

Instrucțiuni de utilizare

RealStar[®] WNV RT-PCR Kit 2.0

03/2020 RO

RealStar[®]

WNV RT-PCR Kit 2.0

Pentru utilizare cu

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



322013



96



03 2020



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

Cuprins

1.	Utilizarea prevăzută	6
2.	Componentele kitului.....	6
3.	Depozitare.....	6
4.	Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate	7
5.	Informații generale	8
6.	Descrierea produsului	10
6.1	Instrumente PCR în timp real.....	11
6.2	Tipuri de probă	12
7.	Avertismente și măsuri de precauție.....	12
8.	Procedură	14
8.1	Pregătirea probei.....	14
8.2	Configurare amestec master mix	17
8.3	Configurare reacție.....	18
9.	Programarea instrumentului PCR în timp real	19
9.1	Setări.....	20
9.2	Detectoare de fluorescență (coloranți).....	20
9.3	Profilul de temperatură și achiziția de fluorofor	20
10.	Analiza datelor.....	21
10.1	Validitatea ciclurilor de test de diagnosticare	21
10.1.1	Ciclu de test de diagnosticare valid.....	21
10.1.2	Ciclu de test de diagnosticare nevalabil	21
10.2	Interpretarea rezultatelor.....	22
10.2.1	Analiză calitativă	22

11. Evaluarea performanței	22
11.1 Sensibilitatea analitică.....	23
11.2 Specificitate analitică.....	24
11.3 Precizie	25
12. Limitări	26
13. Controlul calității.....	27
14. Asistență tehnică	27
15. Literatură de specialitate.....	27
16. Mărci comerciale și declinări de răspundere	28
17. Explicarea simbolurilor	29

1. Utilizarea prevăzută

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este un test de diagnostic *in vitro*, bazat pe tehnologie PCR în timp real, pentru detecția calitativă a ARN specific virusului Virusul West Nile (WNV).

2. Componentele kitului

Culoarea capacului	Componentă	Număr de tub	Volum [μl/tub]
Albastru	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Roșu	Positive Control	1	250
Alb	Water (PCR grade)	1	500

ATENȚIE



Înainte de prima utilizare, verificați integralitatea produsului și a componentelor sale în ceea ce privește numărul, tipul și nivelul predefinit de umplere. Nu utilizați un produs defect sau incomplet; performanța poate fi afectată.

3. Depozitare

- Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este expedit pe gheață carbonică. Componentele kitului trebuie să ajungă congelate. Dacă una sau mai multe componente nu sunt congelate la primire sau dacă tuburile au fost compromise în timpul transportului, contactați Altona Diagnostics GmbH pentru asistență.
- Toate componentele trebuie depozitate la temperaturi cuprinse între -25 °C și -15 °C la sosire.

- Trebuie evitată decongelarea și congelarea repetată a reactivilor master (mai mult de două ori), deoarece acest lucru poate afecta performanța testului. Reactivii trebuie congelați în alicote, dacă urmează să fie utilizați intermitent.
- Depozitarea la temperaturi cuprinse între +2 °C și +8 °C nu trebuie să depășească o perioadă de 2 ore.
- Feriți reactivii Master A și Master B de lumină.

ATENȚIE

Condițiile necorespunzătoare de depozitare pot duce la compromiterea performanței produsului.

ATENȚIE

Nu depășiți secvența de decongelare-congelare și duratele de manipulare specificate în aceste instrucțiuni de utilizare.

ATENȚIE

Nu utilizați componentele produsului după data de expirare imprimată pe eticheta componentei.

4. Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate

- Instrument PCR în timp real corespunzător (consultați capitolul 6.1 Instrumente PCR în timp real)
- Sistem sau kit corespunzător pentru extracția acidului nucleic (consultați capitolul 8.1 Pregătirea probei)
- Centrifugă pentru desktop cu un rotor pentru tuburi de reacție de 2 ml
- Centrifugă cu un rotor pentru plăci de microtitrare, dacă se utilizează plăci de reacție cu 96 de godeuri
- Agitator vortex
- Plăci de reacție cu 96 de godeuri sau tuburi de reacție adecvate cu material de închidere (optic) corespunzător

- Pipete (ajustabile)
- Vârfuri pentru pipete cu filtre (de unică folosință)
- Mănuși fără pudră (de unică folosință)

NOTĂ

Vă rugăm să vă asigurați că toate instrumentele utilizate au fost instalate, calibrate, verificate și întreținute în conformitate cu instrucțiunile și recomandările producătorului.

NOTĂ

Se recomandă cu fermitate utilizarea rotorului cu 72 de godeuri împreună cu tuburi de reacție de 0,1 ml corespunzătoare dacă se utilizează Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) sau Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informații generale

Virusul West Nile (WNV) este o specie de virusuri care aparține familiei *Flaviviridae*. Genomul ARN al flavivirusurilor este monocatenar și are o orientare pozitivă [(+)ssARN]. Genele sunt toate localizate pe un singur segment cu o lungime de aproximativ 9-12 kb. Capătul 5' al genomurilor conține secvențe specifice care se pliază în conformații relativ stabile. Aceste așa-numite secvențe de intrare ribozomială permit translația directă și sinteza proteinelor de către ribozomii gazdei.

Virusul West Nile este transmis de vectori artropode (diferiți țânțari din genurile *Culex*, *Aedes* sau *Ochlerotatus*). Acesta poate infecta o varietate de specii gazdă diferite, cum ar fi caii, păsările și, în cele din urmă, oamenii. Virusul a fost identificat pentru prima dată în 1937 în Uganda și, de atunci, a fost descoperit în mod constant la păsări, cai și oameni în Africa, Orientul Mijlociu și Europa de Sud. În anul 1999, virusul a ajuns în America de Nord. Un țânțar purtător al virusului a fost probabil adus din Israel la New York. De atunci au fost înregistrate mai multe focare în SUA.

În majoritatea cazurilor (70-80 %), infecția este asimptomatică la om. În cazurile simptomatice, se poate observa febră însoțită de alte semne și simptome, cum ar fi dureri de cap, dureri articulare, vărsături și alte stări de rău mai degrabă nespecifice. În puține cazuri, aproximativ 1 % din totalul infecțiilor, vor apărea complicații neurologice severe. Ca urmare, acești pacienți dezvoltă dureri de cap severe, rigiditate a gâtului, comă sau paralizie. 10 % dintre acești pacienți vor muri din cauza infecției cu WNV.

Nu există niciun tratament specific disponibil pentru vindecarea infecțiilor cu WNV. Se pot administra medicamente pentru a reduce febra și durerea, iar cazurile severe vor primi tratament de susținere și vor fi spitalizate.

Virusul poate fi detectat din ziua 2-3 până la 14-19 zile post-infecție în serul/plasma pacienților. Este interesant faptul că detecția ARN-ului virusului din urină este posibilă chiar și după ce acesta a dispărut din sânge.

Serologia este dificilă, deoarece anticorpii au reacții încrucișate cu alte flavivirusuri. IgM și IgG pot fi detectate la pacienți la 4-8 zile după detectarea virusului în sânge. Cel mai specific test serologic este testul de neutralizare prin reducerea plăcii, dar acesta necesită cultivarea virusului și poate fi efectuat numai de laboratoare specializate.

Detecția ARN-ului virusului se face în principal în două scopuri diferite. În primul rând, RT-PCR se efectuează pe probele cazurilor suspecte pentru efectuarea diagnosticării *in vitro*. În acest caz, încărcătura virală este de obicei ridicată, iar limita de detecție a testului este o preocupare minoră. În al doilea rând, în zonele în care WNV este endemic, transmiterea virusului a avut loc prin transfuzia de sânge. Prin urmare, trebuie să se efectueze un screening în scop de siguranță al donărilor de sânge și pentru aceasta este necesară o sensibilitate foarte ridicată.

NOTĂ



Data fiind evoluția moleculară relativ rapidă a virusurilor ARN, există un risc inerent pentru orice sistem de testare bazat pe RT-PCR ca acumularea de mutații în timp să poată duce la rezultate fals negative.

6. Descrierea produsului

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este un test de diagnostic *in vitro*, bazat pe tehnologie PCR în timp real, pentru detecția calitativă a ARN specific virusului Virusul West Nile (WNV).

Testul include un sistem de amplificare heterolog (control intern) pentru a identifica posibila inhibare a RT-PCR și pentru a confirma integritatea reactivilor kitului.

Tehnologia RT-PCR în timp real utilizează reacția de revers transcriptază (RT) pentru a converti ARN-ul în ADN complementar (cDNA), reacția de polimerizare în lanț (PCR) pentru amplificarea secvențelor target specifice și a sondelor target specifice pentru detecția ADN-ului amplificat. Sondele sunt etichetate cu coloranți raportori fluorescenți și substanțe extincatoare de luminescență.

Sondele specifice pentru ARN WNV sunt etichetate cu fluoroforul FAM™. Sonda specifică pentru controlul intern (IC) este etichetată cu fluoroforul JOE™.

Utilizarea sondelor asociate cu coloranți care se pot distinge permite detecția în paralel a ARN specific pentru WNV și a controlului intern în canalele de detecție corespunzătoare ale instrumentului PCR în timp real.

Testul constă din trei proceduri într-un singur tub de test:

- Transcripția inversă a ARN-ului target și de control intern în cDNA
- Amplificarea PCR a cDNA-ului target și de control intern
- Detectarea simultană a ampliconilor PCR prin sonde marcate cu colorant fluorescent

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 constă din:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Master A și Master B conțin toate componentele (soluție-tampon PCR, revers transcriptază, ADN polimerază, sare de magneziu, primeri și sonde) pentru a permite transcripția inversă, amplificarea mediată a PCR și detecția unui ARN specific pentru WNV și a controlului intern într-o configurare a reacției.

6.1 Instrumente PCR în timp real

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost dezvoltat și validat pentru a fi utilizat cu următoarele instrumente PCR în timp real:

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

6.2 Tipuri de probă

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost validat pentru utilizarea cu următorul tip de probă:

- Plasmă EDTA umană

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost validat utilizând setul AltoStar® Purification Kit 1.5 pe sistemul de automatizare AltoStar® AM16 pentru extracția și purificarea acidului nucleic.

7. Avertismente și măsuri de precauție

- Înainte de prima utilizare, verificați integralitatea produsului și a componentelor sale în ceea ce privește numărul, tipul și nivelul predefinit de umplere. Nu utilizați un produs defect sau incomplet; performanța poate fi afectată.
- Nu utilizați alte tipuri de probă! Utilizarea altor tipuri de probe poate compromite performanța produsului.
- Prezența inhibitorilor PCR (de exemplu, a heparinei) poate determina rezultate fals negative sau nevalabile.
- În cazul în care proba conține alți agenți patogeni decât WNV, poate apărea concurență cu amplificarea target sau reactivități încrucișate.
- Condițiile necorespunzătoare de depozitare pot duce la compromiterea performanței produsului.
- Lipsa centrifugării componentelor produsului după decongelare ar putea duce la contaminarea componentelor cu reziduuri de reactivi în capace și, în consecință, la o performanță compromisă a produsului.
- Nu depășiți secvența de decongelare-congelare și duratele de manipulare specificate în aceste instrucțiuni de utilizare.
- Nu utilizați componentele produsului după data de expirare imprimată pe eticheta componentei.
- Manipularea necorespunzătoare a componentelor produsului și a probelor poate duce la contaminare și la rezultate incorecte ale examinării IVD.

- Nu schimbați capacele fiolelor sau ale flacoanelor, deoarece poate surveni contaminarea încrucișată.
 - Pentru a minimiza riscul de contaminare prin transfer, depozitați materialul pozitiv și/sau potențial pozitiv separat de componentele kitului.
 - Utilizați zone de lucru separate pentru activitățile de pregătire a probei/configurare a reacției și de amplificare/detecție.
 - Purtați întotdeauna mănuși de unică folosință.
 - Nu deschideți plăcile sau tuburile PCR după amplificare pentru a evita contaminarea cu ampliconi.
- Depozitarea eluatelor în condiții necorespunzătoare poate duce la degradarea secvenței target WNV.
 - Nu depășiți timpul de depozitare pentru PCR mix. Acest lucru ar putea duce la o performanță compromisă a produsului.
 - Tratați întotdeauna probele ca fiind infecțioase și reprezentând un pericol (biologic) în conformitate cu procedurile de laborator sigure. În cazul scurgerilor de material de probă, utilizați imediat un dezinfectant adecvat. Manipulați materialele contaminate ca reprezentând un pericol biologic.
 - Eliminați deșeurile periculoase și biologice numai în conformitate cu reglementările locale și naționale pentru a evita contaminarea mediului.
 - Ca în cazul oricărui test de diagnostic, rezultatele trebuie interpretate luând în considerare toate rezultatele clinice și de laborator.
 - Mutațiile potențiale din regiunile target ale genomului WNV acoperite de primerii și/sau sondele utilizate în kit pot duce la imposibilitatea de a detecta prezența agentului patogen.
 - Dacă sistemul dumneavoastră de pregătire a probelor utilizează soluții-tampon de spălare care conțin etanol, asigurați-vă că eliminați orice urmă de etanol înainte de eluția acidului nucleic. Etanolul este un inhibitor puternic al PCR în timp real.
 - Utilizarea ARN-ului transportor este esențială pentru eficacitatea și stabilitatea extracției acidului nucleic extras.
 - Acest test nu trebuie utilizat direct pe mostră. Înainte de utilizarea acestui test, trebuie efectuate metode adecvate de extracție a acidului nucleic.

8. Procedură

ATENȚIE



Manipularea necorespunzătoare a componentelor produsului și a probelor poate duce la contaminare și la rezultate incorecte ale examinării IVD.

- Nu schimbați capacele fiolelor sau ale flacoanelor, deoarece poate surveni contaminarea încrucișată.

- Pentru a minimiza riscul de contaminare prin transfer, depozitați materialul pozitiv și/sau potențial pozitiv separat de componentele kitului.

- Utilizați zone de lucru separate pentru activitățile de pregătire a probei/configurare a reacției și de amplificare/detecție.

- Purtați întotdeauna mănuși de unică folosință.

- Nu deschideți plăcile sau tuburile PCR după amplificare pentru a evita contaminarea cu ampliconi.

8.1 Pregătirea probei

ARN extras este materia primă pentru setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0.

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost validat cu plasmă EDTA umană utilizând sistemul de automatizare AltoStar® AM16 în combinație cu setul AltoStar® Purification Kit 1.5.

Pot fi adecvate și alte sisteme și kituri de extracție a acidului nucleic (consultați lista de mai jos). Potrivirea procedurii de extracție a acidului nucleic pentru utilizare cu setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 trebuie să fie validată de utilizator.

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

În cazul în care se utilizează o procedură de pregătire a probelor pe bază de tub de centrifugă care include soluție-tampon de spălare cu etanol, este recomandat să se efectueze o centrifugare suplimentară timp de 10 min. la aproximativ 17.000 x g (~ 13.000 rpm), utilizând un tub de colectare nou, înainte de eluția acidului nucleic.

După finalizarea procedurii de extracție, eluatele din placa pentru eluat nesigilată sunt stabile la temperatura camerei (max. 30 °C) pentru un total de 6 ore. Eluatele dintr-o placă pentru eluat sigilată pot fi păstrate la temperaturi de 2-8 °C timp de până la 24 de ore înainte de începerea configurației unei reacții PCR.

ATENȚIE



Nu utilizați alte tipuri de probă! Utilizarea altor tipuri de probe poate compromite performanța produsului.

ATENȚIE



Dacă sistemul dumneavoastră de pregătire a probelor utilizează soluții-tampon de spălare care conțin etanol, asigurați-vă că eliminați orice urmă de etanol înainte de eluția acidului nucleic. Etanolul este un inhibitor puternic al PCR în timp real.

ATENȚIE



Utilizarea ARN-ului transportor este esențială pentru eficacitatea și stabilitatea extracției acidului nucleic extras.

ATENȚIE

Tratați întotdeauna probele ca fiind infecțioase și reprezentând un pericol (biologic) în conformitate cu procedurile de laborator sigure. În cazul scurgerilor de material de probă, utilizați imediat un dezinfectant adecvat. Manipulați materialele contaminate ca reprezentând un pericol biologic.

ATENȚIE

Prezența inhibitorilor PCR (de exemplu, a heparinei) poate determina rezultate fals negative sau nevalabile.

ATENȚIE

Acest test nu trebuie utilizat direct pe mostră. Înainte de utilizarea acestui test, trebuie efectuate metode adecvate de extracție a acidului nucleic.

ATENȚIE

Eliminați deșeurile periculoase și biologice numai în conformitate cu reglementările locale și naționale pentru a evita contaminarea mediului.

ATENȚIE

Depozitarea eluatelor în condiții necorespunzătoare poate duce la degradarea secvenței target WNV.

Pentru informații suplimentare și asistență tehnică privind pre-tratarea și pregătirea probelor, contactați asistența noastră tehnică (consultați capitolul 14. Asistență tehnică).

8.2 Configurare amestec master mix

Înainte de utilizare, toți reactivii și toate probele trebuie decongelate complet, amestecate (prin pipetare sau prin turbionare ușoară) și centrifugate scurt.

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 conține un control intern (IC) heterolog, care poate fi utilizat fie ca control de inhibare RT-PCR sau ca un control al procedurii de pregătire a probei (extracția acidului nucleic) și ca un control de inhibare RT-PCR.

- ▶ Dacă IC este utilizat ca control de inhibare RT-PCR, dar nu și ca control pentru procedura de pregătire a probei, configurați amestecul master mix în conformitate cu următoarea schemă de pipetare:

Număr de reacții (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control intern)	1 µl	12 µl
Volum amestec master mix	21 µl	252 µl

- ▶ Dacă IC este utilizat ca control pentru procedura de pregătire a probei și ca control de inhibare RT-PCR, adăugați controlul IC în timpul procedurii de extracție a acidului nucleic.
- ▶ Indiferent de metoda/sistemul care se utilizează pentru extracția acidului nucleic, IC **nu** trebuie adăugat direct în mostră. Controlul IC trebuie adăugat întotdeauna în amestecul de mostră/soluție-tampon de liză. Volumul IC care trebuie adăugat depinde întotdeauna de volumul eluției. Acesta reprezintă 10 % din volumul eluției. De exemplu, dacă acidul nucleic urmează să fie eluat în 60 µl de soluție-tampon de eluție sau apă, în amestecul de mostră/soluție-tampon de liză se vor adăuga 6 µl de IC per probă.

- ▶ Dacă IC a fost adăugat în timpul procedurii de pregătire a probei, configurați amestecul master mix în conformitate cu următoarea schemă de pipetare:

Număr de reacții (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volum amestec master mix	20 µl	240 µl

ATENȚIE

Lipsa centrifugării componentelor produsului după decongelare ar putea duce la contaminarea componentelor cu reziduuri de reactivi în capace și, în consecință, la o performanță compromisă a produsului.

NOTĂ

În cazul în care IC [Internal Control (control intern)] a fost adăugat în timpul procedurii de pregătire a probei, cel puțin controlul negativ trebuie să includă IC.

NOTĂ

Indiferent de metoda/sistemul care se utilizează pentru extracția acidului nucleic, nu adăugați niciodată IC direct în mostră.

8.3 Configurare reacție

- ▶ Pipetați 20 µl de amestec master mix în fiecare godeu necesar al unei plăci de reacție optică cu 96 de godeuri sau al unui tub de reacție optică corespunzător.
- ▶ Adăugați 10 µl de probă (eluat din extracția acidului nucleic) sau 10 µl din controale (control pozitiv sau negativ).

Configurare reacție	
Amestec master mix	20 μ l
Probă sau control	10 μ l
Volum total	30 μl

- ▶ Asigurați-vă că se utilizează cel puțin un control pozitiv și un control negativ per ciclu.
- ▶ Amestecați bine probele și controalele cu amestecul master mix prin pipetări în sus și în jos.
- ▶ Închideți plăcile de reacție cu 96 de godeuri cu capacele corespunzătoare sau cu o peliculă adezivă optică și tuburile de reacție cu capacele corespunzătoare.
- ▶ Centrifugați placa de reacție cu 96 de godeuri într-o centrifugă cu rotor pentru placa de microtitrare timp de 30 de secunde la aproximativ 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

După finalizarea configurării reacției PCR, PCR mix este stabil la temperatura camerei (max. 30 °C) timp de 30 de minute.

ATENȚIE



Nu depășiți timpul de depozitare pentru PCR mix. Acest lucru ar putea duce la o performanță compromisă a produsului.

9. Programarea instrumentului PCR în timp real

Pentru informații de bază privind configurarea și programarea diferitelor instrumente PCR în timp real, consultați manualul de utilizare al instrumentului respectiv.

Pentru instrucțiuni de programare detaliate privind utilizarea setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 pe anumite instrumente PCR în timp real, vă rugăm să contactați asistența tehnică (consultați capitolul 14. Asistență tehnică).

9.1 Setări

- Definiți următoarele setări:

Setări	
Volum de reacție	30 µl
Rată de creștere	Implicită
Referință pasivă	ROX™

9.2 Detectoare de fluorescență (coloranți)

- Definiți detectoarele de fluorescență (coloranți):

Target	Nume detector	Raportor	Substanță extincătoare de luminescență
ARN specific WNV	WNV	FAM™	(Fără)
Internal Control (control intern, IC)	IC	JOE™	(Fără)

9.3 Profilul de temperatură și achiziția de fluorofor

- Definiți profilul de temperatură și achiziția de fluorofor:

	Stadiu	Repetări ciclu	Achiziție	Temperatură [°C]	Timp [min:s]
Transcripție inversă	Menținere	1	-	55	20:00
Denaturare	Menținere	1	-	95	02:00
Amplificare	Prelucrare în cicluri	45	-	95	00:15
			Da	55	00:45
			-	72	00:15

10. Analiza datelor

Pentru informații de bază privind analiza datelor pe instrumente PCR în timp real specifice, consultați manualul de utilizare al instrumentului respectiv.

Pentru instrucțiuni detaliate privind analiza datelor generate cu setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 pe instrumente PCR în timp real diferite, contactați asistența noastră tehnică (consultați capitolul 14. Asistență tehnică).

10.1 Validitatea ciclurilor de test de diagnosticare

10.1.1 Ciclu de test de diagnosticare valid

Un ciclu de test de diagnosticare este **valid**, dacă sunt îndeplinite următoarele condiții de control:

ID control	Canal de detecție	
	FAM™	JOE™
Control pozitiv	+	+/-*
Control negativ	-	+

* Prezența sau absența unui semnal pe canalul JOE™ nu este relevantă pentru validitatea ciclului de test.

10.1.2 Ciclu de test de diagnosticare nevalabil

Un ciclu de test de diagnosticare este **nevalabil**, (i) dacă ciclul nu a fost finalizat sau (ii) dacă există condiții de control pentru un ciclu de test de diagnosticare **valid** care nu sunt îndeplinite.

În cazul unui ciclu de test de diagnosticare **nevalabil**, repetați testarea utilizând acizii nucleici purificați rămași sau începeți din nou folosind probele inițiale.

10.2 Interpretarea rezultatelor

ATENȚIE



Ca în cazul oricărui test de diagnostic, rezultatele trebuie interpretate luând în considerare toate rezultatele clinice și de laborator.

10.2.1 Analiză calitativă

Canal de detecție		Interpretarea rezultatului
FAM™	JOE™	
+	+*	ARN specific WNV detectat.
-	+	Niciun ARN specific WNV detectat. Proba nu conține cantități detectabile de ARN specific WNV.
-	-	Inhibarea RT-PCR sau eșecul reactivului. Repetați testarea din proba inițială sau colectați și testați o probă nouă.

* Detecția controlului intern în canalul de detecție JOE™ nu este obligatorie pentru rezultate pozitive în canalul de detecție FAM™. O încărcătură a ARN WNV ridicată în probă poate duce la un semnal redus sau absent al controlului intern.

11. Evaluarea performanței

Evaluarea performanței analitice a setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost efectuată utilizând virusul West Nile (tulpina NY2001-6263) furnizat de ZeptoMetrix®.

11.1 Sensibilitatea analitică

Sensibilitatea analitică a setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este definită ca concentrația (copii/ml) de molecule ARN specifice WNV care poate fi detectată cu o rată de pozitivitate de 95 %. Sensibilitatea analitică a fost determinată de analiza seriilor de diluție ale WNV în plasmă EDTA umană. Materialul virusului West Nile (tulpina NY2001-6263) a fost furnizat de ZeptoMetrix®.

Fiecare diluție a fost testată în 8 replici, în 3 zile diferite (nr. total = 24 per diluție) utilizând combinații de 3 loturi din setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0, 3 loturi din setul AltoStar® Purification Kit 1.5 și 3 loturi din setul AltoStar® Internal Control 1.5. Ciclurile au fost efectuate utilizând 3 instrumente AltoStar® Automation System AM16 și CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System diferite.

Datele de la toate ciclurile au fost combinate și a fost efectuată o analiză probit pentru a determina valoarea LD de 95 %.

Tabelul 2: Rezultatele RT-PCR utilizate pentru calcularea sensibilității analitice cu privire la detecția ARN specific pentru WNV

Conc. intrare [copii/ml]	Număr de replici	Număr de pozitive	Rată de succesiune [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	19	79
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

Sensibilitatea analitică a setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost determinată de analiza probit:

- Pentru detecția ARN specific pentru WNV, specificitatea analitică este de 258 copii/ml [interval de încredere (IÎ) de 95 %: 150–599 copii/ml]

11.2 Specificitate analitică

Specificitatea analitică a setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este asigurată de selecția atentă a oligonucleotidelor (primeri și sonde). Oligonucleotidele au fost verificate prin analiza de comparare a secvențelor cu secvențele disponibile public pentru a asigura faptul că vor fi detectate toate genotipurile WNV relevante.

Specificitatea analitică a setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 în ceea ce privește reactivitatea încrucișată cu alți agenți patogeni în afară de WNV a fost evaluată prin testarea virusurilor asociate WNV, a agenților patogeni care provoacă simptome similare cu cele ale unei infecții cu WNV și a agenților patogeni care pot fi prezenți la pacienții care suferă de o infecție cu WNV.

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 nu a prezentat reactivitate încrucișată cu niciunul dintre următorii agenți patogeni:

- Virusul Denga 1
- Virusul Denga 2
- Virusul Denga 3
- Virusul Denga 4
- Virusul hepatitei A
- Virusul hepatitei C
- Virusul hepatitei E
- Virusul herpes simplex 1
- Virusul herpes simplex 2
- Virusul imunodeficienței umane 1
- Virusul encefalitei japoneze
- Virusul encefalitei Văii Murray
- *Neisseria meningitidis*
- Virusul encefalitei St. Louis
- *Streptococcus pneumoniae*
- Virusul encefalitei transmise de căpușe (FSME)
- Virusul Usutu
- Virusul febrei galbene
- Virusul Zika

Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 poate detecta WNV din liniile genetice 1 și 2:

- Linia genetică 1 (NY99)
- Linia genetică 2 (Heja, B-956 Uganda, 1986)

ATENȚIE



În cazul în care proba conține alți agenți patogeni decât WNV, poate apărea concurență cu amplificarea target sau reactivității încrucișate.

11.3 Precizie

Precizia setului RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 a fost determinată ca variabilitate intra-testare (variabilitatea în cadrul unui singur experiment), variabilitate inter-testare (variabilitatea între diferite experimente) și variabilitate între loturi (variabilitatea între diferite loturi de producție). Variabilitatea totală a fost calculată prin combinarea celor 3 analize.

Datele variabilității sunt exprimate în termeni de coeficient de variație pe baza valorilor ciclului de prag (C_t). Cel puțin 4 replici per probă au fost analizate pentru variabilitatea intra-testare, inter-testare și pentru variabilitatea între loturi.

Tabelul 3: Datele de precizie (CV % [valorile C_t]) pentru probele de plasmă EDTA pozitive cu valori înalte de WNV

	Probă pozitivă cu valori înalte de WNV [CV % pe baza valorilor C_t]
Variabilitate intra-testare	0,32-0,95
Variabilitate inter-testare	0,02-0,40
Variabilitate între loturi	1,38
Variabilitate totală	1,21

Toate probele testate la 3x LD (probe slab pozitive) au fost detectate pozitive pentru WNV.

Tabelul 4: Datele de precizie (CV % [valorile C_t]) pentru controlul intern în probele de plasmă EDTA negative la WNV

	Control intern
Variabilitate intra-testare	0,18-0,67
Variabilitate inter-testare	0,04-0,32
Variabilitate între loturi	0,61
Variabilitate totală	1,52

12. Limitări

- Pentru rezultate optime este necesară respectarea strictă a instrucțiunilor de utilizare.
- Utilizarea acestui produs este limitată la personalul special instruit și format în tehnicile de PCR în timp real și în procedurile de diagnostic *in vitro*.
- Buna practică de laborator este esențială pentru performanța corespunzătoare a acestui test. Trebuie să se acorde o atenție deosebită păstrării purității componentelor kitului și a configurărilor reacțiilor. Toți reactivii trebuie monitorizați îndeaproape cu privire la impurități și contaminare. Orice reactiv suspect trebuie eliminat.
- Pentru efectuarea optimă a acestui test sunt necesare proceduri adecvate de colectare, transport, depozitare și procesare a mostrelor.

13. Controlul calității

În conformitate cu standardul altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 – Sistem certificat de management al calității, fiecare lot de set RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este testat în funcție de specificațiile prestabilite pentru a asigura calitatea constantă a produsului.

14. Asistență tehnică

Pentru asistență pentru clienți, vă rugăm să contactați asistența noastră tehnică:

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

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

15. Literatură de specialitate

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

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

16. Mărci comerciale și declinări de răspundere

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); ZeptoMetrix®.

Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în acest document, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific ca atare, nu trebuie considerate ca neintrând sub sfera de protecție a legislației.

















Setul RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 este un kit de diagnosticare cu marcaj CE în conformitate cu directiva pentru diagnostic *in vitro* 98/79/CE.

Produsul nu este licențiat de Health Canada și nu este autorizat sau aprobat de FDA.

Nu este disponibil în toate țările.

© 2024 altona Diagnostics GmbH; toate drepturile rezervate.

17. Explicarea simbolurilor

Simbol	Explicație
	Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>
	Cod lot
	Culoare capac
	Număr de catalog
	Conținut
	Număr
	Componentă
	Numărul articolului comercial global
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Conține o cantitate suficientă pentru „n” teste/reacții (rxns)
	Limită de temperatură
	Data expirării
	Producător
	Atenție: evidențiază instrucțiunile de utilizare sau procedurile care, dacă nu sunt respectate corect, pot duce la vătămări corporale sau pot afecta performanța produsului. Contactați asistența tehnică altona Diagnostics pentru asistență.
	Notă: utilizatorului i se oferă informații utile, dar nu esențiale pentru sarcina în cauză.
	Versiune

Note:

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

