

2018. november

# artus<sup>®</sup> CMV TM PCR Kit kézikönyv



24 (katalógusszám: 4503163)

96 (katalógusszám: 4503165)

Kvantitatív in vitro diagnosztikai használatra

Az *ABI PRISM<sup>®</sup> 7000*, *7700* és *7900HT* szekvenciadetektáló rendszerekkel való használatra

2018. november – 1. verzió



4503163, 4503165



1115297HU



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R4

MAT

1115297HU

# Tartalom

1.	Tartalom .....	4
2.	Tárolás .....	5
3.	A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek .....	5
4.	Általános óvintézkedések .....	6
5.	Kórokozókkal kapcsolatos információk .....	6
6.	A valós idejű PCR elve .....	7
7.	Termékleírás .....	7
8.	Protokoll .....	8
8.1.	Az analitikai műveletek előtti lépések: Mintagyűjtés, -tárolás és -szállítás ....	8
8.2.	DNS-izolálás .....	10
8.3.	Belső kontroll .....	10
8.4.	Kvantifikálás .....	12
8.5.	A PCR-reakció előkészítése .....	13
8.6.	Az <i>ABI PRISM SDS</i> készülékek beprogramozása .....	19
9.	Eredmények értékelése .....	38
10.	Hibaelhárítás .....	43
11.	Teljesítmény-jellemzők .....	46
11.1.	Analitikai érzékenység .....	46
11.2.	Specifitás .....	48
11.3.	Pontosság .....	50
11.4.	Megbízhatóság .....	52
11.5.	Reprodukálhatóság .....	52

---

11.6.	Diagnosztikai kiértékelés .....	52
12.	A termék használatának korlátai .....	54
13.	Biztonsági információk .....	54
14.	Minőség-ellenőrzés .....	55
15.	Hivatkozások .....	55
16.	Szimbólumok magyarázata .....	56
17.	Rendelési információk .....	57

## artus CMV TM PCR Kit

Az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT* szekvenciadetektáló rendszerekkel való használatra, az EDTA-s plazmából kinyert CMV DNS kvantitatív kimutatására.

**Figyelem:** Az *artus CMV TM PCR Kit* kombinált használata nem javasolt sem a *GeneAmp® 5700 SDS* rendszerrel, sem az *ABI PRISM 7900HT SDS 384* lemezes formátumával.

# 1. Tartalom

	Címkézés és tartalom	Cikkszám: 4503163	Cikkszám: 4503165
		24 reakció	96 reakció
<b>Kék</b>	<i>CMV TM Master</i>	2 x 12 reakció	8 x 12 reakció
<b>Sárga</b>	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol<sup>®</sup></i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
<b>Piros</b>	<i>CMV LC/RG/TM QS 1<sup>st</sup></i> <i>1 x 10<sup>4</sup> kópia/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Piros</b>	<i>CMV LC/RG/TM QS 2<sup>nd</sup></i> <i>1 x 10<sup>3</sup> kópia/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Piros</b>	<i>CMV LC/RG/TM QS 3<sup>rd</sup></i> <i>1 x 10<sup>2</sup> kópia/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Piros</b>	<i>CMV LC/RG/TM QS 4<sup>th</sup></i> <i>1 x 10<sup>1</sup> kópia/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Zöld</b>	<i>CMV TM IC<sup>®</sup></i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
<b>Fehér</b>	<i>Water (PCR grade)</i> (Víz (PCR-minőségű))	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

QS = Kvantifikációs standard

IC = Belső kontroll

Mg-Sol = Magnéziumoldat

## 2. Tárolás

Az *artus* CMV TM PCR Kit részegységeit  $-30$  és  $-15$  °C közötti hőmérsékleten kell tárolni, ekkor a címkén található lejáratú időig stabilak maradnak. Kerülni kell az ismételt ( $> 2$  x) felolvasztást és lefagyasztást, mivel ez ronthatja a minőséget. Ha a reagenseket csak alkalomszerűen használja, alikvotokban, fagyasztva tárolja. A  $4$  °C-on történő tárolás ne haladja meg az 5 órát.

## 3. A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek

- Egyszer használatos, púder mentes gumikesztyű
- DNS-izoláló kit (lásd **8.2.** DNS-izolálás)
- Pipetták (állítható)
- Steril, szűrős pipettahegyek
- Vortex keverő
- Asztali centrifuga 2 ml-es reakciócsövekhez megfelelő rotorral
- Centrifugálja a mikrotiter lemezekhez való rotorral (opcionális)
- 96 cellás reakciólemez/reakciócsövek a megfelelő optikai záróanyagokkal való optikai méréshez\* (lásd **8.5. A PCR-reakció előkészítése**)
- 96 cellás, két részes tálcás tartóállvány az optikai reakciócsövekkel való használatra (*96-Well Tray/Retainer Set*, katalógusszám: 403 081, Applied Biosystems), lásd **8.5. A PCR-reakció előkészítése**)
- Kompressziós tömítőpárna az optikai adhéziós zárófoliákkal való használatra (*Optical Cover Compression Pads*, katalógusszám: 4 312 639, Applied Biosystems), lásd **8.5. A PCR-reakció előkészítése**).

\* A domború kupakos reakciócsövek használata az optikai analízishez csak az *ABI PRISM 7700 SDS* készülékkel megengedett, és módosítani kell hozzá az expozíciós időt (lásd **8.6.2. Az ABI PRISM 7700 SDS beprogramozása**, 8.6.2.5. Fontos további beállítások).

- Applikátor a reakciólemezek optikai adhézíós zárófoliákkal való befedéséhez (*Adhesive Seal Applicator Kit*, katalógusszám: 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000* (szoftver verziószáma: 1.0.1), *7700* (szoftver verziószáma: 1.9.1) vagy *7900HT SDS* (szoftver verziószáma: 2.1)

**Figyelem:** A készülékek használatba helyezésekor szükséges a tiszta festékek (*Pure Spectra Component File* (Tiszta spektrumösszetevők)) és a háttér (*Background Component File* (Háttér-komponens fájl)) hiteles kalibrálása.

## 4. Általános óvintézkedések

Mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Használjon szűrős steril pipettákat.
- A pozitív anyagokat (minták, kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakciómixhez térben elkülönített helyen adja hozzá.
- Szobahőmérsékleten olvassa fel az összes komponenset a vizsgálat előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket és röviden centrifugálja le.
- A jégen vagy a hűtőblokkban gyorsan dolgozzon.

## 5. Kórokozókkal kapcsolatos információk

A humán cytomegalovírusok (CMV) a fertőzött személyek vérében, szöveteiben és szinte minden váladékában megtalálhatóak. A vírus orális, szexuális úton, illetve vértranszfúzióval, szervtranszplantációval, intrauterin és perinatális módon is terjed. A CMV-fertőzés gyakran tünetmentes, melyet a vírus élethosszig tartó a szervezetben való jelenléte követ.

Ha tizenéveseknél és felnőtteknél tünetek jelentkeznek, ezek hasonlítanak a mononucleosis tüneteire: láz, enyhe hepatitis és általános gyengeség. Súlyos lefolyású CMV-fertőzés különösen az intrauterin fertőződött, illetve immunhiányos betegek körében figyelhető meg.

## 6. A valós idejű PCR elve

A kórokozó kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR) történik, mely a kórokozó genom specifikus szakaszának amplifikációján alapszik. A valós idejű PCR esetében az amplifikált termék fluoreszcens festék által mutatja ki. A festék általában olyan oligonucleotidhoz van kapcsolva, mely specifikusan kötődik az amplifikált termékhez. A fluoreszcencia intenzitásának a PCR futtatása alatti (azaz valós idejű) követése lehetővé teszi a termék kimutatását és kvantifikálását anélkül, hogy a PCR-reakció végén újra ki kellene nyitni a csöveket (Mackay, 2004).

## 7. Termékleírás

Az *artus* CMV TM PCR Kit használatra kész rendszert alkot a CMV DNS polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT szekvenciadetektáló rendszerben* való kimutatásához. A *CMV TM Master* tartalmazza a CMV-genom egy adott, 105 bázispár hosszúságú régiójának specifikus amplifikációjához szükséges reagenseket és enzimeket. A képződő ampliconok a FAM™ fluoreszcencia mérésével detektálhatók az *ABI PRISM SDS* készülékben. Emellett az *artus* CMV TM PCR Kit egy második heterológ amplifikációs rendszert is tartalmaz a PCR esetleges gátlásának kimutatására. Ez *Internal Control (IC)* belső kontrollként detektált, a VIC®/JOE™ fluoreszcencia mérésével. Az analitikai CMV PCR detekciós határértéke (lásd **11.1. Analitikai érzékenység**) nem csökkentett. A kit külső pozitív kontrollokat is tartalmaz (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*), amelyek lehetővé teszik a patogénfelhalmozódás meghatározását. További információkért nézze át a **8.4. Kvantifikálás** részt.

**Figyelem:** A citomegalovírus *artus* CMV TM PCR Kit használatával való kimutatásának hőmérséklet-profilja megegyezik az *artus* EBV TM PCR Kit és az *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit hőmérséklet-profiljaival. Ezért az említett *artus* rendszerekkel kivitelezett PCR assay-k egyetlen futtatással kivitelezhetők és elemezhetők. Kérjük, vegye figyelembe, hogy a PCR analízissel kapcsolatos javaslatok a **8.4. Kvantifikálás** és **9. Eredmények értékelése** fejezetekben található.

## 8. Protokoll

### 8.1. Az analitikai műveletek előtti lépések: Mintagyűjtés, -tárolás és -szállítás

Óvintézkedés: Minden mintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

**Figyelem:** A jelenlegi kutatások a CMV kimutatásához az EDTA-s vagy citrátos plazmát tekintik legjobb mintának. Ezért ezen anyagok használatát ajánljuk az *artus* CMV TM PCR Kittel való alkalmazásra.

Az *artus* CMV TM PCR Kit validálását EDTA-s humán plazma mintákon végezték. Más mintákra a validálást nem végezték el. Kérjük, csak az ajánlott nukleinsav-izoláló kitéket használja a minta-előkészítéshez (lásd **8.2. DNS-izolálás**).

Bizonyos mintatípusok esetében a gyűjtésre, szállításra és tárolásra vonatkozó utasításokat szigorúan be kell tartani.

#### 8.1.1. Mintagyűjtés

Minden vérvétel az erek (artériák, vénák, kapillárisok) sérülésével jár. Csak tiszta és steril eszközöket szabad használni. A vérvételhez megfelelő eldobható eszközök állnak rendelkezésre. A véna punkciójához a túl vékony kapilláris tűk nem alkalmasak. A vénás vért a könyökhajlat, az alkar vagy a kézfej megfelelő részeiből kell venni. A vért szabványos mintavevő csővel kell levenni (pl. piros kupakos Sarstedt, vagy ezzel egyenértékű, más gyártótól származó). 5–10 ml térfogatú EDTA-s vért kell venni. A csövek tartalmát a csövek 8-szor történő felfordításával kell összekeverni (ne rázza).



**Figyelem:** Nem használhatóak olyan minták, amelyek heparint kapott betegektől származnak (lásd **8.1.4. Zavaró anyagok**).

### 8.1.2. Mintatárolás

A teljes vért hat órán belül 20 perces 800–1600 g-s centrifugálással szeparálni kell plazmára és sejtes összetevőkre. Az elválasztott plazmát át kell pipettázni egy steril polipropilén csőbe. A mintáknak rutinszerű vagy hosszabb tároláshoz szükséges fagyasztása csökkentheti az assay érzékenységét.

### 8.1.3. Mintaszállítás

A mintákat alapvetően törésálló szállítókonténerben kell szállítani. Ezáltal elkerülhető a minták szivárgása okozta fertőzésveszély. A mintákat a patogén anyagokra vonatkozó helyi és nemzeti előírásoknak megfelelően kell szállítani.\*

A mintákat hat órán belül el kell szállítani. Nem ajánlott a minták gyűjtőhelyen történő tárolása. Ha lehetséges, a mintákat levélben a patogén anyagokra vonatkozó előírásoknak megfelelően szállítsa. Ajánlott futár igénybevétele. A vérmintákat hűtve (2 °C és 8 °C között), az elválasztott plazmát mélyfagyasztva (–20 °C-on) kell szállítani.

### 8.1.4. Zavaró anyagok

Megemelkedett bilirubin- ( $\leq 4,5$  mg/dl) és lipidszintek ( $\leq 1100$  mg/dl), illetve a minta hemolízise nem zavarja a CMV analitikai rendszert. A heparin befolyásolja a PCR-reakciót. Ne használjon olyan mintákat, amelyeket heprinnal alvadásgátolt csövekben vettek le. Emellett olyan minták sem használhatóak, melyek heparint kapott betegektől származnak.

\* International Air Transport Association (IATA, Nemzetközi Légi Szállítási Szövetség). Dangerous Goods Regulations, 41st Edition (Veszélyes árukkal kapcsolatos előírások, 41. kiadás), 2000. 704.

## 8.2. DNS-izolálás

A CMV DNS izolálásához az alábbi izoláló kit használata javasolt:

Minta típusa	Nukleinsav-izoláló kit	Katalógusszám	Gyártó	Hordozó RNS
EDTA-s plazma	QIAamp® DSP Virus Kit (50)	60704	QIAGEN	tartalmaz

- A **hordozó RNS** alkalmazása kritikus az extrakció hatékonysága, és ennek következtében a DNS/RNS hozam szempontjából. A QIAamp DSP Virus Kitben lévő hordozó RNS stabilitásának növelése érdekében kérjük, kövesse a hordozó RNS kezelésére és tárolására vonatkozó utasításokat (lásd A *QIAamp DSP Virus Kit kézikönyv* „Reagensok és pufferek előkészítése” című fejezetét).
- Az izoláló kit **etanol**-tartalmú mosópuffereket is tartalmaz. Kérjük, az eluálás előtt ne felejtse el elvégezni egy további centrifugálási lépést (3 perc, 13 000 rpm), hogy eltávolítson minden maradék etanolt. Így megelőzhető a PCR lehetséges gátlása.

**Fontos:** Az *artus* CMV TM PCR Kit *belső kontrollja* közvetlenül az izolálási eljárás során hozzáadható. Kérjük, ügyeljen arra, hogy egy negatív plazmaminta is legyen az izolálási eljárásban. A *belső kontroll* megegyező jele képezi az izolálás értékelésének alapját (lásd

### 8.3. Belső kontroll).

## 8.3. Belső kontroll

A kit részét képezi a *belső kontroll* (CMV TM IC) is. Ez lehetővé teszi a felhasználónak a **DNS-izolálási eljárás kontrollálását, és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzését** is (lásd 1. ábra). Ennek az eljárásnak a kivitelezéséhez adjon a *belső kontrollból* az elúciós térfogathoz 0,1 µl/1 µl arányban. A QIAamp DSP Virus Kit használata esetén a DNS például 60 µl AE pufferben kerül eluálásra. Ezért az eljárás elején 6 µl *belső kontrollt*

szükséges hozzáadni. A felhasznált *belső kontroll* mennyisége **kizárólag** az elúciós térfogattól függ.

A *belső kontrollt* és a hordozó RNS-t (lásd **8.2. DNS-izolálás**) csak az alábbiakhoz kell hozzáadni:

- lízispuffer és minta keverékéhez, vagy
- közvetlenül a lízispufferhez.

A *belső kontrollt* nem szabad a feldolgozandó mintához adni. Amennyiben a lízispufferhez adta a *belső kontrollt*, ügyeljen arra, hogy a *belső kontrollt* és a lízispuffert és lízispuffert/hordozó RNS-t frissen készítse elő és azonnal használja fel (a keveréket szobahőmérsékleten vagy hűtőben tárolva a *belső kontroll* néhány órán belül tönkremegy, ezáltal csökkent extrakciós hatékonyságot okozhat). Kérjük, hogy a *belső kontrollt* és a hordozó RNS-t **ne** adja közvetlenül a mintához.

Ahhoz, hogy egy tisztítást sikeresnek lehessen tekinteni, egy negatív plazmaminta *belső kontrollja* – amelyet a QIAamp DSP Virus Kittel, az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT SDS* készülékeken végzett tisztítással dolgoztak fel – Ct értékének el kell érnie a 25,3–31,3 Ct tartományt (*küszöbértékek: ABI PRISM 7000: 0,2; ABI PRISM 7700 és 7900HT SDS: 0,2*). Az eloszlás a készülék és a tisztítás varianciáján alapul. Nagyobb eltérés tisztítási problémát jelezhet. Ilyen esetben ellenőrizni kell a tisztítást és szükség esetén újra kell validálni. Ha bármilyen további kérdése van, vagy ha probléma merülne fel, forduljon bizalommal műszaki ügyfélszolgálatunkhoz.

Opcionálisan a *belső kontrollt* **kizárólag az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére is használhatja** (lásd 2. ábra). Ezen alkalmazás esetén adjon 2 µl *belső kontrollt* és 5 µl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* oldatot reakcióként közvetlenül a 25 µl *CMV TM Master* reagenshez.

Minden egyes PCR-reakcióhoz 30 µl mesterkeveréket készítsen az előzőekben\* leírtak alapján, és adjon hozzá 20 µl tisztított mintát. Ha több mintához készít elő PCR-futtatást, kérjük, a minták száma szerint arányosan növelje a *CMV TM Master*, a *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* és a *belső kontroll* térfogatát (lásd **8.5. A PCR-reakció előkészítése**).

## 8.4. Kvantifikálás

A mellékelt *kvantifikációs standardok (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4)* a korábban már megtisztított mintáknak megfelelően kerülnek kezelésre, térfogatuk is azonos (20 µl). A standard görbe generálásához egy *ABI PRISM szekvenciadetektáló rendszerben* mind a négy *kvantifikációs standardot* fel kell használni, és standardként definiálni, a megfelelő koncentrációk meghatározásával (lásd **8.6. Az ABI PRISM SDS készülékek beprogramozása**). A korábbi futtatásokból származó standard görbék importálása nem lehetséges az *ABI PRISM 7000, 7700 és 7900HT SDS* készülékek szoftverével.

Ha egynél több herpes *artus* rendszert integrált a PCR-futtatásba, ezeket a különböző rendszereket külön-külön analizálja a nekik megfelelő *kvantifikációs standardokkal*.

**Figyelem:** A pontos kvantifikálás biztosítása érdekében erősen ajánlott a megfelelő mennyiségű *belső kontrollal* kiegészíteni a *kvantifikációs standardokhoz* használt mesterkeveréket. E célból, kérjük, adjon hozzá minden egyes *kvantifikációs standardhoz (CMV LC/RG/TM QS 1 – CMV LC/RG/TM QS 4)* 2 µl *belső kontrollt* és 5 µl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* oldatot közvetlenül a 25 µl *CMV TM Master* mesterkeverékhez (a vázlatos összefoglaláshoz lásd 2. ábra). Ez a pipettázási séma általánosan alkalmazható a *CMV kvantifikációs standardokhoz*, és független a felhasznált *kvantifikációs standardok* számától.

A *kvantifikációs standardok* mértékegysége a kópia/µl. A standard görbe által meghatározott értékeket az alábbi egyenlet segítségével lehet átszámolni a minták kópia/ml értékeire.

\* A PCR assay előkészítése során a *belső kontroll* hozzáadásával előidézett térfogat-növekedés elhanyagolható. A detektálórendszer érzékenységét ez nem befolyásolja.

$$\text{Eredmény (kópia/ml)} = \frac{\text{Eredmény (kópia/}\mu\text{l)} \times \text{Elúciós térfogat (}\mu\text{l)}}{\text{Mintatérfogat (ml)}}$$

Felhívjuk figyelmét, hogy a fenti egyenletben elvi okokból a kezdeti minta térfogatával kell számolni. Ezt figyelembe kell venni, amikor a minta térfogata a nukleinsav extrakció előtt megváltozik (pl. centrifugálásnál csökken, az izoláláshoz szükséges térfogat kiegészítési korrekciója után pedig növekedhet a térfogat).

**Fontos:** Az *ABI PRISM 7000 SDS* készülékekhez használt *artus* rendszerek kvantitatív analízisének irányelvei megtalálhatók a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) címen.

## 8.5. A PCR-reakció előkészítése

Készítse elő a kívánt számú reakciócsövet, vagy egy 96 cellás reakciólemezt az ütemezett reakciókhoz. Az ajánlott anyagok listája megtalálható az alábbi táblázatban:

Cikk	Leírás	Katalógusszám	Gyártó	Tálcás tartóállvány	Kompressziós tömítőpárna
96 cellás optikai reakciólemez	96 Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nem	–
Optikai adhéziós zárófoliák	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	–	igen
Optikai reakciócsövek	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	igen	–
Optikai reakciócsövek	MicroAmp <sup>®</sup> Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	igen	–
Cikk	Leírás	Katalógusszám	Gyártó	Tálcás tartóállvány	Kompressziós tömítőpárna
96 cellás optikai reakciólemez	96 Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nem	–
Optikai adhéziós zárófoliák	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	–	igen
Optikai reakciócsövek	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	igen	–

---

**Figyelem:** A domború kupakos reakciócsövek használata az optikai analízishez csak az *ABI PRISM 7700 SDS* készülékkel megengedett, és módosítani kell hozzá az expozíciós időt (lásd **8.6.2. Az ABI PRISM 7700 SDS készülék beprogramozása, 8.6.2.5. Fontos további beállítások**).

Kérjük, a PCR-reakció előkészítése során ügyeljen rá, hogy a PCR futtatásonként párhuzamosan legalább egy *kvantifikációs standardot*, és egy negatív kontrollt (*PCR tisztaságú víz*) is tartalmazzon. Standard görbe létrehozásához használja fel a kitben lévő összes *kvantifikációs standardot (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4)* minden egyes PCR-futtatásnál.

**Figyelem:** A standard görbe létrehozása érdekében erősen ajánlott a megfelelő mennyiségű *belső kontrollal* kiegészíteni a *kvantifikációs standardokhoz* használt mesterkeveréket (lásd **8.4. Kvantifikálás**). Minden használat előtt az összes reagenst teljesen fel kell olvasztani, össze kell keverni (ismételt fel és le pipettázással vagy gyors vortexeléssel), és röviden centrifugálni.

Ha a *belső kontrollt* kívánja használni a **DNS-izolálási eljárás monitorozására és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére**, az már hozzá lett adva az izoláláshoz (lásd **8.3. Belső kontroll**). Ebben az esetben kövesse az alábbi pipettázási vázlatot (vázlatos áttekintés 1. ábra):

	Mintaszám	1	12
<b>1. Mesterkeverék előkészítése</b>	<i>CMV TM Master</i>	25 µl	300 µl
	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol</i>	5 µl	60 µl
	<i>CMV TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
<b>2. PCR assay előkészítése</b>	Mesterkeverék	30 µl	egyenként 30 µl
	Minta	20 µl	egyenként 20 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>50 µl</b>	<b>egyenként 50 µl</b>

Ha *belső kontrollt* csak az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére kívánja használni, közvetlenül a *CMV TM Master* mixhez adja hozzá. Ebben az esetben kövesse az alábbi pipettázási vázlatot (vázlatos áttekintés 2. ábra):

	Mintaszám	1	12
<b>1. Mesterkeverék előkészítése</b>	<i>CMV TM Master</i>	25 µl	300 µl
	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol</i>	5 µl	60 µl
	<i>CMV TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl</b>
<b>2. PCR assay előkészítése</b>	Mesterkeverék	30 µl	egyenként 30 µl
	Minta/ <i>CMV LC/RG/TM QS 1 – 4</i>	20 µl	egyenként 20 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>50 µl</b>	<b>egyenként 50 µl</b>

\* A PCR assay előkészítése során a *belső kontroll* hozzáadásával előidézett térfogat-növekedés elhanyagolható. A detektálórendszer érzékenységét ez nem befolyásolja.

---

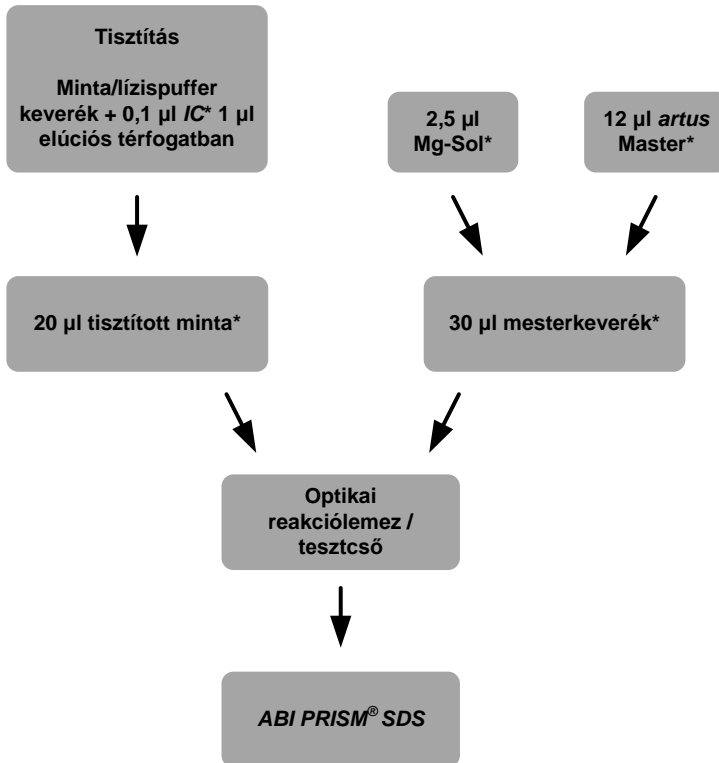
Pipetázzon 30 µl mesterelegyet minden egyes szükséges reakciócsőbe vagy a 96 cellás reakciólemez megfelelő celláiba. Ezt követően adjon hozzá a DNS-izolálásból kapott 20 µl eluátumot. Ismételt pipettás szuszpendálással alaposan keverje össze az elegyet. Zárja le a reakciócsöveket a megfelelő kupakkal vagy – 96 cellás reakciólemez használata esetén – az optikai adhézios zárófóliával (*Optical Adhesive*). Centrifugálja a reakciócsöveket (PCR tesztcsövek tartóállványában) vagy a 96 cellás reakciólemezt a lemezekhez való rotorral 30 másodpercig 1780 x g (4000 rpm) sebességen, hogy összegyűjtse az előkészített reakcióterfogatot a tesztcsövek vagy cellák aljára. Ha ilyen centrifuga nem áll a rendelkezésére, kérjük, ügyeljen rá, hogy mind a mesterkeverék, mind a minta teljes mennyisége a tesztcsövek vagy cellák aljára legyen pipetázva. Az előkészített reakciókat tárolja +4 °C-on, amíg az *ABI PRISM SDS* készüléket beprogramozza (lásd **8.6. Az *ABI PRISM SDS* készülékek beprogramozása**), majd töltsse be azokat a készülékbe.

**Figyelem:** Optikai reakciócsövek és optikai kupakok kombinált használata esetén mindig helyezzen be egy tálcás tartóállványt (*96-Well Tray/Retainer Set*) a készülékbe (*ABI PRISM 7000, 7700 és 7900HT SDS*). Ha két részes tálcás tartóállványt használ, ki kell nyitnia a reakciócsöveket, amikor behelyezi azokat a tartóállványba, vagy kiveszi azokat onnan. Az ezen eljárás miatti keresztzennyeződés elkerülése érdekében csak a tálcás tartóállvány első részét használja.

96 cellás optikai reakciólemez és optikai adhézios zárófóliák kombinált használata esetén le kell fednie a lemezeket kompressziós tömítőpárnával (*Optical Cover Compression Pads*).



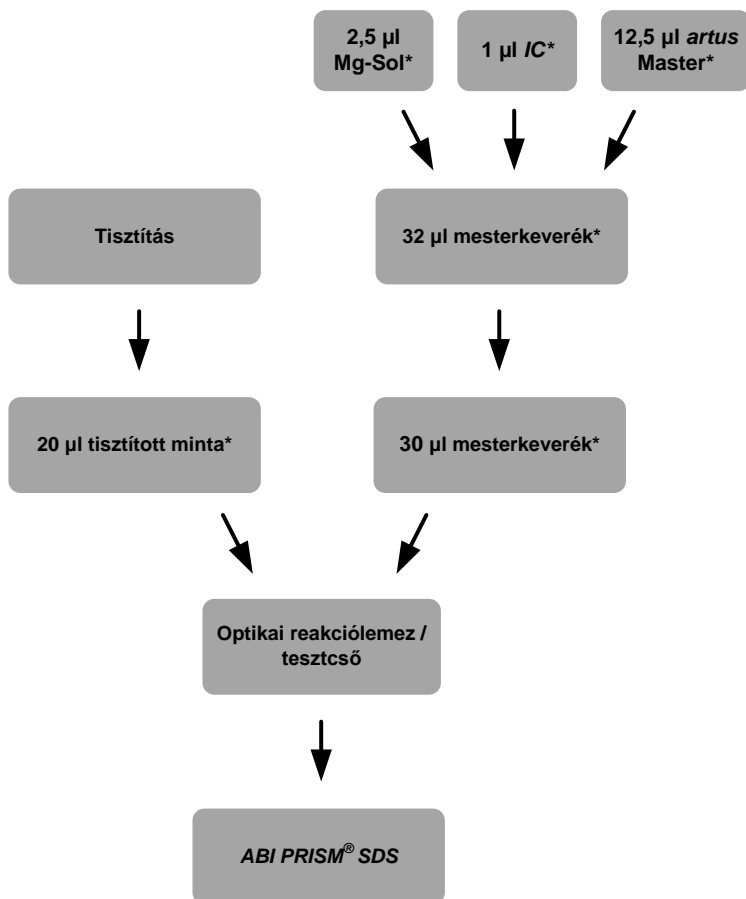
A *belső kontroll* hozzáadása a tisztítási eljáráshoz



1. ábra: Sematikus munkafolyamat a tisztítási eljárás és PCR-gátlás ellenőrzéséhez.

\*Kérjük, ügyeljen arra, hogy az oldatot teljesen olvassa fel, jól keverje fel, és csak rövid ideig centrifugálja.

Az *artus* master mixhez történő *belső kontroll* hozzáadása



2. ábra: Sematikus munkafolyamat a PCR gátlás ellenőrzéséhez.

\*Kérjük, ügyeljen arra, hogy az oldatot teljesen olvassza fel, jól keverje fel, és csak rövid ideig centrifugálja.

## 8.6. Az ABI PRISM SDS készülékek beprogramozása

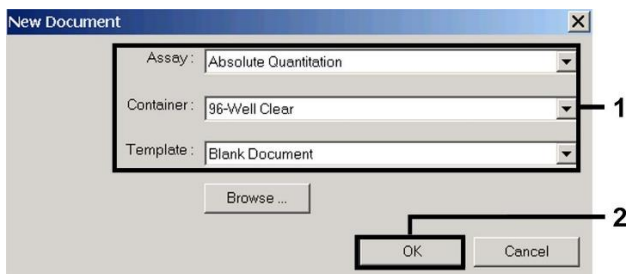
Az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT* szekvenciadetektáló rendszerek (Sequence Detection Systems, *SDS*) szoftverének használata további információkat igényel, mielőtt elindítaná a PCR-futtatást. Az egyes készülékek programozási eljárásai azonban jelentős mértékben eltérnek egymástól, ezért az alábbiakban külön-külön kerülnek kifejtésre.

### 8.6.1. Az *ABI PRISM 7000 SDS* készülék beprogramozása

A CMV DNS kimutatásához hozzon létre egy új profilt az *ABI PRISM 7000 SDS* készülékén az alábbi hat lépésnek megfelelően (8.6.1.1. – 8.6.1.6.). Az összes leírás az *ABI PRISM 7000 SDS* 1.0.1 verziószámú szoftverére vonatkozik. Az *ABI PRISM 7000 SDS* készülék beprogramozásának részletei megtalálhatók az *ABI PRISM 7000 SDS felhasználói útmutatójában*. A jobb áttekinthetőség kedvéért a szoftver beállításai vastag fekete keretben lettek kiemelve.

#### 8.6.1.1. Előbeállítások egy új PCR-futtatás létrehozásához

Az *ABI PRISM 7000 SDS File (Fájl)* menüjéből válassza ki a *New (Új)* opciót, és programozza be az alábbi kezdeti beállításokat az új dokumentumhoz (lásd 3. ábra). A mentett sablonok (*SDS Template (SDS sablon) [\*.\*.sdq]*) elérhetők a *Template (Sablon)* listából, vagy megkereshetők a *Browse (Tallózás)* funkció használatával (lásd **8.6.1.5. A PCR-futtatás elmentése**). Erősítse meg az előbeállításait (*OK*).



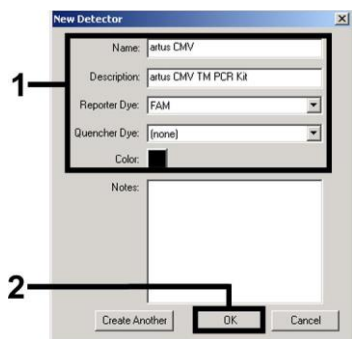
3. ábra: Előbeállítások egy új PCR-futtatás létrehozásához (New Document (Új dokumentum)).

### 8.6.1.2. A detektorok létrehozása/kiválasztása

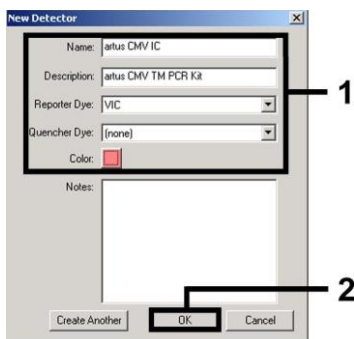
A *Tools* (Eszközök) menüpont *Detector Manager* (Detektorkezelő) almenüje segítségével rendelje hozzá a megfelelő kimutató festékeket a fájlhoz. A *CMV DNS*, valamint a *belső kontroll* az *artus CMV TM PCR Kit* segítségével való kimutatásához meg kell határozni az alábbi táblázatban felsorolt jelző- és kioltófestékeket:

Kimutatás	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
CMV DNS	FAM	none (semmi)
<i>Belső kontroll (CMV TM IC)</i>	VIC	none (semmi)

Ezen detektorok létrehozásához válassza ki a *File* (Fájl) opciót (a *Detector Manager* (Detektorkezelő) bal alsó részén), majd azt követően a *New* (Új) opciót.

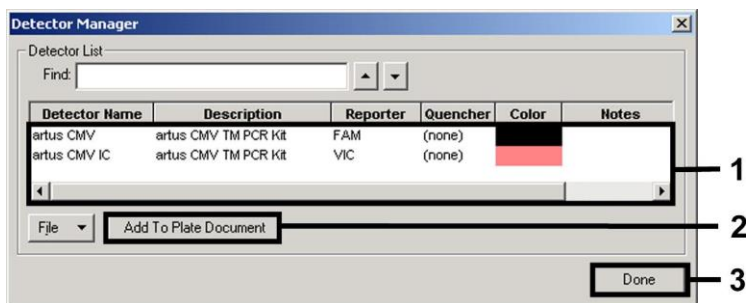


4. ábra: A **CMV**-specifikus detektor létrehozása (a *Detector Manager* (Detektorkezelő) használatával).



5. ábra: Az **IC**-specifikus detektor létrehozása (a *Detector Manager* (Detektorkezelő) használatával).

A *CMV DNS* kimutatásához az új programablakban adja meg a **FAM/none** (FAM/semmi) jelzőfesték/kioltófesték kombinációt. A *belső kontroll* kimutatásához válassza ki a **VIC/none** (VIC/semmi) kombinációt (a 4. ábra és 5. ábra szerint). A bevitt adatok megerősítésével (*OK*) térjen vissza a *Detector Manager* (Detektorkezelő) menübe. Jelölje meg az újonnan létrehozott detektorokat, és vigyen át minden egyes választást a *Well Inspector* (Cellafigyelő) felületre az *Add to Plate Document* (Hozzáadás a lemezdokumentumhoz) opcióra kattintással (lásd 6. ábra). Zárja be a programablakot (*Done* (Kész)).



6. ábra: A detektorok kiválasztása (a Detector Manager (Detektorkezelő) használatával).

### 8.6.1.3. A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz

Nyissa meg a *Well Inspector* (Cellafigyelő) opciót a *View* (Nézet) menüből, hogy megtalálja a 8.6.1.2. pontban kiválasztott detektorokat (lásd 7. ábra).



7. ábra: A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz (a *Well Inspector* (Cellafigyelő) használatával).

Jelölje meg a CMV DNS kimutatására fenntartott lemezpozíciókat. Rendelje hozzá a kiválasztott detektorokat ezekhez a pozíciókhoz: aktiválja a *Use* (Használat) opciót mindkét detektor esetében, és megjelenik mellettük egy pipa. Az egyes reakciók elnevezéséhez válassza ki a nekik megfelelő pozíciót a lemezen, és írja be a kívánt nevet (Sample Name (A minta neve)). Kérjük, vegye figyelembe, hogy a szoftver párhuzamos mintákként fogja

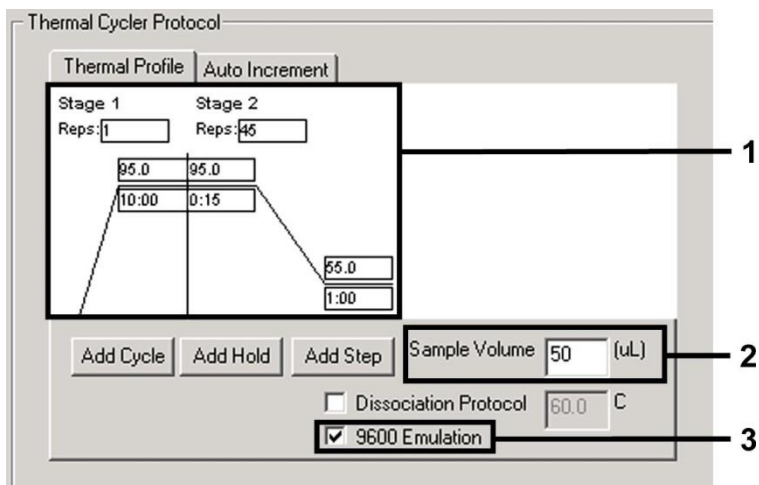
azonosítani az azonos Sample Name (A minta neve) elemmel és azonos detektor-hozzárendeléssel rendelkező előkészített mintákat, és a patogénfelhalmozódás mennyiségi meghatározásakor azok átlagával fog számolni. Majd válassza ki a megfelelő funkciót (Task (Feladat)) minden egyes mintatípus esetében, az alábbi táblázat szerint:

Mintatípus	Funkció (Task (Feladat))	Koncentráció (Quantity (Mennyiség))	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
Minta	Unknown (Ismeretlen)	–	FAM	none (semmi)
Sablon nélküli kontroll	NTC	–	FAM	none (semmi)
Standard	Standard	Lásd <b>1. Tartalom</b>	FAM	none (semmi)

A standard görbe létrehozásához használja az összes mellékelt *kvantifikációs standardot* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) PCR-futtatásonként, és írja be a megfelelő koncentrációkat (lásd **1. Tartalom**) minden egyes standard esetében (*Quantity* (Mennyiség)). Kérjük, vegye figyelembe, hogy az *artus* CMV TM PCR Kittel történő PCR-futtatáshoz a **ROX™** festéket passzív referenciaként kell beállítani (*Passive Reference* (Passzív referencia)). A ROX festék egyenlő eloszlása a *CMV TM Master* elkeverése révén minden előkészített PCR-reakcióban garantálja a csövenkénti variációk (az egyes PCR-preparátumok közötti fluoreszcencia-különbségek) felismerését, és az azokkal való kalkulálást a *szekvenciadetektáló szoftver* segítségével (a kapott eredmények normalizálása).

#### 8.6.1.4. A hőmérsékleti profil létrehozása

Egy adott hőmérsékleti profil létrehozásához váltson át a *Setup* (Beállítások) szintről az *Instrument* (Készülék) szintre a szoftverben. Írja be a CMV DNS kimutatásához szükséges specifikus hőmérsékleti profilt, a 8. ábra szerint. Az előbeállítások között eltárolt 50 °C-os lépés eltávolításához jelölje meg a bal egérgomb és a shift billentyű egyidejű lenyomásával, majd azt követően törölje ki a backspace billentyűvel. Ügyeljen rá, hogy a reakcióterfogat 50 µl-re legyen állítva. A *9600 Emulation* (9600 emulációja) opciót aktiválni kell, az *Auto Increment* (Automatikus növelés) előre beállított értékét nem kell megváltoztatni (*Auto Increment* (Automatikus növelés): 0,0 °C, 0,0 másodperc).



8. ábra: A hőmérsékleti profil létrehozása.

### 8.6.1.5. A PCR-futtatás elmentése

Mentse el sablonként a beállításokat (*Setup* (Beállítások)), hogy a későbbiekben ismét felhasználhassa azt módosított vagy változatlan formában. Ha elmenti a beállításokat *SDS Template* (SDS sablon) (\*.sdt) formában a *Template Directory* (Sablonkönyvtár) célhelyre (elérési út: *helyi merevlemez [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates*, az Applied Biosystems által létrehozva), ezt a fájlt utána közvetlenül is kiválaszthatja a *New Document* (Új dokumentum) ablakban, a *Template* (Sablon) legördülő listáról. A más mappákba mentett másolatokat a *Browse* (Tallózás) funkcióval lehet megnyitni. A PCR-futtatás elindítása előtt mentse el ismét *SDS Document* (SDS dokumentum) (\*.sds) formában, hogy garantálja a PCR-reakció folyamán gyűjtött adatok elmentését.

### 8.6.1.6. A PCR-futtatás elindítása

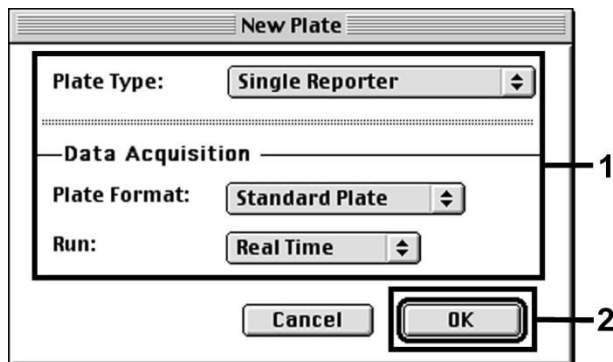
Indítsa el a PCR-futtatást a *Start* (Indítás) opció kiválasztásával az *Instrument* (Készülék) menüelemből, vagy az *Instrument* (Készülék) szintjének *Start* (Indítás) mezőjéből.

## 8.6.2. Az ABI PRISM 7700 SDS készülék beprogramozása

A CMV DNS kimutatásához hozzon létre egy új profilt az *ABI PRISM 7700 SDS* készülékén az alábbi hét lépésnek megfelelően (8.6.2.1. - 8.6.2.7.). Az összes leírás az *ABI PRISM 7700 SDS* 1.9.1 verziószámú szoftverére vonatkozik. Az *ABI PRISM 7700 SDS* készülék beprogramozásának részletei megtalálhatók az *ABI PRISM 7700 SDS felhasználói kézikönyvében*. A jobb áttekinthetőség kedvéért a szoftver beállításai vastag fekete keretben lettek kiemelve.

### 8.6.2.1. Előbeállítások egy új PCR-futtatás létrehozásához

Az *ABI PRISM 7700 SDS* készülék *File* (Fájl) menüjéből válassza ki a *New Plate* (Új lemez) opciót, és programozza be az alábbi kezdeti beállításokat az új dokumentumhoz (lásd 9. ábra). Erősítse meg az előbeállításokat (OK).



9. ábra: Előbeállítások új PCR-futtatás létrehozásához (New Plate (Új lemez)).

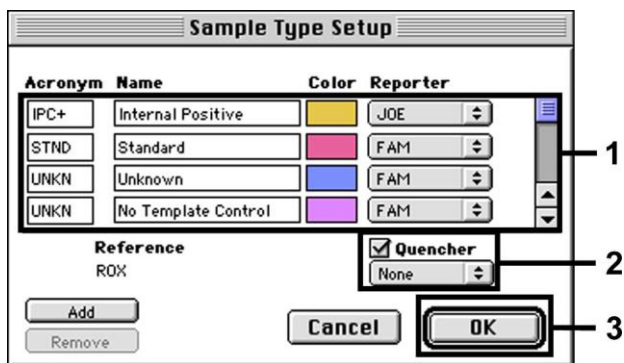


### 8.6.2.2. A fluoreszcens festékek kiválasztása, és a mintatípus kiosztása

A *Sample Type Setup* (Mintatípus beállítása) (*Setup* (Beállítások) szint: *Sample Type/Sample Type Setup* (Mintatípus / Mintatípus beállítása)) segítségével rendelje hozzá a megfelelő kimutató festékeket, és a megfelelő mintatípust a fájlhoz. A CMV DNS, valamint a *belső kontroll* az *artus CMV TM PCR Kit* segítségével való kimutatásához meg kell határozni az alábbi táblázatban felsorolt jelző- és kioltófestékeket:

Kimutatás	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
CMV DNS	FAM	none (semmi)
<i>Belső kontroll (CMV TM IC)</i>	JOE	none (semmi)

A CMV DNS *artus CMV TM PCR Kit* segítségével történő analizéséhez válassza ki a FAM jelzőfestéket, a táblázatban megadottak szerint. Ugyanez vonatkozik a standardokra (STND) és mintákra (UNKN), valamint a sablon nélküli kontrollokra (UNKN). A belső kontroll (IPC+) analizéséhez jelzőfestékként állítsa be a JOE festéket. Kioltófestékként (quencher) állítsa be a none (semmi) opciót. A festékek és mintatípusok hozzárendelését a *Sample Type Setup* (Mintatípus beállítása) programablakban lásd a 10. ábra szerint.



10. ábra: A fluoreszcens festékek kiválasztása és a mintatípus hozzárendelése (*Sample Type Setup* (Mintatípus beállítása)).

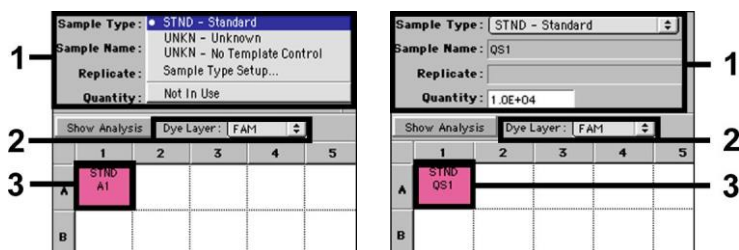
Kérjük, az alábbi táblázat alapján rendelje hozzá a mintatípust egy megfelelő funkcióhoz (*Acronym*) (Rövidítés):

Mintatípus	Funkció ( <i>Acronym</i> (Rövidítés))	Koncentráció ( <i>Quantity</i> (Mennyiség))	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
Minta	UNKN	–	FAM	none (semmi)
Sablon nélküli kontroll	UNKN	–	FAM	none (semmi)
Standard	STND	Lásd <b>1. Tartalom</b>	FAM	none (semmi)

### 8.6.2.3. A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz

A detektorok és mintatípusok egyes lemezpozíciókhoz való hozzárendeléséhez válassza ki a megfelelő mezőket. Majd nyissa meg a *Dye Layer* (Festékréteg) párbeszédablakot a *Setup* (Beállítások) szinten, és rendelje hozzájuk a megfelelő jelzőfestéket. A *Sample Type* (Mintatípus) felugró menü aktiválásakor megtalálja a jelzőfestékhez társított mintatípusokat a *Sample Type Setup* (Mintatípus beállítása) menüpontban a megjelenő listán (lásd 11/12. ábra). Válassza ki a megfelelő mintatípust (lásd a

8.6.2.2.. alatti táblázatot), és ossza ki a fennmaradó lemezpozíciókat a *Dye Layers* (Festékrétegek) és a *Sample Type* (Mintatípus) menüpontok használatával. A *Sample Name* (A minta neve) mezőben minden egyes mintához hozzárendelhet egy nevet. A *Replicates* (Párhuzamos minták) jelöléssel (a referenciaminta nevének a *Replicate* (Párhuzamos minták) oszlopba való beírásával) meghatározott mezőket a szoftver beátlagolja a patogénfelhalmozódás mennyiségi meghatározásakor, és kiszámolja a szórási értékeket.

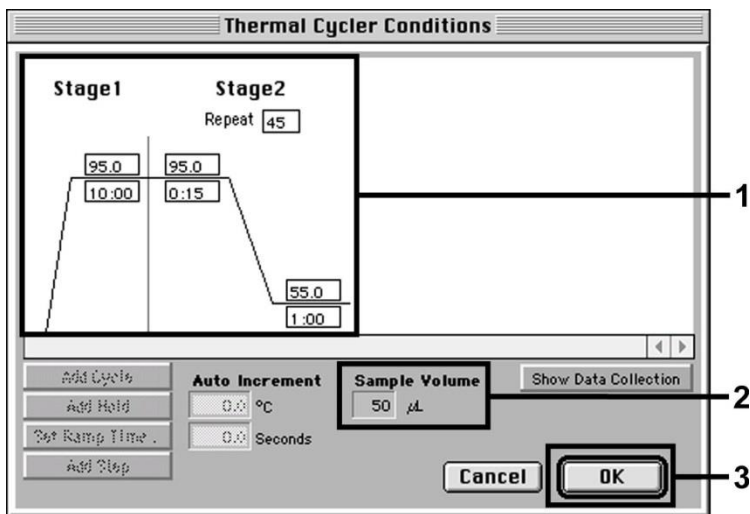


11/12. ábra: A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz.

A standard görbe létrehozásához használja az összes mellékelt *kvantifikációs standardot* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) PCR-futtatásonként, és írja be a megfelelő koncentrációkat (lásd 1. Tartalom) minden egyes standard esetében a *Quantity* (Mennyiség) mezőbe (lásd 12. ábra). Ez azonban csak akkor lehetséges, ha a standardok számára fenntartott pozíciókat már előtte így definiálta a *Sample Type* (Mintatípus) menüpont használatával.

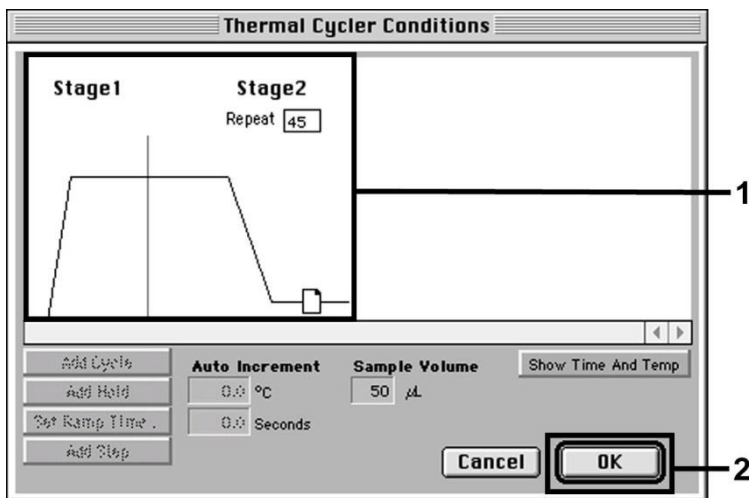
#### 8.6.2.4. A hőmérsékleti profil létrehozása

A hőmérsékleti profil létrehozásához váltson át a *Thermal Cycler Conditions* (PCR működési feltételek) menüpontba a *Setup* (Beállítások) szinten. Írja be a CMV DNS kimutatásához szükséges specifikus hőmérsékleti profilt, a 13. ábra szerint. Ügyeljen rá, hogy a reakciótérfogat 50 µl-re legyen állítva. A *Ramp times* (Hőmérséklet-változtatás sebessége) és az *Auto Increment* (Automatikus növelés) előre beállított értékei változatlanok maradnak (*Ramp Time* (Hőmérséklet-változtatás sebessége): 0:00; *Auto Increment* (Automatikus növelés): 0,0 °C; 0,0 másodperc).



13. ábra: A hőmérsékleti profil létrehozása.

Ezen felül, a *Thermal Cycler Conditions* (PCR működési feltételek) menüpont a *Show Data Collection* (Adatgyűjtés mutatása) opciót is tartalmazza. Ezen opció kiválasztásával megnyílik a 14. ábra szerint bemutatott ablak. A hőmérsékleti görbe minden meredek hőmérséklet-változásakor és minden állandó hőmérsékletű részénél látható egy *Data Collection* (Adatgyűjtés) ikon, amely grafikusán jelzi, hogy a futtatás ezen pontján adatgyűjtés történik. A szükségtelen fluoreszcencia-mérések kizárása érdekében távolítsa el az összes ilyen szimbólumot az *Annealing* (Kapcsolódás) lépés kivételével (*Stage2*/ (2. fázis) *Step2* (2. lépés)). A teljes futtatási idő és a kapott adatmennyiség ily módon minimálisra csökkenthető.



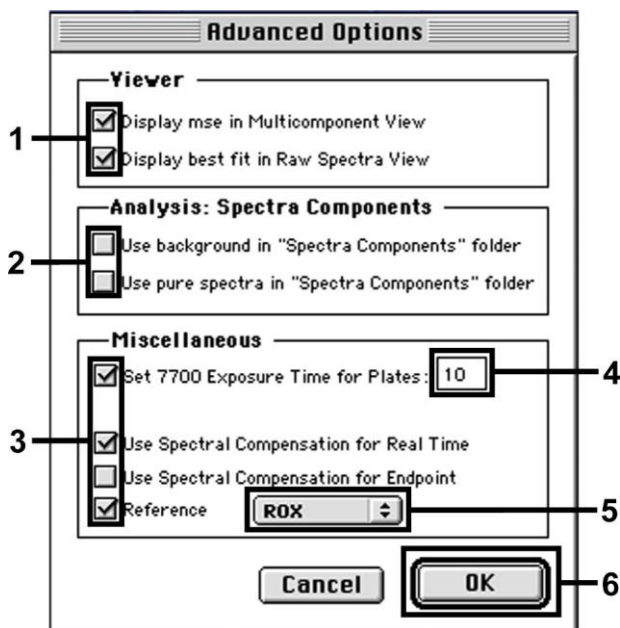
14. ábra: Adatgyűjtés.

### 8.6.2.5. Fontos további beállítások

Az expozíciós idő (a fluoreszcens festékek gerjesztési ideje) beállításához, valamint a Pure Spectra (Tiszta spektrumok) / Background (Háttér) fájlok kiválasztásához váltson át a Setup (Beállítások) szintről az Analysis (Analízis) szintre. Válassza ki az aktivált Advanced Options (Speciális beállítások) alpontot, amely a Diagnostics (Diagnosztika) menüpont alatti Instrument (Készülék) menüpontban található. Módosítsa a beállításokat a 15. ábra szerint. A program a Spectra Components (Spektrumösszetevők) (Analysis (Analízis)) opcionális funkció inaktíválása révén automatikusan felhasználja az adatgenerálás pillanatában a Spectra Components (Spektrumösszetevők) mappában tárolt aktuális kalibrációs fájlokat a korábban már kielemezett futtatások újraértékelésekor. A korábbi futtatások újonnan bevitt Spectra Components (Spektrumösszetevők) használatával végzett analíziséhez aktiválja ezt a két mezőt. Kérjük, vegye figyelembe, hogy az artus CMV TM PCR Kittel történő PCR-futtatáshoz a ROX festéket passzív referenciaként kell beállítani (Reference (Referencia)). A ROX festék egyenlő eloszlása a CMV TM Master elkeverése révén minden előkészített PCR-reakcióban garantálja a csövenkénti variációk (az egyes PCR-preparátumok közötti

fluoreszcencia-különbségek) felismerését, és az azokkal való kalkulálást a *szekvenciadetektáló szoftver* segítségével (a kapott eredmények normalizálása).

**Figyelem:** Amikor 96 cellás reakciólemezeket használ az optikai mérésekhez optikai adhéziós zárófoliákkal kombinálva, vagy lapos kupakú optikai reakciócsöveket, az expozíciós idő tíz milliszekundum. Ha **domború kupakos optikai reakciócsöveket** használ, **25 milliszekundumra** kell módosítania az expozíciós időt.



15. ábra: Fontos további beállítások (Advanced Options (Speciális beállítások)).

#### 8.6.2.6. A PCR-futtatás elmentése

Mentse el sablonként a beállításokat (*Setup* (Beállítások)), hogy a későbbiekben ismét felhasználhassa azt módosított vagy változatlan formában. Ennek érdekében tárolja a fájlt a *Stationary File Format* (Rögzített fájlformátum) formában. Újonnan programozott PCR-

---

futtatás elindítása előtt mentse el ismét, ezúttal *Normal File Format* (Normál fájlformátum) formában, hogy garantálja a PCR-reakció folyamán gyűjtött adatok elmentését.

#### **8.6.2.7. A PCR-futtatás elindítása**

Indítsa el a PCR-futtatást a *Run* (Futtatás) opció kiválasztásával az *Instrument* (Készülék) menüelemből vagy az *Analysis* (Analízis) szintjének *Run* (Futtatás) mezőjéből.

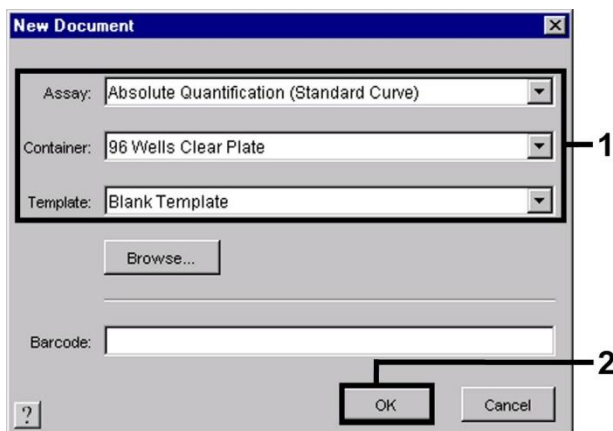
#### **8.6.3. Az ABI PRISM 7900HT SDS készülék beprogramozása**

A CMV DNS kimutatásához hozzon létre egy új profilt az *ABI PRISM 7900HT SDS* készülékén az alábbi hat lépésnek megfelelően (8.6.3.1. – 8.6.3.6.). Az összes leírás az *ABI PRISM 7900HT SDS* 2.1 verziószámú szoftverére vonatkozik. Az *ABI PRISM 7900HT SDS* készülék beprogramozásának részletei megtalálhatók az *ABI PRISM 7900HT SDS felhasználói útmutatójában*. A jobb áttekinthetőség kedvéért a szoftver beállításai vastag fekete keretben lettek kiemelve.

##### **8.6.3.1. Előbeállítások egy új PCR-futtatás létrehozásához**

Az *ABI PRISM 7900HT SDS File* (Fájl) menüjéből válassza ki a *New* (Új) opciót, és programozza be az alábbi kezdeti beállításokat az új dokumentumhoz (lásd 16. ábra). A mentett sablonok (*ABI PRISM SDS Template Document* (ABI PRISM SDS sablondokumentum) [*\*.sdf*]) elérhetők a *Template* (Sablon) listából, vagy megkereshetők a *Browse* (Tallózás) funkció használatával (lásd **8.6.3.5. A PCR-futtatás elmentése**). Erősítse meg az előbeállításokat (*OK*).

**Figyelem:** Az *artus* CMV TM PCR Kit kombinált használata nem javasolt az *ABI PRISM 7900HT SDS* 384 lemezes formátumával.



16. ábra: Előbeállítások egy új PCR-futtatás létrehozásához (New Document (Új dokumentum)).

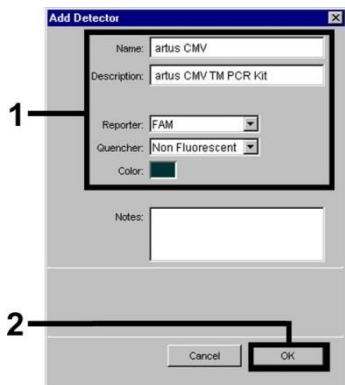
### 8.6.3.2. A detektorok létrehozása/kiválasztása

A *Tools* (Eszközök) menüpont *Detector Manager* (Detektorkezelő) almenüje segítségével (vagy: *Setup* (Beállítások) szint / *Add Detector* (Detektor hozzáadása) funkció kiválasztásával) rendelje hozzá a megfelelő kimutató festékeket a fájlhoz. A CMV DNS, valamint a *belső kontroll* az *artus CMV TM PCR Kit* segítségével való kimutatásához meg kell határozni az alábbi táblázatban felsorolt jelző- és kioltófestékeket:

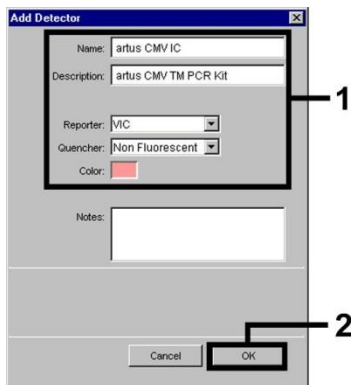
Kimutatás	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
CMV DNS	FAM	Non Fluorescent (Nem fluoreszcens)
<i>Belső kontroll (CMV TM IC)</i>	VIC	Non Fluorescent (Nem fluoreszcens)

Ezen detektorok létrehozásához válassza ki a *New (Új)* opciót (a *Detector Manager* (Detektorkezelő) bal alsó részén).



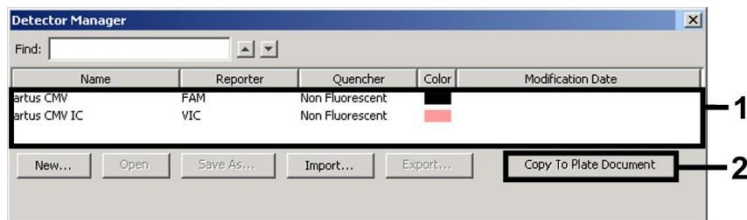


17. ábra: A CMV-specifikus detektor létrehozása (a Detector Manager (Detektorkezelő) használatával).



18. ábra: Az IC-specifikus detektor létrehozása (a Detector Manager (Detektorkezelő) használatával).

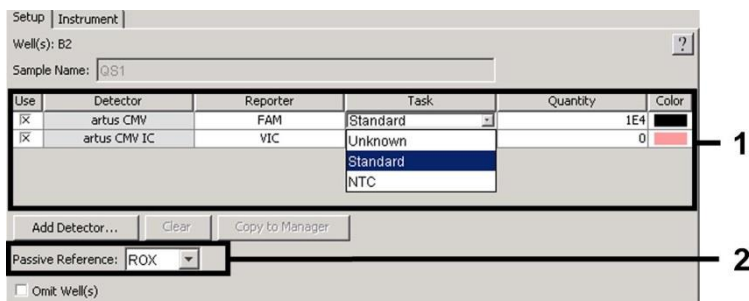
A CMV DNS kimutatásához az új ablakban adja meg a **FAM/Non Fluorescent** (FAM/nem fluoreszcens) jelzőfesték/kioltófesték kombinációt. A *belső kontroll* kimutatásához válassza ki a **VIC/Non Fluorescent** (VIC/nem fluoreszcens) kombinációt (a 17. ábra és 18. ábra szerint). A bevitt adatok megerősítésével (OK) térjen vissza a *Detector Manager* (Detektorkezelő) menübe. Jelölje meg az újonnan létrehozott detektorokat, és vigyen át minden egyes választást a *Setup* (Beállítások) szintre a *Copy to Plate Document* (Másolás a lemezdokumentumba) opcióra kattintással (lásd 19. ábra). Zárja be a programablakot (*Done* (Kész)).



19. ábra: A detektorok kiválasztása (a Detector Manager (Detektorkezelő) használatával).

### 8.6.3.3. A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz

Miután bezárta a *Detector Manager* (Detektorkezelő) ablakot (*Done* (Kész)), a 8.6.3.2. alatt kiválasztott detektorok megtalálhatók a *Setup* (Beállítások) szinten egy táblázatban (lásd 20. ábra).



20. ábra: A szükséges információk hozzárendelése a lemezpozíciókhoz.

Jelölje meg a CMV DNS kimutatására fenntartott lemezpozíciókat. Rendelje hozzá a kiválasztott detektorokat ezekhez a pozíciókhoz: aktiválja a *Use* (Használat) opciót mindkét detektor esetében, és megjelenik mellettük egy kereszt jel. Az egyes reakciók elnevezéséhez válassza ki a nekik megfelelő pozíciót a lemezen, és írja be a kívánt nevet (*Sample Name* (A minta neve)). Kérjük, vegye figyelembe, hogy a szoftver párhuzamos mintákként fogja azonosítani az azonos *Sample Name* (A minta neve) elemmel és azonos detektor-hozzárendeléssel rendelkező előkészített mintákat, és a patogénfelhalmozódás mennyiségi meghatározásakor azok átlagával fog számolni. Majd válassza ki a megfelelő funkciót (*Task* (Feladat)) minden egyes mintatípus esetében, az alábbi táblázat szerint:

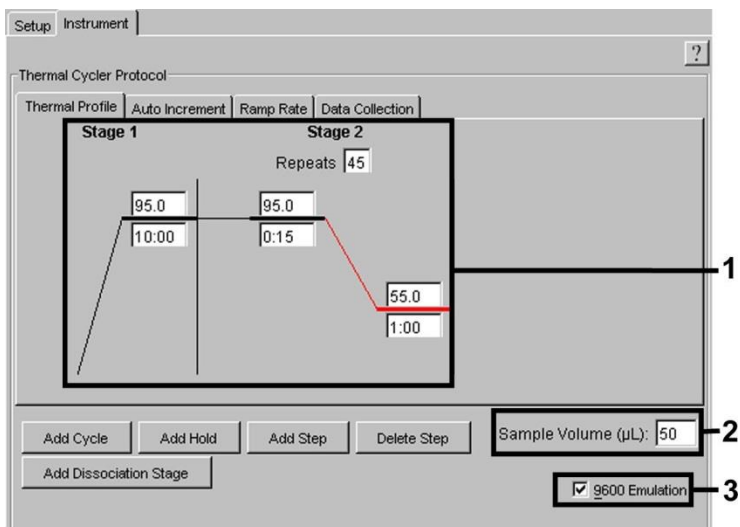
Mintatípus	Funkció ( <i>Task</i> (Feladat))	Koncentráció ( <i>Quantity</i> (Mennyiség))	Reporter (Jelzőfesték)	Quencher (Kioltófesték)
Minta	Unknown (Ismeretlen)	–	FAM	Non Fluorescent (Nem fluoreszcens)
Sablon nélküli kontroll	NTC	–	FAM	Non Fluorescent (Nem fluoreszcens)
Standard	Standard	Lásd 1. <b>Tartalom</b>	FAM	Non Fluorescent (Nem fluoreszcens)

---

A standard görbe létrehozásához használja az összes mellékelt *kvantifikációs standardot* (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) PCR-futtatásonként, és írja be a megfelelő koncentrációkat (lásd **1 Tartalom**) minden egyes standard esetében (*Quantity* (Mennyiség)). Kérjük, vegye figyelembe, hogy az *artus CMV TM PCR Kittel* történő PCR-futtatáshoz a **ROX** festéket passzív referenciaként kell beállítani (*Passive Reference* (Passzív referencia)). A ROX festék egyenlő eloszlása a *CMV TM Master* elkeverése révén minden előkészített PCR-reakcióban garantálja a csövenkénti variációk (az egyes PCR-preparátumok közötti fluoreszcencia-különbségek) felismerését, és az azokkal való kalkulálást a *szekvenciadetektáló szoftver* segítségével (a kapott eredmények normalizálása).

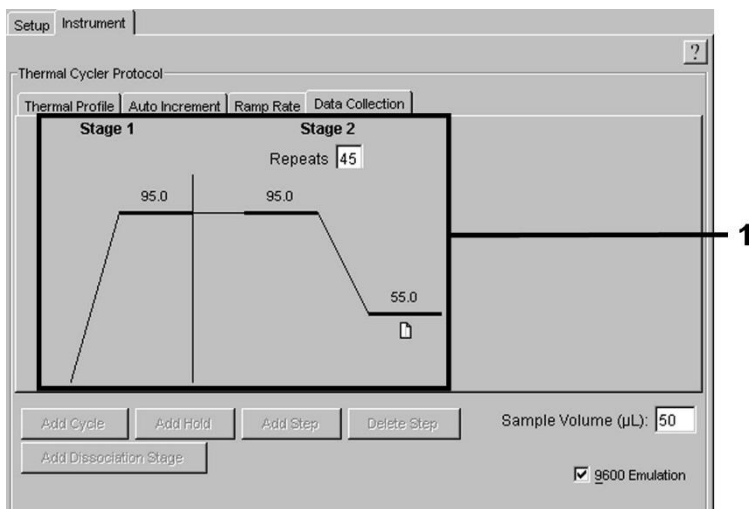
#### **8.6.3.4. A hőmérsékleti profil létrehozása**

Egy adott hőmérsékleti profil létrehozásához váltson át a *Setup* (Beállítások) szintről az *Instrument* (Készülék) szintre a szoftverben. Írja be a *CMV DNS* kimutatásához szükséges érvényes hőmérsékleti profilt, a 21. ábra. szerint. Ügyeljen rá, hogy a reakciótérfogat 50 µl-re legyen állítva. A *9600 Emulation* (9600 emulációja) opciót aktiválni kell, a *Ramp times* (Hőmérséklet-változtatás sebessége) és az *Auto Increment* (Automatikus növelés) előre beállított értékeit nem kell megváltoztatni (*Ramp Time* (Hőmérséklet-változtatás sebessége): 0:00; *Auto Increment* (Automatikus növelés): 0,0 °C; 0,0 másodperc).



21. ábra: A hőmérsékleti profil létrehozása.

Ezen felül, az *Instrument* (Készülék) szint a *Data Collection* (Adatgyűjtés) opciót is tartalmazza. Ezen opció kiválasztásával megnyílik a 22. ábra szerint bemutatott ablak. A hőmérsékleti görbe minden meredek hőmérséklet-változásakor és minden állandó hőmérsékletű részénél látható egy *Data Collection* (Adatgyűjtés) ikon, amely grafikusán jelzi, hogy a futtatás ezen pontján adatgyűjtés történik. A szükségtelen fluoreszcencia-mérések kizárása érdekében rákattintással távolítsa el az összes ilyen szimbólumot az *Annealing* (Kapcsolódás) lépés kivételével (*Stage2*/ (2. fázis) *Step2* (2. lépés)). A teljes futtatási idő és a kapott adatmennyiség így módon minimálisra csökkenthető.



22. ábra: Adatgyűjtés.

### 8.6.3.5. A PCR-futtatás elmentése

Mentse el sablonként a beállításokat (*Setup* (Beállítások)), hogy a későbbiekben ismét felhasználhassa azt módosított vagy változatlan formában. Ha elmenti a beállításokat egy *ABI PRISM SDS Template Document* (ABI PRISM SDS sablondokumentum) (\*.sdt) formában a *Template Directory* (Sablontároló) célhelyre (elérési út: *helyi merevlemez ([D:] \Program Files \Applied Biosystems \SDS 2.1 \Templates*, az Applied Biosystems által létrehozva), ezt a fájlt utána közvetlenül is kiválaszthatja a *New Document* (Új dokumentum) ablakban, a *Template* (Sablon) listáról. A más mappákba mentett másolatokat a *Browse* (Tallózás) funkcióval lehet megnyitni. A PCR-futtatás elindítása előtt mentse el ismét, ezúttal *ABI PRISM SDS Document* (ABI PRISM SDS dokumentum) (\*.sds) formában, hogy garantálja a PCR-reakció folyamán gyűjtött adatok elmentését.

### 8.6.3.6. A PCR-futtatás elindítása

Indítsa el a PCR-futtatást: válassza ki a *Start* (Indítás) opciót az *Instrument* (Készülék) menüelemből.

## 9. Eredmények értékelése

A készülékek használatba helyezésekor szükséges a festékek (*Pure Spectra Component File* (Tiszta spektrumösszetevők)) és a háttér (*Background Component File* (Háttér-komponens fájl)) hiteles kalibrálása. Ezekre a kalibrációs fájlokra szükség van az eredmények pontos kiszámításához, az alábbiak szerint:

Ca készülék által létrehozott minden olyan zavaró jelet, amely befolyásolná a mérést, kiküszöböli az *ABI PRISM szekvenciadetektáló rendszerek szekvenciadetektáló szoftvere* a *Background Component File* (Háttér-komponens fájl) révén.

Továbbá, a többszínű (többfestékes) analízisek során is fellépnek interferenciák az egyes fluoreszcens festékek emissziós spektrumai között. Az *ABI PRISM SDS* készülék szoftvere a *Pure Spectra Component File* (Tiszta spektrumösszetevők) fájlban tárolt egyéni festékek spektrumadatait felhasználó kalkulációkkal kompenzálja ezeket az interferenciákat. A szoftver ugyanazt a fájlt használja a PCR-reakció során összegyűjtött, a teljes mérhető spektrumot felölelő fluoreszcencia-adatok programozott detektorokhoz való hozzárendeléséhez. Az egyedi festékek fluoreszcencia-adatait azután elosztják a passzív referencia (ROX) jelére kapott értékkel, hogy számításba vegyék a tesztcsövenkénti eltéréseket (a különböző PCR-preparátumok közötti fluoreszcencia-különbségeket). Az ily módon normalizált jelek azután már értékelhetők az *Amplification Plot* (Amplifikációs grafikon) segítségével.

Egy adott PCR-futtatás értékeléséhez felhasznált kalibrációs fájlok automatikusan tárolódnak a futtatás elmentésekor. Ha nincs telepítve semmilyen **kalibrációs fájl**, kérjük, hozza létre azokat az *ABI PRISM SDS felhasználói útmutatóban/kézikönyvben* megadott vonatkozó instrukciók szerint.

Ha egynél több *artus*™ PCR rendszer van integrálva a PCR-futtatásában (**figyelje meg a hőmérsékleti profilt**), ezeket az assay-eket egymástól függetlenül kell kielemezni. Az *ABI PRISM 7000* és *7900HT SDS* szoftvere automatikusan párhuzamos mintákként fogja azonosítani az azonos *Sample Name* (A minta neve) elemmel és azonos detektor-hozzárendeléssel rendelkező mintákat, és a patogénfelhalmozódás mennyiségi meghatározásakor azok átlagával fog számolni.

---

A mennyiségi futtatások analizéséhez kövesse a **8.4. Kvantifikálás** részben megadott instrukciókat, valamint az *ABI PRISM 7000 SDS* kvantifikáláshoz mellékelt technológiai tájékoztató jegyzetét, amely elérhető a **www.qiagen.com** címen.

Ha egynél több herpes *artus* rendszert integrált a PCR-futtatásba, ezeket a különböző rendszereket külön-külön analizálja a nekik megfelelő *kvantifikációs standardokkal*. Ennek megfelelően válassza ki az analizéshez a mintapozíciókat.

A következő eredmények fordulhatnak elő:

1. FAM fluoreszcenciajel detektálva.

**A vizsgálat eredménye pozitív: A minta CMV DNS-t tartalmaz.**

Ilyen esetben a VIC/JOE fluoreszcenciajelétől (*belső kontroll*) el lehet tekinteni, mivel a CMV DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív FAM fluoreszcenciajel) a *belső kontroll* fluoreszcenciajelenek csökkenéséhez vagy hiányához vezethet (kompetíció).

2. Nincs FAM fluoreszcenciajel detektálva. Ugyanakkor megjelenik a *belső kontroll* VIC/JOE fluoreszcenciajele.

**A mintában CMV DNS nem volt kimutatható. Negatívnak tekinthető.**

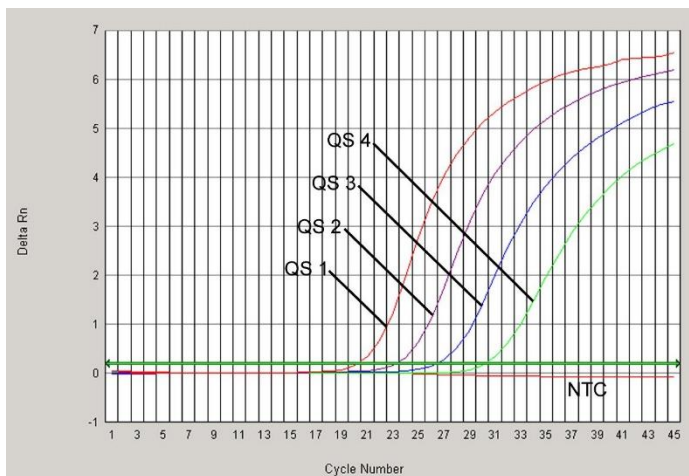
Negatív CMV PCR esetén a *belső kontroll* érzékelt jele kizárja a PCR-reakció gátlásának lehetőségét.

3. Sem FAM fluoreszcenciajel, sem VIC/JOE fluoreszcenciajel nem volt kimutatható.

**Nem határozható meg diagnózis.**

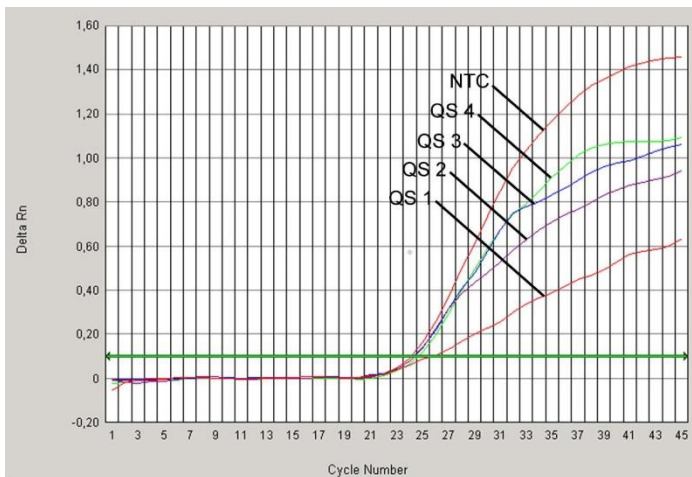
A hibák okaival és megoldásuk módjaival kapcsolatos információk a **10 Hibaelhárítás** fejezetben található.

A pozitív és negatív PCR-reakciók példái az alábbi ábrákon láthatók: 23. és 24. ábra (ABI PRISM 7000 SDS), 25. és 26. ábra (ABI PRISM 7700 SDS), valamint 27. és 28. ábra (ABI PRISM 7900HT SDS).

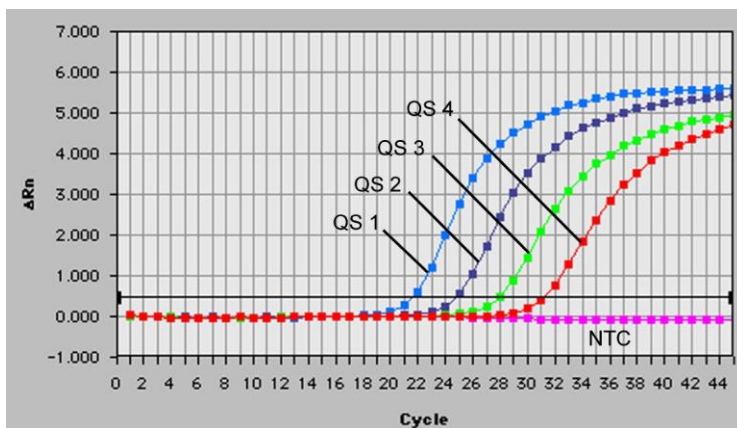


**23. ábra: A kvantifikációs standardok kimutatása (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) a FAM fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).**

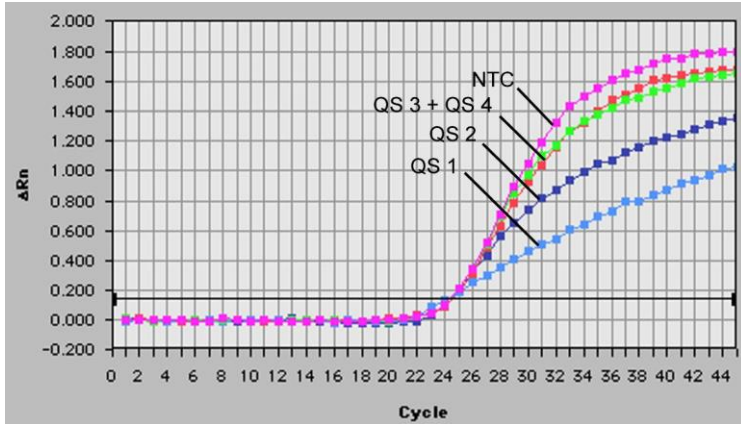




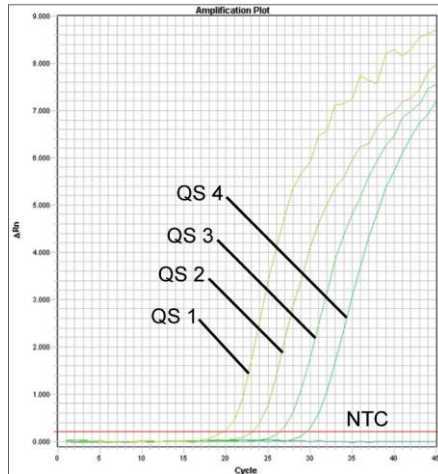
24. ábra: Belső kontroll (IC) kimutatása a VIC fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7000 SDS), a kvantifikációs standardok (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).



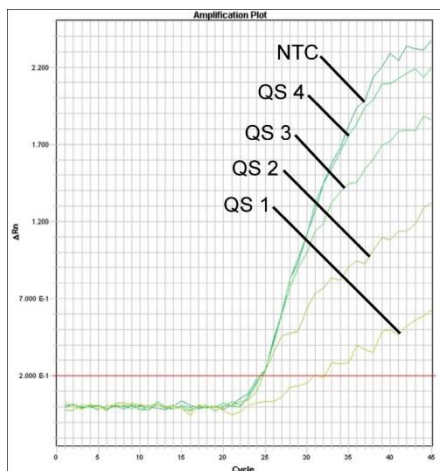
25. ábra: A kvantifikációs standardok kimutatása (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) a FAM fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).



26. ábra: Belső kontroll (IC) kimutatása a JOE fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7700 SDS), a kvantifikációs standardok (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).



27. ábra: A kvantifikációs standardok kimutatása (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) a FAM fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).



28. ábra: Belső kontroll (IC) kimutatása a VIC fluoreszcenciajel mérésével (ABI PRISM 7900HT SDS), a kvantifikációs standardok (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: no template control (sablon nélküli kontroll (negatív kontroll)).

## 10. Hibaelhárítás

Nincs FAM fluoreszcenciajel a pozitív kontrollokkal (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- A PCR-adatok elemzéséhez választott detektáló festék nem felel meg a protokollnak.
  - Az adatelemzéshez válassza ki a FAM detektáló festéket az analitikai CMV PCR-hez, és a VIC/JOE detektáló festéket a *belső kontroll* PCR-hez.
- Az *Options* (Beállítások) (*Extension Phase Data Extraction* (Adatkinyerés a lánchosszabbítási fázisban)) menüpont alatt megadott, az adatok elemzéséhez használt beállítások nem egyeznek meg a *Data Collection* (Adatgyűjtés) beállításával (az *ABI PRISM 7700 SDS* esetében lásd **8.6.2.4.** **A hőmérsékleti profil létrehozása**, az *ABI PRISM 7900HT SDS* esetében lásd **8.6.3.4.** **A hőmérsékleti profil létrehozása**).
  - Analizálja a PCR-futtatást a kijavított beállításokkal, és ismétlje meg az adatelemzést (*Analysis* (Elemzés)).

- Az *ABI PRISM szekvenciadetektáló rendszer* hőmérsékleti profiljának nem megfelelő programozása.
  - Hasonlítsa össze a hőmérsékleti profilt a protokollal (lásd **8.6. Az ABI PRISM SDS készülékek beprogramozása**).
- PCR reakció helytelen összemérése.
  - Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási vázlat alapján (lásd **8.5. A PCR-reakció előkészítése**), és szükség esetén ismételje meg a PCR-futtatást.
- Egy vagy több kitkomponens tárolási feltételei nem feleltek meg a **2. Tárolás** részben található instrukcióknak, vagy az *artus CMV TM PCR Kit* szavatossága lejárt.
  - Ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejáratát (lásd a kit címkéjét), és használjon új kitet, amennyiben szükséges.

**Egy (QIAamp DSP Virus Kit segítségével) tisztított negatív plazmaminta belső kontrolljának gyenge vagy hiányzó jele (VIC/JOE fluoreszcenciajel, az eltérés nagyobb, mint a 25,3–31,3 közötti Ct-tartomány) (küszöbértékek: ABI PRISM 7000: 0,2; ABI PRISM 7700 és 7900HT SDS: 0,2), és az FAM fluoreszcenciajel egyidejű hiánya a specifikus CMV PCR-reakció esetében:**

- A PCR körülményei nem felelnek meg a protokollnak.
  - Ellenőrizze a PCR körülményeket (lásd fentebb) és ismételje meg a PCR-futtatást a helyes beállításokkal, amennyiben szükséges.
- A PCR gátolt.
  - Ellenőrizze, hogy a javasolt izolálási módszer szerint járt-e el (lásd **8.2. DNS-izolálás**), és szigorúan tartsa be a gyártó utasításait.
  - Ellenőrizze, hogy a DNS-izolálás során elvégezte-e a javasolt további centrifugálási lépést az elúció előtt, hogy eltávolítson minden esetlegesen visszamaradt etanol a rendszerből (lásd **8.2. DNS-izolálás**).

- Az extrakció során a DNS elveszett.
  - Amennyiben a *belső kontroll* hozzá lett adva az extrakcióhoz, a *belső kontroll* meglévő jele utalhat a DNS elvesztésére az extrakciós lépés alatt. Ellenőrizze, hogy a javasolt izolálási módszert alkalmazta-e (lásd **8.2. DNS-izolálás**), és szigorúan tartsa be a gyártó utasításait.
- Egy vagy több kitkomponens tárolási feltételei nem feleltek meg a **2. Tárolás** részben található instrukcióknak, vagy az *artus* CMV TM PCR Kit szavatossága lejárt.
  - Ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejáratát dátumát (lásd a kit címkéjét), és használjon új kitet, amennyiben szükséges.

Az analitikai PCR-reakció FAM fluoreszcenciajele a negatív kontrollokkal:

- Szennyeződés történt a PCR előkészítése során.
  - Ismétlje meg a PCR futást replikátumban új reagensekkel.
  - Amennyiben lehetséges, zárja le a PCR csövet közvetlenül a vizsgálati minta hozzáadása után.
  - A pozitív kontrollt szigorúan csak a végén pipettázza az elegyhez.
  - Ügyeljen rá, hogy a munkafelület és a készülékek rendszeres időközönként legyenek fertőtlenítve.
- Szennyeződés történt az extrakció során.
  - Ismétlje meg az extrakciót és a PCR futást a vizsgálni kívánt mintával és új reagensekkel.
  - Ügyeljen rá, hogy a munkafelület és a készülékek rendszeres időközönként legyenek fertőtlenítve.

Ha bármilyen további kérdése van, vagy ha probléma merülne fel, forduljon bizalommal műszaki ügyfélszolgálatunkhoz.

## 11. Teljesítmény-jellemzők

### 11.1. Analitikai érzékenység

Meghatározták az *artus* CMV TM PCR Kit analitikai kimutatási határát, valamint a tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási szintjét (érzékenységi határértékeit). A tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási szint CMV-pozitív klinikai minták bizonyos extrakciós eljárással történő feldolgozásával került meghatározásra. Ezzel szemben az analitikai kimutatási határ klinikai minták nélkül lett meghatározva, és független a választott extrakciós módszertől, mert ismert koncentrációjú CMV DNS-t használt.

*artus* CMV TM PCR Kit **analitikai érzékenységének** meghatározása érdekében hígítási sort készítettek genomi CMV DNS-ből, 10 és névleges 0,00316 CMV kópia/μl közötti koncentrációkkal, és analitikai vizsgálatot végeztek velük az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT* szekvenciadetektáló rendszerekkel, valamint az *artus* CMV TM PCR Kit kombinációjával. A vizsgálatot minden készülék esetén három különböző napon, nyolc párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg.

Kimutatási határérték (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,20 kópia/μl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,20 kópia/μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,17 kópia/μl

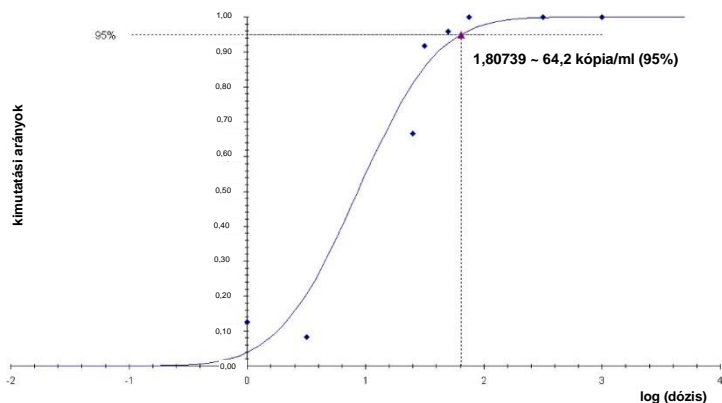
Ez azt jelenti, hogy 95%-os a valószínűsége annak, hogy 0,20 kópia/μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,20 kópia/μl (*ABI PRISM 7700 SDS*) és 0,17 kópia/μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*) koncentrációjú CMV DNS már kimutatható.

Az *artus* CMV TM PCR Kit a tisztítást (QIAamp DSP Virus Kit) is figyelembe vevő analitikai érzékenységének meghatározásához a CMV vírusanyag 1000 és nominális 0,316 CMV kópia/μl-es koncentrációja közötti hígítási sort készítettek, és azt klinikai plazmamintákhoz adták. Ezután DNS-extrakciót végeztek QIAamp DSP Virus Kit segítségével (extrakciós térfogat: 0,5 ml; elúciós térfogat: 70 μl). Mind a nyolc hígítást analizáltak az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT SDS* készülékek, valamint az *artus* CMV TM PCR Kit segítségével, három különböző napon, nyolc párhuzamos méréssel. Az eredményeket egy probit (valószínűségi egység) -analízissel határozták meg, és az alábbi táblázatban foglalták össze:

Kimutatási határérték (p = 0,05) a tisztítási művelet figyelembe vételével		
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	64,2	kópia/ml
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	100,5	kópia/ml
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	53,5	kópia/ml

Az *ABI PRISM 7000 SDS* készülék eredményeinek grafikus illusztrációja itt látható: 29. ábra. Az *artus* CMV TM PCR Kit tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási határa 64,2 kópia/ml (p = 0,05). Ez azt jelenti, hogy a 64,2 kópia/ml koncentrációjú vírusanyag 95%-os eséllyel kimutatható.

## Probit-elemzés: Citomegalovírus (ABI PRISM 7000 SDS)



29. ábra: Az artus CMV TM PCR Kit tisztítást is figyelembe vevő (QIAamp DSP Virus Kit) analitikai érzékenysége (ABI PRISM 7000 SDS készülékkel).

## 11.2. Specifitás

Az *artus* CMV TM PCR Kit specifikitása elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztásán, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételeken alapul. A primerek és próbák lehetséges homológiáját szekvencia-összehasonlítási elemzéssel ellenőrizték minden génbankban publikált szekvenciával szemben. Ezáltal minden releváns genotípus kimutathatósága biztosítva van.

Emellett a specifikitást 100 különböző CMV-negatív szérummintán is validálták. Ezek nem adtak semmilyen jelet a *CMV TM Master* mixben található CMV-specifikus primerekkel és próbákkal.

Az *artus* CMV TM PCR Kit specifikitásának meghatározásához letesztelték az alábbi táblázatban felsorolt kontrollcsoport keresztreaktivitását (lásd 1. táblázat). A tesztelt patogének egyike sem mutatott keresztreaktivitást. Nem volt keresztreaktivitás kevert fertőzések esetén.



**1. táblázat: A kit specifikitásának vizsgálata potenciális keresztreaktív patogénekkal.**

Kontroll csoport	CMV (FAM)	Belső kontroll (VIC)
Humán herpeszvírus 1 (Herpes simplex vírus 1)	–	+
Humán herpeszvírus 2 (Herpes simplex vírus 2)	–	+
Humán herpeszvírus 3 (Varicella-zoster vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 4 (Epstein-Barr vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 6A	–	+
Humán herpeszvírus 6B	–	+
Humán herpeszvírus 7	–	+
Humán herpeszvírus 8 (Kaposi-szarkómával kapcsolatos herpeszvírus)	–	+
Hepatitis-A vírus	–	+
Hepatitis-B vírus	–	+
Hepatitis-C vírus	–	+
Humán immunodeficiencia vírus 1 (HIV)	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 1	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 2	–	+
Nyugat-Nílus vírus	–	+
Enterovírus	–	+
Parvovírus B19	–	+

### 11.3. Pontosság

Az assay teljes varianciájának meghatározásához az *artus* CMV TM PCR Kit pontossági adatait az *ABI PRISM 7000 SDS* készülék segítségével gyűjtötték össze. A teljes variancia összetevői: az **assay-n belüli variabilitás** (azonos koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), az **assay-k közötti variabilitás** (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több operátor által végzett assay-k eredményeinek variabilitása), és a **gyártási tételek közötti variabilitás** (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett assay-k eredményeinek variabilitása). A mért adatok alapján meghatározásra került a patogénspecifikus, illetve a *belső kontroll* PCR eredmények szórása, varianciája és variációs koefficiense.

Az *artus* CMV TM PCR Kit pontossági adatait a legkisebb koncentrációjú *kvantifikációs standard* (QS 4; 10 kópia/μl) segítségével gyűjtötték össze. A vizsgálatot nyolc párhuzamos mintával végezték. A pontossági adatokat az amplifikációs görbék Ct-értékei alapján határozták meg (Ct: *küszöbciklus*, lásd 2. táblázat). Továbbá, a kvantitatív eredmények kópia/μl-ben megadott pontossági adatait a megfelelő Ct értékek használatával határozták meg (lásd 3. táblázat). Ezen eredmények alapján a fenti koncentrációjú bármely adott minta átlagos statisztikai eloszlása: 1,06% (Ct) vagy 12,93% (konc.), a *belső kontroll* detektálásakor pedig 1,14% (Ct). Ezen értékek a meghatározott variabilitások minden egyes értékének összességén alapszanak.

**2. táblázat: Pontossági adatok a Ct-értékek alapján.**

	Standard deviáció (szórás)	Variancia	Variációs koefficiens [%]
Tesztben belüli variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,10	0,01	0,33
Tesztben belüli variabilitás: <i>Belső kontroll</i>	0,12	0,01	0,50
Tesztek közötti variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,67
Tesztek közötti variabilitás: <i>Belső kontroll</i>	0,30	0,09	1,23
Gyártási tételek közötti variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,32	0,10	1,01
Gyártási tételek közötti variabilitás: <i>Belső kontroll</i>	0,26	0,07	1,05
Teljes variancia: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,33	0,11	1,06
Teljes variancia: <i>Belső kontroll</i>	0,28	0,08	1,14

**3. táblázat: Pontossági adatok a kvantitatív értékek alapján (kópia/μl).**

	Standard deviáció (szórás)	Variancia	Variációs koefficiens [%]
Tesztben belüli variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,72	0,52	7,20
Tesztek közötti variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,25	1,57	12,45
Gyártási tételek közötti variabilitás: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,53	2,33	15,10
Teljes variancia: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,30	1,70	12,93

## 11.4. Megbízhatóság

A megbízhatóság igazolása lehetővé teszi az *artus CMV TM PCR Kit* teljes hibaarányának meghatározását. 100 db CMV-negatív plazmamintához adtak CMV DNS-t úgy, hogy a végkoncentrációjuk 170 kópia/ml lett (vagyis az analitikai érzékenységi határ kb. háromszoros koncentrációja). A QIAamp DSP Virus Kit segítségével végzett extrakció után (lásd **8.2. DNS-izolálás**) az *artus CMV TM PCR Kit* segítségével analizálták ezeket a mintákat. Az összes CMV-minta esetében 0% volt a hibaarány. Emellett a *belső kontroll* megbízhatóságát 100 db CMV-negatív plazmaminta tisztításával és vizsgálatával mérték fel. Ezek alapján az *artus CMV TM PCR Kit* megbízhatósága  $\geq 99\%$ .

## 11.5. Reprodukálhatóság

A reprodukálhatósági adatok lehetővé teszik az *artus CMV TM PCR Kit* teljesítmény-jellemzőinek rendszeres felmérését, valamint más termékekkel történő hatékonysági összehasonlítását. Ezek az adatok laboratóriumi szakmai alkalmassági programokban történő részvételtől származnak.

## 11.6. Diagnosztikai kiértékelés

Az *artus CMV TM PCR Kit*et egy vizsgálat keretein belül értékelték. Az *artus CMV TM PCR Kit*nek a COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test segítségével történő összehasonlításához 154 db EDTA-s klinikai plazmamintát vizsgáltak meg retrospektív és prospektív módon. Előzetesen a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR segítségével rutindiagnosztika keretein belül megvizsgálták, és pozitívnak vagy negatívnak találtak minden mintát.

Az *artus CMV TM PCR Kit* tesztelésére használt mintákat az *artus CMV TM PCR Kit* *belső kontrolljainak* hozzáadásával izolálták a QIAamp DSP Virus Kit segítségével, majd az *ABI PRISM 7000 SDS* készülékkel analizálták. A COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test mintáit a gyártó által a terméktájékoztatóban megadott utasításoknak megfelelően izolálták és vizsgálták meg.

Mind a 11 olyan minta, amelyet a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test pozitívnak talált, az *artus* CMV TM PCR Kit is pozitívnak állapította meg. Mind a 125 olyan minta, amelyet a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test negatívnak talált, az *artus* CMV TM PCR Kit is negatívnak állapított meg. Összesen 18 db eltérő mintaeredményt kaptak. Az eredmények összefoglalását lásd 4. táblázat.

4. táblázat: Az összehasonlító validálási vizsgálat eredményei.

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		
		+	-	Összesen
<i>artus</i> CMV TM PCR Kit	+	11	18	29
	-	0	125	125

Ha a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test eredményeit referenciának tekintjük, az *artus* CMV TM PCR Kit minden mintára vonatkozó érzékenysége 100%-os, a diagnosztikai specificitása pedig 87,4%-os.

A 18 db eltérő eredményt adó minta további vizsgálata az *artus* PCR Kitek eredményeit erősítette meg. Ezek alapján valószínű, hogy az eredményekben mutatkozó különbség az *artus* CMV TM PCR Kit magasabb érzékenységén alapult.

## 12. A termék használatának korlátai

- Minden reagens kizárólag in vitro diagnosztikai célra használható.
- Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki képzett és gyakorlott az in vitro diagnosztikai eljárások területén.
- Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.
- Figyelni kell a dobozon és minden összetevő címkéjén található lejáratú időkre. Ne használjon lejárt reagenst.
- Bár ez ritka jelenség, a virális genom nagyon konzervatív régiókban a kitben található primerek és próbák által lefedett területeken kialakuló mutációk a vírusszám alulbecslését, vagy a vírusjelenlét kimutatásának hibáját eredményezheti. Az assay érvényességét és teljesítményét rendszeres időközönként felülvizsgálják.

## 13. Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS-ek) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN® kitek és kitben található komponensek biztonsági adatlapja.

A mintákat és a vizsgálati hulladékokat a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani és eltávolítani.

---

## 14. Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN teljes minőségirányítási rendszerének megfelelően az *artus* CMV TM PCR Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel is biztosítva a termék egyenletes és megbízható minőségét.

## 15. Hivatkozások

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.

## 16. Szimbólumok magyarázata



Lejárat dátum



Tételszám



Gyártó



Katalógusszám



Anyagszám



Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)



<N>

Vizsgálat elvégzéséhez elegendő <N> tesztet tartalmaz



Hőmérséklet korlátozás

**QS**

*Kvantifikációs standard*

**IC**

*Belső kontroll*



## 17. Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
<i>artus</i> <sup>®</sup> CMV TM PCR Kit (24)	24 reakcióhoz: 2 Master, 4 kvantifikációs standard, belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4503163
<i>artus</i> <sup>®</sup> CMV TM PCR Kit (96)	96 reakcióhoz: 8 Master, 4 kvantifikációs standard, 2 db belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4503165
QIAamp <sup>®</sup> DSP Virus Kit (50)	50 minta-előkészítéshez: QIAamp MinElute <sup>®</sup> spin oszlopok, pufferek, reagensek, tesztcsövek, oszloptoldalékok és VacConnector vákuumcsatlakozók	60704

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói útmutatói a **www.qiagen.com** webhelyen érhetők el, vagy a QIAGEN Műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

---

## Megjegyzések

---

## Megjegyzések

---

## Megjegyzések

## A dokumentum átdolgozási előzményei

R4 Frissített minőség-ellenőrzési (QC) kiadás műszaki leírásai az IC belső kontrollokhöz.  
11/2018 Rendelési információk szakasz hozzáadása. Szerkezeti felépítés frissítése.

### Korlátozott licencszerződés az *artus CMV TM PCR Kit* kézikönyvhöz

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a kíthez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a kíthez tartozó komponenseket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a kíthez tartozó komponensekbe beépítsék, vagy azokkal együtt használják. A további protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sérítik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a kít és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A kít és komponenseinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználásuk, felújításuk vagy újraértékesítésük tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kít vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztül érvényesítésére és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licenfeltételekről a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oldalon tájékozódhat.

Védjegyek: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN cégcsoport); *ABI PRISM*® (Applied vállalat); AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH); FAM™, *GeneAmp*®, JOE™, MicroAmp®, ROX™, VIC® (Life Technologies).

A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvényi védelemen kívül esőnek, ha nem rendelkeznek külön jelöléssel.

11/2018 HB-0069-006 1115297HU © 2018 QIAGEN, minden jog fenntartva.

---

Rendelés: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Műszaki támogatás: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webhely: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)