



quanty HEV

REF: RT-41

Detekce a kvantifikace viru hepatitidy E pomocí Real Time PCR

ÚVOD A ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Systém **quanty HEV** je kvantitativní test, který umožňuje amplifikaci a kvantifikaci RNA pomocí *Real Time PCR*, konkrétně oblasti ORF3 viru hepatitidy E.

Postup umožňuje detekci cílové RNA pomocí real time PCR.

Analýza výsledků se provádí pomocí analyzátoru real time PCR (termocykler integrovaný se systémem pro detekci fluorescence a specializovaným softwarem)).

OBSAH KITU

Kit obsahuje reakční činidla v množství dostatečném pro provedení 24 testů

	Množství	Popis
R1	2 x 8 µl	Enzymový mMix Reverzní transkriptáza a Taq polymeráza (modré víčko)
R2	2 x 200 µl	HEV Mix sond Upstream primer, downstream primer, cílové sondy (FAM pro HEV a VIC pro interní kontrolu), voda bez nukleáz, ROX, dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ (zelené víčko)
R3	2 x 35 µl	syntetická RNA odpovídající genu ORF3 100.000 cps/µl
R4	2 x 35 µl	syntetická RNA odpovídající genu ORF3 10.000 cps/µl
R5	2 x 35 µl	syntetická RNA odpovídající genu ORF3 1.000 cps/µl
R6	2 x 35 µl	syntetická RNA odpovídající genu ORF3 100 cps/µl
R7	2 x 160 µl	Inhibiční kontrola (myší RNA – GAPDH)
R8	1 x 50 µl	Negativní kontrola

Návod k použití: **ST. RT41-ENG.4**

POTŘEBNÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ KITU

Jednorázové latexové rukavice bez pudru;

Stolní mikrocentrifuga (12 000 - 14 000 rpm);

Mikropipety a sterilní špičky s aerosolovým filtrem;

Vortex;

Plasty (mikrotitrační destička a optický adhezivní krypt);

EZ1 Advanced XL DSP Virus Card. - Ref. 9018703 - QIAGEN.

Reagencie

Kit **quanty HEV** byl hodnocen s následujícími extrakčními metodami:

Manuální extrakce

Ref. 52906. QIAmp Viral RNA Mini Kit

Souprava umožňuje ruční extrakci RNA z lidských vzorků.

Souprava obsahuje činidla pro 250 vzorků. (QIAGEN)

Automatická extrakce

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit.

Souprava umožňuje automatickou izolaci RNA z lidských vzorků.

Souprava obsahuje činidla pro 48 vzorků. (QIAGEN)

Podle instrukcí výrobce mohou být vhodné také alternativní systémy a kity pro extrakci nukleových kyselin. Vhodnost postupu extrakce nukleových kyselin pro použití s quanty HEV musí uživatel ověřit.

Přístroje

Kit **quanty HEV** byl hodnocen při použití s následujícími přístroji:

Extrakce

Ref. 9001492. EZ1 Advanced XL.

Robotická pracovní stanice pro automatickou purifikaci nukleových kyselin do 14 vzorků současně (QIAGEN).

Real Time PCR

Kit ***quanty HEV*** byl vyvinut a ověřen pro použití s následujícími přístroji pro qPCR:

- 7500 Fast* Lifetechnologies
- Rotor-Gene Q* MDx QIAGEN
- Versant kPCR AD: Siemens* *nebo Stratagene MX3005P/MX3000P*
- LightCycler 480 Roche

Zajistěte, aby byly přístroje nainstalovány, kalibrovány, zkontrolovány a udržovány v souladu s pokyny a doporučeními výrobce.

VZORKY A SKLADOVÁNÍ

Quanty HEV systém musí být použit s extrahovanou RNA pouze z následujících biologických vzorků: plazmy a séra.

Odebraný materiál musí být odeslán a skladován při +2 až + 8 ° C. Vzorky skladujte při -20 ° C, pokud se do 3 dnů nepoužijí.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Tato souprava je určena *pro in vitro diagnostiku* (IVD), pouze pro profesionální použití, a ne pro použití in vivo.

Po rozpuštění lze hlavní amplifikační směs použít jednou (12 reakcí). Je třeba se vyhnout opakovanému rozmrazování a zmrazování činidel (více než dvakrát), protože by to mohlo ovlivnit provedení testu. Pokud se mají reagencie používat přerušovaně, musí být zmrazeny v alikvotech.

Vždy se řiďte pokyny správné laboratorní praxe (GLP).

Při testování vzorků noste ochranný oděv, jako jsou laboratorní pláště a jednorázové rukavice.

Během odběru a testování vzorků se vyvarujte kontaktu s nimi.

Se všemi použitými materiály zacházejte jako s potenciálně infekčními a likvidujte je do příslušných nádob na biologicky nebezpečný odpad. Musí být zlikvidovány podle místních zákonů. Extrakci nukleové kyseliny a přípravu reagiencí provádějte odděleně.

Nikdy pipetujte roztoky ústy.

Během dávkování mastermixu se vyhněte vzduchovým bublinám.

Před zahájením amplifikace je odstaňte.

Po manipulaci se vzorky a reagenciemi si důkladně umyjte ruce.

Nemíchejte činidla z různých sarží.

Kit není infekční ani nebezpečný pro zdraví (viz Bezpečnostní list materiálu – MSDS).

V oblasti manipulace se vzorky a reagenciemi soupravy nejezte, nepijte a nekuřte.

Před použitím tohoto testu si pozorně přečtěte všechny pokyny. Nepoužívejte kit po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku obalu.

Nepoužívejte test z poškozeného ochranného obalu.

OMEZENÍ METODY

Extrémní citlivost genové amplifikace může v důsledku křížové kontaminace mezi vzorky a kontrolami způsobit falešně pozitivní výsledky. Proto je potřeba:

- fyzicky oddělit všechny produkty a činidla použítá pro amplifikační reakce od produktů používaných pro jiné reakce, jakož i od produktů po amplifikaci;

- používat špičky s filtry, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi vzorky;

- používat jednorázové rukavice a často je měnit;

- zkumavky otevírat opatrně, aby se zabránilo tvorbě aerosolů;

- zkumavku před otevřením další zkumavky uzavřít.

Správné fungování amplifikační směsi závisí na správném odběru, správném transportu, správném skladování a správné přípravě biologického vzorku.

Stejně jako u jiných diagnostických zařízení musí být výsledky získané tímto produktem interpretovány s ohledem na všechna klinická data a další laboratorní testy provedené na pacientovi.

Negativní výsledek získaný u tohoto produktu naznačuje, že RNA HEV nebyla detekována v RNA extrahované ze vzorku, ale může také obsahovat HEV-RNA s nižším titrem, než je detekční limit pro produkt, v takovém případě by byl výsledek falešně negativní.

Stejně jako u jiných diagnostických zařízení existuje u tohoto produktu zbytkové riziko získání neplatných, falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Skladujte kit ***quanty HEV*** při **–20 °C**.

Kit ***quanty HEV*** se dodává na suchém ledu. Všechny součásti soupravy by měly být zamrazeny.

Pokud jedna nebo více součástí při přijetí nejsou zamražené nebo pokud během přepravy došlo k poškození zkumavek, požádejte o pomoc zástupce společnosti Clonit.

Neporušený a dobře skladovaný produkt má stabilitu 6 měsíců od data výroby. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku obalu.

Je třeba se vyhnout opakovanému rozmrazování a zmrazování činidel (více než dvakrát), protože by to mohlo ovlivnit provedení testu. Pokud se mají reagencie používat přerušovaně, měly by být zamrazeny v alikvotech.

ANALYTICKÝ POSTUP

Manuální extrakce

Ref. 52906. QIAmp Viral RNA Mini Kit

Postup pro plazmu a sérum

Postupujte podle pokynů uvnitř kitu QIAmp Viral RNA Mini Kit.

Po inkubační době 10 minut při pokojové teplotě přidejte 5 µl

Inhibiční kontroly.

Postupujte podle pokynů uvnitř soupravy

Eluujte vzorek v 50 µl pufru AVE. Vzorky jsou nyní připraveny k amplifikaci nebo skladování při -80 °C.

Automatická extrakce

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit

Postup pro plazmu a sérum

Postupujte podle pokynů obsažených v kitu EZ1 XL DSP Virus.

Objem vzorku, který se má použít:

<i>Plazma [µl]</i>	<i>Sérum [µl]</i>
200	200

Příprava nosiče (carrier) a vnitřní kontroly (inhibiční kontrola).

Lyofilizovanou carrier RNA kompletně rozpustte v elučním pufru (AVE), od 310 µl, rozdělte na alikvoty a uložte do –20 ± 5 °C. Neopakujte zmrazování a rozmrazování alikvotů více než 2×. Pro každý analyzovaný vzorek nafedte pomocí elučního pufru (AVE) 3,6 µl originálního roztoku včetně carrier RNA a 10 µl inhibiční kontroly do celkovém objemu 60 µl.

Vyberte protokol začínající 200 µl vzorku a končící elucí do 60 µl.

Postupujte podle pokynů obsažených v soupravě EZ1 XL DSP Virus Kit. Vzorky jsou nyní připraveny k amplifikaci nebo skladování při -80 °C.

NASTAVENÍ SOFTWARE

Lifetechnologies 7500 fast

Zapněte přístroj a počítač a otevřete ovládací software. Klikněte na **“Advance Setup”**: ve výchozím nastavení software zobrazí stránku **“experiment properties”**. Napište do políčka **“experiment name”** jméno souboru, vyberte druh přístroje (**7500 nebo 7500fast**), typ reakce (**quantitation standard curve**), druh použitých reagiencí (**Taqman®Reagents**) a čas analýzy (**Standard ≈ 2 hodiny k dokončení runu**).

Otevřete stránku nazvanou **“page setup”** (list pro pojmenování cílových sekvencí a vzorků – Define **Target and Samples**).

V okně **Define Targets** nastavte:

Cílová sekvence	Reportér	Zhášeč
Sonda HEV	FAM	TAMRA
Sonda pro interní kontrolu (IC)	VIC	TAMRA

Zadejte jména vzorků v okně **“Define Samples”**.

Na stejné stránce **“plate setup”** vyberte možnost **“Assign Target and Samples”**. Na obrazovce uvidíte schéma mikrostředíčky. Vyberte oblast desky, kde budou umístěny kontroly: vyberte jamky desky a nastavte oba cíle (HEV a IC). Vyberte **“Assign target to selected wells”** v prázdném políčku a **“task Standard (S)”** pro cílovou sekvenci HEV a nastavte koncentraci kontrol. Vyberte oblast v destičce, kde bude umístěna negativní kontrola: v prázdném políčku vyberte **“Assign target to selected wells”** a **“task Negative (N)”** pro cílovou sekvenci HEV. Vyberte oblast destičky, na které budou vzorky umístěny: vyberte jamky a nastavte oba cíle (HEV a IC). Propojte každou jamku se vzorkem pomocí okna **“Assign samples to selected wells”**. Pro každý vzorek vyberte v prázdné části **“Assign targets to selected wells”** **“task UnKnown (U)”** pro cílovou sekvenci HEV.

Vyberte oblast destičky, na které budou vzorky umístěny: vyberte jamky a nastavte oba cíle (HEV a IC). Propojte každou jamku se vzorkem pomocí okna **“Assign samples to selected wells”**. Pro každý vzorek vyberte v prázdné části **“Assign targets to selected wells”** **“task UnKnown (U)”** pro cílovou sekvenci HEV.

Nastavte ROX jako pasivní referenci a použijte ji jako normalizátor detekce fluorescence. Otevřete **“Run Method”** (list **Graphic View**) a nastavte správné časy a teploty cyklů.

<i>cykly</i>	<i>denaturace</i>	<i>nasedání primerů</i>	<i>extenze</i>
1	50 °C 30 min		
1	95 °C 2 min		
45	95 °C 15 sec	55 °C 45 sec	72 °C 15 sec

V okně **“Reaction volume plate per well”** nastavte objem 30 µl. Po přípravě destičky a správném vložení destičky do přístroje stiskněte tlačítko **“Start Run”**.

Rotor Gene Q MDx

Nastavení experiment lze provést pomocí průvodce **Quick Start Wizard** nebo Advanced Wizard, které se spustí při zapnutí software. Vyberte průvodce **“Advanced”**. V prvním kroku vyberte model **“Two Step Reaction”** s dvojitým kliknutím na **“New Run”**.

V následujícím okně vyberte ze seznamu typ instalovaného rotoru. Zkontrolujte umístění zajišťovacího kruhu, zaškrtněte políčko **“Locking Ring Attached”** a klikněte na **“Next”**. Zadejte jméno operátora a reakční objem 30 µl, a pak klikněte na **“Next”**.

V následujícím okně klikněte na **"edit profile"**. Nastavte následující podmínky reakce:

<i>cykly</i>	<i>denaturace</i>	<i>nasedání primerů</i>	<i>extenze</i>
1	50 °C 30 min		
1	95 °C 2 min		
45	95 °C 15 sec	55 °C 45 sec	72 °C 15 sec

Vyberte nasedání primerů/extenzi z termálního profilu a klikněte na **“Acquiring A to cycling.”** V dalším okně vyberte žlutý z dostupných kanálů a přidejte jej k snímanému kanálu spolu se zeleným kanálem a klikněte na „OK“. V dalším okně klikněte na „OK“ a poté na „Next“. Klikněte na tlačítko „Edit Gain“ a nastavte následující hodnoty pro každý kanál:

Reportér	Gain
Green	5
Yellow	5

Reakci zahájíte kliknutím na tlačítko **“Start Run”**. Templát můžete uložit před zahájením běhu kliknutím na **„Save Template”**.

Po kliknutí na tlačítko **“Start Run”** se objeví okno **“Save As”**. Po spuštění běhu vám okno **„EditSamples”** umožňuje pojmenovat vzorky a kontroly v pozicích, ve kterých byly načteny do přístroje.

Vyberte místa, kde jsou umístěny, kontroly o známé koncentraci a označte je jako standard HEV. Kliknutím na pole **„Type”** můžete v rozbalovací nabídce **„Samples”** vybrat typ analyzovaného vzorku. Vyberte **„Standards”**. Zadejte koncentrace kontrol.

Vyberte místo, kde jste umístili negativní kontrolu, a pojmenujte ji jako negativní kontrolu. Kliknutím na pole **„Type”** můžete v rozbalovací nabídce **„Samples”** vybrat typ analyzovaného vzorku. Vyberte **“Negative Controls”**.

Vyberte umístění každého vzorku a zadejte jméno nebo kód pacienta. **Samples**“ vybrat typ analyzovaného vzorku. Vyberte možnost **“UnKnown”**

Na konci operace klikněte na "OK" v **“Edit samples”** a vyčkejte do konce runu. Pak je teprve možné provést analýzu dat.

Versant kPCR AD nebo Stratagene MX3005P/MX3000P

Zapněte přístroj a počkejte, dokud obě zelené kontrolky nebudou trvale svítit, zapněte počítač a spusťte ovládací software. Na hlavní obrazovce se objeví okno **“New Experiment Options”**: vyberte **“Experiment type”**: **quantitative PCR (Multiple Standard)**. Před provedením nového experimentu lampu zapněte 20 minut předem. Chcete-li lampu zapnout, klikněte na ikonu lampy na panelu nástrojů nebo vyberte **“Lamp On”** v nabídce **“Instruments”**. Ověřte správné nastavení gainu fluorescenčních reportérů: v nabídce nastavení zvolte: **“Instrument”** a pak **“Filter set gain setting“**.

Reportér	Gain
FAM	4
HEX	4
ROX	1

Klikněte na tlačítko „Setup“ na panelu nástrojů a vyberte „Setup plate“. Popište jamky odpovídající kalibrátorům. Definujte pozice kalibrátoru v pravém menu a nastavte:

Typ jamky:	Fluorescenční data:	Referenční barva:	Replikační symbol:
Standard	FAM/HEX/ROX	ROX	Není

Kliknutím na každou jamku se zobrazí okno „well information“: vyberte název kalibrátoru. V okně **“Select Quantity”** nastavte koncentrace 4 kalibrátorů podle pokynů uvedených v odstavci Interpretace výsledků.

Popište jamky odpovídající negativní kontrole. Definujte pozice NTC v pravém menu a nastavte je:

Typ jamky:	Fluorescenční data:	Referenční barva:	Replikační symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	Není

Kliknutím na libovolnou jamku se zobrazí okno **“well information”**: jako název zadejte NTC.

Popište jamky odpovídající vzorkům. Definujte pozice vzorků v pravém menu a nastavte:

Typ jamky:	Fluorescenční data:	Referenční barva	Replikační symbol:
Neznámý vzorek	FAM/HEX/ROX	ROX	Není

Kliknutím na každou jednotlivou jamku se zobrazí okno **“well information“**: nastavte název nebo kód vzorku.

FAM	HEX
HEV	Interní kontrola

Na panelu nástrojů vyberte list **“Thermal Profile Setup”**, nastavte správně teplotní cykly a čtení fluorescence při nasedání primerů:

<i>cykly</i>	<i>denaturace</i>	<i>nasedání primerů</i>	<i>extenze</i>
1	50 °C 30 min		
1	95 °C 2 min		
45	95 °C 15 sec	55 ° C 45 sec	72 °C 15 sec

Po přípravě destičky a jejím vložení do přístroje stiskněte tlačítko **“Run”**, na listu **Thermal profile status** a zkontrolujte správnost teplotního profilu. Na konci vyberte políčko **Turn Lamp Off**. Stiskněte tlačítko Start: software vás požádá o zadání názvu uloženého souboru. Analýza může začít.

LightCycler 480

Zapněte přístroj a počítač a spusťte ovládací software. Na hlavní obrazovce zapněte **“Experiment Creation”** vyberte **“Plate type”** a stiskněte tlačítko **“New experiment”**. Objeví se okno **„Experiment”**. Na listu **„Run protocol”** nastavte: Teplotní profil, Reakční objem (30 µl) a Detekční formát (**dual colour hydrolysis probe**).

<i>cykly</i>	<i>denaturace</i>	<i>nasedání primerů</i>	<i>extenze</i>
1	50 °C 30 min		
1	95 °C 2 min		
45	95 °C 15 sec	55 °C 45 sec	72 °C 15 sec

Stiskněte tlačítko **“Subset editor”** a v tomto okně vyberte oblast destičky, ve které budou napipetovány kontroly a vzorky. Stiskněte tlačítko **“Sample editor”**. Vyberte správný postup. (Krok1: **Abs quantification**), vyberte podmnožinu vzorků vytvořenou v předchozím kroku a zadejte název pro každou jamku. Vyberte pro každou jamku správný typ vzorku nebo kontroly: Pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo neznámý vzorek. Stiskněte opět tlačítko **“experiment button”**, vložte destičku do přístroje a stiskněte **“start run”**.

PŘÍPRAVA REAKCE:

Rozmrazte zkumavku **Enzyme mMix**;

Rozmrazte zkumavku sond **HEV probes Mix**;

Jemně zvortexujte **6,5 µl Enzyme mMix a 190 µl HEV probes Mix** (dohromady postačí k přípravě **12 amplifikačních reakcí: 4 pozitivní kontroly, 1 negativní kontrola a 7 vzorků**).

Rozpipetujte mix po **15 µl** do vybraných jamek na destičce

odpovídajících nastavení softwaru přístroje.

Napipetujte do příslušné pozice negativní kontroly 15 µl mixu.

Napipetujte do příslušných pozic pro vzorky 15 µl mixu

Napipetujte do příslušných pozic pro pozitivní kontroly 15 µl mixu: po **15 µl** pro **10² kopií/µl, 10³ kopií/µl, 10⁴ kopií/µl a pro 10⁵ kopií/µl**.

Versant kPCR AD nebo Stratagene MX3005P/MX3000P

Klikněte na tlačítko **"Analysis"** na panelu nástrojů. Software se ve výchozím nastavení otevře **"Analysis Term Setting"**. Aktivujte tlačítka FAM a HEX v dolní části obrazovky a vyberte testovací vzorky.

Klikněte na list „Results“; software se ve výchozím nastavení otevře na stránce **„Amplification plot“**. Zkontrolujte správné nastavení prahu v konkrétním okně **„Threshold fluorescence“** v nabídce na pravé straně obrazovky.

Vybráním **“Standard Curve”** z nabídky **“Area to Analyze”** je možné zobrazit data vztažená ke kalibrační křivce a verifikovat parametry popsané v odstavci Interpretace výsledků (korelační koeficient, sklon etc...). Vybráním políčka **„Text report”** z nabídky **“Area to Analyze”** je možné verifikovat data získaná z experimentů: Prahové cykly, emitovaná fluorescence a kvantifikace cíle vyjádřená v kopiích/reakčních kopiích/ml v závislosti na nastavení kalibrační křivky.

Z okna **Text Report** je možné exportovat výsledky získané kliknutím na **file, export** nebo hlavní nabídku.

LightCycler 480

Po dokončení běhu vyberte správný druh analýzy, kterou chcete: **"Abs Quant/Fit Points"**. Vyberte podmnožinu vzorků, kterou chcete analyzovat. Vyberte list **"NoiseBand"**, pod grafem můžete vybrat „NoiseBand (Fluoresc.)“; a přesuňte čáru NoisBand na grafu pomocí myši vašeho PC. Tuto akci opakujte pro každý fluorofor pomocí tlačítka **„Filter comb”**. Kliknutím na list **„Analysis“** můžete nastavit práh výběrem možnosti „Prah (ruční).

Po nastavení parametrů stiskněte tlačítko **„Calculate"**. Tuto akci opakujte pro každý fluorofor.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Prostřednictvím qPCR reakce v reálném čase je možné získat RNA kvantifikaci HEV-RNA nastavením hodnot pozitivních kontrol kalibrační křivky. Pro výpočet těchto hodnot je třeba vzít v úvahu všechny kroky ředění, které vzorek podstoupil během fáze extrakce a amplifikace.

Hodnoty Ct získané amplifikací 4 kontrol známého titru jsou používány softwarem pro výpočet kalibrační křivky, ze které jsou interpolovány neznámé vzorky. Správné fungování amplifikační směsi lze ověřit analýzou těchto parametrů:

Parametry	Reference
RTS konc. 10 ⁵ kopií/μl (FAM)	Ct ≤ 22
Korelační koeficienty	0.990 ≤ r ² ≤ 1
Křivka	-3,6 ≤ sklon ≤ 3,2
PCR účinnost	90 ≤ účinnost ≤ 100

Pokud RTS amplifikační reakce při koncentraci 105 kopií vytvoří Ct> 22 nebo neurčená, relace nemůže být považována za platnou a musí být opakována.

Ověřte, zda hodnota korelačního koeficientu (r²), sklon nebo účinnost reakce odpovídají limitům uvedeným ve výše uvedené tabulce nebo se od nich příliš neodchylují, což představuje ideální rozsah pro správnou reakci PCR.

Správným nastavením koncentrace standardů jako funkce extrakčního systému získáte kvantifikaci vzorku přímo v kopiích / ml:

		Manuální extrakce Ref. 52906 (QIAGEN)	Automatická extrakce Ref. 62724 (QIAGEN)	Alternativní extrakce
	RTS 1	35.700.000 kopií	30.000.000 kopií	1.500.000 kopií
	RTS 2	3.570.000 kopií	3.000.000 kopií	150.000 kopií
	RTS 3	357.000 kopií	300.000 kopií	15.000 kopií
	RTS 4	35.700 kopií	30.000 kopií	1.500 kopií

Pokud se použijí alternativní systémy, získá se koncentrace vzorku vyjádřená v kopiích / ml pomocí vzorce:

$$copie / ml = \frac{1000}{Ve} \times \frac{Ev}{Ea} \times C_{real}$$

Kde

- Ve: extrahovaný vzorek Objem vyjádřený v μl
- Ev: eluovaný vzorek Objem během fáze extrakce vyjádřený v μl
- Ea: extrahovaný objem vzorku použitý pro amplifikaci vyjádřený v μl
- C_{real}: kopie poskytnuté nástrojem.

Stejně jako u jiných diagnostických zařízení musí být výsledky získané s tímto přípravkem interpretovány s ohledem na všechna klinická data a další laboratorní testy provedené na pacientovi.

Stejně jako u jiných diagnostických zařízení existuje u tohoto produktu zbytkové riziko získání neplatných, falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků.

Použití pozitivních a negativních kontrol v každé amplifikační relaci umožňuje ověření správného fungování amplifikační směsi a absence kontaminace.

V amplifikační reakci každého vzorku jsou hodnoty Ct pro sondu specifickou pro vnitřní kontrolu použity k ověření analytické relace, od extrakčního procesu až po detekční krok.

V amplifikační reakci každého vzorku se hodnoty Ct pro sondu specifickou pro vnitřní kontrolu používají k ověření analýzy, od procesu reverzní transkripce až po detekční krok.

Ujistěte se, že vyzařovaná fluorescence při zesílení vnitřní kontroly nemá Ct> 30 nebo není určeno. Pokud vzorek vykazuje neurčenou HEV RNA a vnitřní kontrolu Ct> 30, znamená to, že se vyskytly problémy ve fázi extrakce nebo ve fázi amplifikace; proto může být vzorek falešně negativní.

Opakování analýzy vzorku.

Lze považovat za platné pro vzorky s Ct> 30 pro vnitřní kontrolu a vysokou koncentraci HEV RNA. V tomto případě může kompetitivní charakter PCR skrytý nebo znevýhodnit amplifikaci vnitřní kontroly.

Detektor FAM	Detektor VIC/Hex	PCR Run	vzorek
Ct neurčeno	Ct > 30 nebo neurčeno	neplatný	opakovat
Ct neurčeno	Ct < 30	platný	negativní
Vysoké Ct	Ct < 30	platný	pozitivní
Nízké Ct	Ct > 30 nebo neurčeno	platný	vysoce pozitivní

VÝKONNOST

Analytická senzitivita:

Za analytickou citlivost se považuje nejvyšší zředění (titr), na které lze pozitivní vzorek naředit, aniž by systém ztratil schopnost vzorek detekovat s mírou pozitivity ≥ 95 %. Analytická citlivost systému byla stanovena analýzou syntetické RNA, kvantifikované spektrofotometrickou analýzou, obsahující zájmové oblasti (ORF3) viru v sériových ředěních.

Analytická citlivost ***quanty HEV*** stanovena pomocí analýzy Probit.

Přístroj	Kopie/μl	95% interval spolehlivosti
7500 Fast	0.348 cps/ul	Inf. 0.153 cps/ul Sup.3.364 cps/ul
RotorGene Q MDx	0.39 cps/ul	Inf. 0.178 cps/ul Sup.2.149 cps/ul
<i>Versant kPCR AD</i>	0.3 cps/ul	Inf. 0.12 cps/ul Sup.1.84 cps/ul

Přístroj	Kopie/μl	95% interval spolehlivosti
7500 Fast	104 cps/ml	Inf. 45.9 cps/ml Sup.1000 cps/ml
RotorGene Q MDx	117 cps/ml	Inf. 53 cps/ml Sup. 645 cps/ml
<i>Versant kPCR AD</i>	90 cps/ml	Inf. 36 cps/ml Sup. 552 cps/ml

Klinická senzitivita:

Za klinickou senzitivitu se považuje schopnost detekovat pravdivé pozitivní vzorky v celkovém počtu testovaných vzorků jako pozitivní. Analýza byla provedena na HEV pozitivních vzorcích a test byl proveden podle doporučení dané metody. Pozitivní vzorky byly potvrzeny další CE metodou.

Získané výsledky ukazují klinickou citlivost 100 %.

Diagnostická specifita:

Za diagnostickou specifitou se považuje schopnost metody detekovat pravdivé negativní vzorky. Diagnostická specifita systému byla hodnocena analýzou testovaných lidských vzorků a potvrzena jako HEV negativní pomocí jiné CE metody. Diagnostická specifita je 100 % pro materiál extrahovaný z plazmy.

Analytická Specifita:

Specifita testu byla zaručena použitím specifických primerů pro HEV. Přřazení oblastí výběru pro hybridizaci specifických primerů pro HEV s dostupnými sekvencemi oblasti ORF3 přítomné v databázích, prokázalo: jejich konzervativnost, nepřítomnost významných mutací a úplnou specifitu pro analyzovaný cíl. Genotypy obsažené v referenčním panelu WHO byly pomocí soupravy "quanty HEV" úspěšně detekovány, což ukazuje, že souprava je schopna amplifikovat:

Genotyp 1
Genotyp 2
Genotyp 3
Genotyp 4

Sledovatelnost versus kontrola WHO

Použitý standard (kód PEI 8578/13, verze 2.0 ze dne listopadu) byl zaveden jako 1. mezinárodní referenční panel WHO pro genotypy RNA viru hepatitidy typu E pro testy založené na technologii amplifikace nukleových kyselin (NAT).

Vzorek	Matrice	Genotyp	Průměrný Log (IU/ml)	Získané výsledky IU/ml
8567/13	Plazma	1a	2.64	2.60
8568/13s	Stolice	1a	4.25	4.64
8569/13	Plazma	1e	3.25	3.66
8570/13	Plazma	3b	4.20	3.38
8571/13	Plazma	3c	3.40	2.61
8572/13	Plazma	3e	3.50	2.75
8573/13	Plazma	3f	3.84	3.71
8574/13s	Stolice	3	4.98	4.36

8575/13	Plazma	4c	4.07	3.57
8576/13	Plazma	4g	3.77	3.69
8577/13s	Stolice	2a	5.42	5.63

Průměrný faktor konverze pro quanty HEV Kit:

1 kopie/ml = 1 IU/ml

1 kopie/ml = 1 IU/ml

Baylis SA, Terao E, Hanschrmann KM, Collaborative Sudy to establish the **1st WHO International Reference Panel for Hepatitis E Virus RNA genotypes for Nucleic Acid Amplification technology (NAT) based assays**. WHO Report 2015, WHO/BS/2015.2264

Křížová reaktivita:

Zkouška přiřazení oblasti vybrané pro hybridizaci primerů specifických pro HEV se sekvencemiORF3 dostupnými v databázích oblasti ukázala jejich konzervativnost, nepřítomnost významných mutací a úplnou specifitu pro analyzovaný cíl.

Pro kontrolu zkřížené reaktivity testu byly analyzovány vzorky pozitivní na jiné viry.

Vzorek	Pozitivní vzorek	Získaný výsledek cps/ml
1	HCV	Negativní
2	HBV	Negativní
3	HDV	Negativní
4	Enterovirus	Negativní
5	HIV	Negativní

INTERFERENCE:

Ověřte, že v RNA extrahované ze vzorku nedochází ke kontaminaci mukoproteiny a hemoglobinem, aby se vyloučila možná inhibice reakce PCR. Interference způsobená kontaminací může být detekována spektrofotometrickou analýzou, ověřující poměr mezi hodnotami absorbance při 260 nm (maximální absorbance nukleových kyselin) a 280 nm (maximální absorbance proteinů). Čistá RNA by měla mít tento poměr přibližně 2.

KONTROLA KVALITY

Doporučuje se zahrnout do každé analytické zkoušky jako kontrolu kvality každého kroku extrakce, amplifikace a detekce již testovaný negativní a pozitivní vzorek nebo referenční materiál se známou koncentrací.

V souladu s certifikovaným systémem managementu kvality Clonit srl ISO EN 13485 je každá šarže HEV testována podle předem stanovené specifikace, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

BIBLIOGRAFIE

Sally A. Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, Kay-Martin O. Hanschmann. **Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays**. WHO/BS/2011.2175








Sally A. Baylis at al. **Standardization of HEV Nucleic Acid Amplification Technique based assays: an Initial study to evaluate a panel of HEV Strains and investigate laborator performance**. Journal of Clinical microbiology, Apr. 2011, p1234-1239

Baylis SA, Terao E, Hanschrmann KM, Collaborative Sudy to establish the **1st WHO International Reference Panel for Hepatitis E Virus RNA genotypes for Nucleic Acid Amplification technology (NAT) based assays**. WHO Report 2015, WHO/BS/2015.2264

TECHNICKÁ POMOC

V případě jakýchkoli dotazů a podpory se obraťte na naši technickou podporu:

Mgr. Jiří Smutný
(aplikační specialista molekulární biologie)
Čechy a Morava
e-mail: smutny@biovendor.cz
tel.: +420 601 394 077

	Zařízení pro diagnostiku <i>In vitro</i>
	Čtete návod k použití
	Teplotní rozsah
	Použitelné do (dd/mm/yyyy)
	Šarže (xxxx)
	Identifikační kód
	Výrobce
	Dostatečné pro <n> testů

EDMA: 15020540

CND: W0105020507

Kit **quanty HEV** je diagnostická souprava s označením CE podle evropské in vitro diagnostické směrnice 98/79/CE.

CLONIT

S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano
Production Site: Via B. Quaranta 57 - 20139 Milano

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

CLONIT

S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano
Production Site: Via B. Quaranta 57 - 20139 Milano

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

CLONIT

S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano
Production Site: Via B. Quaranta 57 - 20139 Milano

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

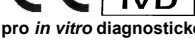
CLONIT

S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano
Production Site: Via B. Quaranta 57 - 20139 Milano

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it



pro *in vitro* diagnostické použití