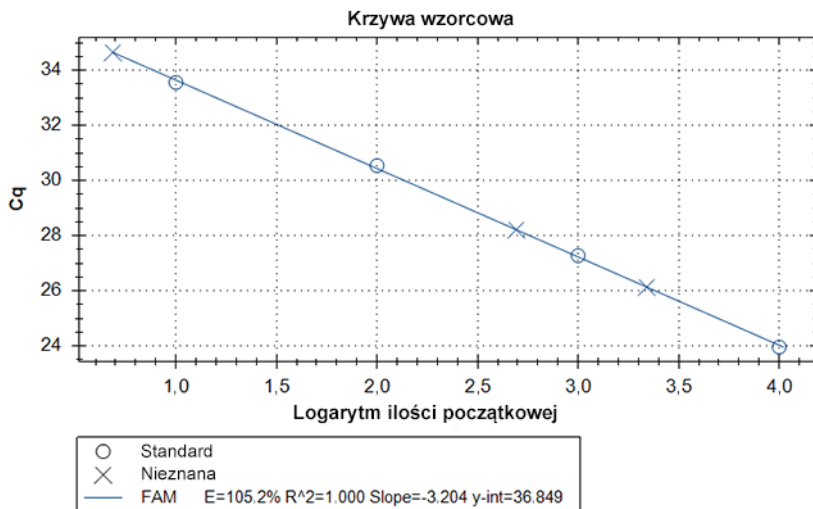
Kontrola	Kanał detekcji	
	FAM™ (sekwencja docelowa HBV)	VIC™ (IC)
QS	+	Nie dotyczy
NTC	-	+

i b) wyznaczona krzywa wzorcowa osiąga następującą wartość parametru kontrolnego:

Tabela 9: Parametr kontrolny krzywej wzorcowej

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

Parametr kontrolny krzywej wzorcowej jest wyświetlany poniżej wykresu krzywej wzorcowej w oknie Data Analysis (Analiza danych) (patrz rysunek 13).



Rysunek 13: Dane krzywej wzorcowej

Diagnostyczne badanie PCR jest **nieprawidłowe**, jeśli:

- Badanie nie zostało ukończone.
- Jakikolwiek warunki kontrolne dla prawidłowego diagnostycznego badania PCR nie zostały spełnione.

W przypadku nieprawidłowego badania diagnostycznego PCR, wszystkie studzienki reakcyjne należy wykluczyć z analizy i powtórzyć serię AltoStar® z użyciem pierwotnych próbek.

7.6.8.3 Prawidłowość wyników dla danej próbki

Wynik dla indywidualnej próbki jest **nieprawidłowy**, jeśli sygnały w kanałach detekcji VIC™ (IC) oraz FAM™ (sekwencja docelowa HBV) dają wynik negatywny (patrz tabela 10). W przypadku nieprawidłowego wyniku dla danej próbki, studzienkę reakcyjną należy wykluczyć z analizy i powtórzyć test z użyciem pierwotnej próbki lub pobrać i wykonać test na nowej próbce.

Tabela 10: Prawidłowość wyniku

Kanał detekcji		Prawidłowość wyniku
FAM™ (sekwencja docelowa HBV)	VIC™ (IC)	
+	+	Wynik prawidłowy
+	-	Wynik prawidłowy*
-	+	Wynik prawidłowy
-	-	Wynik nieprawidłowy

* Detekcja IC nie jest wymagana w przypadku wykrycia sekwencji docelowej HBV. Wysokie stężenie próbki DNA HBV może powodować osłabienie lub brak sygnału IC.

7.6.9 Eksport wyników badania PCR do automatycznej analizy

Aby udostępnić wyniki badań PCR do podłączonego systemu LIMS do automatycznej analizy, należy je wyeksportować do pliku wyników LIMS (.csv).

1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4).
2. Upewnij się, że wszystkie etapy procesu analizy (patrz rozdziały 7.6.7.1 Korekta linii bazowej do 7.6.8.1 Wykluczenie studzienek reakcyjnych zawierających nieprawidłowe dane) zostały ukończone dla grupy studzienek reakcyjnych zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5.
3. Na pasku menu okna Data Analysis (Analiza danych) kliknij **Export** → **Export All Data Sheets** (Eksport → Eksportuj wszystkie arkusze danych), aby otworzyć okno dialogowe Browse For Folder (Wybierz folder).
4. W oknie dialogowym Browse For Folder (Wybierz folder) podaj lokalizację plików wyników LIMS i kliknij przycisk **OK**.

UWAGA

Integracja z systemem LIMS powinna być wdrożona zgodnie ze specyfikacjami Altona Diagnostics. Informacje dotyczące integracji z systemem LIMS znajdują się w rozdziale 15. Protokół testu dla oprogramowania AltoStar® Connect i informacje na temat integracji z systemem LIMS można uzyskać w dziale pomocy technicznej Altona Diagnostics (patrz rozdział 11. Pomoc techniczna).

UWAGA

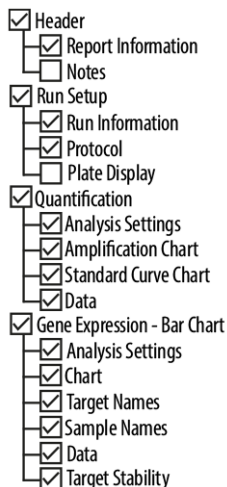
Zapisanie wyników więcej niż jednego testu (grupy studzienek reakcyjnych) z badania PCR w tym samym folderze spowoduje zastąpienie plików wyników LIMS pierwszego testu (grupy studzienek reakcyjnych) plikami wyników LIMS drugiego testu (grupy studzienek reakcyjnych). W tym przypadku, pliki wyników LIMS dla pierwszego testu (grupy studzienek reakcyjnych) można wyeksportować ponownie.

7.6.10 Eksport wyników badania PCR do manualnej analizy

Jeśli wyniki nie są przekazane do systemu LIMS do automatycznej analizy, analiza musi być wykonana manualnie przez użytkownika. W tym celu, wyniki analizy dla każdego testu (grupy studzienek reakcyjnych) należy eksportować w postaci raportu.

1. W oknie Data Analysis (Analiza danych) wybierz **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5. Na pasku narzędzi kliknij menu rozwijane **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) po prawej stronie przycisku **Well Group** (Grupa studzienek reakcyjnych) (patrz rysunek 4).
2. Po lewej stronie okna Data Analysis (Analiza danych) zaznacz pole wyboru **VIC** i pole wyboru **FAM**.
3. Upewnij się, że wszystkie etapy procesu analizy (patrz rozdziały 7.6.7.1 Korekta linii bazowej do 7.6.8.1 Wykluczenie studzienek reakcyjnych zawierających nieprawidłowe dane) zostały ukończone dla grupy studzienek reakcyjnych zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5.
4. Na pasku menu okna Data Analysis (Analiza danych) kliknij **Tools** → **Reports...** (Narzędzia → Raporty...), aby otworzyć okno dialogowe Report (Raport).

- Upewnij się, że w lewej górnej części okna dialogowego Report (Raport) wybrane zostały co najmniej następujące elementy wymagane do utworzenia raportu (patrz rysunek 14):



Rysunek 14: Okno dialogowe Report (Raport)

- Wybierz lub usuń dodatkowe elementy raportu zaznaczając odpowiednie pola tekstowe.
- Na pasku menu okna dialogowego Report (Raport) kliknij **File** → **Save As...** (Plik → Zapisz jako...), aby otworzyć okno dialogowe Save Report (Zapisz raport).
- W oknie dialogowym Save Report (Zapisz raport) podaj nazwę i lokalizację pliku raportu i kliknij przycisk **Save** (Zapisz).

7.6.10.1 Manualna analiza

1. Otwórz plik raportu wygenerowany dla grupy studzienek reakcyjnych zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 (patrz rozdział 7.6.10 Eksport wyników badania PCR do manualnej analizy).
2. Zapoznaj się z treścią tabeli Quantification Data (Dane oznaczenia ilościowego) w raporcie (patrz rysunek 15). Tabela obejmuje 2 wiersze dla każdej próbki **Sample** (Próbka) – jeden dla **Target** (Sekwencja docelowa) *HBV* i jeden dla **Target** (Sekwencja docelowa) *Internal Control* (Kontrola wewnętrzna).

Quantification Data

Well	Floor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Well Note
A01	FAM	HBV	NTC	NTC 125208051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	
A02	FAM	HBV	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
B01	FAM	HBV	Std	HBV QS1 125038051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00	
B02	FAM	HBV	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	4.855E+00	0.686	4.85E+00	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
C01	FAM	HBV	Std	HBV QS2 125048051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00	
C02	FAM	HBV	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
D01	FAM	HBV	Std	HBV QS3 125058051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00	
E01	FAM	HBV	Std	HBV QS4 125068051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	1.000E+01	1.000	1.00E+01	0.00E+00	
E02	FAM	HBV	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	4.924E+02	2.692	4.92E+02	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
F01	FAM	HBV	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	26.14	26.14	0.000	2.195E+03	3.341	2.20E+03	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
H01	FAM	HBV	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC 125208051910	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
E02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HBV PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 80.00 IU/ml

Rysunek 15: Raport: Quantification Data (Dane oznaczenia ilościowego)

Wyniki są oznaczone terminem *Concentration factor* (Współczynnik stężenia) w kolumnie **Well Note** (Uwagi dotyczące studzienki reakcyjnej) tabeli Quantification Data (Dane oznaczenia ilościowego) (patrz rysunek 15).

3. Zgodnie z kolumną **Starting Quantity (SQ)** [Ilość początkowa (SQ)] podane jest stężenie sekwencji docelowej HBV mierzone w eluacie danej próbki **Sample** (Próbka). W celu obliczenia wyniku dla pierwotnej próbki pacjenta, wartość **Starting Quantity (SQ)** [Ilość początkowa (SQ)] musi zostać pomnożona przez odpowiedni *Concentration factor* (Współczynnik stężenia) (wraz z jednostką).

4. W tabeli 11 podano informacje na temat interpretacji wyników.

Tabela 11: Analiza

Starting Quantity (SQ) [Ilość początkowa (SQ)] sekwencji docelowej HBV	Analiza
> 0	Wykryto DNA właściwe dla HBV. Pomnóż wartość Starting Quantity (SQ) [Ilość początkowa (SQ)] przez <i>Concentration factor</i> (Współczynnik stężenia) w kolumnie Well Note (Uwagi do studzienki reakcyjnej) (wraz z jednostką), aby obliczyć stężenie w pierwotnej próbce pacjenta.
Nie dot.	Nie wykryto DNA właściwego dla HBV. Próbkę nie zawiera wykrywalnych ilości DNA właściwego dla HBV.

8. Charakterystyka działania testu

Charakterystyka działania zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 została wyznaczona przy użyciu 4th WHO International Standard for HBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 10/266, genotyp A2) i wzorca HBV kalibrowanego względem międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia.

8.1 Osocze

8.1.1 Czulość analityczna

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności (limit of detection, LoD), została wykonana seria rozcieńczeń przy użyciu 4th WHO International Standard for HBV DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 10/266, genotyp A2) w osoczu z EDTA w zakresie stężeń od 1,00E+02 to 5,00E-01 IU/ml.

Każde rozcieńczenie badano przy użyciu 8 powtórzeniach próbek w 3 seriach (całkowita liczba n = 24 na rozcieńczenie) z użyciem:

- 3 zestawów AltoStar® HBV PCR Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 systemów AltoStar® AM16
- 3 urządzeń CFX96™ DW Dx

Dane ze wszystkich serii zostały zestawione i na ich podstawie wykonano analizę probit, w wyniku której obliczono LoD przy poziomie 95%.

Tabela 12: Wyniki testu PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5

Stężenie [IU/ml]	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	24	100
2,00E+01	24	24	100
1,00E+01	24	23	96
7,00E+00	24	21	88
5,00E+00	24	20	83
2,50E+00	24	9	38
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	2	8

Wartość LoD dla zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 do detekcji HBV w osoczu z EDTA wynosi 10,2 IU/ml (przedział ufności 95%: 7,6–15,8 IU/ml).

Wartość LoD dla HBV genotypów B–H potwierdzono zgodnie z protokołem opisanym w wytycznych CLSI EP17-A2 („Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition”).

Dla każdego genotypu HBV negatywne osocze z EDTA było wzbogacone o HBV do końcowego stężenia o wartości LoD (10,2 IU/ml) ustalonego wobec 4th WHO International Standard for HBV DNA for Nucleic Acid Amplification (NIBSC code: 10/266, genotyp A2). Następnie próbki były badane w 3 różnych seriach przy użyciu kombinacji 3 partii AltoStar® HBV PCR Kit 1.5, 3 partii AltoStar® Purification Kit 1.5 i 3 partii AltoStar® Internal Control 1.5 (n = 20 na serię; łącznie 60 powtórzeń).

Tabela 13: Potwierdzenie czułości analitycznej dla genotypów B–H HBV

Genotyp HBV	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
B	60	56	93
C	60	57	95
D	60	56	93
E	60	59	98
F	60	56	93
G	60	60	100
H	60	59	98

Wyniki potwierdziły LoD o wartości co najmniej 10,2 IU/ml dla genotypów B–H HBV.

8.1.2 Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 jest zapewniona poprzez precyzyjny wybór oligonukleotydów (startery i sondy). Oligonukleotydy zostały sprawdzone metodą analizy porównania sekwencji w stosunku do sekwencji dostępnych publicznie w celu zapewnienia wykrywania wszystkich istotnych genotypów HBV.

W celu weryfikacji swoistości analitycznej zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 wykonano następujące doświadczenia (patrz rozdziały od 8.1.2.1 Próbki negatywne do 8.1.2.3 Reaktywność krzyżowa).

8.1.2.1 Próbki negatywne

Testom z użyciem zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 poddano 104 negatywnych pod kątem HBV próbek osocza z EDTA od indywidualnych dawców. Wszystkie (104 z 104) próbki dały wynik negatywny pod kątem DNA właściwego dla HBV i pozytywny dla IC. Swoistość analityczna zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 dla próbek osocza z EDTA wynosi $\geq 99\%$.

8.1.2.2 Substancje interferujące

W celu oceny wpływu potencjalnie interferujących substancji endogennych i egzogennych na działanie zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5, wybrane substancje zostały dodane do próbek osocza z EDTA. Próbki osocza zawierały odpowiednio HBV w stężeniu $3 \times \text{LoD}$ ($3,06\text{E}+01$ IU/ml), $1,50\text{E}+03$ IU/ml oraz nie zawierały HBV.

Wyniki uzyskane dla próbek zawierających potencjalnie interferujące substancje zostały porównane z wynikami uzyskanymi dla próbek osocza z EDTA niezawierających substancji interferujących. Każdą próbkę oznaczano w 3 powtórzeniach.

Nie stwierdzono interferencji dla próbek zawierających podwyższone poziomy:

- Substancji endogennych
 - Bilirubiny
 - Hemoglobiny
 - Ludzkiego genomowego DNA
 - Albuminy surowicy krwi ludzkiej
 - Triglicerydów
- Substancji egzogennych
 - Adefowiru
 - Entekawiru
 - Interferonu- α 2a
 - Lamiwudyny

- Telbivudyny
- Tenofoviru

Dodatkowo, próbki osocza z EDTA od pacjentów cierpiących na choroby autoimmunologiczne (toczeń rumieniowaty układowy i reumatoidalne zapalenie stawów) były badane przy użyciu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 bez wzbogacenia i z wzbogaceniem HBV do stężenia końcowego odpowiednio $3,06E+01$ IU/ml i $1,50E+03$ IU/ml. Nie stwierdzono zakłóceń w zakresie swoistości, czułości i wiarygodności pomiaru ilościowego.

OSTROŻNIE



Obecność inhibitorów PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.

8.1.2.3 Reaktywność krzyżowa

Swoistość analityczna zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 w odniesieniu do reaktywności krzyżowej z patogenami innymi niż HBV została oceniona poprzez testy:

- Wirusów spokrewnionych z HBV
- Wirusów powodujących podobne objawy, co zakażenie HBV
- Wirusów, których prawdopodobieństwo występowania u pacjentów zakażonych HBV jest duże

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Wirus cytomegalii (CMV)
- Wirus Epsteina-Barr (EBV)
- Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV)
- Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)
- Wirus zapalenia wątroby typu D (HDV)
- Wirus zapalenia wątroby typu E (HEV)
- Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1)
- Wirus opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2)
- Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1 (HIV-1)
- Ludzki wirus T-limfotropowy I (HTLV-I)
- Ludzki wirus T-limfotropowy II (HTLV-II)
- Parwovirus B19

OSTROŻNIE



W przypadku próbki zawierającej patogeny inne niż HBV, może występować konkurencja z amplifikowaną sekwencją docelową lub reaktywność krzyżowa, powodujące nieprawidłowe wyniki IVD.

8.1.3 Zakres liniowości

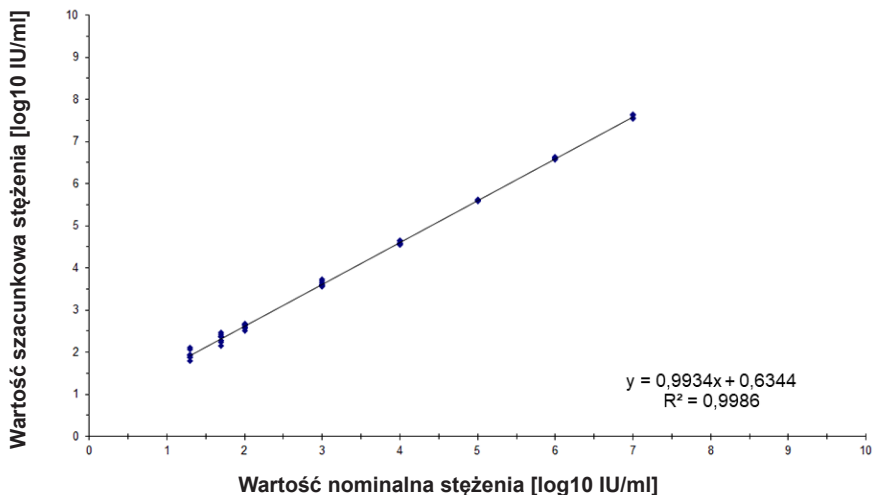
W celu wyznaczenia zakresu liniowości zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5, poddano testom serię rozcieńczeń HBV w osoczu ludzkim pobranym na EDTA w zakresie stężeń od 1,00E+07 do 2,00E+01 IU/ml:

- Rozcieńczenia o stężeniu w zakresie od 1,00E+07 do 1,00E+05 IU/ml testowano na podstawie 4 powtórzeń.
- Rozcieńczenia o stężeniu w zakresie od 1,00E+04 do 2,00E+01 IU/ml testowano na podstawie 8 powtórzeń.

Analizę przeprowadzono metodą regresji wielomianowej.

Zakres liniowości zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 dla oznaczenia ilościowego HBV w osoczu pobranym na EDTA wynosi od 2,00E+01 do 1,00E+07 IU/ml. Na rysunku 16 przedstawiono graficzną reprezentację danych.

Wartość szacunkowa stężenia (log₁₀) w funkcji wartości nominalnej stężenia (log₁₀) zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5



Rysunek 16: Analiza regresji liniowej zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 dla próbek osocza z EDTA

8.1.4 Precyzja

Precyzja zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 oceniono z użyciem panelu zawierającego:

- 1 próbkę pozytywną osocza z EDTA o wysokim stężeniu HBV ($1,50E+03$ IU/ml)
- 1 próbkę pozytywną osocza z EDTA o niskim stężeniu [$1,00E+02$ IU/ml (5 x dolna granica pomiaru ilościowego HBV (lower limit of quantitation (LLoQ)))]
- 1 próbkę osocza z EDTA z wynikiem negatywnym HBV

Każdy element panelu został poddany testom z użyciem co najmniej 4 powtórzeń na serię.

W ciągu 5-ciu dni wykonano 5 serii testów z użyciem kombinacji:

- 3 zestawów AltoStar® HBV PCR Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 systemów AltoStar® AM16
- 3 urządzeń CFX96™ DW Dx

Powtarzalność (zmiennność międzyseryjna), zmiennność wewnątrzseryjna i odtwarzalność (zmiennność całkowita) zostały wyznaczone na podstawie:

- Wartości oznaczenia ilościowego dla próbek pozytywnych o wysokim i niskim stężeniu HBV (patrz tabela 14)
- Cyklu progowego (C_q) IC w próbkach z wynikiem negatywnym HBV (patrz tabela 15)

Tabela 14: Dane precyzji (CV% określone jako \log_{10} z wartości oznaczenia ilościowego) dla próbek pozytywnych osocza pobranych na EDTA o wysokim i niskim stężeniu HBV

	Próbki pozytywne o wysokim stężeniu HBV (1,50E+03 IU/ml)	Próbki pozytywne o niskim stężeniu HBV (1,00E+02 IU/ml)
Zmienność międzyseryjna	0,67–3,41	3,15–8,33
Zmienność wewnątrzseryjna	2,94	6,87
Zmienność całkowita	2,83	6,68

Tabela 15: Dane precyzji (CV% określone na podstawie wartości C_q) dla IC w próbkach osocza pobranych na EDTA z wynikiem negatywnym HBV

	IC
Zmienność międzyseryjna	1,18–2,00
Zmienność wewnątrzseryjna	2,99
Zmienność całkowita	6,20

Ponadto oceniono zmienność między poszczególnymi laboratoriami poprzez badanie panelu próbek w 3 różnych laboratoriach. Panel próbek obejmował HBV pozytywne próbki osocza z EDTA w 3 różnych stężeniach [1,50E+03 IU/ml, 1,00E+02 IU/ml (5 x LLoQ) i 3,06E+01 IU/ml (3 x LoD)], jak również próbki HBV negatywne. Wyniki uzyskane dla próbki 1,50E+03 IU/ml i 1,00E+02 IU/ml zestawiono w tabeli 16.

Tabela 16: Dane precyzji (CV% określone jako \log_{10} z wartości oznaczenia ilościowego) zmienność międzylaboratoryjna

	Próbki pozytywne o wysokim stężeniu HBV (1,50E+03 IU/ml)	Próbki pozytywne o niskim stężeniu HBV (1,00E+02 IU/ml)
Zmienność międzylaboratoryjna	5,01	10,88

8.1.5 Całkowity odsetek nieudanych

Elastyczność zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 została oceniona na podstawie testu 104 próbek osocza z EDTA od indywidualnych dawców z negatywnym wynikiem HBV, z dodanym HBV do końcowego stężenia 3 x LoD (3,06E+01 IU/ml). 99% (103 z 104) próbek dały wynik pozytywny dla kanału detekcji fluorescencji (FAM™) właściwego dla HBV.

8.1.6 Efekt przeniesienia

Efekt przeniesienia stanowi ryzyko zależne od procedury wykonania badania, a nie od stosowanego testu PCR. Dla zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow, jako modelu przykładowego użyto zestawu AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Potencjalne zanieczyszczenie krzyżowe poprzez zanieczyszczenie pozostałościami z próbek pozytywnych o wysokim stężeniu zostało ocenione na podstawie naprzemiennych testów próbek pozytywnych o wysokim stężeniu parwowirusa B19 (1,00E+07 IU/ml) oraz próbek negatywnych (n = 23 na serię; 5 serie) z użyciem zestawu AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Nie stwierdzono efektu przeniesienia, a wszystkie próbki negatywne parwowirusa B19 dały wynik negatywny testu.

8.1.7 Parametry kliniczne

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 oceniono w badaniu porównawczym z testem Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) posiadającym oznaczenie CE. Retrospektywnie, 316 próbek osocza z EDTA z rutynowego monitorowania HBV przebadano równolegle za pomocą z testem Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) oraz z użyciem zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5.

Test Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) został użyty w połączeniu z systemem Abbott *mSample* Preparation System (Abbott Molecular) i systemem Abbott *m2000* Complete System (Abbott Molecular).

Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 został użyty w połączeniu z zestawem Purification Kit 1.5 oraz AltoStar® Internal Control 1.5 wraz z systemem AltoStar® AM16 oraz urządzeniem CFX96™ DW Dx.

Do analizy czułości i swoistości diagnostycznej wykorzystano 272 prawidłowych próbek. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 17.

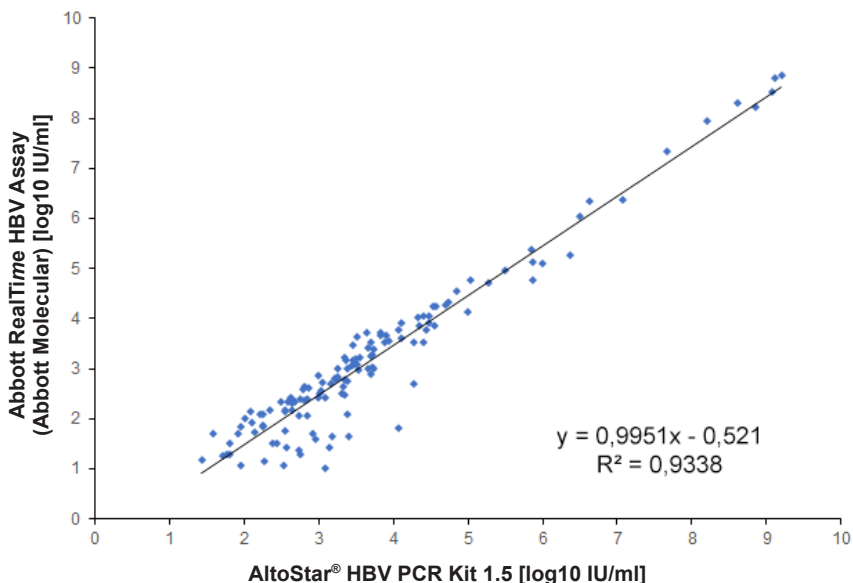
Tabela 17: Wyniki oceny czułości i swoistości diagnostycznej dla HBV w próbkach osocza z EDTA

		Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular)	
		POZYTYWNY	NEGATYWNY
AltoStar® HBV PCR Kit 1.5	POZYTYWNY	133	7
	NEGATYWNY	0	132

Czułość i swoistość diagnostyczna zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 w porównaniu z testem Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) wynosiła odpowiednio 100% (przedział ufności 97,3%–100,0%) i 95% (przedział ufności 90,0%–97,9%).

Z oceny korelacji ilościowej zostały wykluczone próbki z wynikiem ujemnym dla jednego lub obu oznaczeń. Po odrzuceniu wartości odstających wyniki dla pozostałych 132 próbek zostały użyte do korelacji ilościowej metodą analizy regresji liniowej (patrz rysunek 17).

Porównanie testu Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) i zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5



Rysunek 17: Analiza regresji liniowej wyników uzyskanych z użyciem testu Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) (test referencyjny) oraz z użyciem zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5

Wykazano bardzo dobrą korelację pomiędzy wynikami oznaczenia ilościowego uzyskanymi z użyciem zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 oraz użyciem testu Abbott RealTime HBV Assay (Abbott Molecular) [współczynnik korelacji $R = 0,96$ ($R^2 = 0,93$)].

9. Utylizacja

Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi. Pozostałych składników wyrobu i odpadów nie należy odprowadzać do kanalizacji, cieków wodnych lub gleby.

OSTROŻNIE



Próbki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.

OSTROŻNIE



Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi, aby uniknąć skażenia środowiska.

UWAGA



Płytkę do PCR należy utylizować w stanie zamkniętym, ponieważ nie należy usuwać folii do zamykania płytek do PCR po ich użyciu.

10. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością Altona Diagnostics GmbH według wytycznych EN ISO 13485, każda partia zestawów AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

11. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej altona Diagnostics:

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

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

UWAGA



Wszelkie poważne wypadki związane z użyciem tego wyrobu należy zgłaszać firmie altona Diagnostics oraz właściwym władzom w kraju użytkowania.

12. Literatura

- [1] https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rnaviruses-2011/w/rt_viruses/155/hepadnaviridae
- [2] <https://academic.oup.com/labmed/article/42/8/488/2657686>
- [3] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

13. Znaki towarowe i zastrzeżenia

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); FAM™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

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
















Zestaw AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 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 zatwierdzony przez FDA.

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; Wszelkie prawa zastrzeżone.

14. Symbole

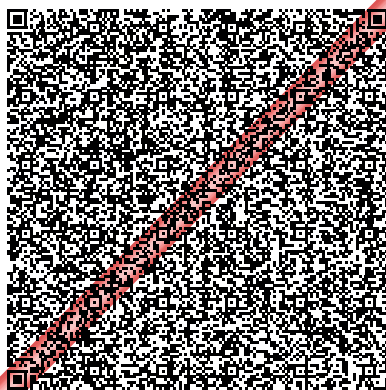
Symbol	Wyjaśnienie
	Wyrób medyczny używany do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Global Trade Item Number
	Numer partii
	Zawartość
	Kolor zakrętki
	Numer katalogowy
	Numer
	Składnik
	Zapoznaj się z instrukcją użytkowania
	Zawiera ilość wystarczającą na „n” testów/reakcji (rxns)
	Limit temperatury
	Termin ważności
	Producent
	Ostrożnie
	Numer materiału

Symbol	Wyjaśnienie
	Wersja
	Uwaga
	Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego

15. Protokół testu dla oprogramowania AltoStar® Connect i informacje na temat integracji z systemem LIMS

Kod kreskowy 2D przedstawiony na rysunku 18 musi być użyty do zainstalowania najnowszego protokołu testu do użycia zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 z systemem AltoStar® AM16. Kod kreskowy może być skanowany wyłącznie w postaci wydrukowanej. Kod kreskowy można zeskanować bezpośrednio z instrukcji lub wydrukować go na osobnym arkuszu. Należy pamiętać, że rozmiar druku może wpływać na parametry skanowania kodu kreskowego. Należy upewnić się, że kod jest drukowany w skali 100%. Skierować skaner na czerwoną linię na kodzie kreskowym. Szczegółowe informacje na temat zarządzania protokołami testów znajdują się w odpowiednim rozdziale instrukcji używania oprogramowania AltoStar® Connect. Informacje na temat integracji z systemem LIMS, patrz tabela 19.

AltoStar® HBV PCR Kit 1.5



Protocol Verslon:

Checksum: 6C315B6A7547CFEEE462EA45998929B31B4164CE

Rysunek 18: Kod kreskowy protokołu testu dla zestawu AltoStar® HBV PCR Kit 1.5

Tabela 18: Dziennik zmian dla protokołu testu

Wersja protokołu	Aktualizacje
1	Pierwsze wydanie

Tabela 19: Informacje na temat integracji z systemem LIMS

Użycie	Dane
Zlecenie testu (LIMS → system AltoStar® AM16)	AltoStar HBV PCR Kit 1.5
Wynik testu (CFX96™ DW Dx → LIMS) - jednostka	IU/ml
Wynik testu (CFX96™ DW Dx → LIMS) - kanał 1	HBV
Wynik testu (CFX96™ DW Dx → LIMS) - kanał 2	Internal Control

Informacje na temat LOINC® (Nazwy i kody logicznych identyfikatorów obserwacji) można znaleźć na stronie internetowej altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) lub uzyskać w dziale pomocy technicznej altona Diagnostics (patrz rozdział 11. Pomoc techniczna).

16. Historia zmian

Tabela 20: Historia zmian

Identyfikator	Data wydania [miesiąc/rok]	Zmiany
MAN-AS0201510- PL-S01	10/2021	Pierwsze wydanie

strona celowo pozostawiona pusta

strona celowo pozostawiona pusta

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

