

Instrukcja użytkowania

RealStar[®] RSV RT-PCR Kit 3.0

01/2017 PL

RealStar[®]

RSV RT-PCR Kit 3.0

Do stosowania z

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



193013



96



01 2017



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

Spis treści

1.	Przeznaczenie zestawu.....	6
2.	Składniki zestawu	6
3.	Przechowywanie	6
4.	Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone.....	7
5.	Podstawowe informacje	8
6.	Opis wyrobu	9
6.1	Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym	10
7.	Ostrzeżenia i środki ostrożności	11
8.	Procedura	12
8.1	Przygotowanie próbki.....	12
8.2	Przygotowanie mieszaniny master mix.....	14
8.3	Konfiguracja reakcji.....	15
9.	Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym	16
9.1	Ustawienia.....	16
9.2	Detektory fluorescencji (barwniki)	17
9.3	Profil temperatury i pomiar barwnika.....	17
10.	Analiza danych	18
10.1	Prawidłowość badań diagnostycznych.....	18
10.1.1	Prawidłowe badanie diagnostyczne	18
10.1.2	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne	19
10.2	Manualna analiza	19
10.2.1	Analiza jakościowa.....	19
11.	Charakterystyka działania testu	20

11.1	Czułość analityczna	21
11.2	Swoistość analityczna	22
11.3	Precyzja	23
12.	Ograniczenia.....	25
13.	Kontrola jakości	26
14.	Pomoc techniczna.....	26
15.	Literatura.....	26
16.	Znaki towarowe i zastrzeżenia	27
17.	Wyjaśnienie symboli.....	28

1. Przeznaczenie zestawu

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania jakościowego RNA właściwego dla syncytialnego wirusa układu oddechowego (RSV). Ponadto, test umożliwia rozróżnienie pomiędzy RNA właściwym dla RSV podtyp A (RSV A) oraz RSV podtyp B (RSV B).

2. Składniki zestawu

Tabela 1: Składniki zestawu

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

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Positive Control = kontrola pozytywna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

3. Przechowywanie

- Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 jest wysyłany w suchym lodzie. Składniki zestawu powinny być dostarczone w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub próbki zostały uszkodzone podczas transportu należy skontaktować się z Altona Diagnostics GmbH w celu uzyskania pomocy.

- Po odbiorze wszystkie składniki należy przechowywać w temperaturze od -25 °C do -15 °C.
- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania odczynników Master (więcej niż dwukrotnie), ponieważ może to negatywnie wpływać to na właściwości użytkowe testu. Odczynniki powinny być zamrażane w porcjach, jeśli nie zostaną użyte na raz.
- Przechowywanie w temperaturze +2 °C do +8 °C nie powinno przekroczyć 2 godzin.
- Mieszanki reakcyjne Master A i Master B należy chronić przed światłem.

4. Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone

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

UWAGA



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

UWAGA

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

5. Podstawowe informacje

Ludzki syncytialny wirus oddechowy (RSV) to wirus z jednonicowym RNA o polarności ujemnej należący do rodziny *Paramyxoviridae*. RSV dzieli się na dwie podstawowe grupy genetyczne: RSV A i RSV B. W ramach tej samej epidemii, różne genotypy z obu podgrup mogą występować z różną częstotliwością.

RSV powoduje zakażenia układu oddechowego. Praktycznie wszystkie dzieci ulegną zakażeniu RSV do wieku od 2 do 3 lat. W przebiegu życia dochodzi do wielokrotnych powtórnych zakażeń. W większości przypadków zakażenie RSV powoduje tylko łagodne objawy, takie jak zwykłe przeziębienie. W przypadku niemowląt i małych dzieci, RSV stanowi główną przyczynę poważnych chorób górnych dróg oddechowych oraz podstawową przyczynę zapalenia oskrzelików i zapalenia płuc. Ponadto, RSV stanowi poważny problem u osób starszych, u pacjentów z chorobami sercowo-płucnymi i u osób z obniżoną odpornością.

RSV rozprzestrzenia się drogą kropelkową lub przez kontakt z wydzieliną z nosa lub ust osób zakażonych. Ogniska zakażeń RSV są obserwowane na całym świecie, z corocznymi epidemiami zimą i wczesną wiosną w klimatach umiarkowanych, na przykład w Europie i Ameryce Północnej oraz w porze deszczowej w tropikach.

UWAGA

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

6. Opis wyrobu

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i rozróżniania RNA właściwego dla wirusa syncytialnego układu oddechowego podtyp A (RSV A) oraz wirusa syncytialnego układu oddechowego podtyp B (RSV B). Test zawiera heterologiczny system amplifikacji (kontrola wewnętrzna) umożliwiający identyfikację ewentualnej inhibicji RT-PCR oraz weryfikację integralności odczynników wchodzących w skład zestawu.

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

Sondy właściwe dla RNA RSV A są oznakowane fluoroforem Cy[®]5, natomiast sondy właściwe dla RNA RSV B są oznakowane fluoroforem FAM[™]. Sonda właściwa dla IC jest oznakowana fluoroforem JOE[™].

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

Badanie obejmuje trzy procesy w pojedynczym oznaczeniu:

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

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 obejmuje:

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

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Positive Control = kontrola pozytywna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

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

6.1 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 został opracowany i zwalidowany do pracy z następującymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym:

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

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

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

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

8. Procedura

8.1 Przygotowanie próbki

Materiał startowy dla zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 stanowi wyizolowane RNA.

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

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)

- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Inne systemy oraz zestawy izolacji kwasu nukleinowego mogą również być odpowiednie. Możliwość używania danej procedury izolacji kwasu nukleinowego z zestawem RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

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

OSTROŻNIE



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

OSTROŻNIE



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

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

8.2 Przygotowanie mieszaniny master mix

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

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 zawiera heterologiczną IC, która może być stosowana jako kontrola inhibicji RT-PCR lub jako kontrola dla procedury przygotowania próbki (izolacja kwasu nukleinowego) i jako kontrola inhibicji RT-PCR.

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

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

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

- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna została dodana podczas procedury przygotowania próbki, mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującą procedurą schematu pipetowania:

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

OSTROŻNIE

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

OSTROŻNIE

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

8.3 Konfiguracja reakcji

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

Konfiguracja reakcji	
Mieszanina master mix	20 µl
Próbka lub kontrola	10 µl
Objętość całkowita	30 µl

- ▶ Upewnić się, że dla każdego badania używana jest każda kontrola pozytywna i co najmniej jedna kontrola negatywna.
- ▶ Dokładnie wymieszaj próbki i kontrole z mieszaniną master mix poprzez pipetowanie w górę i w dół.
- ▶ Zamknij 96-studzienkową płytkę, używając odpowiednich pokrywek lub optycznej folii do zamykania płytek oraz zamknij próbówki reakcyjne, używając odpowiednich pokrywek.
- ▶ Odwiruj 96-studzienkową płytkę reakcyjną w wirówce kompatybilnej z mikroplatką przez 30 sekund z prędkością około 1000 x g (~ 3000 obr./min).

9. Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym

Szczegółowe informacje dotyczące konfiguracji i programowania różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkownika danego urządzenia. Szczegółowe instrukcje dotyczące programowania i używania zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

9.1 Ustawienia

- ▶ Wybierz następujące ustawienia:

Ustawienia	
Objętość reakcji	30 µl
Szybkość zmiany	Domyślna
Wzorzec pasywny	ROX™

9.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

Sekwencja docelowa	Nazwa detektora	Barwnik reporterowy	Barwnik tłumiący
RNA właściwe dla RSV A	RSV A	Cy [®] 5	(Brak)
RNA właściwe dla RSV B	RSV B	FAM [™]	(Brak)
Kontrola wewnętrzna	Internal Control	JOE [™]	(Brak)

9.3 Profil temperatury i pomiar barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiar barwnika:

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

10. Analiza danych

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

Szczegółowe instrukcje dotyczące analizy danych generowanych przez zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 dla różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

10.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne

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

ID kontroli	Kanał detekcji		
	Cy [®] 5	FAM™	JOE™
Kontrola pozytywna RSV A	+	-	+/-*
Kontrola pozytywna RSV B	-	+	+/-*
Kontrola negatywna	-	-	+

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

10.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne

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

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

10.2 Manualna analiza

10.2.1 Analiza jakościowa

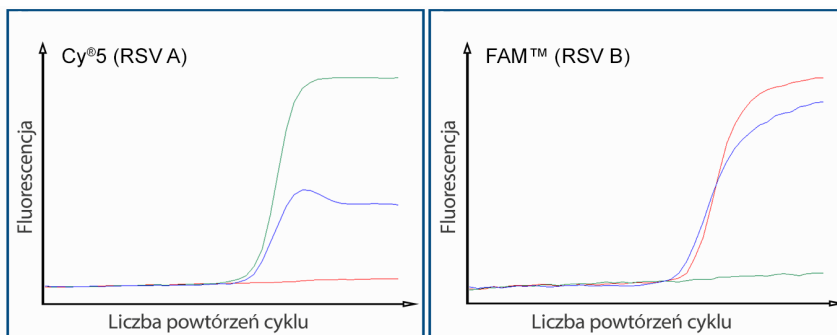
Kanał detekcji			Manualna analiza
Cy [®] 5	FAM [™]	JOE [™]	
+	-	+ [*]	Wykryto RNA właściwe dla RSV A.
-	+	+ [*]	Wykryto RNA właściwe dla RSV B.
-	-	+	Nie wykryto RNA właściwego dla RSV A i RSV B. Próbka nie zawiera wykrywalnych ilości RNA właściwego dla RSV A lub RSV B.
-	-	-	Inhibicja RT-PCR lub nieprawidłowe działanie odczynnika. Powtórzyć oznaczenie rozpoczynając od pierwotnej próbki lub pobrać i wykonać oznaczenie na nowej próbce.

* Detekcja kontroli wewnętrznej w kanale detekcji JOE[™] nie jest wymagana dla wyników pozytywnych w kanale detekcji Cy[®]5 lub w kanale detekcji FAM[™]. Wysokie stężenie RNA RSV A i/lub RSV B w próbce może powodować osłabienie lub brak sygnału kontroli wewnętrznej.

11. Charakterystyka działania testu

Charakterystykę działania zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 wykonano z użyciem oznaczonego ilościowo RNA właściwego dla RSV A (ATCC® VR-26D™) oraz RNA właściwego dla RSV B (ATCC® VR-955D™).

Pod względem szczepów referencyjnych oraz większości dotychczas przebadanych izolatów RSV, zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 pozwala na wyraźne rozróżnienie pomiędzy RNA właściwym dla RSV A i RSV B. W zależności od stosowanych do analizy izolatów RSV i urządzeń PCR w czasie rzeczywistym, może wystąpić nieznaczna reaktywność krzyżowa pomiędzy systemem RSV A i RSV B (patrz rysunek 1).



Rysunek 1: Krzywe amplifikacji uzyskane z użyciem zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 oraz RNA izolowane z próbek wymazu z górnych dróg oddechowych pobranych w Niemczech. Zielony: RNA właściwe dla RSV A, detekcja wyłącznie w kanale Cy®5; Czerwony: RNA właściwe dla RSV B, detekcja wyłącznie w kanale FAM™; Niebieski: RNA właściwe dla RSV B, wydajna amplifikacja z systemem właściwym dla RSV B (FAM™) oraz niewydajna amplifikacja/reakcja krzyżowa z systemem właściwym dla RSV A (Cy®5).

11.1 Czulość analityczna

Czulość analityczna zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 jest definiowana jako stężenie (kopie/μl eluatu) cząsteczek RNA właściwych dla RSV A i RSV B, dla których wskaźnik pozytywnych wyników detekcji wynosi 95%. Czulość analityczna została wyznaczona na podstawie analizy serii rozcieńczeń RNA RSV A i RNA RSV B o znanym stężeniu.

Tabela 2: Wyniki RT-PCR użyte do obliczeń czulości analitycznej w odniesieniu do detekcji RNA właściwego dla RSV A

Stężenie początkowe [kopie/μl]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	23	96
0,316	24	15	63
0,100	24	5	21
0,032	24	0	0
0,010	24	0	0

Tabela 3: Wyniki RT-PCR użyte do obliczeń czułości analitycznej w odniesieniu do detekcji RNA właściwego dla RSV B

Stężenie początkowe [kopie/ μ l]	Liczba powtórzeń	Liczba wyników pozytywnych	Odsetek pozytywnych wyników [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	23	23	100
1,000	24	24	100
0,316	24	13	54
0,100	24	4	17
0,032	23	0	0
0,010	24	1	4

Czułość analityczna zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 została wyznaczona na podstawie analizy probit:

- Przy detekcji RNA właściwego dla RSV A, czułość analityczna wynosi 0,93 kopie/ μ l [przedział ufności 95% (CI): 0,61–1,95 kopie/ μ l]
- Przy detekcji RNA właściwego dla RSV B, czułość analityczna wynosi 0,83 kopie/ μ l [przedział ufności 95% (CI): 0,56–1,81 kopie/ μ l]

11.2 Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 jest zapewniona poprzez precyzyjny wybór oligonukleotydów (starterów i sond). Oligonukleotydy zostały sprawdzone metodą analizy porównania sekwencji wobec sekwencji dostępnych publicznie w celu zapewnienia wykrywania wszystkich istotnych genotypów RSV A i RSV B.

Swoistość analityczna zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 została oceniona przez testy panelu genomowego RNA/DNA wyizolowanego z wirusów spokrewnionych z RSV oraz innych patogenów powodujących objawy zbliżone do RSV.

Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Ludzki adenowirus typu 1
- Ludzki adenowirus typu 2
- Ludzki adenowirus typu 3
- Ludzki adenowirus typu 4
- Ludzki wirus paragrypy typu 1
- Ludzki wirus paragrypy typu 2
- Ludzki wirus paragrypy typu 3
- Ludzki wirus paragrypy typu 4a/b
- Ludzki metapneumowirus typu A
- Ludzki metapneumowirus typu B
- Wirus grypy typu A H1N1
- Wirus grypy typu A
- Wirus grypy typu B
- Enterowirus, Coxsackie A3
- Rynowirus
- Ludzki koronawirus 229E
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Precyzja

Precyzja zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 została wyznaczona jako zmienność wewnątrztestowa (zmienność w ramach pojedynczego eksperymentu), zmienność międzytestowa (zmienność pomiędzy różnymi eksperymentami) oraz zmienność wewnątrzseryjna (zmienność pomiędzy różnymi seriami produkcyjnymi). Zmienność całkowita została obliczona przez połączenie wyników 3 analiz.

Dane zmienności są wyrażone w postaci odchylenia standardowego i współczynnika zmienności na podstawie wartości cyklu progowego (C_t). W celu ustalenia zmienności wewnętrznej, międzytestowej i wewnątrzseryjnej przeanalizowano co najmniej 6 powtórzeń każdej próbki.

Tabela 4: Dane precyzji detekcji RNA właściwego dla RSV A i RSV B

RSV A i RSV B		Średni cykl progowy (C_t)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnętrzna	RSV A	32,14	0,06	0,20
	RSV B	33,24	0,08	0,30
Zmienność międzytestowa	RSV A	32,24	0,13	0,40
	RSV B	33,18	0,10	0,30
Zmienność wewnątrzseryjna	RSV A	31,70	0,45	1,42
	RSV B	33,26	0,12	0,36
Zmienność całkowita	RSV A	31,91	0,49	1,54
	RSV B	33,21	0,13	0,39

Tabela 5: Dane precyzji detekcji kontroli wewnętrznej

Kontrola wewnętrzna	Średni cykl progowy (C_t)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Zmienność wewnętrzna	29,38	0,06	0,20
Zmienność międzytestowa	29,23	0,16	0,55
Zmienność wewnątrzseryjna	29,03	0,36	1,24
Zmienność całkowita	29,05	0,30	1,03

12. Ograniczenia

- Optymalne rezultaty mogą być zapewnione wyłącznie w przypadku ścisłego przestrzegania zaleceń instrukcji użytkowania.
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Dobra praktyka laboratoryjna jest kluczowa dla prawidłowego działania testu. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie doprowadzić do zanieczyszczenia składników zestawu i konfiguracji reakcji. Wszystkie odczynniki należy monitorować pod kątem zanieczyszczenia i skażenia. Wszelkie podejrzone odczynniki należy utylizować.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnego działania testu.
- Test nie może być stosowany bezpośrednio na próbce. Przed użyciem tego testu należy zastosować odpowiednie metody izolacji kwasu nukleinowego.
- Obecność inhibitorów RT-PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu RSV A oraz RSV B objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą spowodować niewykrycie obecności patogenów.
- W zależności od izolatów i stosowanych do analizy urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym może wystąpić nieznaczna reaktywność krzyżowa pomiędzy systemem RSV A i RSV B.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

13. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością według wytycznych Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485, każda partia zestawów RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

14. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
telefon: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Literatura

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

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

16. Znaki towarowe i zastrzeżenia

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

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















Zestaw RealStar® RSV RT-PCR Kit 3.0 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.



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

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.

17. Wyjaśnienie symboli

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

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

Uwagi:

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

