

Mart 2021

# artus<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit Kullanım Talimatları (El Kitabı)



24 (katalog no. 4503263)



96 (katalog no. 4503265)

Sürüm 1

Kantitatif in vitro diagnostik

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx Cihazlarıyla kullanım için

**IVD**

**CE** 0197

**REF**

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R6 **MAT**

1123965TR



# İçerik

Kullanım Amacı .....	5
Açıklama ve İlke .....	5
Patojen Bilgisi.....	6
Prosedür Prensipleri.....	6
Sağlanan Materyaller.....	7
Kit İçeriği .....	7
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller .....	8
Reaktifler .....	8
Sarf Malzemeleri .....	8
Ekipman .....	8
Uyarılar ve Önlemler.....	9
Güvenlik bilgileri .....	9
Önlemler.....	9
Reaktif Saklama ve Kullanma.....	10
Numune Kullanımı ve Saklama .....	10
Numune Toplama.....	10
Örnek Saklama .....	11
Örnek Taşıma .....	11
Prosedür .....	12
DNA İzolasyonu .....	12
Dahili Kontrol.....	13
Protokol: PCR ve Veri Analizi .....	14

---

Sonuçların Yorumlanması .....	22
Kantitasyon .....	22
Sonuçlar .....	23
Kalite Kontrol .....	26
Sınırlamalar .....	26
Performans Özellikleri .....	27
Analitik Duyarlılık.....	27
Doğrusal Aralık.....	29
Özgüllük .....	30
Kesinlik.....	32
Olumsuz Etkileyen Maddeler.....	34
Güçlülük .....	36
Yeniden Üretilbilirlik.....	36
Diagnostik Değerlendirme .....	38
Referanslar .....	40
Sorun Giderme Kılavuzu .....	41
Semboller .....	43
Sipariş Bilgisi .....	44
Belge Revizyon Geçmişi.....	47

# Kullanım Amacı

*artus* CMV RG PCR Kit insan plazmasında sitomegalovirüs (CMV) DNA'sının kantitasyonu için bir in vitro nükleik asit amplifikasyonu testidir. Bu diagnostik test kiti polimeraz zincir reaksiyonunu (Polymerase Chain Reaction, PCR) kullanır ve Rotor-Gene Q Cihazlarıyla kullanılmak üzere konfigüre edilmiştir.

*artus* CMV RG PCR Kit'in CMV hastalığına yönelik risk altında olan hastalarda CMV enfeksiyonunun yönetimi için klinik sunum ve diğer laboratuvar işaretleriyle birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

*artus* CMV RG PCR Kit'ten elde edilen sonuçlar, tüm ilgili klinik ve laboratuvar bulguları bağlamında yorumlanmalıdır.

*artus* CMV RG PCR Kit'in kanda veya kan ürünlerinde CMV varlığına yönelik bir tarama testi veya CMV enfeksiyonu varlığını teyit etmek üzere diagnostik bir test olarak kullanılması amaçlanmamıştır.

## Açıklama ve İlke

*Artus* CMV RG PCR Kit, Rotor-Gene Q MDx Cihazlarında polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) kullanılarak CMV DNA saptanması için kullanıma hazır bir sistem oluşturur. CMV RG Master, CMV genomu içerisinde Major Immediate Early (*MIE*) Geninin bir 105 bp bölgesinin spesifik amplifikasyonuna (tahlil gB1 – gB4 CMV genotiplerini saptayabilir) ve Rotor-Gene Q MDx cihazının Cycling Green floresans kanalında bu spesifik ampikonun doğrudan saptanmasına yönelik reaktifler ve enzimler içerir.

Buna ek olarak, *artus* CMV RG PCR Kit olası PCR inhibisyonunu tespit etmek için ikinci bir heterolog amplifikasyon sistemi içerir. Bu, Rotor-Gene Q MDx cihazının Cycling Yellow floresans kanalında bir dahili kontrol (Internal Control, IC) olarak saptanır. Harici pozitif kontroller (CMV QS 1–4) sağlanır ve bunlar viral DNA miktarının belirlenmesini sağlar. Daha fazla bilgi için, bakınız "Kantitasyon", sayfa 22.

## Patojen Bilgisi

İnsan sitomegalovirüsü (CMV) enfekte kişilerde kan, dokular ve hemen hemen tüm sekretuar sıvılarda bulunur. Bulaşma oral veya cinsel yolla, kan nakli veya organ nakliyle ve intrauterin veya perinatal olarak gerçekleşebilir (1-4). CMV viral yük testi hastalık riskini değerlendirme, hastalığı teşhis etme ve tedaviye yanıtı izleme açısından önemli bir yardımcı unsurdur (5).


CMV enfeksiyonu sıklıkla belirtisiz bir enfeksiyona ve sonrasında virüsün vücutta ömür boyu kalmasına neden olur. Belirti oluşursa gençler ve yetişkinlerde ateş, hafif hepatit ve genel halsizlik ile mononükleoza benzer (6). Özellikle intrauterin olarak enfekte olanlar ve immün yetmezlikli hastalarda olmak üzere şiddetli CMV enfeksiyonu seyri gözlenmiştir (4,7).

## Prosedür Prensipleri

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile patojen saptanması patojen genomunun spesifik bölgelerinin amplifikasyonunu temel alır. Real-time PCR'de, amplifiye edilen ürün floresan boyalar yoluyla saptanır. Bunlar genellikle amplifiye edilmiş ürüne spesifik olarak bağlanan oligonükleotid problemleriyle bağlantılıdır. PCR çalışması sırasında (yani, gerçek zamanlı olarak) floresans şiddetlerinin izlenmesi PCR çalışması sonrasında reaksiyon tüplerinin tekrar açılmasına gerek kalmadan biriken ürünün saptanması ve kantitasyonunu mümkün kılar (8).

# Sağlanan Materyaller

## Kit İçeriği

<b>artus CMV RG PCR Kit</b>		(24)	(96)
<b>Katalog no.</b>		4503263	<b>4503265</b>
<b>Reaksiyon sayısı</b>		24	<b>96</b>
Mavi	CMV RG Master (Taq 0,1 U/μl)		2 x 12 reaksiyon
Sarı	CMV Mg-Sol*	<b>Mg-Sol</b>	600 μl
Kırmızı	CMV QS 1† (1 x 104 kopya/μl)	<b>QS</b>	200 μl
Kırmızı	CMV QS 2† (1 x 103 kopya/μl)	<b>QS</b>	200 μl
Kırmızı	CMV QS 3† (1 x 102 kopya/μl)	<b>QS</b>	200 μl
Kırmızı	CMV QS 4† (1 x 101 kopya/μl)	<b>QS</b>	200 μl
Yeşil	CMV RG IC‡	<b>IC</b>	1000 μl
Beyaz	Su (PCR sınıfı) (Water (PCR grade))		1000 μl
	Kullanma talimatı		1

\* Magnezyum solüsyonu

† Kantitasyon standardı

‡ Dahili kontrol

# Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

## Reaktifler

- DNA izolasyon kiti (bakınız "DNA İzolasyonu", sayfa 12)

## Sarf Malzemeleri

- Filtreli steril pipet uçları
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, 72-well rotor ile kullanım için (kat. no. 981103 veya 981106)
- **Alternatif olarak:** PCR Tubes, 0.2 ml, 36-well rotor ile kullanım için (kat. no. 981005 veya 981008)

## Ekipman

- Pipetler (ayarlanabilir)\*
- Vorteks karıştırıcı\*
- 2 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüj\*
- Cycling Green ve Cycling Yellow için floresans kanallı Rotor-Gene Q MDx Cihazları\*
- Rotor-Gene Q Yazılım sürümü 2.3.5 veya üzeri
- Soğutma bloğu (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. no. 9018901 veya Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. no. 9018905)

\* Kullanım öncesinde cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol edildiği ve kalibre edildiğinden emin olun.



# Uyarılar ve Önlemler

## Güvenlik bilgileri

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize uygun olarak atın.

## Önlemler

Kullanıcı şunlara daima dikkat etmelidir:

- Filtreli steril pipet uçları kullanın.
- Pozitif materyalleri (numuneler, pozitif kontroller ve amplikonlar) tüm diğer reaktiflerden ayrı saklayın ve ekstrakte edin ve bunları reaksiyon karışımına konumsal açıdan ayrılmış bir yerde ekleyin.
- Tahlile başlamadan önce tüm bileşenleri oda sıcaklığında (15–25°C) çözündürün.
- Çözdürüldüğünde bileşenleri karıştırın (aşağı ve yukarı pipetleyerek veya titreşimli vorteks yaparak) ve kısaca santrifüj yaptırın.
- Hızlı çalışın ve bileşenleri buz üzerinde veya soğutma bloğunda tutun (72/96 kuyulu yükleme bloğu).

# Reaktif Saklama ve Kullanma

*artus* CMV RG PCR Kit bileşenleri -30°C ila -15°C'de saklanmalıdır ve etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Tahlil duyarlılığını azaltabileceğinden tekrarlanan çözdürme ve dondurmadan (>2x) kaçınılmalıdır. Reaktifler arada kullanılacaksa alikotlar halinde dondurulmaları gerekir. 2–8°C'de saklama 5 saatlik bir dönemi geçmemelidir.

## Numune Kullanımı ve Saklama

**Not:** Tüm örneklere potansiyel enfeksiyöz madde olarak bakılmalıdır.

**Not:** Bu kitin performansını doğrulamak için gerçekleştirilen analitik çalışmalar CMV saptaması için en uygun örnek materyalleri olarak EDTA plazmayı göstermektedir. Bu nedenle *artus* CMV RG PCR Kit ile bu materyalin kullanılmasını öneririz.

*artus* CMV RG PCR Kit'in doğrulaması insan EDTA plazma örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Başka örnek materyalleri doğrulanmamıştır. Lütfen örnek hazırlama için sadece önerilen nükleik asit izolasyon kitini (bakınız "DNA İzolasyonu", sayfa 12) kullanın.

Bazı örnek materyalleri kullanılırken toplama, taşıma ve saklamayla ilgili belirli talimatlara kati şekilde uyulması gerekir.

## Numune Toplama

Her kan alınması kan damarlarında (arterler, venler veya kapillerler) hasara neden olur. Sadece zararsız ve steril materyal kullanılmalıdır. Kan alma için uygun tek kullanımlık malzeme mevcut olmalıdır. Ven ponksiyonu için çok ince olan kapiller iğneler kullanılmamalıdır. Venöz kan alınması dirsek eklemi, ön kol ve elin arkasının uygun kısımlarında yapılmalıdır. Kanın standart numune toplama tüplerine (kırmızı kapak, Sarstedt® veya başka üreticinin eşdeğer tüpü) alınması gerekir. 5-10 ml hacminde kan bir EDTA tüpü içine alınmalıdır. Tüpler örnek alındıktan hemen sonra ters çevrilerek karıştırılmalıdır (8x, sallamayın).

**Not:** Heparinize örnekler kullanılmamalıdır.

## Örnek Saklama

Tam kan 6 saat içinde 20 dakika 800–1600 x g hızında santrifügasyon ile plazma ve hücresel bileşenlerine ayrılmalıdır (9,10). İzole edilen plazma steril polipropilen tüplere aktarılır. Tahlilin duyarlılığı, örnekler rutin şekilde dondurulursa veya daha uzun süreliğine saklanırsa azalabilir.

## Örnek Taşıma

Örnek materyali prensip olarak kırılmaz bir taşıma kabında taşınmalıdır. Bu şekilde örnek sızması nedeniyle olası enfeksiyon tehlikesinden kaçınılabilir. Örnekler patojenik materyalin taşınması için yerel ve ulusal talimat izlenerek taşınmalıdır.\*

Örnekler 6 saat içinde sevk edilmelidir. Örnekleri alındıkları yerde saklamak önerilmez. Örnekleri patojenik materyalin taşınması için yasal talimat izlenerek postayla göndermek mümkündür. Örneklerin bir kuryeyle taşınmasını öneriyoruz. Kan örnekleri soğutulmuş (2-8°C) olarak ve ayrılmış plazma derin dondurulmuş (-30 ila -15°C) olarak gönderilmelidir.

\* International Air Transport Association (Uluslararası Hava Taşımacılığı Derneği, IATA). Dangerous Goods Regulations (Tehlikeli Mallar Düzenlemesi).

# Prosedür

## DNA İzolasyonu

Tablo 1 içerisinde gösterilen QIAGEN'den kitler *artus* CMV RG PCR Kit ile kullanılmak üzere belirtilen insan örneği tiplerinden viral DNA saflaştırma için doğrulanmıştır. Viral DNA saflaştırmayı ilgili kit el kitaplarındaki talimatlara göre yapın.

**Tablo 1. *artus* CMV RG PCR Kit ile kullanılmak üzere doğrulanmış saflaştırma kitleri**

Örnek materyali	Örnek büyüklüğü	Nükleik asit izolasyon kiti	Katalog numarası	Taşıyıcı RNA
EDTA plazma	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Dahil
EDTA plazma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Dahil

**Not:** Ekstraksiyon etkinliği ve sonuçta DNA/RNA verimi açısından taşıyıcı RNA kullanılması çok önemlidir. QIAamp DSP Virus Kit ile sağlanan taşıyıcı RNA'nın stabilitesini artırmak için *QIAamp DSP Virus Kit El Kitabı*'nın "Reaktifleri ve tamponları hazırlama" bölümünde verilen taşıyıcı RNA tekrar oluşturma ve saklamaya ilgili bilgilere göre ilerlemenizi öneririz.

**Not:** *artus* CMV RG PCR Kit dahili kontrolü doğrudan izolasyon işleminde kullanılabilir. İzolasyon sırasında negatif bir plazma örneğini dahil ettiğinizden emin olun. İzolasyonu değerlendirmenin temeli dahili kontrolün karşılık gelen sinyalidir (bakınız aşağıdaki "Dahili Kontrol" bölümü).

## Dahili Kontrol

Bu kit ile bir dahili kontrol (CMV RG IC) sağlanır. Bu durum kullanıcının hem DNA izolasyon prosedürünü kontrol etmesine, hem de olası PCR inhibisyonu için denetim yapmasına izin verir. Bu uygulama için dahili kontrolü 1 µl elüsyon hacmi başına 0,1 µl oranında izolasyona ekleyin. Örneğin QIAamp DSP Virus Kit kullanıldığında, DNA elüsyonu 60 µl Elüsyon Tamponu (AVE) içinde yapılır. Bu nedenle başlangıçta 6 µl dahili kontrol eklenmelidir. Dahili kontrol miktarı sadece elüsyon hacmine bağlıdır.

**Not:** Dahili kontrol ve taşıyıcı RNA (bakınız "DNA İzolasyonu", sayfa 12) sadece lizis tamponu ile örnek materyali karışımına veya doğrudan lizis tamponuna eklenmelidir.

Dahili kontrol örnek materyaline doğrudan eklenmemelidir. Lizis tamponuna eklenirse lütfen dahili kontrol ve lizis tamponu–taşıyıcı RNA karışımının taze olarak hazırlanması ve hemen kullanılması gerektiğine dikkat edin (karışımın oda sıcaklığı veya buzdolabında sadece birkaç saatliğine bile saklanması dahili kontrol başarısızlığı ve azalmış ekstraksiyon etkinliğine yol açabilir).

**Not:** Dahili kontrol ve taşıyıcı RNA'yı örnek materyaline doğrudan eklemeyin.

Bir saflaştırmayı başarılı kabul etmek için saflaştırma (QIAamp DSP Virus Kit) sırasında işlenmiş bir negatif plazma örneği dahili kontrolü  $C_T$  değerinin Rotor-Gene Q Cihazları kullanılarak  $C_T = 27 \pm 3$  (eşik: 0,03) değerine ulaşması gerekir (daha fazla bilgi için bkz. sayfa 25). Belirtilen aralık saflaştırma ve cihazın varyansını temel alır. Daha büyük bir sapma bir saflaştırma problemine işaret eder. Bu durumda, saflaştırmanın kontrol edilip gerekirse ikinci bir kez doğrulanması gerekir. Başka bir sorunuz varsa veya sorun yaşarsanız QIAGEN Teknik Servisleri ile irtibat kurun.

İsteğe bağlı olarak, dahili kontrol sadece olası PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılabilir. Bu uygulama için dahili kontrolü protokolda adım 2b içinde tanımlandığı şekilde CMV RG Master ve CMV Mg-Sol karışımına doğrudan ekleyin (sayfa 15).

# Protokol: PCR ve Veri Analizi

## Başlamadan önce önemli noktalar

- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q Cihazına hakkında bilgi edinmek için zaman ayırın. Daha fazla bilgi için ilgili cihaz kullanım kılavuzuna bakın.
- Her PCR çalışmasında en az bir kantitasyon standardı ve ayrıca bir negatif kontrol (Su, PCR sınıfı) dahil edildiğinden emin olun. Standart bir eğri oluşturmak için her PCR çalışması için sağlanan 4 kantitasyon standardının (CMV QS 1-4) hepsini kullanın.

## Başlamadan önce yapılacaklar

- Soğutma bloğunun (Rotor-Gene Q Cihazının aksesuarı) 2–8°C'ye önceden soğutulduğundan emin olun.
- Her kullanımdan önce tüm reaktiflerin tamamen çözülmesi, karıştırılması (tekrarlanan yukarı - aşağı pipetleme veya hızlı vorteksleme ile) ve kısa süre santrifüje edilmesi gerekir.

## Prosedür

1. İstenecek sayıda PCR tüpünü soğutma bloğunun adaptörlerine yerleştirin.
2. Dahili kontrolü DNA izolasyon işlemini izlemek ve olası PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2a'yı izleyin. Dahili kontrolü sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2b'yi izleyin.

**Not:** Dahili kontrolü kantitasyon standartları için kullanılan CMV RG Master ve CMV Mg-Sol ürünlerine eklemeniz kuvvetle önerilir. Kantitasyon standartları için dahili kontrolü bu protokolda adım 2b içinde tanımlandığı şekilde doğrudan CMV RG Master ve CMV Mg-Sol ürünlerine ekleyin ve bu master karışımı her kantitasyon standardı (CMV QS 1-4) için kullanın.

- 2a. Dahili kontrol, izolasyona zaten eklenmiştir (bakınız *Dahili Kontrol*, sayfa 13). Bu durumda Tablo 2 uyarınca bir master karışım hazırlayın (sonraki sayfa). Reaksiyon karışımı tipik olarak örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

**Tablo 2. Master karışımın hazırlanması (dahili kontrol DNA izolasyonunu izlemek ve PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)**

Örnek sayısı	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Toplam hacim	30 µl	360 µl

- 2b. Dahili kontrol doğrudan CMV RG Master ve CMV Mg-Sol karışımına eklenmelidir. Bu durumda Tablo 3 uyarınca bir master karışım hazırlayın. Reaksiyon karışımı tipik olarak örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

**Tablo 3. Master karışımın hazırlanması (dahili kontrol sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)**

Örnek sayısı	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Toplam hacim	32 µl*	384 µl*

\* Dahili kontrolü eklemenin neden olduğu hacim artışı, PCR tahlili hazırlanırken dikkate alınmaz. Saptama sisteminin duyarlılığı etkilenmez.

3. Her bir PCR tüpüne master karışımın 30 µl kadarını pipetleyin, ardından elüsyon yapılmış örnek DNA'sından 20 µl ekleyin (bkz. Tablo 4). Buna karşılık olarak kantitasyon standartlarının (CMV QS 1-4) en az birinden 20 µl pozitif kontrol olarak ve 20 µl su (Su, PCR sınıfı) negatif kontrol olarak kullanılmalıdır.

**Tablo 4. PCR tahlilini hazırlama**

Örnek sayısı	1	12
Master karışım	30 µl	her birinden 30 µl
Örnek	20 µl	her birinden 20 µl
Toplam hacim	50 µl	her birinden 50 µl
Örnek sayısı	1	12

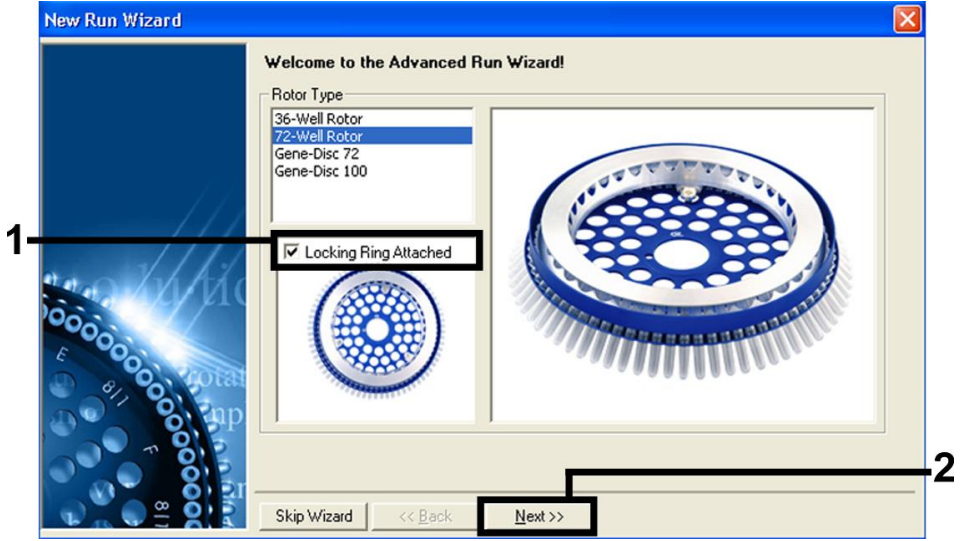
4. PCR tüplerini kapatın. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Cihazının aksesuarı) tüplerin çalışma sırasında yanlışlıkla açılmasını önlemek üzere rotorun üstüne yerleştirildiğinden emin olun.
5. CMV DNA saptamak için aşağıdaki adımlara göre bir sıcaklık profili oluşturun.

Genel tahlil parametrelerini kurma	<b>Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3</b>
Hot-start enziminin başlangıç aktivasyonu	<b>Şekil 4</b>
DNA amplifikasyonu (touchdown PCR)	<b>Şekil 5</b>
Floresans kanalı duyarlılığını ayarlama	<b>Şekil 6</b>
Çalışmayı başlatma	<b>Şekil 7</b>

Tüm spesifikasyonlar Rotor-Gene Q Yazılım sürümü 2.3.5 veya üstü ile ilgilidir. Rotor-Gene Cihazlarını programlama hakkında ek bilgiyi ilgili cihaz kullanım kılavuzunda bulabilirsiniz. Şekillerde bu ayarlar kalın siyah çerçeveye gösterilmiştir. Rotor-Gene Q Cihazları için şekiller dahil edilmiştir.

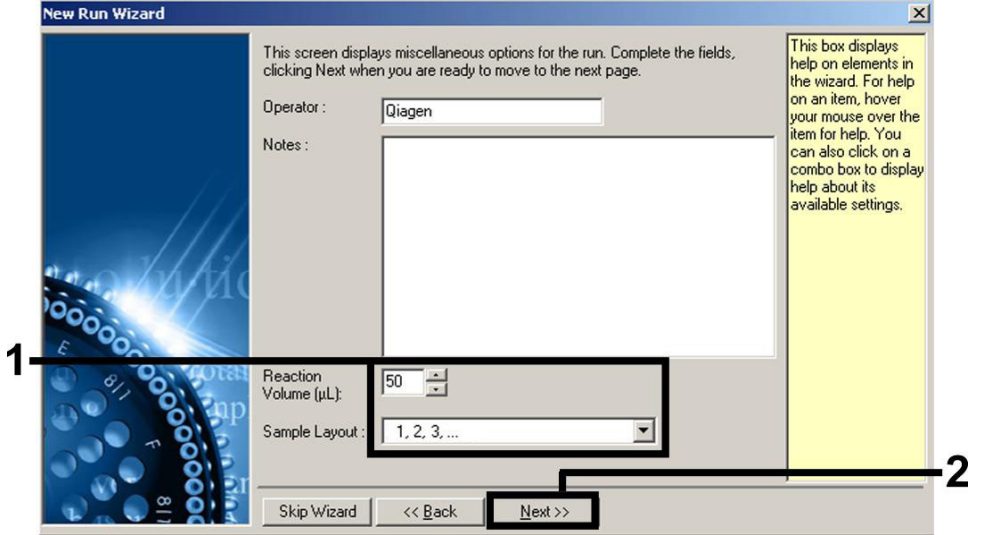
6. **New Run Wizard** (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusunu açın (Şekil 1, sonraki sayfa). **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin ve **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.





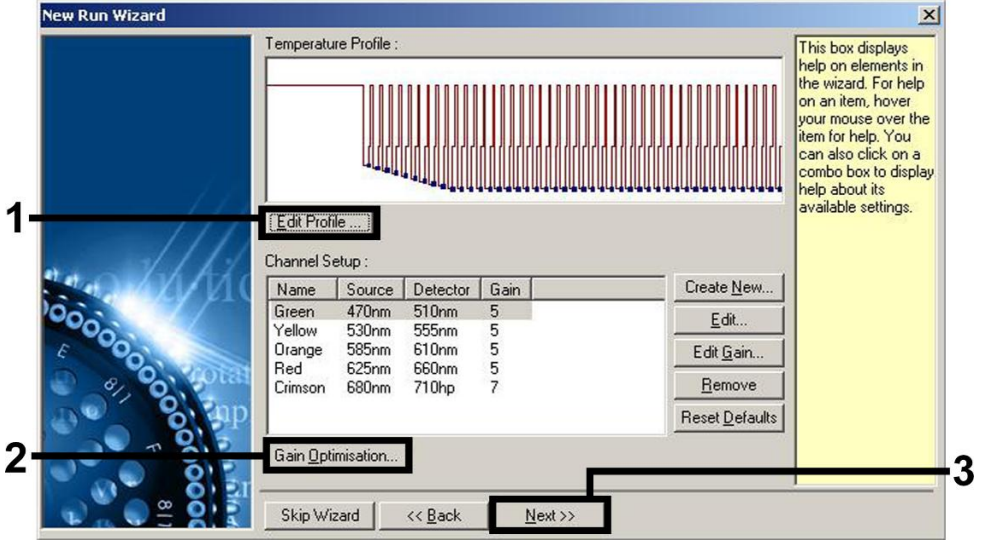
Şekil 1. "New Run Wizard" (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu.

7. PCR reaksiyon hacmi için 50 seçin ve **Next** (Sonraki) kısmına tıklayın (Şekil 2).

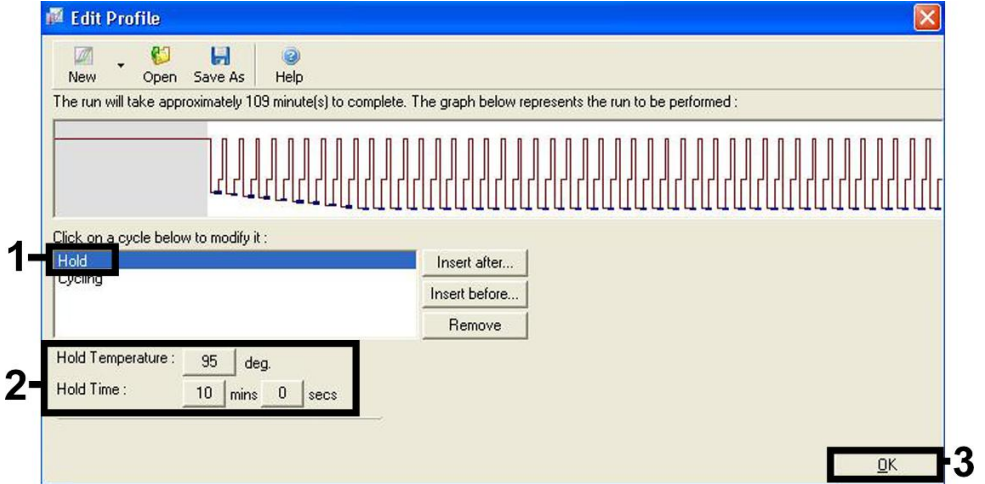


Şekil 2. Genel tahlil parametrelerini kurma.

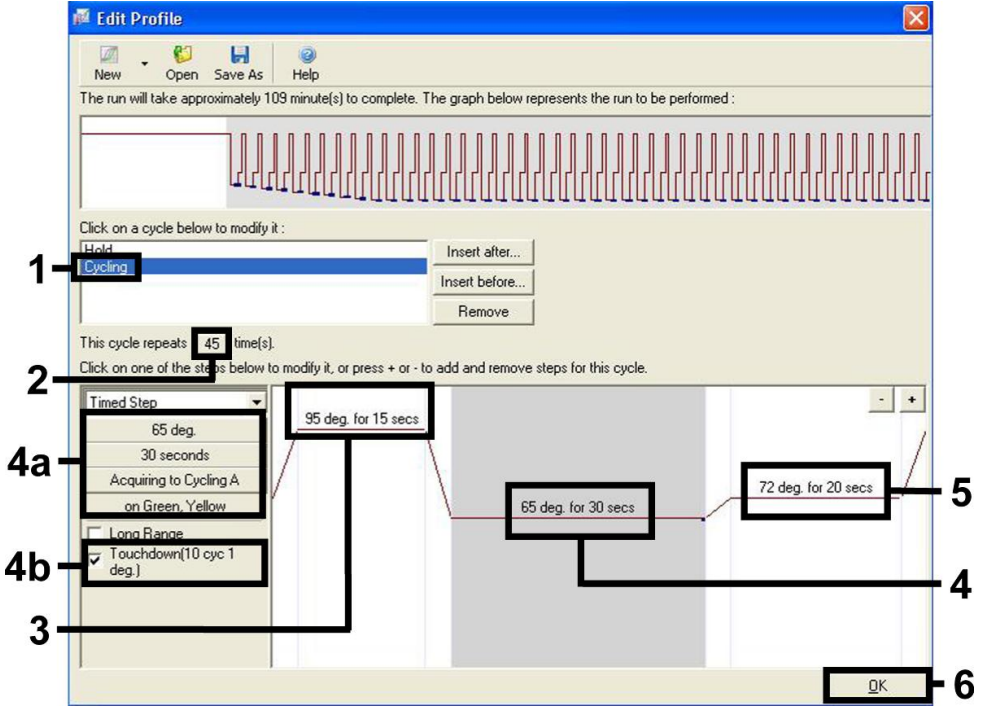
8. Sonraki **New Run Wizard** (Yeni Çalışma Sihirbazı) diyalog kutusunda **Edit Profile** (Profil Düzenle) düğmesine tıklayın (Şekil 3) ve sıcaklık profilini Şekil 3 ile Şekil 5'te gösterildiği gibi programlayın.



Şekil 3. Profili düzenleme.

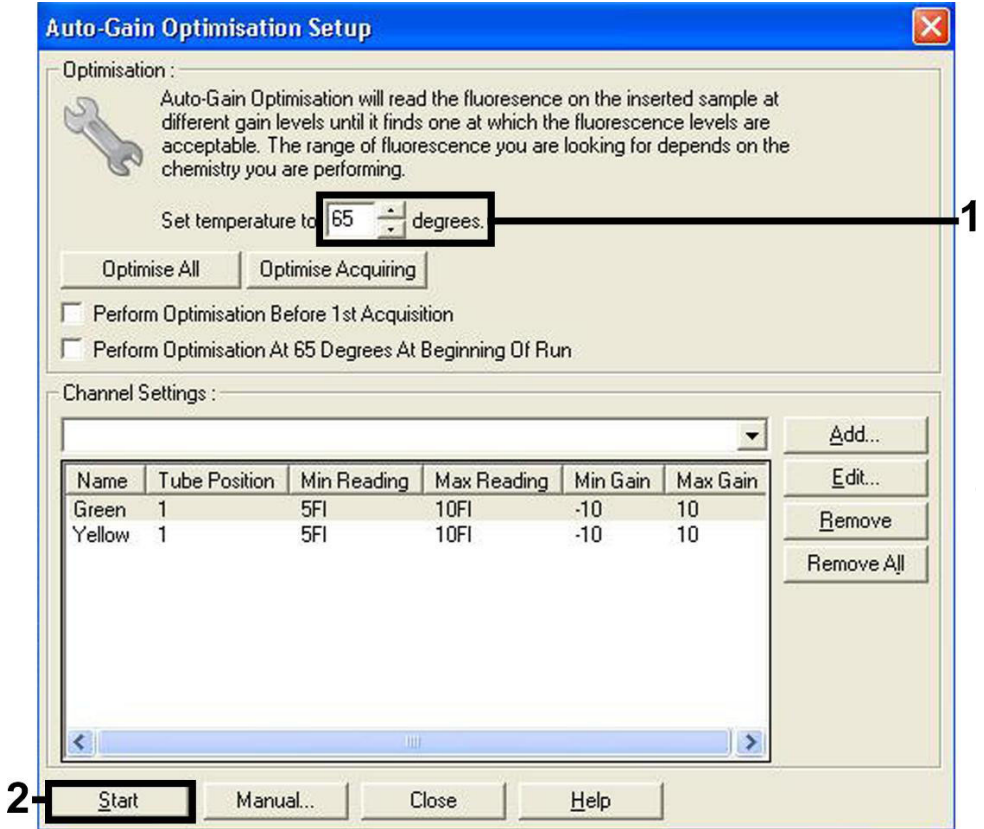


Şekil 4. Hot-start enziminin başlangıç aktivasyonu.



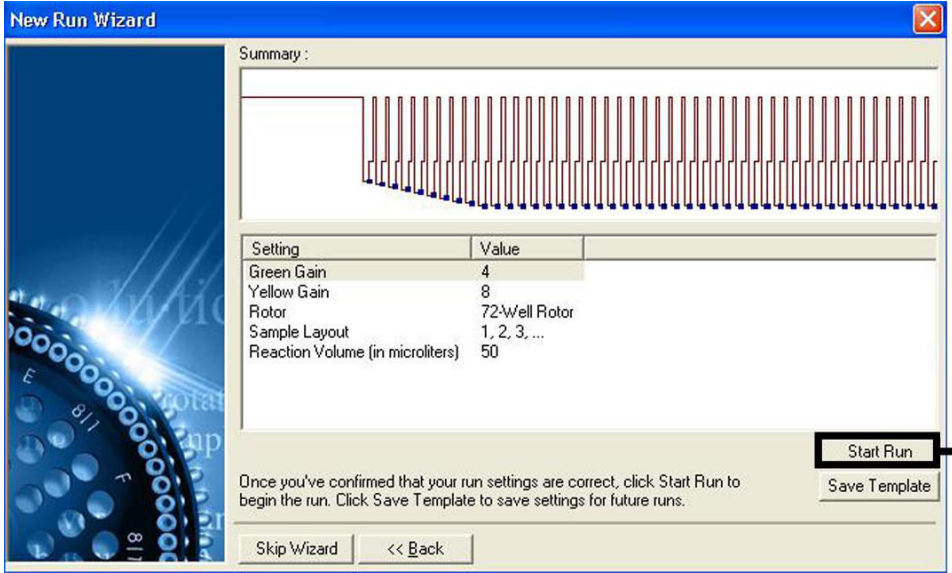
Şekil 5. DNA amplifikasyonu. Bağlanma adımında touchdown işlevini 10 döngü için etkinleştirdiğinizden emin olun.

9. Floresans kanalları için saptama aralığının PCR tüplerindeki floresans yoğunluklarına göre belirlenmesi gerekir. **Auto-Gain Optimisation Setup** (Otomatik Kazanç Optimizasyon Kurulumu) iletişim kutusunu açmak için **New Run Wizard** (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusunda **Gain Optimisation** (Kazanç Optimizasyonu) ögesine tıklayın (bkz. Şekil 3, önceki sayfa). Kalibrasyon sıcaklığını, amplifikasyon programının bağlanma sıcaklığıyla eşleşmesi için 65°C olarak ayarlayın (Şekil 6, sonraki sayfa).



Şekil 6. Floresans kanalı duyarlılığını ayarlama.

10. Kanal kalibrasyonu tarafından belirlenen kazanç değerleri otomatik olarak kaydedilir ve programlama işleminin son menü penceresinde liste halinde verilir (Şekil 7, sonraki sayfa). **Start Run** (Çalışmayı Başlat) öğesine tıklayın.



Şekil 7. Çalışmayı başlatma.

# Sonuçların Yorumlanması

## Kantitasyon

Sağlanan kantitasyon standartlarına (CMV QS 1-4) daha önce saflaştırılmış örneklerle aynı şekilde muamele edilir ve aynı 20 µl hacim doğrudan PCR'de kullanılır (ilave ekstraksiyon gerekmez). Rotor-Gene Q cihazları üzerinde standart bir eğri oluşturmak için 4 kantitasyon standardının hepsi kullanılmalı ve belirtilen konsantrasyonlarla standartlar **Edit Samples** (Örnekleri Düzenle) diyalog kutusunda tanımlanmalıdır (bakınız ilgili cihaz kullanım kılavuzu).

**Not:** Doğru kantitasyon sağlamak için dahili kontrolü kantitasyon standartları için kullanılan CMV RG Master ve CMV Mg-Sol ürünlerine eklemeniz kuvvetle önerilir. Bu uygulama için dahili kontrolü bu protokolda adım 2b içinde (sayfa 15) tanımlandığı şekilde doğrudan CMV RG Master ve CMV Mg-Sol ürünlerine ekleyin ve bu master karışımı her kantitasyon standardı (CMV QS 1-4) için kullanın.

**Not:** Kantitasyon standartları kopya/µl olarak tanımlanır. Aşağıdaki denklemin standart eğri kullanılarak belirlenen değerlerin kopya/ml örnek materyal olarak dönüştürülmesi için uygulanması gerekir:

$$\text{Sonuç} \left( \frac{\text{kopya}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Sonuç (kopya/µl)} \times \text{Elüsyon Hacmi (µl)}}{\text{Örnek Hacmi (ml)}}$$

Prensip olarak başlangıç örnek hacmi yukarıdaki denkleme girilmelidir. Örnek hacmi nükleik asit ekstraksiyonu öncesinde değiştirildiğinde bunun dikkate alınması gerekir (örn. hacmin santrifüjleme işlemiyle azaltılması veya izolasyon için gerekli hacme ekleme yapılarak hacmin artırılması).

**Not:** Kantifikasyon standartları, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen şekliyle İnsan Sitomegalovirüsü için 1. Uluslararası Standart'a (NIBSC kodu: 09/162) göre kalibre edilmiştir.

QIAamp DSP Virus Kit dikkate alınarak kopya/ml'yi IU/ml'ye dönüştürmek için:

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

**Not:** QIAamp iş akışı için, kantifiye edilmiş örnekler  $1 \times 10^1$  ila  $1 \times 10^4$  kopya/μl doğrusal aralığı dahilinde olmalıdır. Bu aralık dışında kantitasyon güvencesi verilemez.

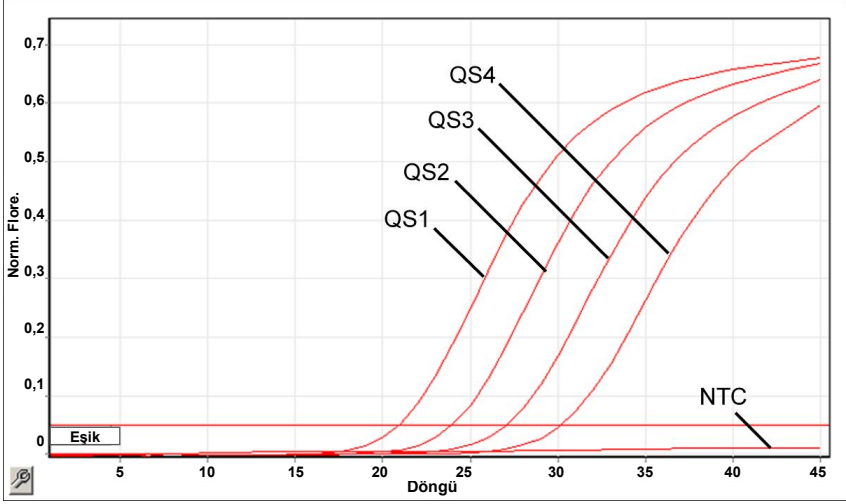
EZ1 Advanced XL cihazı üzerinde EZ1 DSP Virus Kit dikkate alınarak kopya/ml'yi IU/ml'ye dönüştürmek için:

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

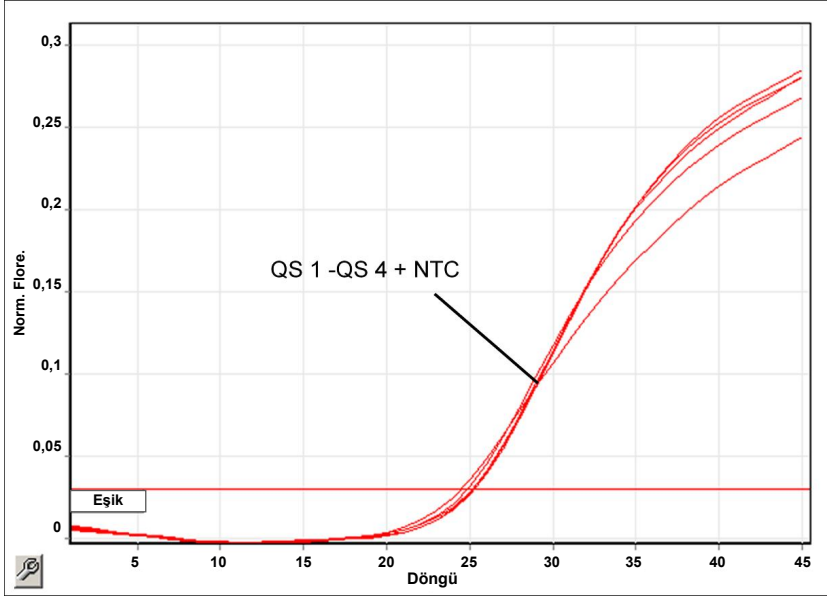
**Not:** EZ1 iş akışı için, kantifiye edilmiş örnekler  $3,16E+02$  ila  $1,00E+08$  kopya/ml doğrusal aralığı dahilinde olmalıdır. Bu aralık dışında kantitasyon güvencesi verilemez.

## Sonuçlar

Pozitif ve negatif PCR reaksiyonları örnekleri Şekil 8 ve Şekil 9'da verilmiştir, (sonraki sayfa).



Şekil 8. Kantitasyon standartlarının (CMV QS 1-4) floresans kanalı Cycling Green içinde saptanması. NTC: No Template Control (Şablon kontrolü yok) (negatif kontrol).



Şekil 9. Kantitasyon standartlarının (CMV QS 1-4) eş zamanlı amplifikasyonu ile dahili kontrolün (internal control. IC) floresans kanalı Cycling Yellow içinde saptanması. NTC: No Template Control (Şablon kontrolü yok) (negatif kontrol).



---

Floresans kanalı Cycling Green içinde bir sinyal saptanır.

Analizin sonucu pozitifdir: örnek CMV DNA içerir.

Bu durumda Cycling Yellow kanalında bir sinyalin saptanması kullanılmayabilir çünkü yüksek başlangıç CMV DNA konsantrasyonları (Cycling Green kanalında pozitif sinyal) Cycling Yellow kanalında dahili kontrol floresans sinyalinin azalmış olması veya olmamasına neden olabilir (rekabet).

Floresans kanalı Cycling Green içinde sinyal saptanmaz. Aynı zamanda Cycling Yellow kanalında dahili kontrolden bir sinyal belirir.

Örnekte hiçbir CMV DNA'sı saptanamaz. Negatif kabul edilebilir.

Negatif CMV PCR durumunda dahili kontrolün saptanan sinyali PCR inhibisyonu olasılığını ortadan kaldırır.

Cycling Green veya Cycling Yellow kanallarında sinyal saptanmaz.

Bir sonuca varılamaz.

Hata kaynakları ve çözümleriyle ilgili bilgi "Sorun Giderme Kılavuzu", sayfa 41 içinde bulunabilir.

# Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca her *artus* CMV RG PCR Kit tutarlı ürün kalitesini sağlamak üzere önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilir.

## Sınırlamalar

Tüm reaktifler sadece in vitro tanı amaçlı kullanım içindir.

Ürün in vitro diagnostik prosedürler konusunda özel olarak talimat ve eğitim almış personel tarafından kullanıma yöneliktir.

Optimum PCR sonuçları için ilgili cihaz kullanım kılavuzuna kati olarak uymak gerekir.

Tüm bileşenlerin kutu ve etiketlerinde basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

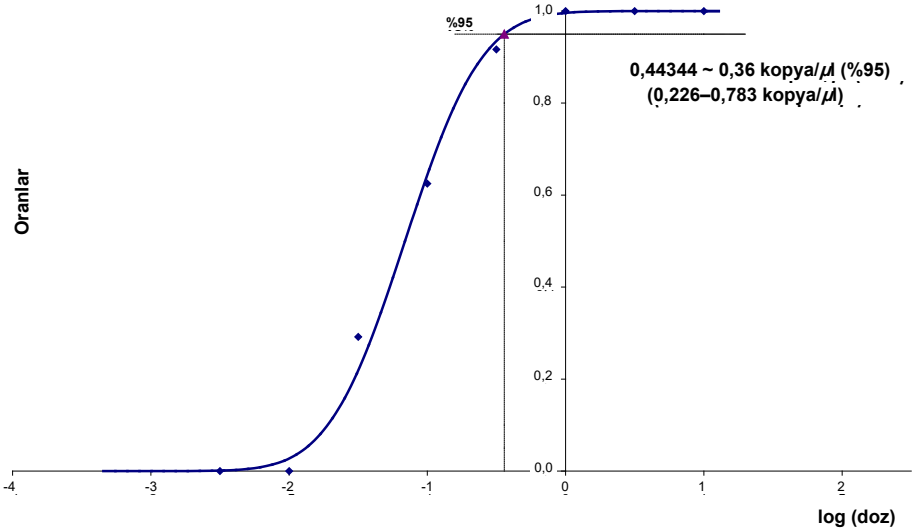
Nadir olsa da kitin primerleri ve/veya probun kapsadığı viral genomun yüksek ölçüde korunmuş bölgelerinde mutasyonlar olması bu vakalarda virüs varlığının saptanmaması veya eksik kantitasyonla sonuçlanabilir. Tahlil tasarımının geçerliliği ve performansı düzenli aralıklarla revize edilmektedir.

# Performans Özellikleri

## Analitik Duyarlılık

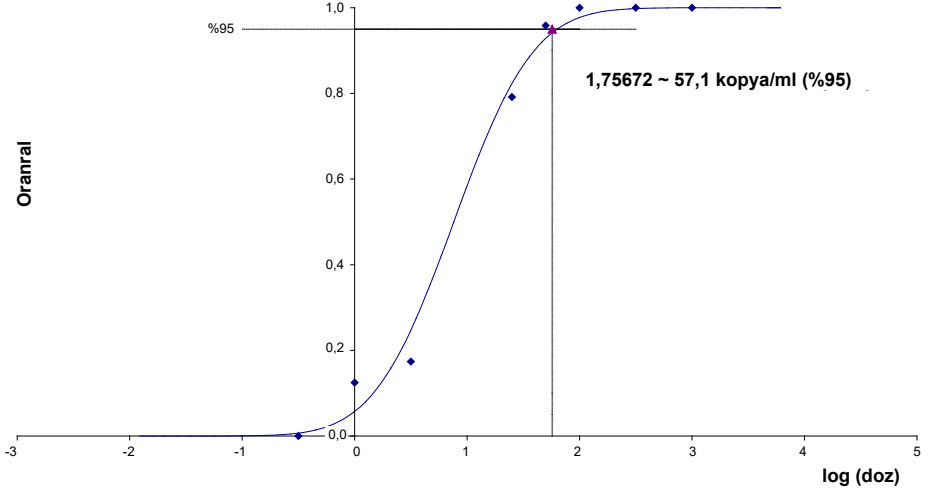
Analitik tespit sınırı ve ayrıca saflaştırma dikkate alınarak analitik tespit sınırı (duyarlılık sınırları) *artus* CMV RG PCR Kit için değerlendirilmiştir. Saflaştırma dikkate alınarak analitik tespit sınırı belirli bir ekstraksiyon yöntemiyle kombinasyon halinde CMV pozitif klinik numuneler kullanılarak belirlenir. Analitik tespit sınırı ise bunun aksine bilinen konsantrasyonda CMV DNA kullanılarak seçilen ekstraksiyon yönteminden bağımsız olarak belirlenir.

*artus* CMV RG PCR Kit'in analitik duyarlılığını belirlemek için 10 ila nominal 0,00316 kopya/ $\mu$ l şeklinde bir CMV genomik DNA dilüsyon serisi oluşturulmuş ve *artus* CMV RG PCR Kit ile kombinasyon halinde Rotor-Gene Cihazları üzerinde analiz edilmiştir. Testler 8 replikatta 3 farklı günde yapılmıştır. Sonuçlar probit analiziyle belirlenmiştir. Rotor-Gene 6000 üzerinde probit analizinin grafik bir temsili Şekil 10'da verilmiştir (sonraki sayfa). Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 ve Rotor-Gene 3000 ile kombinasyon halinde *artus* CMV RG PCR Kit'in analitik tespit sınırı sırasıyla 0,36 kopya/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ) ve 0,24 kopya/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ) şeklindedir. Bu 0,36 kopya/ $\mu$ l veya 0,24 kopya/ $\mu$ l saptanması olasılığının %95 olduğu anlamına gelir.



**Şekil 10. Probit analizi: CMV (Rotor-Gen 6000). Rotor-Gen 6000 üzerinde *artus* CMV RG PCR Kit'in analitik duyarlılığı.**

Rotor-Gen Cihazları üzerinde *artus* CMV RG PCR Kit'in saflaştırılması (QIAamp DSP Virus Kit) dikkate alınarak analitik duyarlılık klinik plazma numunelerine eklenen 1000 ile nominal 0,316 CMV kopya/ml arasında CMV virüs materyali dilüsyon serisi kullanılarak belirlenmiştir. Bunlar şu ürünle DNA ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur: QIAamp DSP Virus Kit (ekstraksiyon hacmi: 0,5 ml elüsyon hacmi: 60 µl). 8 dilüsyonun her biri *artus* CMV RG PCR Kit'te 3 farklı günde 8 replikat ile analiz edilmiştir. Sonuçlar probit analiziyle belirlenmiştir. Probit analizinin grafik bir temsili Şekil 11 içinde gösterilmektedir (sonraki sayfa). Rotor-Gen 3000 ile kombinasyon halinde *artus* CMV RG-PCR Kit'in saflaştırılması açısından analitik tespit sınırı 57,1 kopya/ml şeklindedir ( $p = 0,05$ ). Bu 57,1 kopya/ml saptanması olasılığının %95 olduğu anlamına gelir.



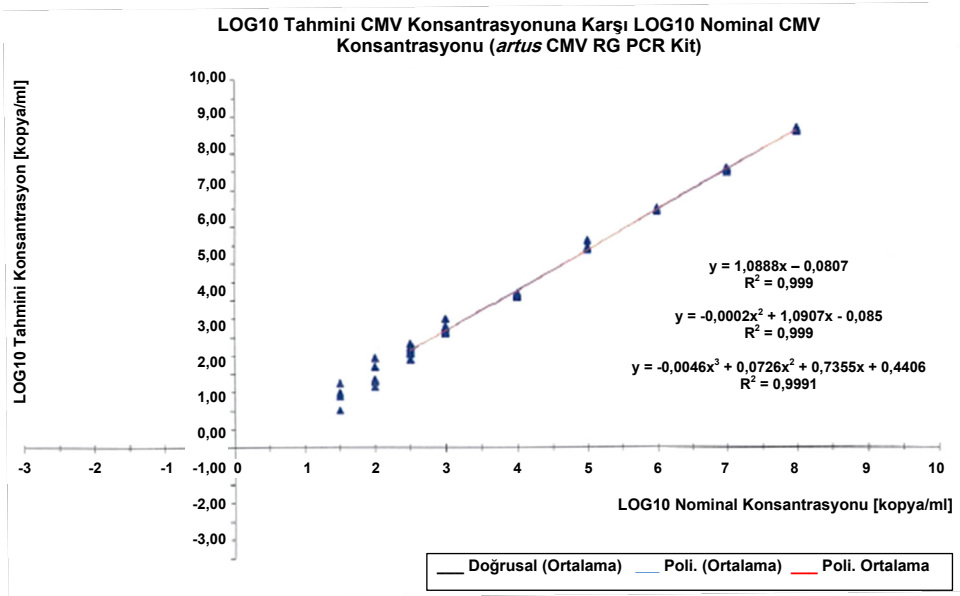
**Şekil 11. Probit analizi: CMV (Rotor-Gene 3000). Rotor-Gene 3000 üzerinde *artus* CMV RG PCR Kit'in saflaştırılması (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) dikkate alınarak analitik duyarlılık.**

EZ1 DSP Virus Kit (ekstraksiyon hacmi: 0,4 ml elüsyon hacmi: 60 µl) ile saflaştırma açısından analitik duyarlılık Rotor-Gene 6000 üzerinde *artus* CMV RG PCR Kit'in EZ1 Advanced XL cihazı kullanılarak 68,75 kopya/ml ( $p = 0,05$ ) şeklindedir. Bu 68,75 kopya/ml saptanması olasılığının %95 olduğu anlamına gelir.

## Doğrusal Aralık

EZ1 DSP Virus Kit (ekstraksiyon hacmi: 0,4ml elüsyon hacmi: 60 µl) ile saflaştırma açısından doğrusal aralık EZ1 Advanced XL cihazı kullanılarak ve  $3,16E+01$  ile  $1,00E+08$  kopya/ml arasında bir dilüsyon serisinde CMV virüs materyalinin 4 ila 6 replikatı test edilerek belirlenmiştir.

Probit analizinin grafik bir temsili Şekil 12 içinde gösterilmektedir (sonraki sayfa).



**Şekil 12.** EZ1 Advanced XL cihazı üzerinde saflaştırma (EZ1 DSP Virus Kit) dikkate alınarak *artus* CMV RG PCR Kit veri setinin polinomiyal regresyonu. Doğrusal, karesel ve kübik regresyon modelleri dahildir.

*artus* CMV RG PCR Kit'in EZ1 DSP Virus Kit (ekstraksiyon hacmi: 0,4ml elüsyon hacmi: 60µl) ile saflaştırma dikkate alınarak doğrusal aralığı EZ1 Advanced XL cihazı kullanıldığında 3,16E+02 ila 1,00E+08 kopya/ml'dir.

**Not:** *artus* CMV RG PCR Kit'in QIAamp DSP Virus Kit (ekstraksiyon hacmi: 0,4 ml elüsyon hacmi: 60 µl) ile saflaştırma dikkate alınarak doğrusal aralığı 1,00E+01 ila 1,00E+04 kopya/µl'dir.

## Özgüllük

*artus* CMV RG PCR Kit özgüllüğü öncelikle primer ve propların seçilmesi ve ayrıca sıkı reaksiyon koşullarının seçilmesiyle sağlanır. Primerler ve proplar gen bankalarında yayımlanmış tüm dizilere olası homolojiler açısından sekans karşılaştırma analiziyle kontrol edilmiştir. Tüm ilgili suçların saptanabilirliği böylece sağlanmıştır.

Ayrıca özgüllük 100 farklı CMV negatif plazma örneğiyle doğrulanmıştır. Bu örneklerden 99'u CMV RG Master'a dahil edilen CMV'ye spesifik primerler ve problemlarla herhangi bir sinyal oluşturmamıştır.

**Not:** CMV'ye özgü primerler ve problemlarda bir sinyal oluşturan ve aynı zamanda *artus* CMV LC ve TM RG PCR Kit'lerinde de CMV pozitif test sonucu veren 1 örneğin pozitif olması muhtemeldir. 100 münferit donör örneğinin test edilmesine dayalı nihai özgüllük %99,00 (99/100) olarak doğrulanmıştır.

*artus* CMV RG PCR Kit olası çapraz reaktivitesi Tablo 5'te liste halinde verilen kontrol grubu kullanılarak test edilmiştir. Test edilen patojenlerin hiçbiri reaktif bulunmamıştır. Karışık enfeksiyonlarla çapraz reaktivite görülmemiştir.

**Tablo 5. Kitin özgüllüğünün potansiyel çapraz reaktif patojenlerle test edilmesi**

Kontrol grubu	CMV (Cycling Green veya Cycling A.FAM)	Dahili kontrol (Cycling Yellow veya Cycling A.JOE)
İnsan herpes virüsü 1 (Herpes simpleks virüsü 1)	-	+
İnsan herpes virüsü 2 (Herpes simpleks virüsü 2)	-	+
İnsan herpes virüsü 3 (Varicella-zoster virüsü)	-	+
İnsan herpes virüsü 4 (Epstein-Barr virüsü)	-	+
İnsan herpes virüsü 6A	-	+
İnsan herpes virüsü 6B	-	+
İnsan herpes virüsü 7	-	+
İnsan herpes virüsü 8 (Kaposi sarkomu ilişkili herpes virüsü)	-	+
Hepatit A virüsü	-	+
Hepatit B virüsü	-	+
Hepatit C virüsü	-	+

(devamı bir sonraki sayfadadır)

Tablo 5 (bir önceki sayfadan devam etmektedir)

Kontrol grubu	CMV (Cycling Green veya Cycling A.FAM)	Dahili kontrol (Cycling Yellow veya Cycling A.JOE)
İnsan immünyetmezlik virüsü 1	-	+
İnsan T hücresi lösemi virüsü 1	-	+
İnsan T hücresi lösemi virüsü 2	-	+
Batı Nil virüsü	-	+
Enterovirüs	-	+
Parvovirüs B19	-	+

## Kesinlik

Rotor-Gene Cihazları yoluyla *artus* CMV RG PCR Kit'in kesinlik verileri toplanmıştır ve tahlilin total varyansının belirlenmesini mümkün kılar. Toplam varyans, tahlil içi değişkenlik (bir deneyde aynı konsantrasyondan örneklerin birden fazla sonucunun değişkenliği), tahliller arası değişkenlik (bir laboratuvarında farklı kullanıcılar tarafından aynı tipte farklı aletlerde oluşturulan birden fazla tahlil sonucunun değişkenliği) ve partiler arası değişkenlikten (çeşitli partiler kullanılarak tahlilin birden fazla sonucunun değişkenliği) oluşur. Elde edilen veriler patojene spesifik ve dahili kontrol PCR için varyasyon katsayısını, varyansı ve standart sapmayı belirlemek için kullanılmıştır.

*artus* CMV RG PCR Kit'in kesinlik verileri en düşük konsantrasyonun (QS 4; 10 kopya/μl) kantitasyon standardı kullanılarak toplanmıştır. Testler 8 replikatla yapılmıştır. Kesinlik verileri amplifikasyon eğrilerinin  $C_T$  değerleri temelinde hesaplanmıştır ( $C_T$ : eşik döngüsü, bakınız Tablo 6, sonraki sayfa). Ayrıca, kopya/μl olarak kantitatif sonuçlar için kesinlik verileri karşılık gelen  $C_T$  değerleri kullanılarak belirlenmiştir (bakınız Tablo 7, sonraki sayfa). Bu sonuçlar temelinde belirtilen konsantrasyonun bulunduğu herhangi bir örnekte genel istatistiksel dağılım %1,21 ( $C_T$ ) veya %14,38 (konsantrasyon) ve dahili kontrolün saptanması için %1,93 ( $C_T$ ) şeklindedir. Bu değerler belirlenmiş değişkenliklerin tüm tek değerlerinin toplamı temelindedir.



**Tablo 6. C<sub>T</sub> değerleri temelinde kesinlik verileri**

	<b>Standart sapma</b>	<b>Varyans</b>	<b>Varyasyon katsayısı (%)</b>
Tahlil içi değişkenlik: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Tahlil içi değişkenlik: Dahili kontrol	0,31	0,10	1,16
Tahliller arası değişkenlik: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Tahliller arası değişkenlik: Dahili kontrol	0,47	0,22	1,77
Gruplar arası değişkenlik: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Gruplar arası değişkenlik: Dahili kontrol	0,53	0,28	2,02
Toplam varyans: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Toplam varyans: Dahili kontrol	0,51	0,26	1,93

**Tablo 7. Kantitatif sonuçlar (kopya/µl olarak) temelinde kesinlik verileri**

	<b>Standart sapma</b>	<b>Varyans</b>	<b>Varyasyon katsayısı (%)</b>
Tahlil içi değişkenlik: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Tahliller arası değişkenlik: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Gruplar arası değişkenlik: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Toplam varyans: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

## Olumsuz Etkileyen Maddeler

Farklı antikoagülanlara sahip ve piyasada bulunabilen farklı kan toplama sistemlerinde negatif plazmaya CMV DNA'sı eklenmiştir. Hesaplanan konsantrasyon, kopya/ml,  $C_T$  ortalama değeri, standart sapma, varyans ve %CV Tablo 8'de raporlanmaktadır. Standart sapma ve varyasyon katsayısı %5'lik kapsam içindedir ve dolayısıyla tolerans aralığı dahilindedir. PCR üzerinde çeşitli maddelerden kaynaklı, anlamlı bir etki saptanmamıştır.

**Tablo 8. Piyasada bulunabilen kan toplama sistemlerinin ve antikoagülanların verileri**

Madde	Konsantrasyon (kopya/ml)	$C_T$ ortalama	$C_T$ Standart sapma	$C_T$ Varyans	$C_T$ CV (%)
Potasyum EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Potasyum EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Potasyum EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Potasyum EDTA, Springe (referans)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Potasyum EDTA, Sarstedt (referans)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Potasyum EDTA (gebelik)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

CMV pozitif EDTA plazma örneklerine 3 x LOD ve 10 x LOD'de endojen maddeler (Tablo 9, sonraki sayfa) eklenmiştir. Tüm örnekler başarıyla saptanmış ve yüksek endojen inhibitör seviyeleri (bilirubin, hemoglobin, trigliserit ve albümin) içeren örnekler için hiçbir interferans gözlemlenmemiştir.

**Tablo 9. Test edilen endojen maddeler**

<b>Olumsuz etkileyen maddeler</b>	<b>Olumsuz etkileyen maddelerin konsantrasyonu</b>
Bilirubin	30 mg/dl
Hemoglobin	2 g/dl
Trigliserit	1 g/dl
Albümin	6 g/dl

Nakil ortamlarında sık kullanılan ilaçlar CLSI® Yönergesi EP07-A2 (11) içerisinde tavsiye edilen şekilde terapötik bir ilaç tedavisini takiben akut pik konsantrasyonun 3 katı seviyede test edilmiştir (Tablo 10'a bakın). Bu maddelerin her biri 4 replikat olarak test edilen CMV negatif ve CMV pozitif örneklere eklenmiştir.

Test edilen eksojen maddelerin hiçbiri *artus* CMV RG PCR Kit performansı üzerinde anlamlı etki göstermemiştir.

**Tablo 10. Eksojen madde olarak test edilen ilaçların listesi**

<b>Olumsuz etkileyen maddeler</b>	<b>Test Konsantrasyonu</b>
<b>Antibiyotikler</b>	
Sülfametoksazol	200 mg/l
Trimetoprim	5,2 mg/l
Claforan® (Sefotaksim)	1 g/l
Tazobac® (Piperasilin+Tazobaktam)	Piperasilin: 1 g/l Tazobaktam:125 mg/l
Tikarsilin	1 g/l
Augmentin® (Amoksisilin + Klavulanik asit)	Amoksisilin:125 mg/l Klavulanik asit: 25 mg/l
Vankomisin	125 mg/l
<b>Antifungal</b>	
Flukonazol	1 mg/l
<b>Bağışıklık baskılayıcı ilaçlar</b>	
Rapamisin	100 mg/l
Mikofenolat sodyum	80 mg/l

## Güçlülük

Güçlülüğün doğrulanması *artus* CMV RG PCR Kit toplam başarısızlık oranının belirlenmesini mümkün kılar. 100 CMV negatif plazma örneğine 170 kopya/ml son konsantrasyonda CMV eklenmiştir (analitik duyarlılık limitinin yaklaşık üç katı konsantrasyon). QIAamp DSP Virus Kit ekstraksiyonundan sonra bu örnekler *artus* CMV RG PCR Kit ile analiz edilmiştir. Tüm CMV örnekleri için başarısızlık oranı %0'dır. Ayrıca dahili kontrolün güçlülüğü 100 CMV negatif plazma örneğinin saflaştırılması ve analizi ile değerlendirilmiştir. Böylece *artus* CMV RG PCR Kit'in güçlülüğü  $\geq$ %99'dur.

## Yeniden Üretilebilirlik

Yeniden üretilebilirlik verileri *artus* CMV RG PCR Kit'in düzenli performans değerlendirmesine ve ayrıca başka ürünlerle etkinlik karşılaştırmasına izin verir. Bu veriler belirlenmiş yeterlik programlarına katılımı elde edilir.

Yerleşik yeterlik programlarına katılıma ek olarak, 10 üyeli bir CMV paneli (Tablo 11) nükleik asidin saflaştırılması için EZ1 Advanced XL cihazı üzerinde EZ1 DSP Virus Kit ve DNA elüatının test edilmesi için *artus* RG PCR Kit kullanılarak 3 dış laboratuvarında test edilmiştir.

**Tablo 11. CMV Panel Üyelerinin Özeti**

Panel Üyesi (Panel Üyesi türü)	Panel Üyesi	Dilüsyon Etkisi
1001 (1)	Negatif	Negatif Havuz 1
1002 (1)	Negatif	Negatif Havuz 2
1003 (2)	Yüksek Negatif	%50 Pozitif
1004 (2)	Yüksek Negatif	%50 Pozitif
1005 (3)	Düşük Pozitif	200 kopya/ml
1006 (3)	Düşük Pozitif	200 kopya/ml
1007 (4)	Orta Pozitif	2.000 kopya/ml
1008 (4)	Orta Pozitif	2.000 kopya/ml
1009 (5)	Yüksek Pozitif	200.000 kopya/ml
1010 (5)	Yüksek Pozitif	200.000 kopya/ml

10 üyeli panel 3 reaktif lotuyla her bir alanda 6 gün boyunca her gün 2 farklı operatörden yararlanılarak ikili şekilde test edilmiştir. Dolayısıyla, 20 örnek 3 alanda 6 gün boyunca 2 operatörle çarpıldığıında 720 veri noktasına eşit olmaktadır.

artus CMV RGQ MDx testinin toplam yeniden üretilebilirliği 200 kopya/ml ve 200.000 kopya/ml arasında konsantrasyona sahip örnekler için  $\leq 12\%$  CV olarak bulunmuştur (Table 12)

**Tablo 12. Genel Özet (her bir Panel Üyesi türü) – gözlemlenen ortalamalar**

panel_üyesi_türü	Gözlem Sayısı	Ortalama	Medyan	Standart Sapma	Yüzde 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

5 panelin her birinin lot, alan, operatör, gün koşulları ve çalışmalar arası ve çalışma içi koşullar açısından log10 IU/ml değerleri için yüzde varyansının ve standart sapmasının genel özeti Tablo 13'te sunulmaktadır (sonraki sayfa).

Tablo 13. Varyans ve standart sapmanın genel özeti

Örnek	1	2	3	4	5	
Örnek tipi	negatif	yüksek negatif	düşük pozitif	orta pozitif	yüksek pozitif	
Gözlemlenen ortalama log <sub>10</sub> IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Test sayısı	144	144	144	144	144	
Ölçüm	%varyans S.S.					
Varyans Bileşeni	Lot	0	3,10	0	0	3,00
		0	0,113	0	0	0,016
	Alan	0	0	0	0,90	0
		0	0	0	0,016	0
	Operatör	4,3	4,6	0	18,8	15,4
		0,033	0,136	0	0,074	0,037
	Gün	0	0	8,60	6,00	48,10
		0	0	0,067	0,042	0,065
	Çalışmalar arası	0	0	4,40	10,90	7,90
		0	0	0,048	0,057	0,026
Çalışma içi	95,7	92,3	87	63,40	25,60	
	0,155	0,611	0,212	0,136	0,048	
Toplam	100	100	100	100	100	
	0,158	0,635	0,227	0,171	0,094	

## Diagnostik Değerlendirme

*artus* CMV RG PCR Kit, *artus* CMV RG PCR Kit'i COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test ile karşılaştıran bir çalışmada değerlendirilmiştir. 156 retrospektif ve prospektif klinik EDTA plazma örneği analiz edilmiştir. Tüm numune örnekleri daha önce rutin diagnostik için COBAS AMPLICOR CMV MONITOR kullanımıyla pozitif veya negatif olarak analiz edilmiştir.

*artus* CMV RG PCR Kit'i test etmek için CMV DNA, QIAamp DSP Virus Kit kullanılarak, *artus* CMV RG PCR Kit'in dahili kontrolü izolasyona eklenerek ve Rotor-Gene 3000 üzerinde analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test için numuneler prospektüste sağlanan üretici talimatına göre işlenmiş ve analiz edilmiştir.

COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test ile pozitif test sonucu veren 11 örneğin tümü aynı zamanda *artus* CMV RG PCR Kit ile pozitif test sonucu vermiştir. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test ile negatif test sonucu veren 145 örneğin 123'ü aynı zamanda *artus* CMV RG PCR Kit ile negatif test sonucu vermiştir. 22 uyumsuz sonuç elde edilmiştir (Tablo 14).

**Tablo 14. Karşılaştırmalı doğrulama çalışması sonuçları**

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

COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test sonuçları referans olarak alınırsa, *artus* CMV RG PCR Kit'in tüm örnekleri için diagnostik duyarlılık %100 ve diagnostik özgüllük %84,8'dir.

22 uyumsuz örnekle yapılan ek testler *artus* PCR Kit'lerin sonuçlarını doğrulamıştır. Bu nedenle uyumsuzluğun *artus* CMV RG PCR Kit'in daha yüksek duyarlılığından kaynaklandığı varsayılabilir.

---

# Referanslar

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).



# Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

## Yorum ve öneriler

### Floresans kanalı Cycling Green içinde pozitif kontrollü sinyal yok (CMV QS 1–4)

- |  |   |
|--|---|
| a) PCR veri analizi için seçilen floresans kanalı protokole uymamaktadır   | Veri analizi açısından analitik CMV PCR için floresans kanalı Cycling Green ve dahili kontrol PCR için floresans kanalı Cycling Yellow seçin. |
| b) Rotor-Gene Cihazının sıcaklık profilinin yanlış programlanması  | Sıcaklık profilini protokolle karşılaştırın. Bkz. "Protokol: PCR ve Veri Analizi", sayfa 14.  |
| c) PCR'nin yanlış yapılandırılması   | Çalışma adımlarınızı pipetleme şeması yoluyla kontrol edin ve gerekirse PCR'ı tekrarlayın. Bkz. "Protokol: PCR ve Veri Analizi", sayfa 14.    |
| d) Bir veya daha fazla kit bileşenine ait saklama koşulları "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 10 bölümünde verilen talimatlara uymamıştır | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.              |
| e) <i>artus</i> CMV RG PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir  | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.              |

### Cycling Yellow floresans kanalı içinde QIAamp DSP Virus Kit ( $C_T = 27 \pm 3$ ; eşik, 0,03) kullanılarak saflaştırma yapılmış bir negatif plazma örneğinin dahili kontrolünün sinyalinin zayıf olması veya hiç olmaması ve aynı zamanda Cycling Green kanalında sinyal bulunmaması

- |  |   |
|--|---|
| a) PCR koşulları protokole uymamaktadır    | PCR koşullarını kontrol edin (yukarıya bakın) ve gerekirse PCR'ı düzeltilmiş ayarlarla tekrarlayın.   |
| b) PCR inhibe olmuştur                     | Önerilen izolasyon yöntemini kullandığınızdan emin olun ve üreticinin talimatını yakından izleyin.  |
| c) Ekstraksiyon sırasında DNA kaybolmuştur | Dahili kontrol ekstraksiyona eklenmişse, dahili kontrol sinyalinin olmaması ekstraksiyon sırasında DNA kaybına işaret edebilir. Önerilen izolasyon yöntemini (bakınız "DNA İzolasyonu", sayfa 12) kullandığınızdan emin olun ve üreticinin talimatını yakından izleyin. |

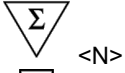
## Yorum ve öneriler

- |  |  |
|--|--|
| d) Bir veya daha fazla kit bileşenine ait saklama koşulları "Reaktif Saklama ve Kullanma", sayfa 10 bölümünde verilen talimatlara uymamıştır | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |
| e) <i>artus</i> CMV RG PCR Kit'in son kullanma süresi geçmiştir  | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |

### **Analitik PCR'de floresans kanalı Cycling Green içinde negatif kontrollü sinyaller**

- |   |   |
|---|---|
| a) PCR hazırlama sırasında kontaminasyon oluşmuştur | PCR'ı replikatlar halinde yeni reaktiflerle tekrarlayın.<br>Mümkünse PCR tüplerini test edilecek örneğin eklenmesinden hemen sonra kapatın.<br>Pozitif kontrolleri en son pipetlediğinizden emin olun.<br>Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun. |
| b) Ekstraksiyon sırasında kontaminasyon oluşmuştur  | Test edilecek örneğin ekstraksiyonu ve PCR'sini yeni reaktifler kullanarak tekrarlayın.<br>Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.  |

# Semboller



<N> test için yeterli reaktif içermektedir



Son kullanma tarihi



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Bileşenler



İçindekiler



Numara



Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatlarına bakın

# Sipariş Bilgisi

Ürün	İçerik	Kat. no.
artus CMV RG PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: Master, Magnezyum Solüsyonu, 4 Kantitasyon Standardı, Dahili Kontrol, Su (PCR sınıfı)	4503263
artus CMV RG PCR Kit (96)	96 reaksiyon için: Master, Magnezyum Solüsyonu, 4 Kantitasyon Standardı, Dahili Kontrol, Su (PCR sınıfı)	4503265
<b>EZ1 DSP Virus Kit — viral DNA ve RNA'nın 1–14 serum, plazma veya BOS örneğinden otomatik, eş zamanlı saflaştırılması için</b>		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	48 viral nükleik asit hazırlama için: Önceden Doldurulmuş Reaktif Kartuşları, Tek Kullanımlık Uç Tutucular, Tek Kullanımlık Filtre Uçları, Örnek Tüpleri, Elüsyon Tüpleri, Tamponlar, Taşıyıcı RNA	62724
<b>QIAamp DSP Virus Kit — in vitro diagnostik amaçlarla insan plazmasından viral nükleik asitlerin saflaştırılması için</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	50 hazırlık için: QIAamp MinElute® Döndürme Kolonları, Tamponlar, Reaktifler, Tüpler, Kolon Uzaticıları ve VacConnectors	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx ve aksesuarları</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar,	9002032

Ürün	İçerik	Kat. no.
	yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) real-time PCR cihazı; dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar dahildir: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) real-time PCR cihazı; dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar dahildir: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	2 kanallı (yeşil, sarı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	2 kanallı (yeşil, sarı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	2 kanal (yeşil, sarı) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve yüksek çözünürlüklü eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002012

Ürün	İçerik	Kat. no.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	2 kanal (yeşil, sarı) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve yüksek çözünürlüklü eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	96 x 0,2 ml tüplerde standart 8 x 12 dizide manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 reaksiyon için 1000 ince duvarlı tüp	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10.000 reaksiyon için 10 x 1000 ince duvarlı tüp	981008

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özgü ret beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

# Belge Revizyon Geçmişi

Revizyon	Deęiřiklikler
R6, Mart 2021	<p>Doğrusal Aralık, Olumsuz Etkileyen Maddeler ve Yeniden Üretilbilirlik bölümlerinin eklenmesi.</p> <p>Kullanım Amacı ve Kantitasyon bölümlerinde güncellemeler.</p> <p>Artık desteklenmeyen QIAGEN cihazlarına referansların kaldırılması.</p>

## artus CMV RG PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinden ulaşabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımnı diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol ağan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Bu ürünün satın alınması, satın alanın, ürünü insanda in vitro tanı amacıyla tanı amaçlı hizmetlerde kullanımına izin verir. Alımdan kazanılan bu özel kullanım hakkı dışında genel patent veya hiçbir türde başka lisans burada verilmemektedir.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, EZ1®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); CLSI®, (Clinical Laboratory and 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, tüm hakları saklıdır.

---

Sipariş [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknik Destek [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Web Sitesi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)