

Marzec 2021 r.

artus[®] CMV RG PCR Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)



24 (nr katalogowy 4503263)



96 (nr katalogowy 4503265)

Wersja 1

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do stosowania z aparatami Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R6 **MAT**

1123965PL

Spis treści

Przeznaczenie.....	5
Opis i zasada procedury.....	5
Informacje o patogenie.....	6
Zasada procedury.....	6
Dostarczone materiały.....	7
Zawartość zestawu.....	7
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	8
Odczynniki.....	8
Materiały eksploatacyjne.....	8
Wyposażenie.....	8
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	9
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	9
Środki ostrożności.....	9
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	10
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	10
Pobieranie próbek.....	11
Przechowywanie próbek.....	11
Transport próbek.....	11
Procedura.....	12
Izolacja DNA.....	12
Kontrola wewnętrzna.....	13
Protokół: Reakcja PCR i analiza danych.....	14

Interpretacja wyników	23
Oznaczenie ilościowe	23
Wyniki	24
Kontrola jakości	27
Ograniczenia	27
Parametry skuteczności	28
Czułość analityczna	28
Zakres liniowy	30
Swoistość	31
Precyzja	33
Substancje zakłócające	35
Odporność	37
Odtwarzalność	37
Ocena diagnostyczna	39
Literatura	41
Rozwiązywanie problemów	42
Symbole	44
Dane do zamówienia	45
Historia zmian dokumentu	49

Przeznaczenie

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit to test amplifikacji kwasu nukleinowego in vitro przeznaczony do ilościowego oznaczenia DNA cytomegalowirusa (Cytomegalovirus, CMV) w ludzkim osoczu. Ten diagnostyczny zestaw testowy wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) i jest skonfigurowany do użytku z aparatami Rotor-Gene Q.

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit, używany w połączeniu z danymi dotyczącymi stanu klinicznego i innych markerów laboratoryjnych, służy do kontrolowania zakażenia wirusem CMV u pacjentów obarczonych ryzykiem rozwoju cytomegalii.

Wyniki uzyskane za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit należy interpretować w kontekście wszystkich istotnych obserwacji klinicznych i wyników badań laboratoryjnych.

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit nie jest przeznaczony do stosowania jako test przesiewowy pod kątem obecności wirusa CMV we krwi lub w produktach krwiopochodnych ani jako test diagnostyczny w celu potwierdzenia zakażenia wirusem CMV.

Opis i zasada procedury

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit jest gotowym do użycia systemem przeznaczonym do wykrywania materiału DNA wirusa CMV za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) w aparatach Rotor-Gene Q MDx. W skład zestawu CMV RG Master wchodzi odczynniki i enzymy do swoistej amplifikacji regionu genomu CMV kodującego główny gen bezpośredni wczesny (Major Immediate Early Gene, *MIE*) o długości 105 pz (oznaczenie umożliwia wykrycie genotypów gB1–gB4 wirusa CMV) oraz do bezpośredniego wykrywania tego amplikonu w kanale fluorescencyjnym Cycling Green aparatu Rotor-Gene Q MDx.

Ponadto zestaw *artus* CMV RG PCR Kit zawiera drugi, heterologiczny system amplifikacji, służący do wykrywania potencjalnej inhibicji reakcji PCR. Wykrywa się ją jako kontrolę wewnętrzną (Internal Control, IC) w kanale fluorescencyjnym Cycling Yellow aparatu Rotor-Gene Q MDx. Dostarczone zewnętrzne kontrole pozytywne (CMV QS 1–4) umożliwiają określenie ilości wirusowego DNA. Więcej informacji zawiera część „Oznaczenie ilościowe”, strona 23.

Informacje o patogenie

Ludzki wirus cytomegalii (CMV) jest wykrywany we krwi, tkankach i prawie wszystkich wydzielinach zakażonych osób. Wirus może przenosić się drogą oralną, poprzez kontakty seksualne, transfuzję krwi lub przeszczep narządu, wewnątrzmacicznie lub okołoporodowo (1–4). Testy pod kątem miana wirusa CMV odgrywają ważną rolę w ocenie ryzyka choroby, ustalaniu rozpoznania choroby oraz monitorowaniu odpowiedzi na leczenie (5).


Zakażenie wirusem CMV często jest bezobjawowe i prowadzi do utrzymywania się wirusa w organizmie do końca życia. Objawy zakażenia u nastolatków lub dorosłych przypominają objawy mononukleozy z gorączką, słabo nasilonymi objawami zapalenia wątroby oraz ogólnego osłabienia (6). Ciężki przebieg zakażenia wirusem CMV zaobserwowano zwłaszcza u noworodków zakażonych wewnątrzmacicznie oraz u pacjentów z niedoborami odporności (4,7).

Zasada procedury

Wykrywanie patogenu za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) opiera się na amplifikacji swoistych regionów genomu patogenu. W przypadku reakcji real-time PCR amplifikowany produkt jest wykrywany za pomocą barwników fluorescencyjnych. Zwykle są one przyłączone do sond oligonukleotydowych, które wiążą się swoiście z amplifikowanym produktem. Monitorowanie natężenia fluorescencji podczas przebiegu reakcji PCR (tzn. w czasie rzeczywistym) umożliwia wykrycie i oznaczenie ilościowe gromadzącego się produktu bez konieczności ponownego otwierania probówek po zakończeniu reakcji PCR (8).

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

artus CMV RG PCR Kit		(24)	(96)
Nr katalogowy		4503263	4503265
Liczba reakcji		24	96
Niebieski	CMV RG Master (polimeraza Taq 0,1 U/μl)		2 x 12 reakcji
Żółty	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 μl
Czerwony	CMV QS 1 [†] (1 x 104 kopie/μl)	QS	200 μl
Czerwony	CMV QS 2 [†] (1 x 103 kopie/μl)	QS	200 μl
Czerwony	CMV QS 3 [†] (1 x 102 kopie/μl)	QS	200 μl
Czerwony	CMV QS 4 [†] (1 x 101 kopii/μl)	QS	200 μl
Zielony	CMV RG IC‡	IC	1000 μl
Biały	Water (Woda) (odpowiednia do PCR)		1000 μl
	Instrukcja użycia		1

* Roztwór magnezu.

† Quantitation Standard — wzorec ilościowy

‡ Internal Control — kontrola wewnętrzna

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Odczynniki

- Zestaw do izolacji DNA (patrz część „Izolacja DNA”, strona 12)

Materiały eksploatacyjne

- Jałowe końcówki do pipet z filtrami
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, do stosowania w rotorze 72-Well Rotor (nr kat. 981103 lub 981106)
- **Zamiennie:** PCR Tubes, 0.2 ml, do stosowania w rotorze 36-Well Rotor (nr kat. 981005 lub 981008)

Wyposażenie

- Pipety (z regulacją)*
- Wytrząsarka*
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 2 ml
- Aparaty Rotor-Gene Q MDX* z kanałami fluorescencyjnymi Cycling Green i Cycling Yellow
- Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.3.5 lub wyższej
- Blok chłodzący (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, nr kat. 9018901, lub Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, nr kat. 9018905)

* Przed użyciem upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyk dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące kwestie:

- Używać jałowych końcówek do pipet z filtrami.
- Materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) przechowywać i izolować oddzielnie względem innych odczynników i dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w osobnym miejscu.
- Przed rozpoczęciem oznaczenia całkowicie rozmrozić wszystkie odczynniki w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszać składniki (kilka razy pipetując w górę i w dół lub wytrząsając pulsacyjnie), a następnie krótko odwirować.
- Pracować szybko i trzymać składniki na lodzie lub w bloku chłodzącym (72/96-dołkowy blok ładowania).

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Składniki zestawu *artus* CMV RG PCR Kit należy przechowywać w temperaturze od -30°C do -15°C , w której zachowują stabilność aż do daty ważności podanej na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania ($>2\times$), ponieważ może to doprowadzić do obniżenia czułości oznaczeń. Jeśli odczynniki będą używane sporadycznie, należy zamrozić je w porcjach. Czas przechowywania w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ nie powinien przekraczać 5 godzin.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Uwaga: Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.

Uwaga: Wyniki badań analitycznych przeprowadzonych w celu weryfikacji działania tego zestawu wskazują osocze EDTA jako materiał próbki najlepiej nadający się do testów wykrywających wirusa CMV. Z tego względu zalecamy używanie tego materiału z zestawem *artus* CMV RG PCR Kit.

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit zwalidowano za pomocą próbek ludzkiego osocza EDTA. Inne materiały próbek nie zostały zwalidowane. Do przygotowania próbek należy używać wyłącznie zalecanego zestawu do izolacji kwasów nukleinowych (patrz część „Izolacja DNA”, strona 12).

W przypadku stosowania określonych materiałów próbek należy ściśle przestrzegać instrukcji dotyczących ich pobierania, transportowania i przechowywania.

Pobieranie próbek

Każde pobranie krwi powoduje uraz naczyń krwionośnych (tętnic, żył, naczyń włosowatych). Należy korzystać tylko z niezakaźnych i jałowych materiałów. Do pobierania krwi powinien być dostępny odpowiedni sprzęt jednorazowego użytku. Do nakłuć żył nie należy używać zbyt cienkich kapilar. Krew żylną należy pobierać z odpowiednich miejsc zgięcia łokciowego, przedramienia lub grzbietu dłoni. Krew należy pobierać do standardowych probówek do pobierania próbek (z czerwoną zatyczką, firmy Sarstedt® lub odpowiednik innego producenta). Należy pobrać objętość 5–10 ml krwi do probówki z EDTA. Zawartość probówek należy wymieszać, odwracając probówki tuż po pobraniu próbki (8x, nie wstrząsać).

Uwaga: Nie należy używać próbek heparynizowanych.

Przechowywanie próbek

Krew pełną należy w ciągu 6 godzin rozdzielić na osocze i składniki komórkowe, wirując ją przez 20 minut przy 800–1600 x g (9,10). Oddzielone osocze należy przenieść do jałowych próbek polipropylenowych. Rutynowe mrożenie próbek lub przechowywanie ich przez dłuższy czas może zmniejszyć czułość oznaczenia.

Transport próbek

Podstawową zasadą jest transportowanie materiału próbek w odpornym na rozbitcie pojemniku. W ten sposób można zapobiec potencjalnemu niebezpieczeństwu zakażenia spowodowanego wyciekami materiału próbki. Probki należy transportować zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami prawa dotyczącymi transportu materiału zakaźnego*.

Probki należy wysłać w ciągu 6 godzin. Nie jest zalecane przechowywanie próbek w miejscu, gdzie zostały pobrane. Można przesyłać próbki pocztą, pod warunkiem przestrzegania przepisów prawa dotyczących transportu materiału zakaźnego. Zalecany jest transport próbek kurierem. Probki krwi należy transportować schłodzone (2–8°C), a oddzielone osocze — głęboko zamrożone (od –30 do –15°C).

* Międzynarodowe Zrzeszenie Przewoźników Powietrznych (International Air Transport Association, IATA). Przepisy dotyczące transportu materiałów niebezpiecznych w międzynarodowym transporcie lotniczym (Dangerous Goods Regulations).

Procedura

Izolacja DNA

Przedstawione zestawy firmy QIAGEN (Tabela 1) zostały zwalidowane do oczyszczania wirusowego DNA we wskazanych typach ludzkich próbek stosowanych z zestawem *artus* CMV RG PCR Kit. Oczyszczanie wirusowego DNA należy wykonywać zgodnie z instrukcjami zawartymi w odpowiednich instrukcjach obsługi zestawów.

Tabela 1. Zestawy do oczyszczania zwalidowane do stosowania z zestawem *artus* CMV RG PCR Kit

Materiał próbki	Objętość próbki	Zestaw do izolacji kwasów nukleinowych	Numer katalogowy	Nośnik RNA
Osocze EDTA	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Zawarty w zestawie
Osocze EDTA	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Zawarty w zestawie

Uwaga: Użycie nośnika RNA ma kluczowe znaczenie dla wydajności izolacji i, co za tym idzie, dla uzysku DNA/RNA. Aby zwiększyć stabilność nośnika RNA dostarczonego z zestawem QIAamp DSP Virus Kit, zalecamy postępowanie zgodnie z informacjami dotyczącymi rekonstrukcji i przechowywania nośnika RNA podanymi w części „Przygotowywanie odczynników i buforów” dokumentu *QIAamp DSP Virus Kit — Instrukcja obsługi*.

Uwaga: Kontroli wewnętrznej zestawu *artus* CMV RG PCR Kit można używać bezpośrednio w procedurze izolacji. W procedurze izolacji należy uwzględnić jedną negatywną próbkę osocza. Sygnał otrzymany dla kontroli wewnętrznej jest podstawą do oceny izolacji (patrz część „Kontrola wewnętrzna” poniżej).

Kontrola wewnętrzna

Wraz z zestawem dostarczana jest kontrola wewnętrzna (CMV RG IC). Dzięki temu użytkownik może kontrolować procedurę izolacji DNA i sprawdzać przebieg reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji. Takie zastosowanie wymaga dodania kontroli wewnętrznej do procedury izolacji w stosunku 0,1 μ l na 1 μ l objętości elucji. Na przykład w przypadku korzystania z zestawu QIAamp DSP Virus Kit proces elucji DNA zachodzi w 60 μ l buforu do elucji (AVE). Z tego względu na początku należy dodać 6 μ l kontroli wewnętrznej. Ilość używanej kontroli wewnętrznej zależy wyłącznie od objętości elucji.

Uwaga: Kontrolę wewnętrzną i nośnik RNA (patrz „Izolacja DNA”, strona 12) należy dodawać wyłącznie do mieszaniny buforu do lizy i materiału próbki lub bezpośrednio do buforu do lizy.

Kontroli wewnętrznej nie wolno dodawać bezpośrednio do materiału próbki. W przypadku dodawania kontroli wewnętrznej do buforu do lizy należy zauważyć, że mieszaninę kontroli wewnętrznej i buforu do lizy-nośnika RNA należy przygotować na świeżo i niezwłocznie jej użyć (przechowywanie mieszaniny w temperaturze pokojowej lub w lodówce przez zaledwie kilka godzin może doprowadzić do nieprawidłowego działania kontroli wewnętrznej i obniżenia wydajności izolacji).

Uwaga: Nie dodawać kontroli wewnętrznej i nośnika RNA bezpośrednio do materiału próbki.

Aby można było uznać proces izolacji za pomyślny, C_T kontroli wewnętrznej próbki negatywnego osocza, którą przetworzono w procesie oczyszczania (QIAamp DSP Virus Kit), musi osiągnąć wartość 27 ± 3 (próg: 0,03) podczas korzystania z aparatów Rotor-Gene Q (więcej informacji podano na stronie 26). Określony rozrzut wynika z wariacji między aparatami oraz procesami oczyszczania. Większe odchylenie wskazuje na problem z oczyszczeniem. W takim przypadku należy sprawdzić poziom oczyszczenia i, w razie konieczności, zwalidować je po raz drugi. W razie jakichkolwiek pytań lub napotkania problemów należy skontaktować się z serwisem technicznym firmy QIAGEN.

Opcjonalnie kontroli wewnętrznej można użyć wyłącznie do kontroli przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji. Takie zastosowanie wymaga dodania kontroli wewnętrznej bezpośrednio do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol, zgodnie z instrukcjami opisanymi w kroku 2b protokołu (strona 15).

Protokół: Reakcja PCR i analiza danych

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem protokołu zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q. Więcej informacji podano w podręczniku użytkownika odpowiedniego aparatu.
- Upewnić się, że do każdej reakcji PCR dołączono co najmniej jeden wzorzec ilościowy, jak również co najmniej jedną kontrolę negatywną (woda odpowiednia do PCR). Aby wyznaczyć krzywą wzorcową, do każdej reakcji PCR należy użyć wszystkich 4 dostarczonych wzorców ilościowych (CMV QS 1–4).

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że blok chłodzący (akcesorium aparatu Rotor-Gene Q) jest wstępnie schłodzony do temperatury 2–8°C.
- Przed rozpoczęciem całkowicie rozmrozić, wymieszać (kilka razy pipetując w górę i w dół lub szybko wytrząsając) i krótko odwirować wszystkie odczynniki.

Procedura

1. Umieścić żądaną liczbę probówek PCR w adapterach bloku chłodzącego.
2. W przypadku używania kontroli wewnętrznej do monitorowania procedury izolacji DNA i sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji należy przejść do kroku 2a. W przypadku używania kontroli wewnętrznej wyłącznie do sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji należy przejść do kroku 2b.

Uwaga: Wysoce zalecane jest dodanie kontroli wewnętrznej do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol używanych do wzorców ilościowych. Na potrzeby wzorców ilościowych należy dodać kontrolę wewnętrzną bezpośrednio do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol, zgodnie z instrukcjami opisanymi w kroku 2b protokołu, i używać tej mieszaniny Master Mix do każdego wzorca ilościowego (CMV QS 1–4).

2a. Kontrolę wewnętrzną dodano już do procedury izolacji (patrz część *Kontrola wewnętrzna*, strona 13). W takim przypadku należy przygotować mieszaninę Master Mix zgodnie z Tabelą 2 (na kolejnej stronie).

Mieszanina reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR z wyjątkiem próbki.

Tabela 2. Przygotowanie mieszaniny Master Mix (kontrola wewnętrzna używana do monitorowania izolacji DNA i sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji)

Liczba próbek	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Całkowita objętość	30 µl	360 µl

2b. Wymagane jest dodanie kontroli wewnętrznej bezpośrednio do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol. W takim przypadku należy przygotować mieszaninę Master Mix zgodnie z Tabelą 3.

Mieszanina reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR z wyjątkiem próbki.

Tabela 3. Przygotowanie mieszaniny Master Mix (kontrola wewnętrzna używana wyłącznie do sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji)

Liczba próbek	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Całkowita objętość	32 µl*	384 µl*

* Wzrost objętości spowodowany dodaniem kontroli wewnętrznej jest pomijany podczas przygotowania reakcji PCR. Nie obniża to czułości systemu detekcji.

3. Za pomocą pipety przenieść 30 µl mieszaniny Master Mix do każdej probówki PCR, a następnie dodać 20 µl próbki DNA po elucji (patrz Tabela 4). Analogicznie jako kontroli pozytywnej należy użyć 20 µl co najmniej jednego ze wzorców ilościowych (CMV QS 1–4), a jako kontroli negatywnej 20 µl wody (woda odpowiednia do PCR).

Tabela 4. Przygotowanie reakcji PCR

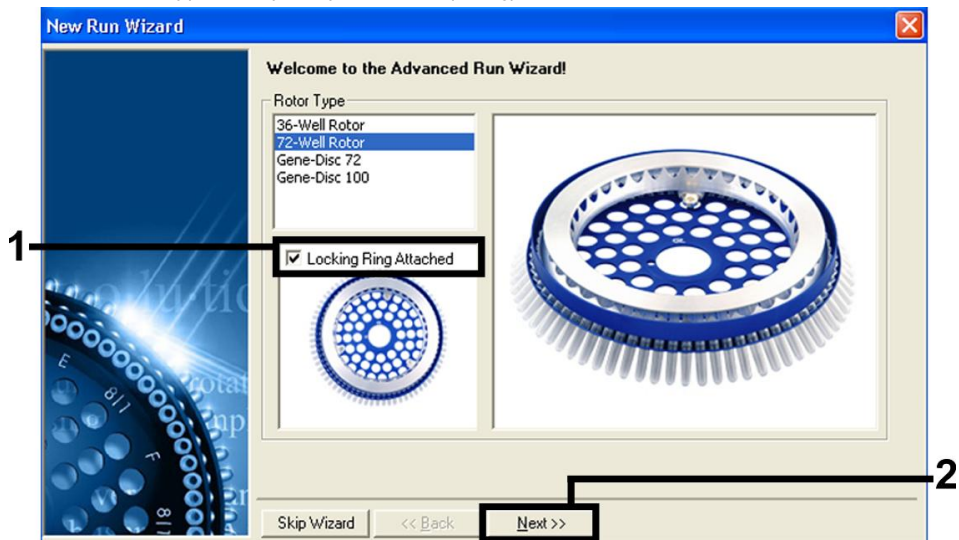
Liczba próbek	1	12
Mieszanina Master Mix	30 µl	30 µl na każdą
Próbka	20 µl	20 µl na każdą
Całkowita objętość	50 µl	50 µl na każdą
Liczba próbek	1	12

4. Zamknąć probówki do reakcji PCR. Upewnić się, że pierścień blokujący (akcesorium do aparatu Rotor-Gene) jest umieszczony na górze rotora, aby zapobiec przypadkowemu otwarciu się probówek podczas cyklu.
5. W celu detekcji DNA wirusa CMV utworzyć profil temperaturowy zgodnie z poniższymi krokami.

Ustawianie ogólnych parametrów oznaczenia	Ryc. 1, Ryc. 2 i Ryc. 3
Wstępna aktywacja enzymu typu hot-start	Ryc. 4
Amplifikacja DNA (touchdown PCR)	Ryc. 5
Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego	Ryc. 6
Rozpoczynanie reakcji	Ryc. 7

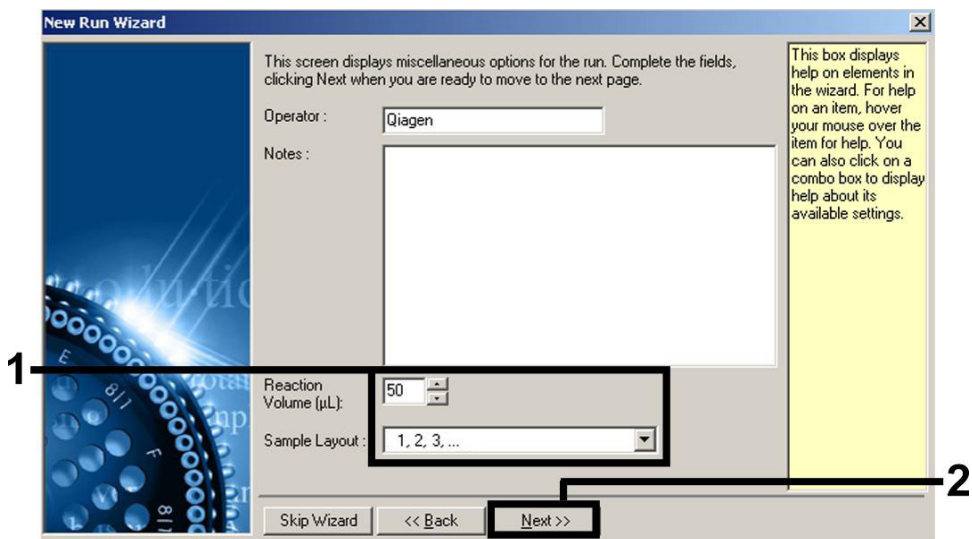
Cała specyfikacja odnosi się do oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.3.5 lub wyższej. Dalsze informacje na temat programowania aparatów Rotor-Gene można znaleźć w odpowiednich podręcznikach użytkownika aparatów. Na ilustracjach odpowiednie ustawienia zakreślono czarnymi ramkami. Przedstawione ilustracje dotyczą aparatów Rotor-Gene Q.

6. Otworzyć okno dialogowe **New Run Wizard** (Kreator nowej reakcji) (Ryc. 1 na kolejnej stronie). Zaznaczyć pole wyboru **Locking Ring Attached** (Pierścień blokujący zamocowany) i kliknąć przycisk **Next** (Dalej).



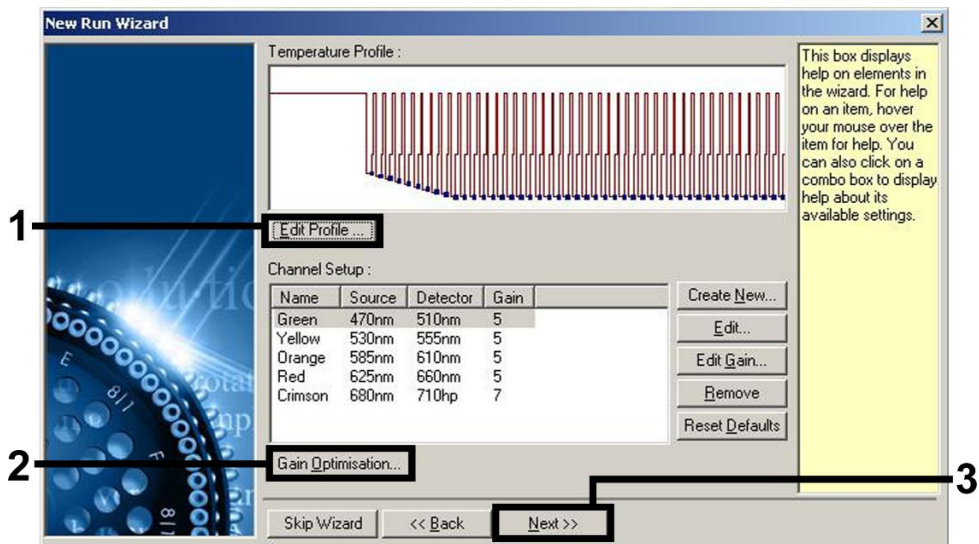
Ryc. 1. Okno dialogowe „New Run Wizard” (Kreator nowej reakcji).

7. Wybrać wartość 50 dla objętości reakcji PCR, a następnie kliknąć przycisk **Next** (Dalej) (Ryc. 2).

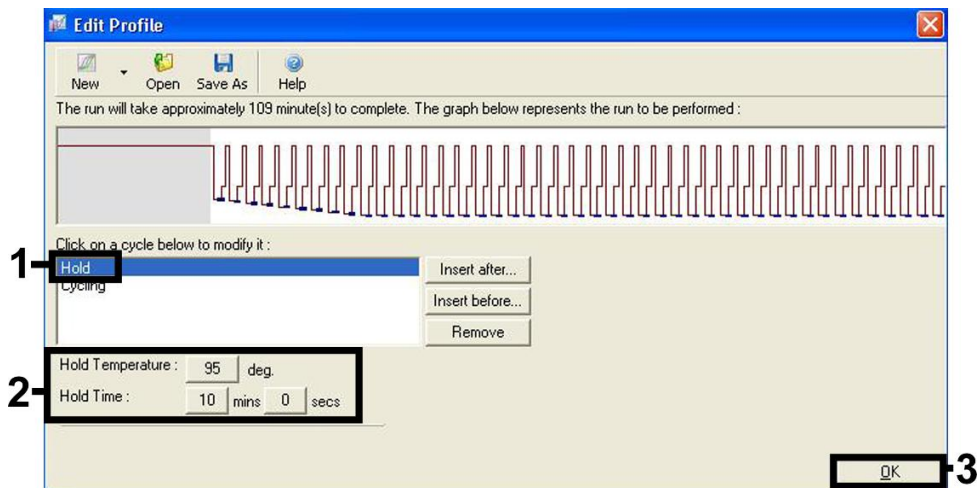


Ryc. 2. Ustawianie ogólnych parametrów oznaczenia.

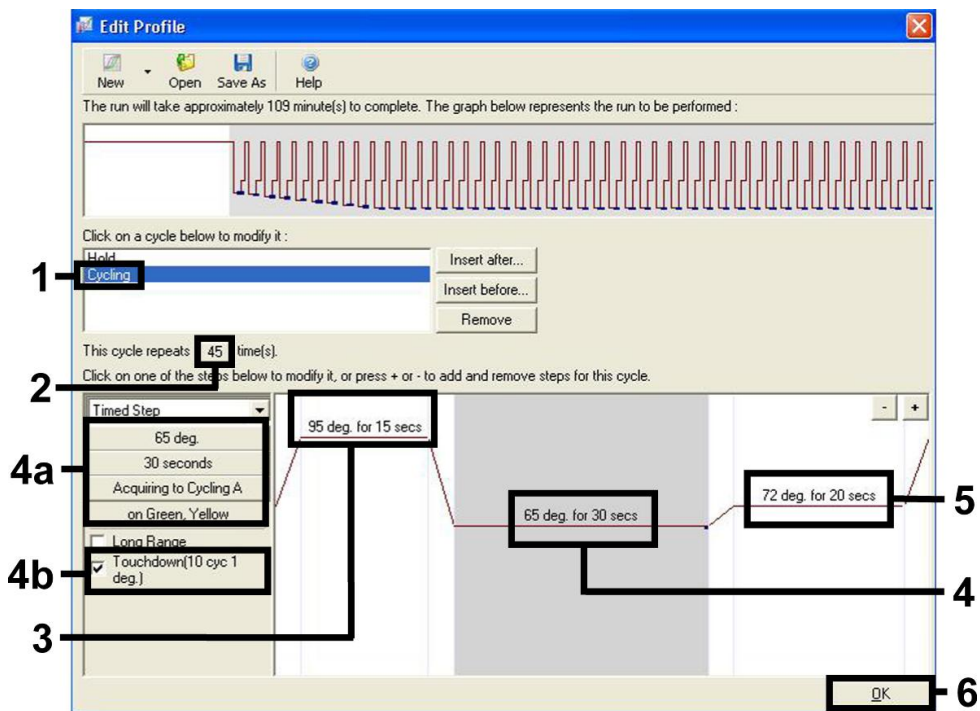
8. Kliknąć przycisk **Edit Profile** (Edytuj profil) w kolejnym oknie dialogowym **New Run Wizard** (Kreator nowej reakcji) (Ryc. 3), a następnie zaprogramować profil temperaturowy w sposób przedstawiony na rycinach (od Ryc. 3 do Ryc. 5).



Ryc. 3. Edycja profilu.

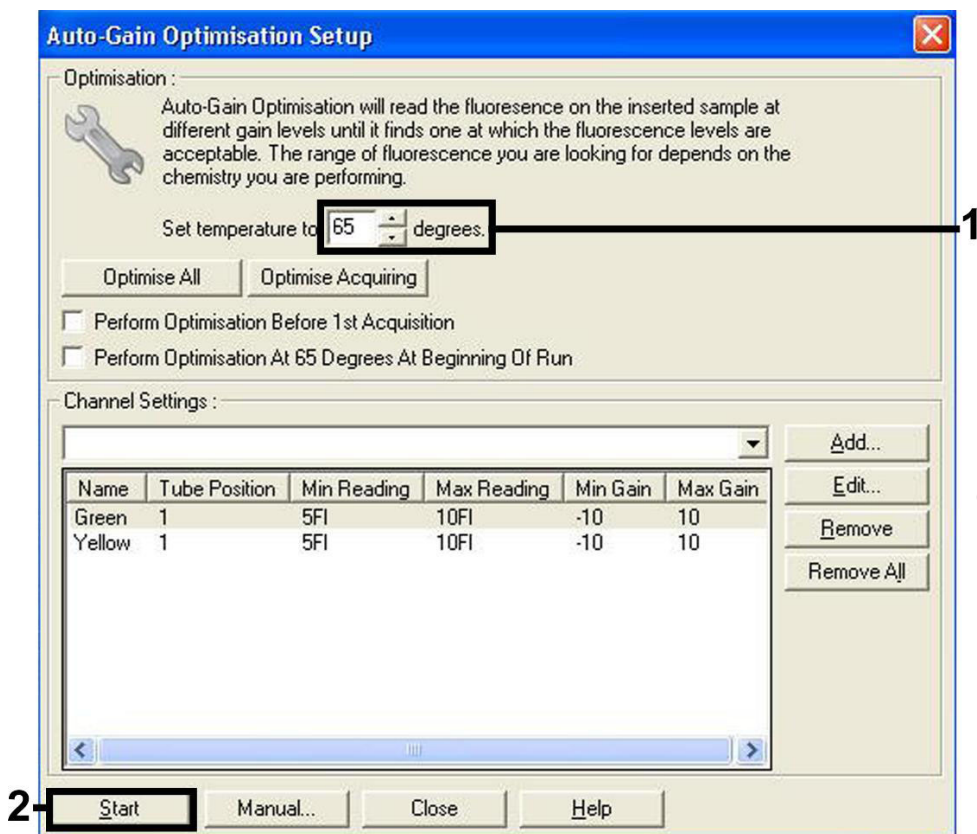


Ryc. 4. Wstępna aktywacja enzymu typu hot-start.



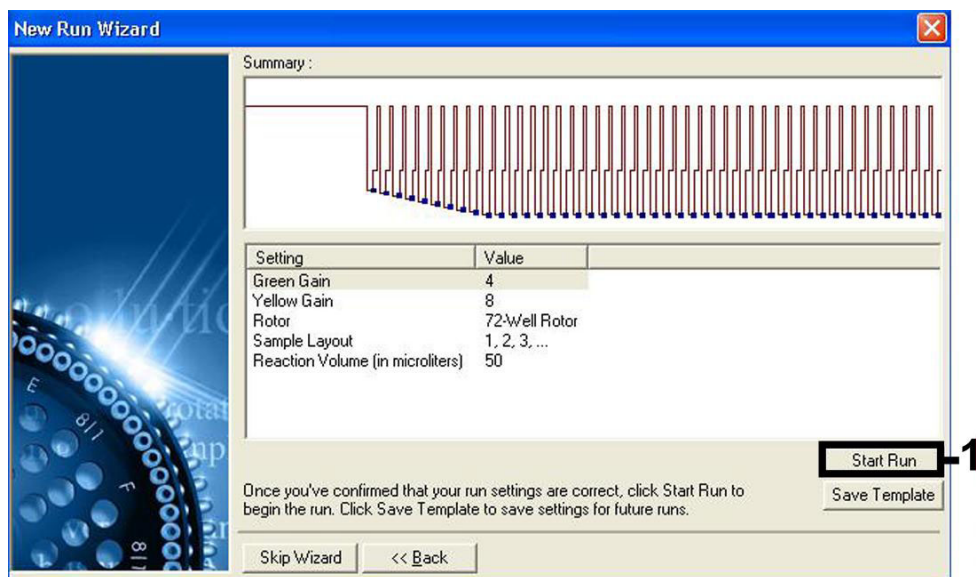
Ryc. 5. Amplifikacja DNA. Upewnij się, że aktywowano funkcję touchdown dla 10 cykli na etapie hybrydyzacji starterów.

9. Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie natężenia fluorescencji w probówkach PCR. Kliknąć przycisk **Gain Optimisation** (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym **New Run Wizard** (Kreator nowej reakcji) (patrz Ryc. 3 na poprzedniej stronie), aby otworzyć okno dialogowe **Auto-Gain Optimisation Setup** (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego). Ustawić temperaturę kalibracji na 65°C, aby odpowiadała ona temperaturze podczas etapu przyłączania starterów (hybrydyzacja) programu amplifikacji (Ryc. 6 na kolejnej stronie).



Ryc. 6. Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego.

10. Wartości wzmacnienia określone podczas kalibracji kanału są zapisywane automatycznie i wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania (Ryc. 7 na kolejnej stronie). Kliknąć przycisk **Start Run** (Rozpocznij reakcję).



Ryc. 7. Rozpoczynanie reakcji.

Interpretacja wyników

Oznaczenie ilościowe

Dostarczone wzorce ilościowe (CMV QS 1–4) są traktowane jak wcześniej oczyszczone próbki. Taka sama objętość (20 µl) jest stosowana bezpośrednio w reakcji PCR (brak konieczności dalszej izolacji). Aby wyznaczyć krzywą wzorcową w aparatach Rotor-Gene Q, należy użyć wszystkich 4 wzorców ilościowych i zdefiniować je w oknie dialogowym **Edit Samples** (Edytuj próbki) jako wzorce o określonych stężeniach (patrz podręcznik użytkownika odpowiedniego aparatu).

Uwaga: Aby zapewnić dokładność oznaczenia ilościowego, wysoce zalecane jest dodanie kontroli wewnętrznej do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol używanych do wzorców ilościowych. W tym celu należy dodać kontrolę wewnętrzną bezpośrednio do mieszaniny CMV RG Master i roztworu CMV Mg-Sol, zgodnie z instrukcjami opisanymi w kroku 2b protokołu (strona 15), i używać tej mieszaniny Master Mix do każdego wzorca ilościowego (CMV QS 1–4).

Uwaga: Wzorce ilościowe są zdefiniowane w kopiach/µl. Aby przekształcić wartości wyznaczone z krzywej wzorcowej na kopie/ml materiału próbki, należy skorzystać z poniższego wzoru:

$$\text{Wynik} \left(\frac{\text{kopie}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Wynik (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{Objętość elucji (}\mu\text{l)}}{\text{Objętość próbki (ml)}}$$

Zasadą jest wstawienie początkowej objętości próbki do powyższego wzoru. Należy tak postąpić, jeśli przed izolacją kwasu nukleinowego zmianie uległa objętość próbki (np. zmniejszyła się w wyniku odwirowania lub zwiększyła się przez dodanie objętości wymaganej do izolacji).

Uwaga: Wzorce ilościowe skalibrowano względem 1. międzynarodowego wzorca dla ludzkiego cytomegalowirusa (kod NIBSC: 09/162) określonego przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO).

Wzór na przekształcenie wartości w kopiach/ml na wartość w IU/ml w przypadku zestawu QIAamp DSP Virus Kit:

$$\text{WHO (IU/ml)} = 2,933 \times \text{artus CMV (kopie/ml)}$$

Uwaga: W przypadku procedury QIAamp wartości dla próbek oznaczonych ilościowo muszą mieścić się w liniowym zakresie od 1×10^1 do 1×10^4 kopii/ μ l. Nie można zagwarantować prawidłowości oznaczenia ilościowego poza tym zakresem.

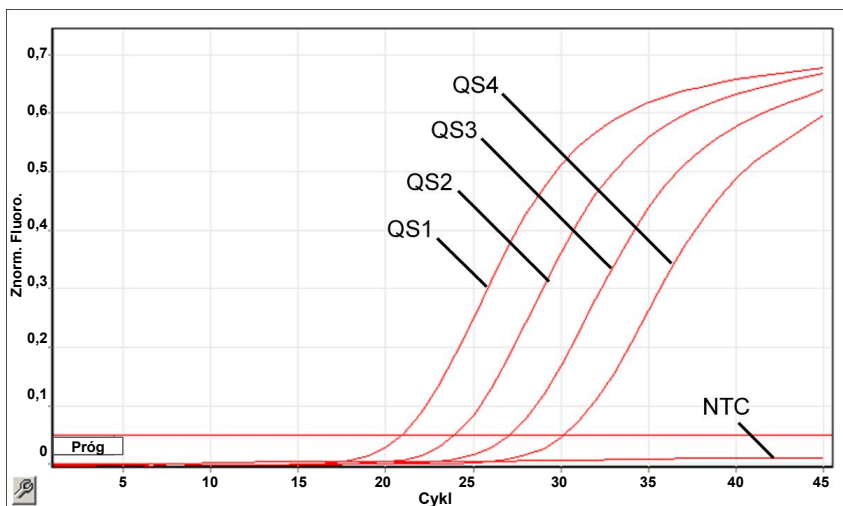
Wzór na przekształcenie wartości w kopiach/ml na wartość w IU/ml w przypadku zestawu EZ1 DSP Virus Kit używanego w aparacie EZ1 Advanced XL:

$$\text{WHO (IU/ml)} = 0,794 \times \text{artus CMV (kopie/ml)}$$

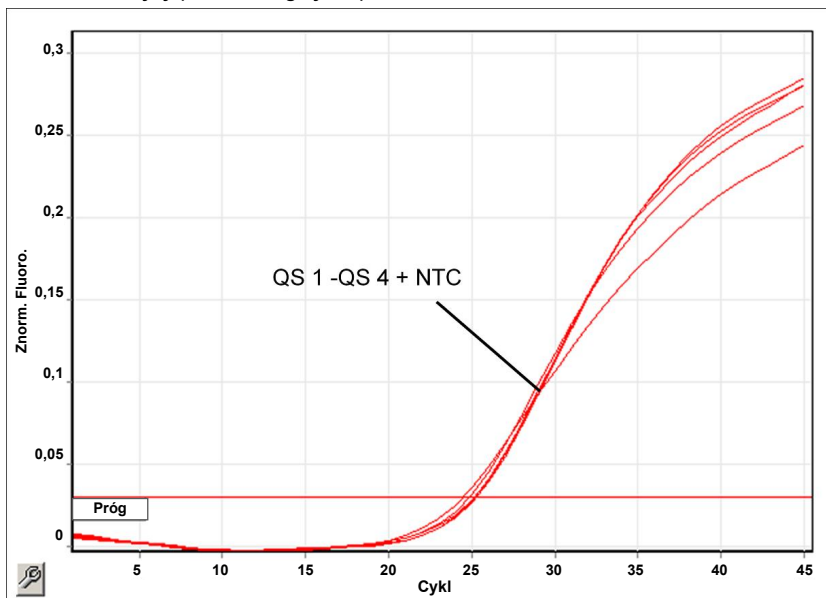
Uwaga: W przypadku procedury EZ1 wartości dla próbek oznaczonych ilościowo muszą mieścić się w liniowym zakresie od $3,16 \times 10^2$ do $1,00 \times 10^8$ kopii/ml. Nie można zagwarantować prawidłowości oznaczenia ilościowego poza tym zakresem.

Wyniki

Przykłady pozytywnych i negatywnych reakcji PCR podano na Ryc. 8 i Ryc. 9 (na kolejnej stronie).



Ryc. 8. Detekcja wzorców ilościowych (CMV QS 1–4) w kanale fluorescencyjnym Cycling Green. NTC: kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).



Ryc. 9. Detekcja kontroli wewnętrznej (Internal Control, IC) w kanale fluorescencyjnym Cycling Yellow z równoczesną amplifikacją wzorców ilościowych (CMV QS 1–4). NTC: kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).

Wykryto sygnał w kanale fluorescencyjnym Cycling Green.

Pozytywny wynik analizy: próbka zawiera DNA wirusa CMV.

W takim przypadku detekcja sygnału z kanału Cycling Yellow nie ma znaczenia, ponieważ wysokie początkowe stężenie DNA wirusa CMV (pozytywny sygnał w kanale Cycling Green) może prowadzić do obniżenia sygnału fluorescencyjnego lub jego braku dla kontroli wewnętrznej w kanale Cycling Yellow (w mechanizmie kompetycyjnym).

Brak sygnału w kanale fluorescencyjnym Cycling Green. W tym samym czasie w kanale fluorescencyjnym Cycling Yellow otrzymano sygnał z kontroli wewnętrznej.

Nie wykryto DNA wirusa CMV w próbce. Wynik można uznać za negatywny.

W przypadku negatywnego wyniku reakcji PCR dla CMV, wykrycie sygnału z kontroli wewnętrznej wyklucza możliwość inhibicji reakcji PCR.

Brak sygnału w kanale Cycling Green lub w kanale Cycling Yellow.

Wynik jest niejednoznaczny.

Informacje dotyczące przyczyn błędów i ich rozwiązywania można znaleźć w części „Rozwiązywanie problemów”, strona 42.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *artus* CMV RG PCR Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia powtarzalnej jakości produktu.

Ograniczenia

Wszystkie odczynniki są przeznaczone wyłącznie do celów diagnostyki *in vitro*.

Z produktu może korzystać wyłącznie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie procedur diagnostycznych *in vitro*.

W celu osiągnięcia optymalnych wyników reakcji PCR należy ściśle przestrzegać instrukcji w podręczniku użytkownika odpowiedniego aparatu.

Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

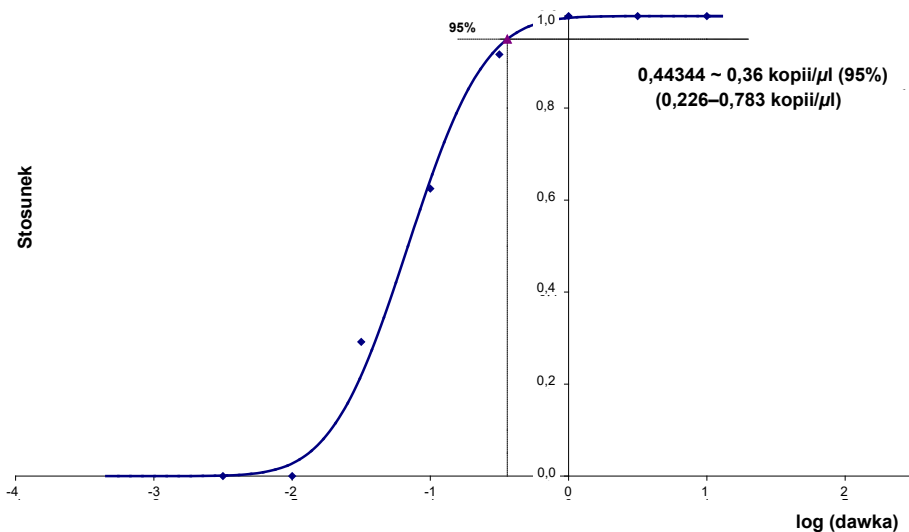
W rzadkich przypadkach mutacje w obrębie wysoce konserwatywnych regionów genomu wirusowego, do których przyłączają się startery i/lub sonda zestawu, mogą być przyczyną niedoszacowania miana wirusa lub niewykrycia obecności wirusa. Wiarygodność i skuteczność oznaczenia są regularnie weryfikowane.

Parametry skuteczności

Czułość analityczna

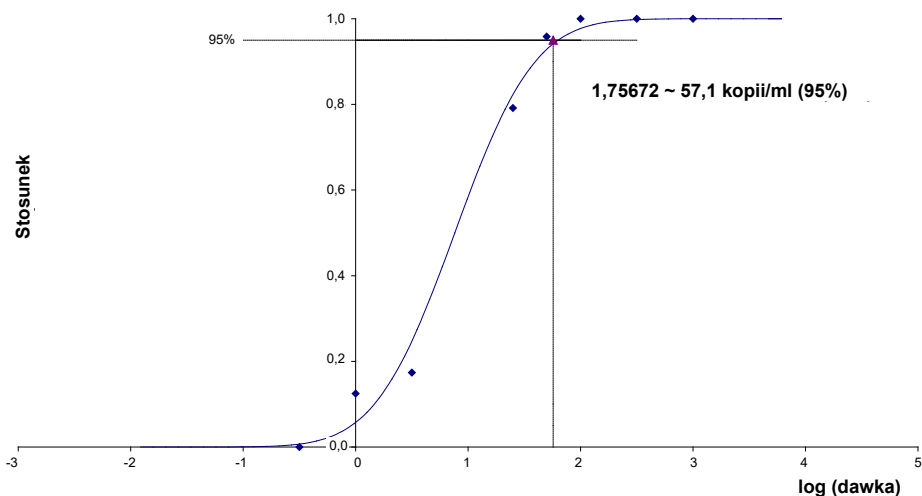
Dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit oceniono analityczną granicę wykrywalności oraz analityczną granicę wykrywalności uwzględniającą stopień oczyszczenia próbki (granice czułości). Analityczną granicę wykrywalności uwzględniającą stopień oczyszczenia próbki wyznaczono za pomocą próbek klinicznych pozytywnych względem wirusa CMV w połączeniu z określoną metodą izolacji. Analityczną granicę wykrywalności wyznaczono natomiast niezależnie od wybranej metody izolacji, używając DNA wirusa CMV w znanym stężeniu.

W celu oceny czułości analitycznej zestawu *artus* CMV RG PCR Kit przygotowano szereg rozcieńczeń genomowego DNA wirusa CMV o stężeniach od 10 do stężenia nominalnego 0,00316 kopii/ μ l, a następnie przeanalizowano za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit w aparatach Rotor-Gene. Testy wykonywano w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono poprzez analizę probitową. Ryc. 10 (na kolejnej stronie) zawiera graficzne przedstawienie analizy probitowej wykonywanej w aparacie Rotor-Gene 6000. Analityczna granica wykrywalności zestawu *artus* CMV RG PCR Kit używanego w aparatach Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 i aparacie Rotor-Gene 3000 wynosi odpowiednio 0,36 kopii/ μ l ($p = 0,05$) i 0,24 kopii/ μ l ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95-procentowe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa przy stężeniu 0,36 kopii/ μ l lub 0,24 kopii/ μ l.



Ryc. 10. Analiza probitowa: CMV (Rotor-Gene 6000). Czulość analityczna zestawu *artus* CMV RG PCR Kit w aparacie Rotor-Gene 6000.

Czulość analityczna uwzględniająca stopień oczyszczenia próbki (QIAamp DSP Virus Kit) dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit używanego w aparatach Rotor-Gene wyznaczono za pomocą szeregu rozcieńczeń materiału wirusa CMV od stężenia 1000 do stężenia nominalnego 0,316 kopii wirusa CMV/ml dodanych do próbek klinicznych osocza. Z próbek tych wyizolowano DNA za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,5 ml, objętość elucji: 60 μl). Każde z 8 rozcieńczeń przeanalizowano za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono poprzez analizę probitową. Ryc. 11 (na kolejnej stronie) zawiera graficzne przedstawienie analizy probitowej. Analityczna granica wykrywalności z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit używanego w aparacie Rotor-Gene 3000 wynosi 57,1 kopii/ml ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95-procentowe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa przy stężeniu 57,1 kopii/ml.



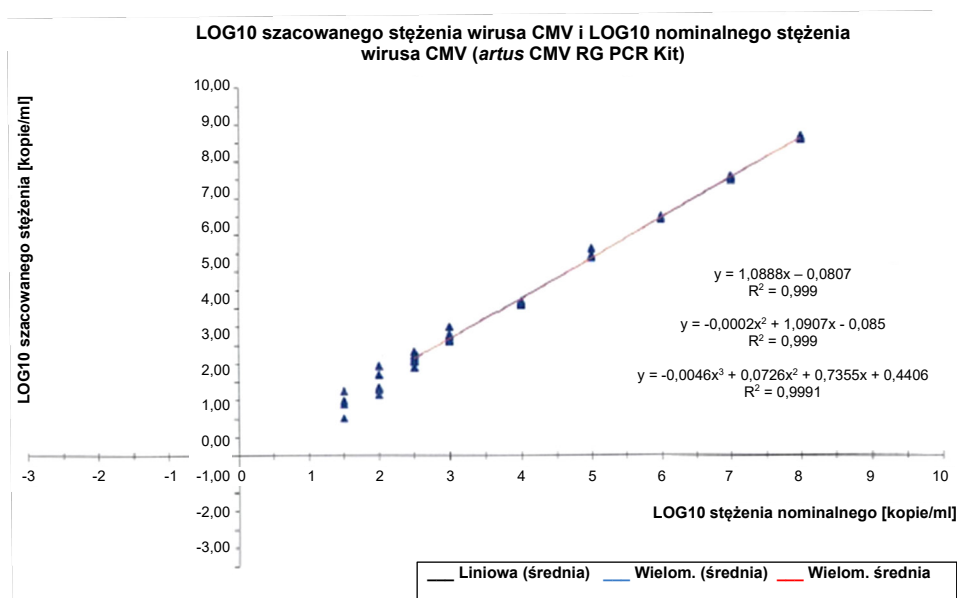
Ryc. 11. Analiza probitowa: CMV (Rotor-Gen 3000). Czulość analityczna z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit używanego w aparacie Rotor-Gen 3000.

Czulość analityczna z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki przy użyciu zestawu EZ1 DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,4 ml, objętość elucji: 60 μ l) w aparacie EZ1 Advanced XL dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit używanego w aparacie Rotor-Gen 6000 wynosi 68,75 kopii/ml ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95-procentowe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa przy stężeniu 68,75 kopii/ml.

Zakres liniowy

Zakres liniowy z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki przy użyciu zestawu EZ1 DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,4 ml, objętość elucji: 60 μ l) w aparacie EZ1 Advanced XL wyznaczono, testując od 4 do 6 powtórzeń próbek materiału wirusa CMV z szeregu rozcieńczeń od $3,16E+01$ do $1,00E+08$ kopii/ml.

Ryc. 12 (na kolejnej stronie) zawiera graficzne przedstawienie analizy probitowej.



Ryc. 12. Regresja wielomianowa zbioru danych uzyskanych za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia (EZ1 DSP Virus Kit) w aparacie EZ1 Advanced XL. Uwzględniono liniowy, kwadratowy i sześcienny model regresji.

Zakres liniowy zestawu *artus* CMV RG PCR Kit z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki przy użyciu zestawu EZ1 DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,4 ml, objętość elucji: 60 µl) w aparacie EZ1 Advanced XL wynosi od 3,16E+02 do 1,00E+08 kopii/ml.

Uwaga: Zakres liniowy zestawu *artus* CMV RG PCR Kit z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki przy użyciu zestawu QIAamp DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,4 ml, objętość elucji: 60 µl) wynosi od 1,00E+01 do 1,00E+04 kopii/µl.

Swoistość

Swoistość zestawu *artus* CMV RG PCR Kit wynika przede wszystkim z doboru starterów i sond oraz z zachowania rygorystycznych warunków reakcji. Startery i sondy sprawdzono za pomocą analizy porównawczej sekwencji pod kątem możliwego występowania obszarów homologicznych ze wszystkimi sekwencjami opublikowanymi w bankach genów. W ten sposób zapewniono wykrywalność wszystkich odnośnych szczepów.

Ponadto swoistość testu poddano walidacji za pomocą 100 różnych próbek osocza negatywnych względem wirusa CMV. 99 z tych próbek nie wygenerowało żadnego sygnału ze starterami i sondami swoistymi dla wirusa CMV, wchodzącymi w skład mieszaniny CMV RG Master.

Uwaga: 1 próbka, która wygenerowała sygnał ze starterami i sondami swoistymi dla wirusa CMV, dała również wynik pozytywny względem wirusa CMV w zestawach *artus* CMV LC i TM RG PCR Kit i prawdopodobnie jest pozytywna. Ostateczną swoistość wyznaczono na podstawie testów 100 odrębnych próbek dawców i wyniosła ona 99,00% (99/100).

Potencjalną reaktywność krzyżową zestawu *artus* CMV RG PCR Kit przebadano za pomocą grupy kontrolnej wymienionej w Tabeli 5. Żaden z badanych patogenów nie był reaktywny. Nie zaobserwowano reakcji krzyżowej w przypadku zakażeń mieszanych.

Tabela 5. Badanie swoistości zestawu z patogenami mogącymi wywołać reakcję krzyżową

Grupa kontrolna	CMV (kanał Cycling Green lub kanał Cycling A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (kanał Cycling Yellow lub kanał Cycling A.JOE)
Ludzki herpeswirus typu 1 (wirus opryszczki pospolitej 1)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 2 (wirus opryszczki pospolitej 2)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 3 (wirus ospy wietrznej i półpaśca)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 4 (wirus Epsteina-Barr)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 6A	–	+
Ludzki herpeswirus typu 6B	–	+
Ludzki herpeswirus typu 7	–	+
Ludzki herpeswirus typu 8 (wirus związany z mięsakiem Kaposiego)	–	+
Wirus zapalenia wątroby typu A	–	+
Wirus zapalenia wątroby typu B	–	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	–	+

(ciąg dalszy na kolejnej stronie)

Tabela 5 (ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony)

Grupa kontrolna	CMV (kanał Cycling Green lub kanał Cycling A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (kanał Cycling Yellow lub kanał Cycling A.JOE)
Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1	–	+
Ludzki wirus białaczki z komórek T typu 1	–	+
Ludzki wirus białaczki z komórek T typu 2	–	+
Wirus Zachodniego Nilu	–	+
Enterowirus	–	+
Parowirus B19	–	+

Precyzja

Dane precyzji zestawu *artus* CMV RG PCR Kit zebrano za pomocą aparatów Rotor-Gene. Na podstawie tych danych określono całkowitą wariancję oznaczenia. Na całkowitą wariancję składa się zmienność wewnątrz oznaczenia (zmienność wielu wyników dla próbek o tym samym stężeniu w ramach jednego badania), zmienność między oznaczeniami (zmienność wielu wyników dla oznaczenia otrzymanych na różnych aparatach tego samego typu przez różnych operatorów w obrębie jednego laboratorium) oraz zmienność pomiędzy poszczególnymi partiami (zmienność wielu wyników dla oznaczenia uzyskanych za pomocą zestawów z różnych partii). Uzyskane dane posłużyły do określenia odchylenia standardowego, wariancji i współczynnika zmienności dla reakcji PCR swoistej patogenowo oraz reakcji PCR dla kontroli wewnętrznej.

Dane precyzji zestawu *artus* CMV RG PCR uzyskano z wykorzystaniem wzorca ilościowego o najniższym stężeniu (QS 4; 10 kopii/μl). Test przeprowadzono w 8 powtórzeniach. Dane precyzji obliczono na podstawie wartości C_T krzywych amplifikacji (C_T : cykl progowy, patrz Tabela 6 na kolejnej stronie). Ponadto dane precyzji dla wyników ilościowych w kopiach/μl zostały wyznaczone z wykorzystaniem odpowiednich wartości C_T (patrz Tabela 7 na kolejnej stronie). W oparciu o te wyniki całkowity rozrzut statystyczny dla dowolnej próbki o podanym stężeniu wynosi 1,21% (C_T) lub 14,38% (stężenie) i 1,93% (τ) dla detekcji kontroli wewnętrznej. Powyższe wartości są oparte na całości wszystkich pojedynczych wartości o określonych zmiennościach.

Tabela 6. Dane precyzji na podstawie wartości C_T

	Odchylenie standardowe	Wariancja	Współczynnik zmienności (%)
Zmienność wewnątrz oznaczenia: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Zmienność wewnątrz oznaczenia: Kontrola wewnętrzna	0,31	0,10	1,16
Zmienność między oznaczeniami: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Zmienność między oznaczeniami: Kontrola wewnętrzna	0,47	0,22	1,77
Zmienność pomiędzy poszczególnymi partiami: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Zmienność pomiędzy poszczególnymi partiami: Kontrola wewnętrzna	0,53	0,28	2,02
Całkowita wariancja: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Całkowita wariancja: Kontrola wewnętrzna	0,51	0,26	1,93

Tabela 7. Dane precyzji na podstawie wyników ilościowych (w kopiach/μl)

	Odchylenie standardowe	Wariancja	Współczynnik zmienności (%)
Zmienność wewnątrz oznaczenia: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Zmienność między oznaczeniami: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Zmienność pomiędzy poszczególnymi partiami: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Całkowita wariancja: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Substancje zakłócające

Do negatywnych próbek osocza znajdujących się w różnych komercyjnie dostępnych systemach do zbierania krwi z różnymi antykoagulantami dodano DNA wirusa CMV. Obliczone stężenia (kopie/ml), średnia wartość C_T , odchylenia standardowe wartości C_T , współczynnik wariancji wartości C_T i CV% wartości C_T przedstawia Tabela 8. Odchylenia standardowe i współczynniki zmienności nie przekraczają poziomu 5%, a zatem mieszczą się w zakresie tolerancji. Nie odnotowano istotnego wpływu obecności różnych badanych substancji na przebieg reakcji PCR.

Tabela 8. Dane dotyczące dostępnych komercyjnie systemów do zbierania krwi oraz antykoagulantów

Substancja	Stężenie (kopie/ml)	Średnia wartość C_T	Odchylenie standardowe wartości C_T	Współczynnik wariancji wartości C_T	CV (%) wartości C_T
Sól potasowa EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Sól potasowa EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Sól potasowa EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Sól potasowa EDTA, Springe (wartość referencyjna)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Sól potasowa EDTA, Sarstedt (wartość referencyjna)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Sól potasowa EDTA (ciąża)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Do próbek osocza EDTA pozytywnych względem wirusa CMV o stężeniach 3 x LOD i 10 x LOD dodano substancje endogenne (Tabela 9 na kolejnej stronie). We wszystkich próbkach pomyślnie wykryto obecność wirusa. Nie zaobserwowano zakłóceń w przypadku próbek z podwyższonymi stężeniami inhibitorów endogennych (bilirubina, hemoglobina, trójglicerydy i albumina).

Tabela 9. Badane substancje endogenne

Substancje zakłócające	Stężenie substancji zakłócających
Bilirubina	30 mg/dl
Hemoglobina	2 g/dl
Trójglicerydy	1 g/dl
Albumina	6 g/dl

Leki powszechnie wykorzystywane podczas przeszczepów przetestowano w stężeniu równym 3x szczytowego stężenia po leczeniu farmakologicznym, zgodnie z zaleceniami przedstawionymi w wytycznej EP07-A2 instytutu CLSI® (11) (patrz Tabela 10). Każdą z tych substancji dodano do próbek negatywnych względem wirusa CMV i próbek pozytywnych względem wirusa CMV, które testowano w 4 powtórzeniach.

Nie wykazano istotnego wpływu żadnej z testowanych substancji egzogennych na skuteczność zestawu *artus* CMV RG PCR Kit.

Tabela 10. Lista leków testowanych jako substancje egzogenne

Substancje zakłócające	Badane stężenie
Antybiotyki	
Sulfametoksazol	200 mg/l
Trimetoprym	5,2 mg/l
Claforan® (cefotaksym)	1 g/l
Tazobac® (piperacylina + tazobaktam)	Piperacylina: 1 g/l Tazobaktam: 125 mg/l
Tykarcylina	1 g/l
Augmentin® (amoksycylina + kwas klawulanowy)	Amoksycylina: 125 mg/l Kwas klawulanowy 25 mg/l
Wankomycyna	125 mg/l
Środek przeciwgrzybiczy	
Flukonazol	1 mg/l
Leki immunosupresyjne	
Rapamycyna	100 mg/l
Mykofenolan sodu	80 mg/l

Odporność

Weryfikacja odporności testu pozwala na wyznaczenie całkowitej częstości niepowodzeń dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit. Do 100 próbek osocza negatywnych względem wirusa CMV dodano wirusa CMV do końcowego stężenia 170 kopii/ml (w przybliżeniu trzykrotność stężenia dla granicy czułości analitycznej). Po izolacji za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit próbki te przeanalizowano za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit. Dla wszystkich próbek zawierających wirusa CMV częstość niepowodzeń wyniosła 0%. Ponadto sprawdzono odporność kontroli wewnętrznej, oczyszczając i analizując 100 próbek osocza negatywnych względem wirusa CMV. Wynika z tego, że odporność zestawu *artus* CMV RG PCR Kit wynosi $\geq 99\%$.

Odtwarzalność

Dane dotyczące odtwarzalności umożliwiają regularną ocenę działania zestawu *artus* CMV RG PCR Kit, jak również porównanie wydajności w stosunku do innych produktów. Dane te uzyskuje się, uczestnicząc w ustalonych programach badań biegłości.

Oprócz uczestnictwa w ustalonych programach badań biegłości w 3 zewnętrznych laboratoriach przetestowano panel wirusa CMV złożony z 10 członków (Tabela 11), wykorzystując zestaw EZ1 DSP Virus Kit w aparacie EZ1 Advanced XL do oczyszczenia kwasu nukleinowego oraz zestaw *artus* RG PCR Kit do przetestowania eluatu zawierającego DNA.

Tabela 11. Podsumowanie danych dotyczących członków panelu wirusa CMV

Numer panelu (typ członka panelu)	Członek panelu	Skutek rozcieńczenia
1001 (1)	Negatywny	Puła negatywna nr 1
1002 (1)	Negatywny	Puła negatywna nr 2
1003 (2)	Silnie negatywny	50% pozytywnych
1004 (2)	Silnie negatywny	50% pozytywnych
1005 (3)	Słabo pozytywny	200 kopii/ml
1006 (3)	Słabo pozytywny	200 kopii/ml
1007 (4)	Umiarkowanie pozytywny	2000 kopii/ml
1008 (4)	Umiarkowanie pozytywny	2000 kopii/ml
1009 (5)	Silnie pozytywny	200 000 kopii/ml
1010 (5)	Silnie pozytywny	200 000 kopii/ml

W każdym ośrodku każdego dnia w okresie 6 dni 2 operatorów testowało panel złożony z 10 członków w dwóch powtórzeniach, korzystając z 3 serii zestawów odczynników. W ten sposób otrzymano 720 punktów danych: 20 próbek x 2 operatorów x 6 dni x 3 ośrodki.

Łączna odtwarzalność testu *artus* CMV RGQ MDx wyniosła $\leq 12\%$ CV dla próbek o stężeniach z zakresu od 200 kopii/ml do 200 000 kopii/ml (Tabela 12).

Tabela 12. Podsumowanie ogółem (każdy typ członka panelu) — obserwowane wartości średnie

Typ_członka_panelu	L. obserwacji	Średnia	Mediana	Odchylenie standardowe	Odsetek CV	Minimum
1	144	0,02	0,00	0,158	849,84	0,00
2	144	0,68	0,83	0,630	92,19	-0,10
3	144	1,91	1,95	0,226	11,83	0,98
4	144	2,96	2,96	0,168	5,68	2,16
5	144	5,03	5,03	0,091	1,80	4,75

Ogólne podsumowanie odsetków wariancji i odchyłeń standardowych dla wartości log 10 IU/ml dla każdego z 5 paneli między seriami, ośrodkami, operatorami, dniami, reakcjami i w ramach reakcji zawiera Tabela 13 (na kolejnej stronie).

Tabela 13. Ogólne podsumowanie wariancji i odchyłeń standardowych

Próbka	1	2	3	4	5	
Typ próbki	negatywna	silnie negatywna	slabo pozytywna	umiarkowanie pozytywna	silnie pozytywna	
Obserwowana średnia wartość log₁₀ IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
L. testów	144	144	144	144	144	
Miara	Odsetek wariancji SD					
Składowa wariancji	Seria	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	Ośrodek	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	Operator	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	Dzień	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	Między reakcjami	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	W ramach reakcji	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	Łącznie	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

Ocena diagnostyczna

Zestaw *artus* CMV RG PCR Kit poddano ocenie w badaniu, w ramach którego porównywano zestaw *artus* CMV RG PCR Kit z testem COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Przeanalizowano 156 klinicznych próbek osocza EDTA zebranych retrospektywnie i prospektywnie. Wszystkie próbki przeanalizowano uprzednio za pomocą testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test używanego do rutynowej diagnostyki i otrzymano wyniki pozytywne lub negatywne.

DNA wirusa CMV przeznaczone do testów przy użyciu zestawu *artus* CMV RG PCR Kit wyizolowano za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit, dodając kontrolę wewnętrzną zestawu *artus* CMV RG PCR Kit do izolacji. Analizę przeprowadzono w aparacie Rotor-Gene 3000. Próbkę przeznaczoną do testów przy użyciu testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test przetwarzano i analizowano zgodnie z instrukcjami producenta podanymi na ulotce dołączonej do opakowania.

Wszystkie 11 próbek, dla których za pomocą testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test otrzymano wynik pozytywny, dało również wynik pozytywny za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit. 123 ze 145 próbek, dla których za pomocą testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test otrzymano wynik negatywny, dały również wynik negatywny za pomocą zestawu *artus* CMV RG PCR Kit. Uzyskano 22 sprzeczne wyniki (Tabela 14).

Tabela 14. Wyniki walidacji porównawczej

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		
		+	-	Łącznie
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit	+	11	22	33
	-	0	123	123

Jeśli wyniki testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test zostaną wzięte pod uwagę jako punkt odniesienia, czułość diagnostyczna zestawu *artus* CMV RG PCR Kit dla wszystkich próbek wynosi 100%, a swoistość diagnostyczna wynosi 84,8%.

Dalsze badania 22 próbek, dla których uzyskano sprzeczne wyniki, potwierdziły wyniki otrzymane za pomocą zestawów *artus* PCR Kit. Z tego względu można założyć, że rozbieżność wyników wynika z wyższej czułości zestawu *artus* CMV RG PCR Kit.

Literatura

1. Plosa E.J., Esbenshade J.C., Fuller M.P., and Weitkamp J.H. (2012). Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Rev.* **33**, 156-163.
2. Furui Y., Satake M., Hoshi Y., Uchida S., Suzuki K., and Tadokoro K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalance in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* **53**, 2190-2197.
3. Atabani, S.F., et al. (2012). Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am. J. Transplant.* **12**, 2457-2464.
4. Enders G., Daiminger A., Bäder U., Exler S., and Enders M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol.* **52**, 244-246.
5. Kotton, C.N., et al. (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* **102**, 900-931.
6. Lancini D, Faddy H.M., Flower R., and Hogan C. (2014). Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med. J. Aust.* **201**, 578-580.
7. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, and Warrell DA. (1997). Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 52-56.
8. Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190-212.
9. Nesbitt S.E., Cook L., Jerome K.R. (2004). Cytomegalovirus quantitation by real-time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. **42**, 1296-1297.
10. Abdul-Ali D., Kraft C.S., Ingersoll J., Frempong M., Caliendo A.M. (2011). Cytomegalovirus DNA stability in EDTA Anti-Coagulated Whole Blood and Plasma Samples. *J. Clin. Virol.* **52**, 222-224
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline – Second Edition. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Komentarze i wskazówki

Brak sygnału kontroli pozytywnych (CMV QS 1–4) w kanale fluorescencyjnym Cycling Green

- | | |
|--|---|
| a) Wybrany do analizy danych PCR kanał fluorescencyjny nie spełnia wymagań protokołu | Do analizy danych wybrać kanał fluorescencyjny Cycling Green dla analitycznej reakcji PCR pod kątem CMV oraz kanał fluorescencyjny Cycling Yellow dla kontroli wewnętrznej PCR. |
| b) Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperaturowego w aparacie Rotor-Gene | Porównać profil temperaturowy z protokołem. Patrz część „Protokół: Reakcja PCR i analiza danych”, strona 14. |
| c) Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR | Sprawdzić etapy pracy według schematu pipetowania i w razie potrzeby powtórzyć reakcję PCR. Patrz część „Protokół: Reakcja PCR i analiza danych”, strona 14. |
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego ze składników zestawu nie były zgodne z zaleceniami zawartymi w części „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” (strona 10) | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |
| e) Upłynęła data ważności zestawu <i>artus</i> CMV RG PCR Kit | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |

Słaby sygnał lub brak sygnału kontroli wewnętrznej negatywnej próbki osocza poddanej oczyszczeniu za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit ($C_T = 27 \pm 3$; próg, 0,03) w kanale fluorescencyjnym Cycling Yellow i jednoczesny brak sygnału w kanale fluorescencyjnym Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) Warunki reakcji PCR nie są zgodne z protokołem | Sprawdzić warunki reakcji PCR (patrz wyżej) i, w razie potrzeby, powtórzyć PCR z prawidłowymi parametrami. |
| b) Wystąpiła inhibicja reakcji PCR | Upewnić się, że stosowana jest zalecana metoda izolacji, i ściśle przestrzegać instrukcji producenta. |
| c) Podczas izolacji utracono DNA | Jeśli do izolacji dodano kontrolę wewnętrzną, brak sygnału z kontroli wewnętrznej może wskazywać na utratę DNA podczas izolacji. Upewnić się, że stosowana jest zalecana metoda izolacji (patrz „Izolacja DNA”, strona 12) i ściśle przestrzegać instrukcji producenta. |

Komentarze i wskazówki

- | | |
|--|---|
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego ze składników zestawu nie były zgodne z zaleceniami zawartymi w części „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” (strona 10) | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |
| e) Upiętna data ważności zestawu <i>artus</i> CMV RG PCR Kit | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |

Sygnaly dla kontroli negatywnych w kanale fluorescencyjnym Cycling Green analitycznej reakcji PCR

- | | |
|--|---|
| a) Podczas przygotowywania reakcji PCR doszło do zanieczyszczenia próbki | Powtórzyć reakcję PCR z nowymi odczynnikami w powtórzeniach.
Jeśli to możliwe, zamknąć probówki PCR niezwłocznie po dodaniu próbki badanej.
Upewnić się, że kontrole pozytywne są dodawane za pomocą pipety jako ostatnie.
Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane. |
| b) Podczas izolacji doszło do zanieczyszczenia | Powtórzyć izolację i reakcję PCR próbki badanej, korzystając z nowych odczynników.
Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane. |

Symbole



Zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N> testów



Termin ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii



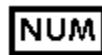
Numer materiału



Składniki



Zawiera



Liczba



Globalny numer jednostki handlowej



Zakres temperatury



Producent



Zapoznać się z instrukcją użycia

Dane do zamówienia

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: mieszanina Master Mix, roztwór magnezu, 4 wzorce ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, roztwór magnezu, 4 wzorce ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4503265
Zestaw EZ1 DSP Virus Kit — do zautomatyzowanego równoczesnego oczyszczania wirusowego DNA i RNA w 1–14 próbkach surowicy, osocza lub płynu mózgowo-rdzeniowego		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Na 48 przygotowań wirusowych kwasów nukleinowych: wstępnie napełnione kasety z odczynnikami, uchwyty na jednorazowe końcówki, jednorazowe końcówki z filtrem, próbki na próbki, próbki do elucji, bufony, nośnik RNA	62724
Zestaw QIAamp DSP Virus Kit — do oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiego osocza do celów diagnostycznych in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 przygotowań: kolumny QIAamp MinElute® Spin Columns, bufony, odczynniki, próbki, przedłużacze kolumn i złącza VacConnectors	60704
Aparat Rotor-Gene Q MDx i akcesoria		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklery do reakcji real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002022

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cykler do reakcji real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator umożliwiający wykonanie analizy metodą HRM (ang. High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator umożliwiający wykonanie analizy metodą HRM (ang. High Resolution Melt) z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Aparat do reakcji real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Aparat do reakcji real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002043

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Cyklerek do reakcji real-time PCR z 2 kanałami (zielony, żółty), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Cyklerek do reakcji real-time PCR z 2 kanałami (zielony, żółty), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Cyklerek do reakcji real-time PCR i analizator umożliwiający wykonanie analizy metodą HRM (ang. High Resolution Melt) z 2 kanałami (zielony, żółty) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Cyklerek do reakcji real-time PCR i analizator umożliwiający wykonanie analizy metodą HRM (ang. High Resolution Melt) z 2 kanałami (zielony, żółty) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji jednokanałową pipetą w układzie 72 probówek o pojemności 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji w standardowej matrycy 8 x 12 przy użyciu 96 probówek o pojemności 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki z zatyczkami na 10 000 reakcji	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 cienkościennych probówek na 1000 reakcji	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 cienkościennych probówek na 10 000 reakcji	981008

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian dokumentu

Wersja	Zmiany
R6, marzec 2021 r.	Dodano części Zakres liniowy, Substancje zakłócające i Odtwarzalność. Zaktualizowano części Przeznaczenie i Oznaczenie ilościowe. Usunięto odniesienia do aparatów QIAGEN, które nie są już obsługiwane.

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu *artus* CMV RG PCR Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji firma QIAGEN nie gwarantuje, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie naruszają praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN podkreśla, że nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązują się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie www.qiagen.com.

Nabycie tego produktu umożliwia nabywcy wykorzystywanie go na potrzeby usług diagnostycznych w zakresie diagnostyki in vitro u ludzi. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkowania wynikającym z nabycia produktu.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, EZ1®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); CLSI® (Clinical and Laboratory Standards, Inc.); Augmentin® (Glaxo Group Limited); Tazobac® (Pfizer Inc.); AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Group); Claforan (Sanofi-Aventis Group); FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific).

HB-0046-008 1123965 R6 03/2021© 2021 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

Składanie zamówień www.qiagen.com/shop | Pomoc techniczna support.qiagen.com | Strona WWW www.qiagen.com