

Luty 2018

# Karta zastosowania QIAAsymphony<sup>®</sup> RGQ

*artus*<sup>®</sup> CMV QS-RGQ Kit (typ próbki: osocze)

R3

**IVD**

**CE**  
0197

**REF**

4503363

Zestaw *artus* CMV QS-RGQ Kit, wersja 1



Przed wykonaniem testu należy sprawdzić dostępność nowych elektronicznych wersji oznakowania pod adresem [www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx).

## Informacje ogólne

Zestaw	<i>artus</i> CMV QS-RGQ Kit, wersja 1 (nr kat. 4503363)
Zatwierdzony materiał próbki	Ludzkie osocze z EDTA
Oczyszczanie początkowe	Zestaw QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr kat. 937055)
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Zestaw parametrów badania	<i>artus</i> _CMV_plasma1000_V5
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych	Cellfree1000_V7_DSP_ <i>artus</i> _CMV
Objętość elucji	60 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa
Objętość mieszaniny Master mix	30 µl
Objętość matrycy	20 µl
Liczba reakcji	6–24
Czas trwania cyklu w module AS	W przypadku 6 reakcji: około 9 minut W przypadku 72 reakcji: około 35 minut

## Materiały wymagane, ale niedostarczone

### Zestaw do oczyszczania

- Zestaw QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr kat. 937055)

### Adaptory do aparatu QIASymphony SP

- Statyw do mikroprowbek do elucji QS (adapter chłodzący, EMT, wer. 2, Qsym, nr kat. 9020730)
- Ramka transferowa
- Wkład probówkowy 3B (wkład, 2,0 ml, wer. 2, samplecarr. (24), Qsym, nr kat. 9242083)

### Materiały eksploatacyjne dla aparatu QIASymphony SP

- Kartridże Sample Prep, 8-dołkowe (nr kat. 997002)
- Zamknięcia 8-szyftowe (nr kat. 997004)
- Końcówki z filtrem, 1500 µl (nr kat. 997024)
- Końcówki z filtrem, 200 µl (nr kat. 990332)
- Mikroprowbki do elucji CL (nr kat. 19588)
- Worki na zużyte końcówki (nr kat. 9013395)
- Mikroprowbki typu H o pojemności 2,0 ml lub mikroprowbki typu I o pojemności 2,0 ml (Sarstedt®, nr kat. 72.693 i 72.694, [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)) do użytku z próbkami i kontrolami wewnętrznymi

### Adaptory i uchwyty na odczynniki dla QIASymphony AS

- Uchwyt na odczynnik 1 QS (adapter chłodzący, uchwyt na odczynnik 1, Qsym, nr kat. 9018090)
- Probówki w paskach RG 72 QS (adapter chłodzący, probówki w paskach RG 72, Qsym, nr kat. 9018092)

### Materiały eksploatacyjne dla aparatu QIASymphony AS

- Probówki w paskach i zatyczki, 0,1 ml (nr kat. 981103)
- Probówki stożkowe o pojemności 2 ml, Qsym AS (nr kat. 997102) lub mikroprowbki typu I o pojemności 2,0 ml (Sarstedt, nr kat. 72.694.005)
- Zamiennie: Probówki stożkowe o pojemności 5 ml, Qsym AS (nr kat. 997104) lub probówki o płaskim dnie z polipropylenu (Sarstedt, nr kat. 60.558.001)

- Końcówki z filtrem, 1500 µl (nr kat. 997024)
- Końcówki z filtrem, 200 µl (nr kat. 990332)
- Końcówki z filtrem, 50 µl (nr kat. 997120)
- Worki na zużyte końcówki (nr kat. 9013395)

## Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie

<b>Pobieranie próbek</b>	<b>Próbka krwi</b> <b>5–10 ml krwi z EDTA</b> <b>Wymieszać, odwracając 8x — nie wstrząsać!</b> <b>Nie należy używać ludzkich próbek heparynizowanych.</b>
Przechowywanie próbek	Rozdzielenie: wirowanie przez 20 minut, 800–1600 x g w ciągu 24 godzin od pobrania Przenieść oddzielone osocze do jałowej próbki z polipropylenu Rutynowe mrożenie próbek lub przechowywanie ich przez dłuższy czas może zmniejszyć czułość oznaczenia.
Transport próbek	Transport w pojemniku odpornym na rozbicie Dostawa w ciągu 24 godzin Wysyłka pocztą zgodnie z przepisami prawa dotyczącymi transportu materiału zakaźnego* Próbki krwi należy transportować w warunkach chłodniczych (od 2 do 8°C)
Substancje zakłócające	Heparyna (≥10 j.m./ml) ma wpływ na reakcję PCR. Nie należy używać próbek pobranych do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant oraz próbek pobranych od pacjentów leczonych heparyną.
Przygotowanie próbki	Nie dopuszczać do wytworzenia piany w próbkach lub na ich powierzchni Przed rozpoczęciem cyklu należy doprowadzić próbki do temperatury pokojowej (15–25°C).

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

---

# Procedura

## Przygotowanie nośnika RNA i dodanie kontroli wewnętrznej do próbek

Stosowanie zestawu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit w połączeniu z zestawem *artus* CMV QS-RGQ Kit wymaga wprowadzenia kontroli wewnętrznej (CMV RG IC) do procedury oczyszczania w celu monitorowania wydajności przygotowywania próbek i dalszych testów.

W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdy podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno CMV, jak i EBV, należy upewnić się, że w procesie oczyszczania używana jest kontrola CMV RG IC z zestawu *artus* CMV QS-RGQ Kit. Do przygotowania próbek i ustawienia badania dla kontroli PCR należy użyć kontroli CMV RG IC z tej samej serii. Nie używać kontroli CMV RG IC o innym numerze serii.

Kontrolę wewnętrzną należy dodać wraz z mieszaniną nośnik RNA (CARRIER)–bufor AVE (AVE). Całkowita objętość mieszaniny kontrola wewnętrzna–nośnik RNA (CARRIER)–bufor AVE (AVE) nadal wynosi 120 µl.

Tabela przedstawia dodawanie kontroli wewnętrznej do procedury izolacji w stosunku 0,1 µl na 1 µl objętości elucji. Zaleca się przygotowanie świeżych mieszanin dla każdego cyklu bezpośrednio przed użyciem. Można też użyć narzędzia „IC Calculator” (Kalkulator kontroli wewnętrznej) oprogramowania QIASymphony Management Console.

Element	Objętość (µl) (próbówki Sarstedt)*	Objętość (µl) (próbówki Corning)†
Roztwór podstawowy nośnika RNA (CARRIER)	5	5
Kontrola wewnętrzna‡	9	9
Bufor AVE	106	106
Objętość końcowa na próbkę (wyłączając objętość martwą)	120	120
Całkowita objętość dla n próbek	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\P}$

\* Mikropróbówki typu H o pojemności 2,0 ml i mikropróbówki typu I o pojemności 2,0 ml, Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694.

† Probówki polistyrenowe z okrągłym dnem o pojemności 14 ml, 17 x 100 mm (Corning® Inc., nr kat. 352051; poprzednim dostawcą tych próbek była firma Becton Dickinson, nowym dostawcą jest firma Corning Inc.).

‡ Obliczenie ilości kontroli wewnętrznej opiera się na początkowych objętościach elucji (90 µl). Dodatkowa objętość nieużyteczna zależy od typu użytej próbki.

§ Wymagana jest objętość mieszaniny kontroli wewnętrznej odpowiadająca 3 dodatkowym próbkom (tj. 360 µl). Nie napełniać do więcej niż 1,92 ml całkowitej objętości (co odpowiada maksymalnej liczbie 13 próbek. Objętości te są charakterystyczne dla mikroprobówek typu H o pojemności 2,0 ml i mikroprobówek typu I o pojemności 2,0 ml, Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694).

¶ Wymagana jest objętość mieszaniny kontroli wewnętrznej odpowiadająca 5 dodatkowym próbkom (tj. 600 µl). Nie napełniać do więcej niż 13,92 ml całkowitej objętości (co odpowiada maksymalnej liczbie 111 próbek. Objętości te są charakterystyczne dla próbek polistyrenowych z okrągłym dnem o pojemności 14 ml, 17 x 100 mm, Corning Inc., nr kat. 352051; poprzednim dostawcą tych próbek była firma Becton Dickinson, nowym dostawcą jest firma Corning Inc.).

## Konfiguracja aparatu QIASymphony SP

### Szuflada „Waste” (Odpady)

<b>Uchwyt na opakowanie jednostkowe 1–4</b>	<b>Opróżnić opakowania jednostkowe</b>
Uchwyt na worek na odpady	Worek na odpady
Uchwyt na butlę na odpady płynne	Opróżnić i zainstalować butlę na odpady płynne

### Szuflada „Eluate” (Eluat)

<b>Statyw elucji</b>	<b>Mikropróbki do elucji CL w statywie do mikropróbek do elucji QS i ramce transferowej</b>
	<b>Użyć gniazda 1, pozycja chłodzenia</b>
Objętość elucji*	Wstępnie wybrana objętość elucji: 60 µl Początkowa objętość elucji: 90 µl

\* Objętość elucji jest wybrana wstępnie dla danego protokołu. Jest to minimalna dostępna objętość eluatu w końcowej próbce elucji. Początkowa objętość roztworu elucji jest wymagana do zapewnienia właściwej objętości eluatu, równej wcześniej zdefiniowanej wartości.

### Szuflada „Reagents and Consumables” (Odczynniki i materiały eksploatacyjne)

<b>Kartridż z odczynnikiem (RC), pozycja 1 i 2</b>	<b>Załadować 1 kartridż z odczynnikiem (reagent cartridge, RC) na maksymalnie 48 próbek lub 2 nowe kartridże z odczynnikiem (RC) na maksymalnie 96 próbek</b>
Uchwyt na statyw na końcówki, pozycje 1–18	Załadować wystarczającą liczbę statywów na jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl i 1500 µl (patrz „Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek”, strona 8)
Uchwyt na opakowanie jednostkowe, pozycje 1–4	Załadować opakowania jednostkowe zawierające kartridże sample prep i zamknięcia 8-sztyftowe (patrz „Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek”, strona 8)

## Szuflada „Sample” (Próbka)

Typ próbki	Ludzkie osocze z EDTA
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Probówki	Mikroprobówki typu H o pojemności 2,0 ml lub mikroprobówki typu I o pojemności 2,0 ml (Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694)
Wkład	Wkład probówkowy 3B (nr kat. 9242083)

## Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek

Element	Jedna partia, 24 próbki*	Dwie partie, 48 próbek*	Trzy partie, 72 próbki*	Cztery partie, 96 próbek*
Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl <sup>†‡</sup>	28	52	76	100
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl <sup>†‡</sup>	113	206	309	402
Kartridże sample prep <sup>§</sup>	21	42	54	72
Zamknięcia 8-sztyftowe <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Użycie więcej niż jednej probówki z kontrolą wewnętrzną na partię oraz przeprowadzenie więcej niż jednego skanowania inwentaryzującego wymaga dodatkowych jednorazowych końcówek z filtrem.

<sup>†</sup> Statyw na końcówki zawiera 32 końcówki z filtrem.

<sup>‡</sup> Liczba wymaganych końcówek z filtrem obejmuje końcówki z filtrem dla 1 skanowania inwentaryzującego na kartridż z odczytnikami.

<sup>§</sup> Opakowanie jednostkowe zawiera 28 kartridży sample prep.

<sup>¶</sup> Opakowanie jednostkowe zawiera dwanaście zamknięć 8-sztyftowych.



## Konfiguracja aparatu QIASymphony AS

### Materiały eksploatacyjne

Podczas konfiguracji pozycje odpowiednie dla każdego materiału eksploatacyjnego w module QIASymphony AS są wyświetlane na ekranie dodatkowym aparatu.

Rodzaj materiału eksploatacyjnego	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym	Do użytku z adapterem/uchwytem na odczynnik
Probówki w paskach i zatyczki, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	Probówki w paskach RG 72 QS
Probówki stożkowe, 2 ml, Qsym AS (500) <sup>†‡</sup>	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	Uchwyt na odczynnik 1 QS
Probówki stożkowe, 5 ml, Qsym AS (500) <sup>†‡</sup>	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	Uchwyt na odczynnik 1 QS

\* Oznacza sprzęt laboratoryjny, który można schłodzić za pomocą adaptera chłodzącego z kodem kreskowym.

<sup>†</sup> Dla odczynników wchodzących w skład mieszaniny master mix, mieszaniny master mix przygotowanej w systemie, wzorców badania i kontroli badania.

<sup>‡</sup> Zamiennie można użyć probówek Sarstedt opisanych w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 3.

<sup>§</sup> Przyrostek „(m)” widoczny na ekranie dotykowym oznacza, że obliczenia dotyczące poziomu płynu dla stosowanej probówki zoptymalizowano pod kątem odczynników tworzących menisk wklęsły.

## Adaptory i uchwyty na odczynniki

<b>Statyw/uchwyt na odczynniki</b>	<b>Nazwa</b>	<b>Wymagana liczba<sup>†</sup></b>
Uchwyty na odczynniki	Uchwyt na odczynniki 1 QS	1
Statywy próbek	Probówki w paskach RG 72 QS	1

<sup>†</sup> Ilość obliczona dla cyklu oznaczeń z 72 reakcjami.

## Końcówki z filtrem

załadować statywy na końcówki, zaczynając od gniazd na końcówki 1, 2 i 3 w szufladzie „Eluate and Reagents” (Eluat i odczynniki), a następnie załadować statywy na końcówki do gniazd na końcówki 7, 8 i 9 w szufladzie „Assays” (Badania).

<b>Rodzaj materiału eksploatacyjnego</b>	<b>Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym</b>	<b>Minimalna liczba dla 24 reakcji</b>	<b>Minimalna liczba dla 72 reakcji</b>
Końcówki z filtrem, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	5
Końcówki z filtrem, 200 µl (1024)	200 µl	10	8
Końcówki z filtrem, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Worki na zużyte końcówki	–	1	1

## PCR w aparacie Rotor-Gene Q\*

Szczegółowe informacje dotyczące protokołu znajdują się we właściwej dla oprogramowania karcie protokołu *Konfiguracja w celu uruchomienia zestawów artus QS-RGQ Kit (Settings to run artus QS-RGQ Kits)* pod adresem [www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx).

### Ustawienia charakterystyczne dla zestawu *artus* CMV QS-RGQ Kit

Poniżej przedstawiono specyficzne ustawienia obowiązujące podczas używania zestawu z oprogramowaniem Rotor-Gene® Q w wersji 2.1 lub wyższej.

<b>Objętość reakcji (µl)</b>	<b>50</b>
Wstrzymanie	Temperatura wstrzymania: 95 stopni Czas wstrzymania: 10 minut
Wykonywanie cykli	45 razy 95 stopni przez 15 sekund 65 stopni przez 30 sekund (rejestrować przy kanale zielonym, żółtym i aktywować funkcję touchdown dla 10 cykli) 72 stopnie przez 20 sekund
Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego	65 stopni (próbki: kanał zielony; IC: kanał żółty)

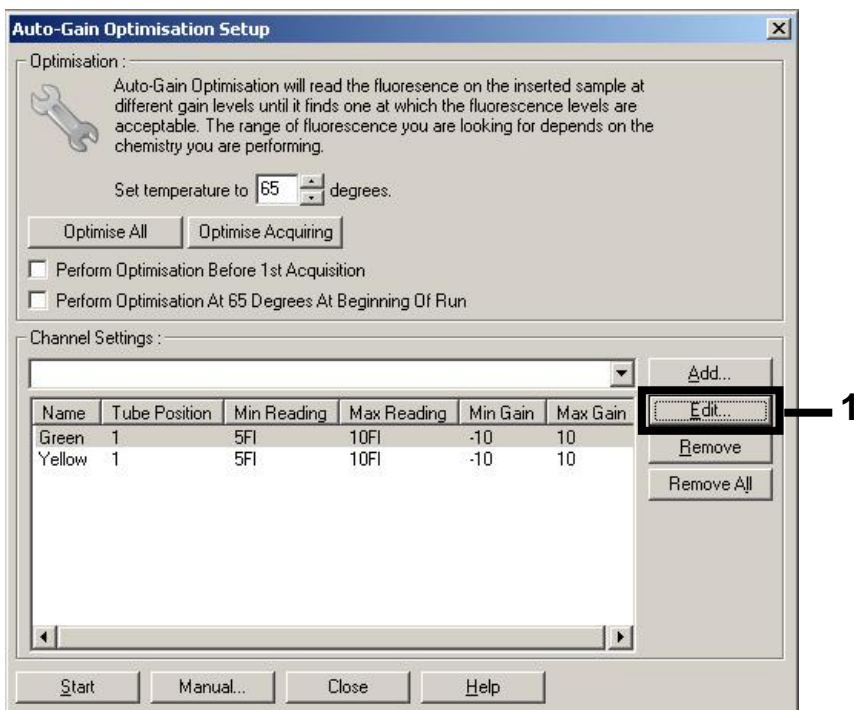
### Cykl z wieloma oznaczeniami

Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie natężenia fluorescencji w próbkach PCR. Kliknąć opcję **Gain Optimisation** (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym **New Run Wizard** (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe **Auto-Gain Optimisation Setup** (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego) (patrz etap 6 i rycina 7 w karcie protokołu *Konfiguracja w celu uruchomienia zestawów artus QS-RGQ Kit*).

W przypadku cyklu z jednym oznaczeniem należy ustawić temperaturę kalibracji na **65** stopni, aby odpowiadała temperaturze hybrydyzacji starterów określonej w programie amplifikacji. W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdy podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno CMV, jak i EBV, należy ręcznie dostosować natężenia kanałów fluorescencyjnych.

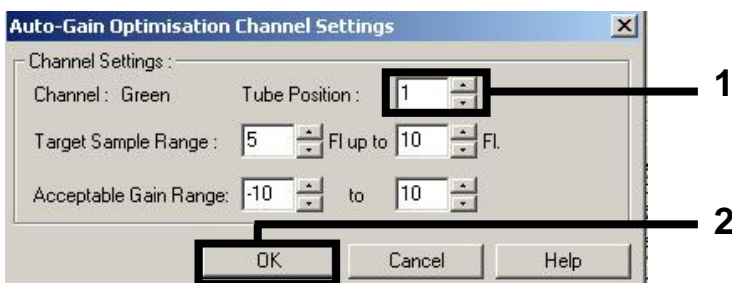
\* Jeśli ma to zastosowanie, aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowany w styczniu 2010 lub później. Datę produkcji można odczytać z numeru seryjnego, który znajduje się na tylnej części aparatu. Numer seryjny ma format „mmrrnnn”, gdzie „mm” oznacza miesiąc produkcji (cyfry), „rr” oznacza dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” oznacza unikalny identyfikator aparatu.

1. Kliknąć przycisk **Edit** (Edytuj) (Ryc. 1), aby edytować ustawienia kanałów fluorescencyjnych.



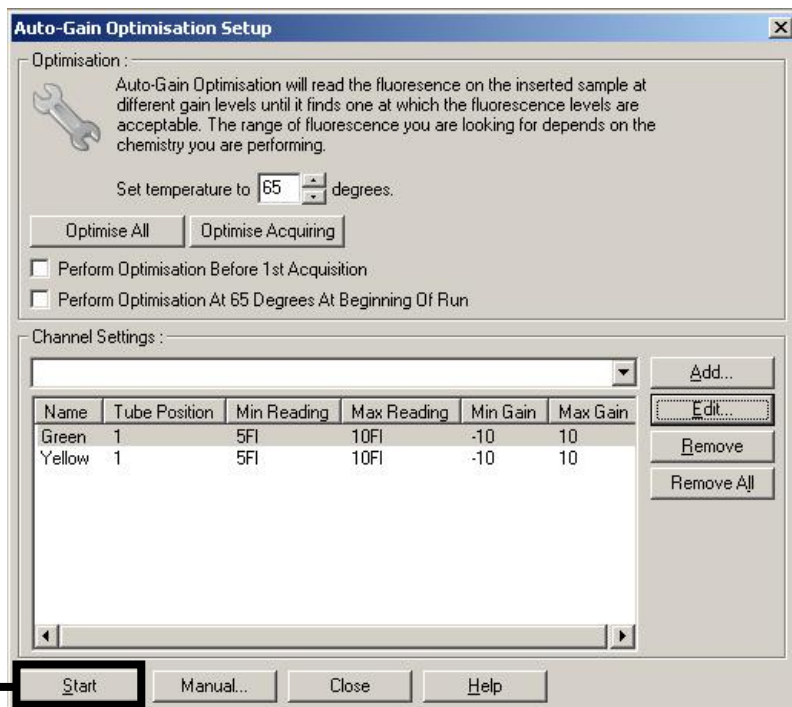
**Ryc. 1. Ręczne dostosowanie natężenia kanału fluorescencyjnego.** Ręcznie dostosować natężenie dla każdego kanału fluorescencyjnego przy różnych pozycjach próbek dla różnych oznaczeń (CMV i EBV).

2. Ustawić pozycję próbki dla pierwszego oznaczenia *artus* (np. CMV). Określić pozycję próbki dla wszystkich kanałów fluorescencyjnych, a następnie kliknąć przycisk **OK** (Ryc. 2).



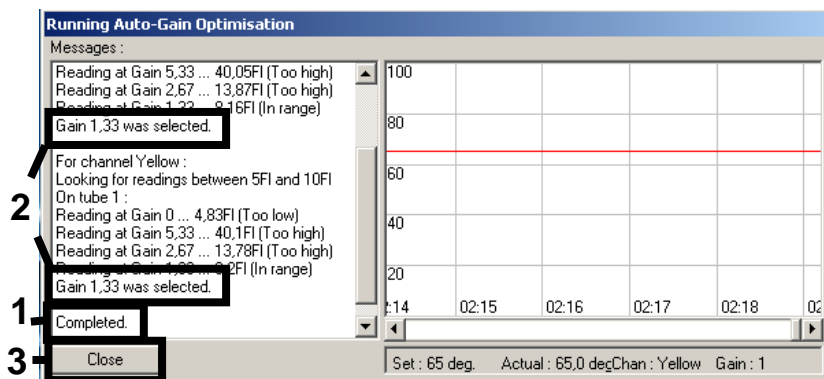
**Ryc. 2. Określanie pozycji próbki.**

3. Kliknąć przycisk **Start**, aby rozpocząć optymalizację wzmocnienia dla pierwszego oznaczenia *artus* (Ryc. 3).



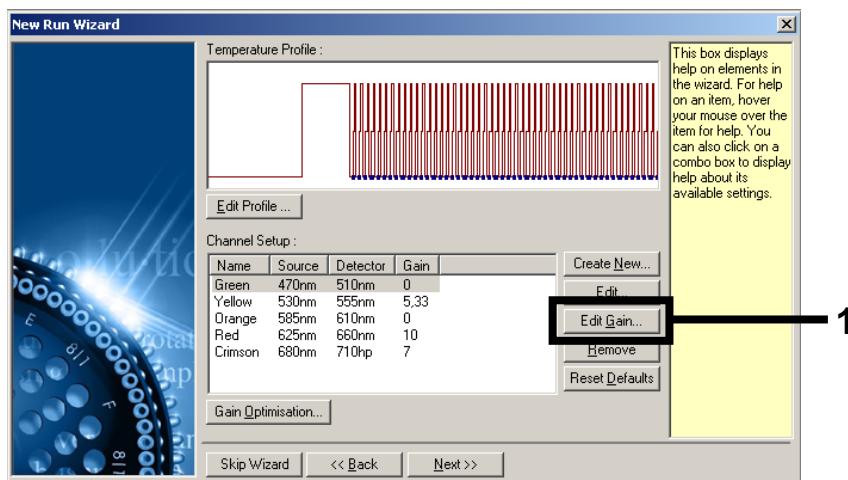
Ryc. 3. Rozpoczęcie optymalizacji wzmocnienia.

4. Zostanie otwarte nowe okno **Running Auto-Gain Optimisation** (Optymalizacja automatycznego wzmocnienia w toku). Poczekać aż w tym oknie pojawi się komunikat **Completed** (Zakończono) (Ryc. 4). Zapisać wybrane wartości wzmocnienia dla obu kanałów, a następnie kliknąć przycisk **Close** (Zamknij) (Ryc. 4).



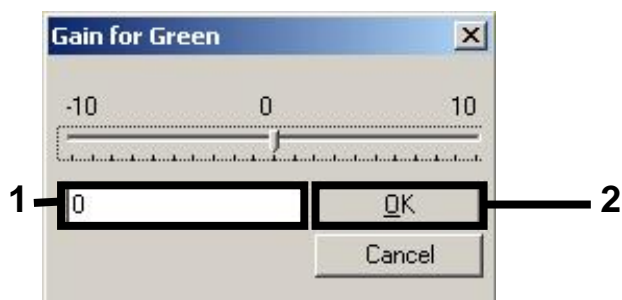
Ryc. 4. Zakończono optymalizację wzmocnienia. Zanotować wartości wzmocnienia (w tym przypadku 1,33 dla obu kanałów fluorescencyjnych).

5. Powtórzyć etapy 1–4 dla pozycji próbki dla drugiego oznaczenia *artus* (np. EBV).
6. Kliknąć przycisk **Edit Gain** (Edytuj wzmocnienie), aby ręcznie edytować wartości wzmocnienia (Ryc. 5).



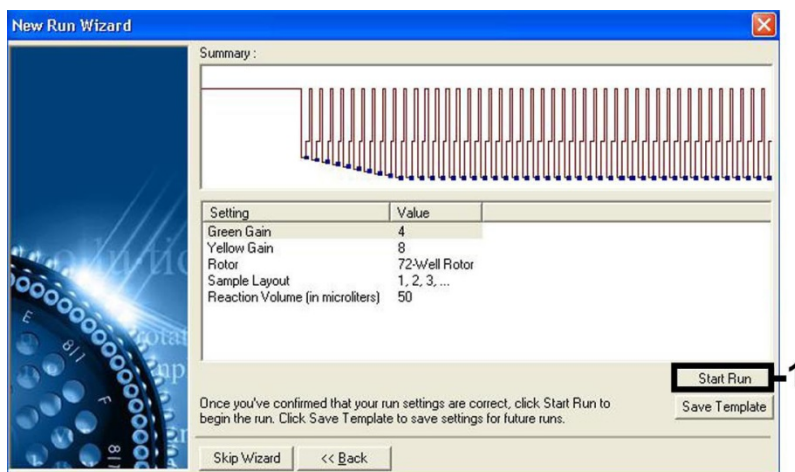
**Ryc. 5. Ręczne edytowanie wartości wzmocnienia.**

7. Wybrać najmniejszą wartość wzmocnienia dla kanału zielonego zanotowaną na etapie 4, a następnie wprowadzić tę wartość ręcznie w oknie **Gain for Green** (Wzmocnienie dla kanału zielonego) (Ryc. 6). Wybrać najmniejszą wartość wzmocnienia dla kanału żółtego zanotowaną na etapie 4, a następnie wprowadzić tę wartość ręcznie w oknie **Gain for Yellow** (Wzmocnienie dla kanału żółtego) (Ryc. 6).



**Ryc. 6. Ręczne wprowadzanie najniższych wartości wzmocnienia.**

8. Wartości wzmacnienia określone podczas kalibracji kanału (lub ręcznie przypisane) są zapisywane automatycznie i wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania (Ryc. 7). Kliknąć przycisk **Start Run** (Rozpocznij cykl).



Ryc. 7. Rozpoczynanie cyklu.

## Interpretacja wyników

W niniejszej sekcji opisano sposób interpretacji wyników uzyskanych za pomocą aparatu Rotor-Gene Q. W celu analizy pełnego przebiegu pracy, „od próbki do uzyskania wyniku”, należy również przejrzeć informacje dotyczące statusu próbki, które znajdują się w plikach wynikowych aparatów QIASymphony SP/AS. Należy używać wyłącznie próbek, które mają ważny status.

Zestaw *artus* CMV QS-RGQ Kit można uruchomić na aparacie Rotor-Gene Q, korzystając z ręcznej analizy za pomocą oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.1 lub wyższej. W poniższych sekcjach opisano sposób interpretacji wyników za pomocą oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.1 lub wyższej.

## Detekcja sygnału i wnioski

Sygnal w zielonym kanale fluorescencyjnym	Sygnal w żółtym kanale fluorescencyjnym	Wynik ilościowy (kopie/ml)	Interpretacja
Tak	Tak	<42,5	Wynik ważny: Wykryto DNA wirusa CMV, <79,4 kopii/ml. Oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się poniżej granicy wykrywalności. Nie można zapewnić odtwarzalności pozytywnych wyników.
Tak	Tak	≥42,5 i <79,4	Wynik ważny: Wykryto DNA wirusa CMV, <79,4 kopii/ml. Oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się poniżej zakresu liniowego oznaczenia.
Tak	Tak/Nie*	≥79,4 i ≤1 x 10 <sup>8</sup>	Wynik ważny: Wykryto DNA wirusa CMV w obliczonym stężeniu. Wynik ilościowy mieści się w zakresie liniowym oznaczenia.
Tak	Tak/Nie*	>1 x 10 <sup>8</sup>	Wynik ważny: Wykryto DNA wirusa CMV, >1 x 10 <sup>8</sup> kopii/ml. Oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się powyżej zakresu liniowego oznaczenia. <sup>†</sup>
Nie	Tak	–	Wynik ważny: Nie wykryto DNA wirusa CMV. <sup>‡</sup>
Nie	Nie	–	Wynik nieważny: Wynik jest niejednoznaczny. <sup>§</sup>

\* W takim przypadku detekcja sygnału z kanału żółtego nie ma znaczenia, ponieważ wysokie wyjściowe stężenie DNA wirusa CMV (pozytywny sygnał w kanale zielonym) może prowadzić do obniżenia sygnału fluorescencyjnego lub jego braku dla kontroli wewnętrznej w kanale żółtym (w mechanizmie kompetycyjnym).

† Jeśli pożądane jest oznaczenie ilościowe, należy rozcieńczyć próbkę osoczem wolnym od wirusa CMV i ponownie przetworzyć próbkę. Wynik ilościowy uzyskany dla ponownie przetworzonej próbki należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

‡ Jeśli w reakcji wartość C<sub>T</sub> dla kontroli wewnętrznej negatywnej próbki przekracza o ponad 3 cykle wartość C<sub>T</sub> dla kontroli wewnętrznej kontroli bez matrycy (tzw. NTC) (C<sub>T</sub> próbki IC — C<sub>T</sub> IC NTC >3), wówczas taką próbkę należy traktować jako nieważną. Wynik jest niejednoznaczny.

§ Informacje dotyczące przyczyn błędów oraz ich rozwiązywania można znaleźć w części „Rozwiązywanie problemów” instrukcji obsługi zestawu *artus CMV QS-RGQ Kit*.



## Konfiguracja wartości progu dla analizy PCR

Doboru optymalnych ustawień wartości progu dla danej kombinacji aparatu Rotor-Gene Q i zestawu *artus* QS-RGQ Kit należy dokonać empirycznie, sprawdzając każdą kombinację oddzielnie, ponieważ jest to wartość względna, zależna od całościowego przebiegu pracy diagnostycznej. Dla pierwszego cyklu PCR wartość progu można ustawić na wstępnym poziomie 0,04. Jednakże wartość tę należy precyzyjnie dostosować poprzez analizę porównawczą kolejnych cykli przebiegu pracy. Wartość progu należy ustawić ręcznie tuż powyżej wartości sygnału tła negatywnych kontroli i negatywnych próbek. Średnia wartość progu obliczona na podstawie tych eksperymentów najprawdopodobniej będzie odpowiednia dla większości przyszłych oznaczeń. Jednakże pomimo tego użytkownik powinien regularnie sprawdzać tę wyznaczoną wartość. Wartość progu zwykle mieści się w przedziale 0,03–0,05 i należy ją zaokrąglić do co najwyżej trzech miejsc po przecinku.

## Oznaczenie ilościowe

Wzorce ilościowe (CMV QS 1–4) z zestawu *artus* CMV QS-RGQ Kit są traktowane jak wcześniej oczyszczone próbki. Stosuje się również tę samą objętość (20 µl). 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) w aparacie Rotor-Gene Q jako wzorce o określonych stężeniach (patrz instrukcja obsługi aparatu).

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

$$\text{Wynik w materiale próbki (kopie/ml)} = \frac{\text{Wynik w eluacie (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{początkowa objętość elucji (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Objętość próbki (ml)}}$$

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).

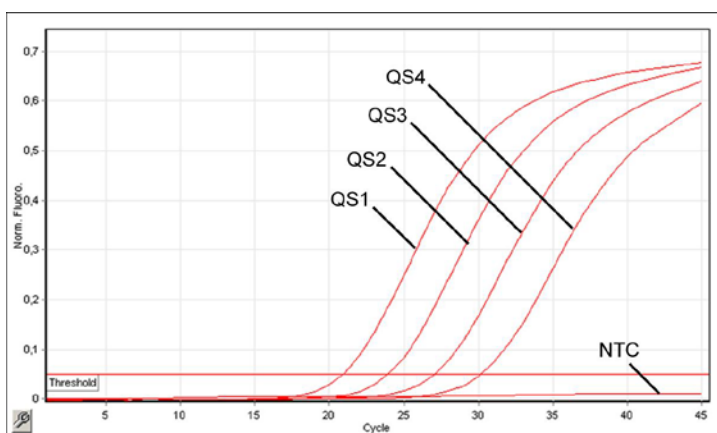
W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdy podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno CMV, jak i EBV, należy sprawdzić, czy próbki są analizowane oddzielnie na obecność CMV i EBV z odpowiednimi wzorcami ilościowymi.

\* Obliczenie jest oparte na początkowych objętościach elucji (90 µl).

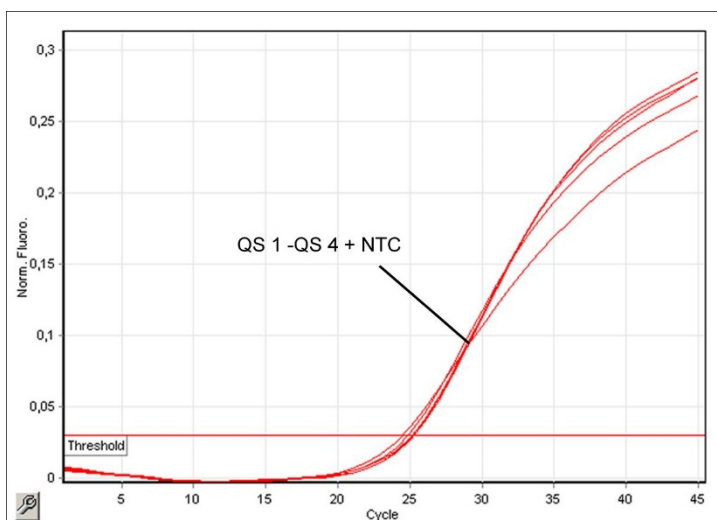
## Przelicznik

W przypadku detekcji DNA wirusa CMV uzyskanego z ludzkiego osocza z EDTA za pomocą aparatu Rotor Gene Q 1,00 kopia/ml odpowiada 1,64 j.m./ml. Ten przelicznik ma zastosowanie, jeśli przestrzegany jest zatwierdzony przebieg pracy określony w niniejszej karcie zastosowania. Przelicznik stanowi wartość przybliżoną wyznaczoną na podstawie średniej wartości przelicznika w obrębie dynamicznego zakresu oznaczenia. Przelicznik ustalono poprzez analizę regresji serii wielokrotnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia WHO w porównaniu do metody odniesienia której wyniki były raportowane w j.m./ml.

## Przykłady pozytywnych i negatywnych reakcji PCR



**Detekcja wzorców ilościowych (CMV QS 1–4) w zielonym kanale fluorescencyjnym.** NTC: Kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).



**Detekcja kontroli wewnętrznej (internal control, IC) w żółtym kanale fluorescencyjnym z równoczesną amplifikacją wzorców ilościowych (CMV QS 1–4).** NTC: Kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).

#### Historia zmian dokumentu

R3, luty 2018

Usunięto przypis dotyczący konfiguracji dla 216 oznaczeń. Zmieniono na nowe wersje protokołów QIASymphony. Zaktualizowano materiały wymagane do konfiguracji maksymalnej liczby 72 reakcji. Dodano informacje dotyczące cyklu z wieloma oznaczeniami z wirusem EBV. Dodano informacje dotyczące korzystania z narzędzia „IC Calculator” (Kalkulator kontroli wewnętrznej) oprogramowania QMC. Zaktualizowano nazewnictwo sprzętu laboratoryjnego firmy Corning (wcześniej Becton Dickinson). Dodano ustawienia cyklu specyficzne dla aparatu Rotor-Gene Q (korzystanie z funkcji touchdown, rejestracje). Dodano informacje do części dotyczącej interpretacji wyników, aby uwzględnić przypadek „pozytywny względem patogenu, negatywny względem kontroli”. Usunięto instrukcje korzystania z narzędzia Rotor-Gene AssayManager®. Dodano informacje dotyczące przelicznika.

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.  
02/2018 HB-0356-S02-003 © 2012–2018 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

