

Maaliskuu 2021

artus[®] CMV RG PCR Kit -sarjan käyttöohje (käsikirja)



24 (tuotenro 4503263)



96 (tuotenro 4503265)

Versio 1

Kvantitatiivinen in vitro -diagnostiikka

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx -laitteiden kanssa



4503263, 4503265



QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA



1123965FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Kuvaus ja toimintaperiaate	5
Patogeenitiedot	6
Menetelmän toimintaperiaate.....	6
Toimitetut materiaalit	7
Sarjan sisältö.....	7
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	8
Reagenssit	8
Tarvikkeet.....	8
Välineet.....	8
Varoitukset ja varotoimet	9
Turvallisuustiedot	9
Varotoimet.....	9
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	10
Näytteiden käsittely ja säilytys.....	10
Näytteenotto.....	10
Näytteen säilytys.....	11
Näytteen kuljetus.....	11
Menetelmä.....	12
DNA:n eristäminen.....	12
Sisäinen kontrolli	13
Protokolla: PCR ja datan analysointi	14

Tulosten tulkitseminen	22
Kvantitointi	22
Tulokset.....	23
Laadunvalvonta	26
Rajoitukset	26
Suorituskykyominaisuudet	27
Analyttinen herkkyys	27
Lineaarinen alue.....	29
Spesifisyys.....	30
Tarkkuus.....	32
Häiritsevät aineet	34
Varmuus.....	36
Uusittavuus	36
Diagnostinen arviointi	38
Lähdeviitteet	40
Vianmääritysopas	41
Symbolit	43
Tilaustiedot	44
Asiakirjan muutoshistoria	47

Käyttötarkoitus

artus CMV RG PCR Kit -sarja on nukleiinihapon in vitro -monistustesti sytomegaloviruksen (CMV) DNA:n kvantitointiin ihmisen plasmasta. Tässä diagnostisessa testisarjassa käytetään polymeerasiketjureaktiota (Polymerase Chain Reaction, PCR), ja se on konfiguroitu käytettäväksi Rotor-Gene Q -laitteiden kanssa.

artus CMV RG PCR Kit -sarja on tarkoitettu käytettäväksi CMV-infektion hoitoon potilailla, joilla on CMV-taudin riski, yhdessä kliinisten oireiden sekä muiden laboratoriomerkkiaineiden kanssa.

artus CMV RG PCR Kit -sarjalla saadut tulokset on tulkittava kaikki asianmukaiset kliiniset löydökset ja laboratoriolöydökset huomioiden.

artus CMV RG PCR Kit -sarjaa ei ole tarkoitettu käytettäväksi seulontatestinä CMV:n havaitsemiseksi veressä tai verituotteissa tai diagnostisena testinä CMV-infektion varmistamiseksi.

Kuvaus ja toimintaperiaate

artus CMV RG PCR Kit -sarja koostuu käyttövalmiista järjestelmästä CMV-viruksen DNA:n tunnistamiseen polymeerasiketjureaktiolla (PCR) Rotor-Gene Q MDx -laitteella. CMV RG Master sisältää reagensseja ja entsyymejä, joilla monistetaan spesifisesti CMV-genomin *MIE*-geenin (Major Immediate Early Gene) emäsparin 105 alue (määritys kykenee havaitsemaan CMV-genotyypit gB1–gB4) ja havaitaan suoraan spesifinen amplikoni Rotor-Gene Q MDx -laitteiden Cycling Green -fluoresenssikanavasta.

Lisäksi *artus* CMV RG PCR Kit -sarja sisältää toisen rinnakkaisen monistusjärjestelmän, jolla voidaan tunnistaa mahdollinen PCR-inhibitio. Tämä havaitaan sisäisenä kontrollina (IC) Rotor-Gene Q MDx -laitteiden Cycling Yellow -fluoresenssikanavassa. Mukana toimitetaan ulkoiset positiiviset kontrollit (CMV QS 1–4), joiden avulla viruksen DNA:n määrä voidaan määrittää. Lisätietoja on kohdassa Kvantitointi, sivulla 22.

Patogeenitiedot

Ihmisen sytomegalovirus (cytomegalovirus, CMV) on havaittavissa infektion saaneiden henkilöiden verestä, kudoksista ja miltei kaikista eritenseistä. Virus voi siirtyä oraalisesti tai seksin välityksellä, verensiirron tai elinsiirron kautta, kohdunsisäisesti tai perinataalisesti (1–4). CMV-viruskuormatestatus on tärkeä apu taudin riskin arvioimisessa, taudin diagnosoinnissa ja hoitovasteen seuraamisessa (5).


CMV-infektio johtaa usein oireettomaan infektiin, jota seuraa viruksen säilyminen kehossa koko elämän ajan. Jos aikuisella tai nuorella ilmenee oireita, ne muistuttavat mononukleosin oireita ja niihin kuuluvat kuume, heikko maksatulehdus ja yleinen huonovointisuus (6). Vaikeita CMV-infektion taudinkulkuja on havaittu erityisesti tartunnan kohdussa saaneilla ja immuunipuutteisilla potilailla (4,7).

Menetelmän toimintaperiaate

Polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvan patogeenintunnistuksen toiminta perustuu patogeenin genomin tiettyjen alueiden monistamiseen. Real-time PCR -menetelmässä monistuksen tuote tunnistetaan fluoresoivien väriaineiden avulla. Yleensä väriaineet liittyvät oligonukleotidikoettiin, jotka sitoutuvat spesifisesti monistettuun tuotteeseen. Fluoresenssivoimakkuuksien tarkkailu PCR-ajon aikana (eli reaaliaikaisesti) mahdollistaa kertyneen tuotteen tunnistamisen ja kvantitoinnin niin, ettei reaktioputkia tarvitse avata uudelleen PCR-ajon jälkeen (8).

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

artus CMV RG PCR Kit -sarja		(24)	(96)
Tuotenumero.		4503263	4503265
Reaktioiden määrä		24	96
Sininen	CMV RG Master (Taq 0,1 U/µl)		2 × 12 reaktiota
Keltainen	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 µl
Punainen	CMV QS 1† (1 × 104 kopiota/µl)	QS	200 µl
Punainen	CMV QS 2† (1 × 103 kopiota/µl)	QS	200 µl
Punainen	CMV QS 3† (1 × 102 kopiota/µl)	QS	200 µl
Punainen	CMV QS 4† (1 × 101 kopiota/µl)	QS	200 µl
Vihreä	CMV RG IC‡	IC	1 000 µl
Valkoinen	Water (PCR grade) (Vesi (PCR-laatu))		1 000 µl
	Käyttöohjeet		1

* Magnesiumliuos

† Kvantitointistandardi

‡ Sisäinen kontrolli

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Reagenssit

- DNA:n eristysarja (katso DNA:n eristäminen, sivu 12)

Tarvikkeet

- Steriilit pipettikärjet, joissa on suodattimet
- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, käytettäväksi tuotteen 72-well rotor kanssa (tuotenro 981103 tai 981106)
- **Vaihtoehtoisesti:** PCR Tubes, 0,2 ml, käytettäväksi tuotteen 36-well rotor kanssa (tuotenro 981005 tai 981008)

Välineet

- Pipettejä (säädettäviä)*
- Vortex-sekoitin*
- Pöytämallinen sentrifugi*, jossa on roottori 2 ml:n reaktioputkia varten
- Rotor-Gene Q MDx -laitteet*, joissa on Cycling Green- ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava
- Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.5 tai uudempi
- Jäähdytyslevy (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, tuotenro 9018901 tai Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, tuotenro 9018905)

* Varmista ennen käyttöä, että laitteet on tarkistettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja sarjakomponenttien käyttöturvallisuustiedotteita.

Hävitä näyte- ja määritysjiäte paikallisten turvallisuusmääräysten mukaisesti.

Varotoimet

Käyttäjän on aina huomioitava alla mainitut varotoimet:

- Käytä steriilejä pipettikärkiä, joissa on suodattimet.
- Säilytä ja uuta positiivinen materiaali (näytteet, positiiviset kontrollit ja amplikonit) erillään, poissa kaikkien muiden reagenssien läheisyydestä, ja lisää ne reaktioseokseen erillisessä tilassa.
- Sulata kaikki osat huolellisesti huoneenlämpötilassa (15–25 °C) ennen määrittämistä.
- Sekoita sulatetut osat (pipetoimalla toistuvasti ylös ja alas tai pulssivorteksoimalla) ja sentrifugoi lyhyesti.
- Työskentele ripeästi ja pidä komponentit jäässä tai jäähdyttimessä (72-/96-kuoppainen latauslohko).

Reagenssien säilytys ja käsittely

artus CMV RG PCR Kit -sarjan komponentteja on säilytettävä $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Ne ovat stabiileja etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivämäärään saakka. Toistuvaa sulatusta ja pakastusta (> 2 kertaa) on vältettävä, sillä se saattaa heikentää määrittelyn herkkyyttä. Jos reagensseja halutaan käyttää eri ajankohtina, ne pitää jäädyttää alikvotteina. Ei saa säilyttää $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa yli 5 tunnin ajanjaksoa.

Näytteiden käsittely ja säilytys

Huomautus: Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisenä materiaalina.

Huomautus: Tämän sarjan suorituskyvyn varmistamiseksi tehdyt analyttiset tutkimukset nimeävät EDTA-plasman sopivimmaksi näytemateriaaliksi CMV-viruksen tunnistamiseen. Siksi on suositeltavaa käyttää tätä materiaalia *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan kanssa.

artus CMV RG PCR Kit -sarjan validointi on tehty käyttämällä ihmisen EDTA-plasmanäytteitä. Muita näytemateriaaleja ei ole validoitu. Käytä vain suositeltua nukleiinihappojen eristyssarjaa (katso DNA:n eristäminen, sivu 12) näytteen valmisteluun.

Käytettäessä tiettyjä näytemateriaaleja on noudatettava tarkasti erityisiä näytteenottoa, kuljetusta ja säilytystä koskevia ohjeita.

Näytteenotto

Jokainen verinäytteen otto aiheuttaa verisuoneen (valtimeen, laskimoon tai hiussuoniin) vaurion. Vain vaarattomia ja steriilejä materiaaleja saa käyttää. Verinäytteen ottoa varten on oltava saatavilla asianmukaisia kertakäyttötarvikkeita. Laskimopunktioon ei pidä käyttää liian ohuita hiusverisuoniin tarkoitettuja neuloja. Verinäytteen otto laskimosta on tehtävä kynnärtaipeen, kynnärvarren tai kämmenselän asianmukaisista kohdista. Verinäyte on otettava tavallisilla näytteenottoputkilla (punainen korkki, Sarstedt® tai toisen valmistajan vastaava putki). Verta on otettava 5–10 ml EDTA-putkeen. Putkia on sekoitettava pään yläpuolella välittömästi näytteenoton jälkeen (8 x, ei saa ravistaa).

Huomautus: Heparinoituja näytteitä ei saa käyttää.

Näytteen säilytys

Kokoveri on eroteltava plasmaksi ja solukomponenteiksi sentrifugoimalla 20 minuuttia nopeudella 800–1600 x g kuuden (6) tunnin sisällä (9,10). Eristetty plasma siirretään steriileihin polypropeeniputkiin. Määrityksen herkkyys voi heiketä, jos näytteet pakastetaan rutiininomaisesti tai niitä säilytetään pitkä aika.

Näytteen kuljetus

Näytemateriaali on aina kuljetettava särkymättömässä kuljetuspakkauksessa. Siten näytteen vuotamisen aiheuttama mahdollinen tartuntavaara voidaan välttää. Näytteet on kuljetettava paikallisten ja kansallisten patogeenimateriaalin kuljetusta koskevien ohjeiden mukaisesti.*

Näytteet on kuljetettava kuuden (6) tunnin sisällä. Ei ole suositeltavaa säilyttää näytteitä paikassa, jossa näytteet on otettu. On mahdollista lähettää näytteet postitse patogeenimateriaalien kuljetusta koskevien lakiohjeiden mukaisesti. On suositeltavaa kuljetuttaa näyte kuriirilla. Verinäytteet on kuljetettava jäähdytettynä (2–8 °C:ssa) ja eristetty plasma syväpakastettuna (-30...-15 °C:ssa).

* International Air Transport Association (IATA) (Kansainvälinen ilmakuljetusliitto). Dangerous Goods Regulations (Vaarallisia aineita koskevat määräykset).

Menetelmä

DNA:n eristäminen

Taulukossa Taulukko 1 lueteltuja QIAGEN-sarjoja suositellaan viruksen DNA:n puhdistamiseen kyseisistä ihmisen näytetyypeistä *artus CMV RG PCR Kit* -sarjaa varten. Puhdista virus-DNA sarjojen käsikirjoissa annettujen ohjeiden mukaan.

Taulukko 1. *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan kanssa validoidut puhdistussarjat

Näyttemateriaali	Näytteen koko	Nukleiinihapon eristyssarja	Tuotenumero	Carrier RNA (Kantaja-RNA)
EDTA-plasma	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit -sarja	60704	Sisältyy
EDTA-plasma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit -sarja (48)	62724	Sisältyy

Huomautus: Kantaja-RNA:n käyttö on erittäin tärkeää erottelun tehokkuuden ja sitä myöten DNA:n/RNA:n tuoton kannalta. QIAamp DSP Virus Kit -sarjan sisältämän kantaja-RNA:n stabiiliuden lisäämiseksi on suositeltavaa noudattaa *QIAamp DSP Virus Kit -sarjan käsikirjan* Reagenssien ja puskureiden valmisteleminen -osiossa annettuja sekoittamista ja kantaja-RNA:n säilytystä koskevia ohjeita.

Huomautus: *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan sisäistä kontrollia voi käyttää suoraan eristystoimenpiteessä. Muista sisällyttää yksi negatiivinen plasmanäyte eristystoimenpiteeseen. Sisäisen kontrollin vastaava signaali on eristyksen arvioinnin perusta (katso Sisäinen kontrolli jäljempänä).

Sisäinen kontrolli

Sarjan mukana toimitetaan sisäinen kontrolli (CMV RG IC). Sitä voi käyttää sekä DNA:n eristystoimenpiteen kontrollina että tarkkailuun mahdollisen PCR-inhibition varalta. Tätä käyttötarkoitusta varten sisäistä kontrollia on lisättävä isolaattiin suhteessa 0,1 µl per 1 µl eluaattia. Esimerkiksi QIAamp DSP Virus Kit -sarjaa käytettäessä DNA eluoidaan 60 µl:aan eluutiopuskuria (AVE). Tässä tapauksessa aluksi on lisättävä 6 µl sisäistä kontrollia. Käytettävän sisäisen kontrollin määrä perustuu ainoastaan eluutiotilavuuteen.

Huomautus: Sisäistä kontrollia ja kantaja-RNA:ta (katso DNA:n eristäminen, sivu 12) on lisättävä vain lyysauspuskurin ja näytemateriaalin seokseen tai suoraan lyysauspuskuriin.

Sisäistä kontrollia ei saa lisätä suoraan näytemateriaaliin. Jos kontrolli lisätään lyysauspuskuriin, huomaa, että sisäisen kontrollin ja lyysauspuskurin/kantaja-RNA:n seos on valmistettava juuri ennen käyttöä ja käytettävä välittömästi (seoksen säilyttäminen huoneenlämpötilassa tai jääkaapissa vaikka vain muutaman tunnin ajan voi johtaa sisäisen kontrollin toimimattomuuteen ja heikentyneeseen erotustehoon).

Huomautus: älä lisää sisäistä kontrollia ja kantaja-RNA:ta suoraan näytemateriaaliin.

Jotta puhdistus onnistuisi, sisäisen kontrollin C_T -arvon negatiivisessa plasmanäytteessä, joka on käsitelty puhdistuksen aikana (QIAamp DSP Virus Kit), on oltava vähintään $C_T = 27 \pm 3$ (kynnys: 0,03) käytettäessä Rotor-Gene Q -laitteita (katso lisätietoja sivulta 25). Ilmoitettu leviäminen perustuu laitteen varianssiin ja puhdistukseen. Suurempi poikkeama viittaa puhdistusongelmaan. Tässä tapauksessa puhdistus on tarkistettava ja tarvittaessa validoitava toiseen kertaan. Jos sinulle jäi kysyttävää tai kohtaat ongelmia, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun.

Vaihtoehtoisesti sisäistä kontrollia voi käyttää pelkästään mahdollisen PCR-inhibition tarkistamiseen. Tässä sovelluksessa sisäistä kontrollia on lisättävä suoraan CMV RG Master -liuoksen ja CMV Mg-Sol -liuoksen seokseen, kuten protokollan vaiheessa 2b on kuvattu (sivu 15).

Protokolla: PCR ja datan analysointi

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q -laitteeseen ennen protokollan aloittamista. Katso lisätietoja laitteen käyttöoppaasta.
- Varmista, että PCR-ajoon sisällytetään vähintään yksi kvantitointistandardi ja yksi negatiivinen kontrolli (vesi, PCR-laatu). Standardikäyrän luominen edellyttää, että kussakin PCR-ajossa käytetään kaikkia 4 kvantitointistandardia, jotka tuotteen mukana on toimitettu (CMV QS 1–4).

Ennen kuin aloitat

- Varmista, että jäähdytyslevy (Rotor-Gene Q -laitteen lisävaruste) on esijäähdytetty +2...+8 °C:n lämpötilaan.
- Kaikki reagenssit on sulatettava kokonaan, sekoitettava (pipetoimalla toistuvasti ylös ja alas tai nopeasti vorteksoimalla) ja sentrifugoitava lyhyesti ennen jokaista käyttöä.

Menetelmä

1. Aseta haluamasi määrä PCR-putkia jäähdytysblokin sovittimiin.
2. Jos DNA:n eristämistoimenpidettä ja mahdollista PCR-reaktion estoa valvotaan sisäisen kontrollin avulla, noudata vaiheen 2a ohjeita. Jos sisäistä kontrollia käytetään vain PCR-reaktion eston tarkistamiseen, noudata vaiheen 2b ohjeita.

Huomautus: On erittäin suositeltavaa lisätä sisäinen kontrolli kvantitointistandardina käytettyyn CMV RG Master -liuoksen ja CMV Mg-Sol -liuoksen seokseen. Lisää kvantitointistandardeja varten sisäistä kontrollia suoraan CMV RG Master- ja CMV Mg-Sol -seokseen, kuten protokollan vaiheessa 2b on kuvattu, ja käytä tätä pääseosta kuhunkin kvantitointistandardiin (CMV QS 1–4).

- 2a. Sisäinen kontrolli on jo lisätty DNA-isolaattiin (katso kohta *Sisäinen kontrolli*, sivu 13). Valmista tässä tapauksessa pääseos taulukon 2 ohjeiden mukaisesti (seuraava sivu). Reaktioseos sisältää yleensä kaikki PCR-reaktioon vaadittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 2. Pääseoksen valmistelu (sisäinen kontrolli, jolla valvotaan DNA:n eristämistä ja tarkistetaan PCR-reaktion esto)

Näytteiden määrä	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Kokonaismäärä	30 µl	360 µl

- 2b. Sisäistä kontrollia on lisättävä suoraan CMV RG Master- ja CMV Mg-Sol -liuosten seokseen. Valmista tässä tapauksessa pääseos taulukon 3 ohjeiden mukaisesti. Reaktioseos sisältää yleensä kaikki PCR-reaktioon vaadittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 3. Pääseoksen valmistelu (sisäistä kontrollia käytetään vain PCR-reaktion eston tarkistamiseen)

Näytteiden määrä	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Kokonaismäärä	32 µl*	384 µl*

* Sisäisen kontrollin lisäämisestä aiheutuva tilavuuden kasvu jätetään huomioimatta PCR-määrittystä valmisteltaessa. Tämä ei heikennä havaitsemisjärjestelmän herkkyyttä.

3. Pipetoi 30 µl pääseosta jokaiseen PCR-putkeen ja lisää sitten 20 µl eluoitua näyte-DNA:ta (katso taulukko 4). Vastaavasti on käytettävä 20 µl vähintään yhtä kvantitointistandardia (CMV QS 1–4) positiivisena kontrollina ja 20 µl vettä (vesi, PCR-laatu) negatiivisena kontrollina.

Taulukko 4. PCR-määrityksen valmistelu

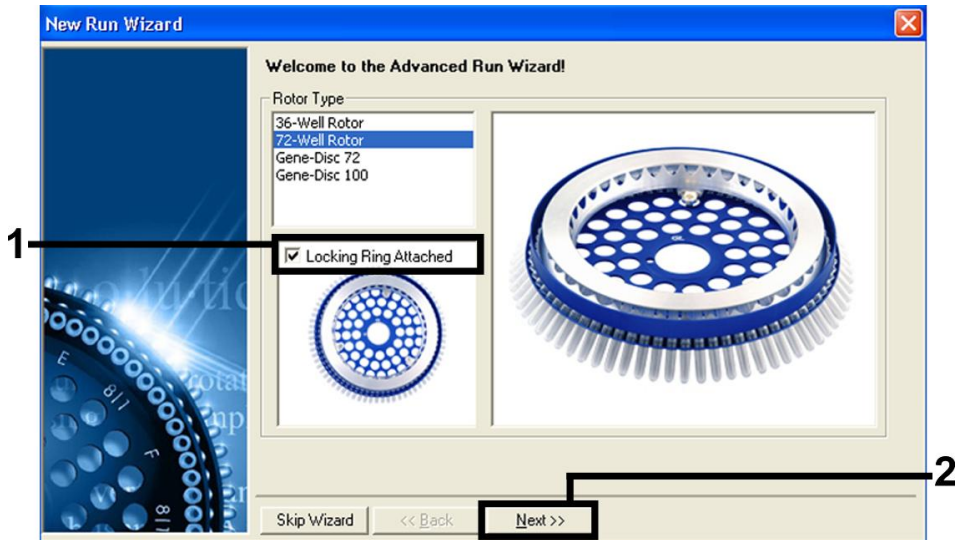
Näytteiden määrä	1	12
Pääseos	30 µl	Kukin 30 µl
Näyte	20 µl	Kukin 20 µl
Kokonaismäärä	50 µl	Kukin 50 µl
Näytteiden määrä	1	12

4. Sulje PCR-putket. Varmista, että lukitusrenas (Rotor-Gene-laitteen lisävaruste) on paikallaan roottorin päällä, jotta putket eivät vahingossa avaudu ajon aikana.
5. Luo CMV-viruksen DNA:n havaitsemista varten lämpötilaprofiili seuraavien ohjeiden mukaan.

Yleisten määrittämissparametrien asetus	Kuva 1, kuva 2 ja kuva 3
Kuumakäynnistysentsyymin alkuaktivointi	Kuva 4
DNA:n monistus (touchdown-PCR)	Kuva 5
Flooresensikanavan herkkyden säätäminen	Kuva 6
Ajon aloittaminen	Kuva 7

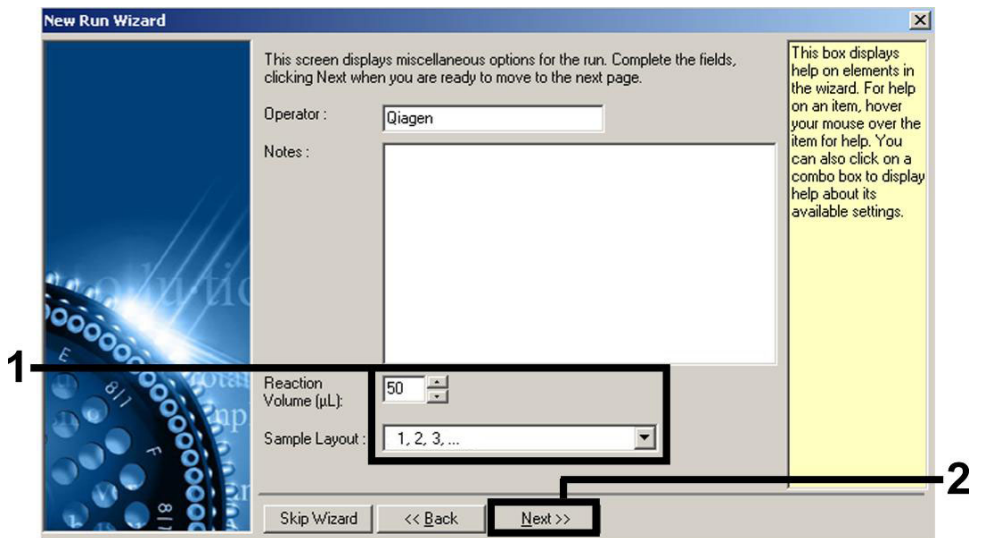
Kaikki tiedot koskevat Rotor-Gene Q -ohjelmistoversiota 2.3.5 tai sitä uudempia versioita. Lisätietoja Rotor-Gene-laitteiden ohjelmoinnista on laitteen käyttöohjeessa. Kuvissa nämä asetukset on merkitty mustilla kehyksillä. Kuvat on lisätty Rotor-Gene Q -laitteille.

6. Avaa **New Run Wizard** (Uuden ajon asetusohjelma) -valintaikkuna (kuva 1, seuraava sivu). Valitse **Locking Ring Attached** (Lukitusrenas kiinnitetty) -ruutu ja valitse sitten **Next** (Seuraava).



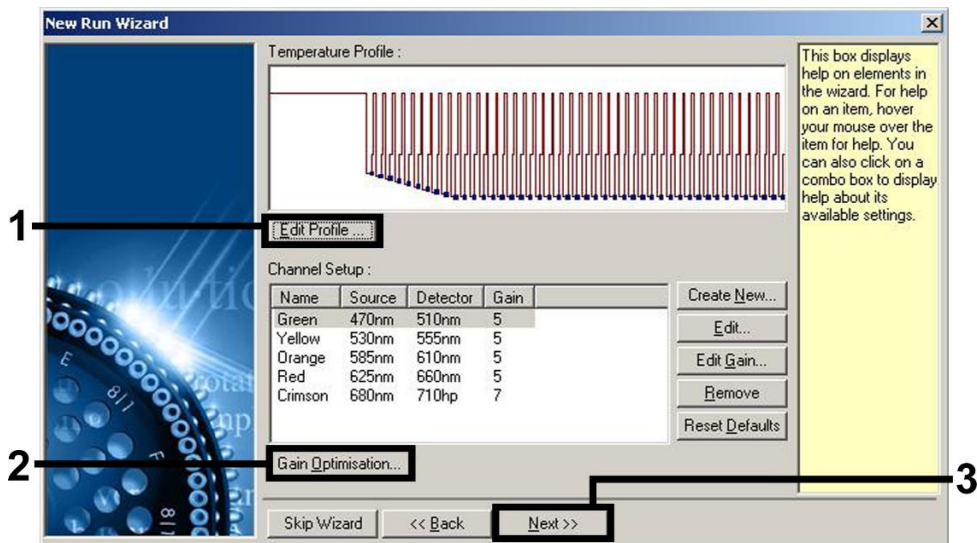
Kuva 1. New Run Wizard (Uuden ajon asetushjelma) -valintaruutu.

7. Valitse PCR-reaktiotilavuudeksi 50 ja valitse sitten **Next** (Seuraava) (kuva 2).

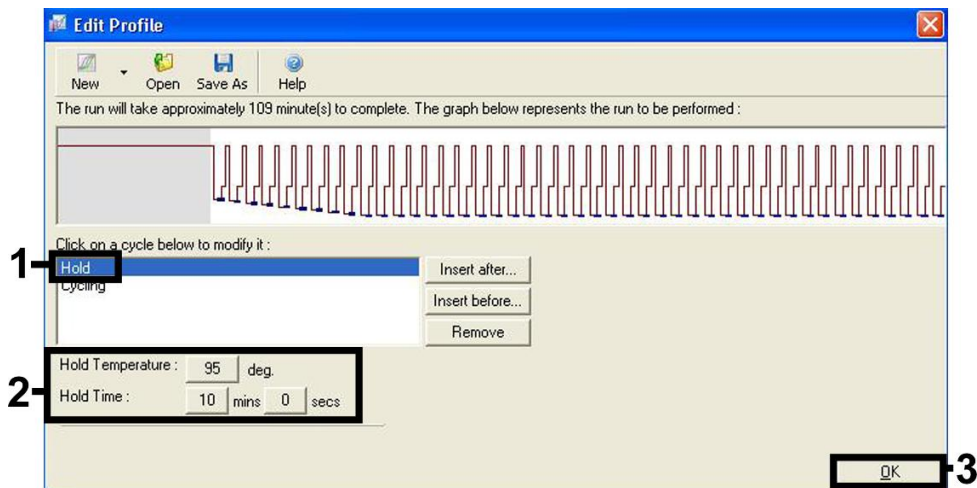


Kuva 2. Yleisten määrittämissparametrien asetukset.

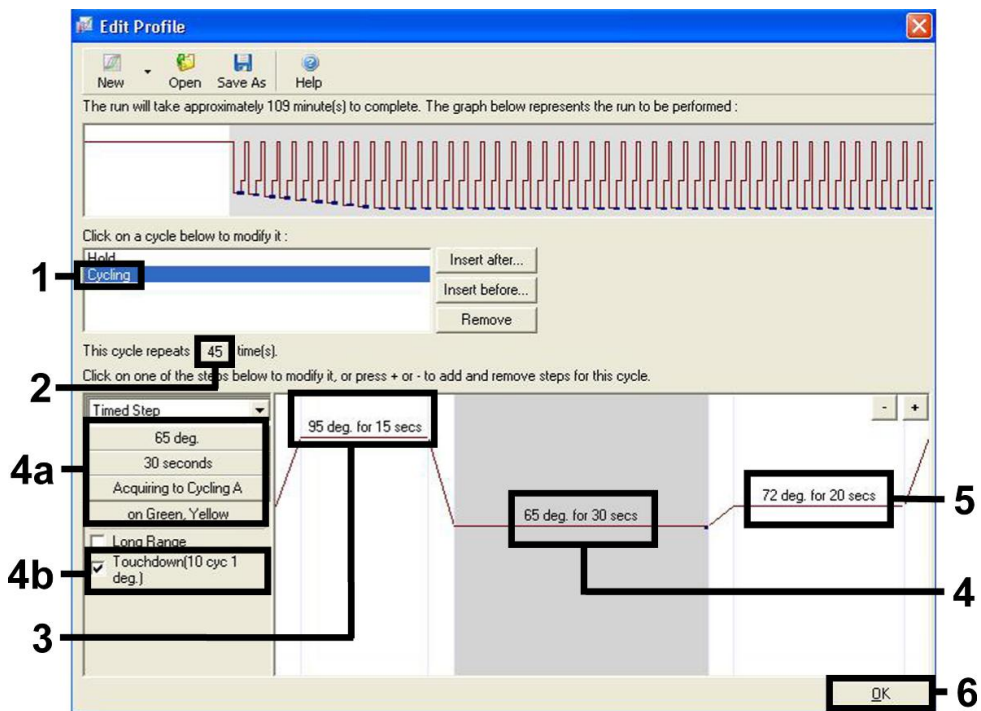
8. Napsauta **Edit Profile** (Muokkaa profiilia) -painiketta seuraavassa **New Run Wizard** -ikkunassa (kuva 3) ja ohjelmoi lämpötilaprofiili kuvissa 3–5) esitetyllä tavalla.



Kuva 3. Profiilin muokkaus.

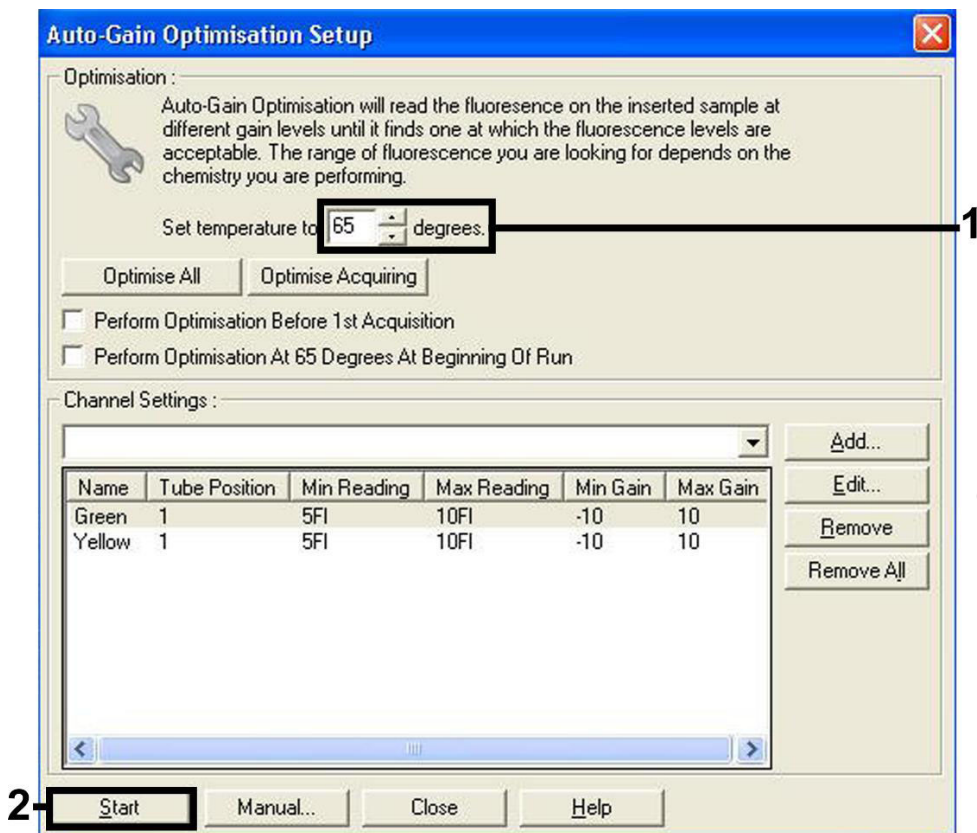


Kuva 4. Kuumakäynnistysentsyymien alkuaktivointi.



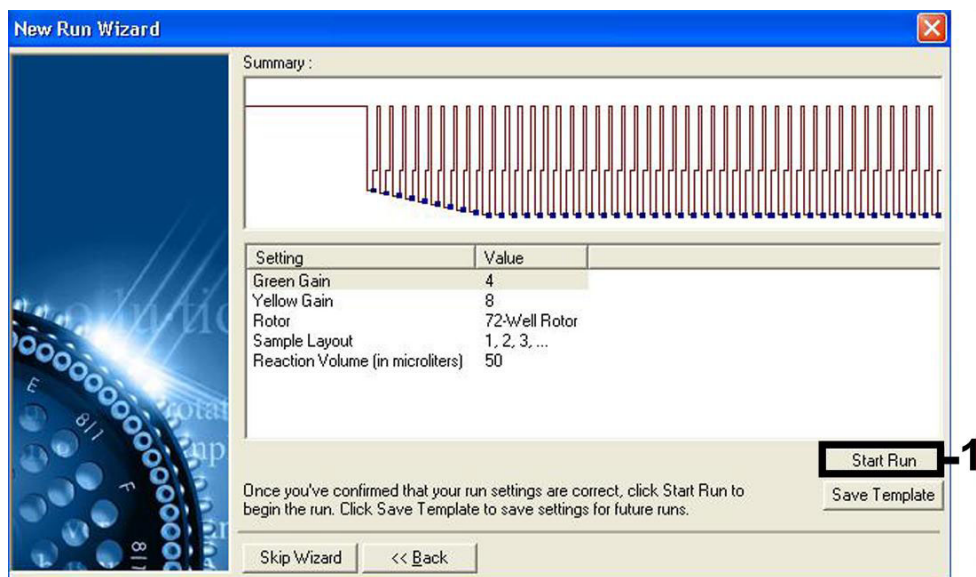
Kuva 5. DNA:n monistus. Muista aktivoida touchdown-toiminto 10 sykliksi kiinnitysvaiheessa.

9. Fluoresenssikanavien havainnointialue on määritettävä PCR-putkien fluoresenssin voimakkuuden mukaan. Valitse **New Run Wizard** (Uuden ajon asetusohjelma) -valintaikkunasta **Gain Optimisation** (Vahvistuksen optimointi) (katso kuva 3, edellinen sivu). Näyttöön tulee **Auto-Gain Optimisation** (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna. Aseta kalibrointilämpötilaksi 65 °C vastaamaan monistusohjelman kiinnityslämpötilaa (kuva 6, seuraava sivu).



Kuva 6. Fluoresenssikanavan herkkyiden säätäminen.

10. Kanavan kalibroinnilla määritetyt vahvistusarvot tallentuvat automaattisesti, ja ne näkyvät ohjelmointitoimenpiteen viimeisessä valikkoikkunassa (kuva 7, seuraava sivu). Valitse **Start Run** (Aloita ajo).



Kuva 7. Ajon aloittaminen.

Tulosten tulkitseminen

Kvantitointi

Tuotteen mukana toimitettavia kvantitointistandardeja (CMV QS 1–4) käsitellään kuten aiemmin puhdistettuja näytteitä, ja niitä käytetään sama määrä 20 µl suoraan PCR:ssä (ei tarvitse uuttaa). Standardikäyrän luomiseksi Rotor-Gene Q -laitteissa kaikkia neljää kvantitointistandardia on käytettävä ja ne on määritettävä **Edit Samples** (Muokkaa näytteitä) -valintaikkunassa standardeina, joilla on määritetyt pitoisuudet (katso laitteen käyttöopas).

Huomautus: Tarkan kvantitoinnin varmistamiseksi on erittäin suositeltavaa lisätä sisäinen kontrolli kvantitointistandardina käytettyyn CMV RG Master -liuoksen ja CMV Mg-Sol -liuoksen seokseen. Tätä tarkoitusta varten lisää sisäistä kontrollia suoraan CMV RG Master- ja CMV Mg-Sol -seokseen, kuten protokollan vaiheessa 2b (sivu 15) on kuvattu, ja käytä tätä pääseosta kuhunkin kvantitointistandardiin (CMV QS 1–4).

Huomautus: Kvantitointistandardit on määritetty yksikössä kopiota/µl. Seuraavan kaavan avulla voi muuntaa standardikvajaaja käyttämällä saadut arvot muotoon kopiota / ml näytemateriaalia:

$$\text{Tulos} \left(\frac{\text{kopiot}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Tulos (kopiot/}\mu\text{l)} \times \text{eluutiotilavuus (}\mu\text{l)}}{\text{Näytteen tilavuus (ml)}}$$

Huomaa perusperiaate, että edellä esitettyyn kaavaan tulee antaa näytteen tilavuus aluksi. Tämä on huomioitava, kun näytteen tilavuus muuttuu ennen nukleiinihappojen erotusta (esim. tilavuuden pieneneminen sentrifugoitaessa tai tilavuuden suureneminen täydennettäessä määrää eristämisen vaatiman tilavuuden saavuttamiseksi).

Huomautus: Kvantitointistandardit on kalibroitu ihmisen sytomegalovirusta koskevan 1. kansainvälisen standardin mukaisesti (NIBSC-koodi: 09/162). Standardin on määritellyt Maailman terveysjärjestö (WHO).

Seuraavan kaavan avulla voit muuntaa arvot muodosta kopiota/ml muotoon IU/ml ottaen huomioon QIAamp DSP Virus Kit -sarjan:

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

Huomautus: QIAamp-työnkulussa kvantifioitujen näytteiden on oltava seuraavalla lineaarisella alueella: $1 \times 10^1 \dots 1 \times 10^4$ kopiota/ μ l. Kvantifiointia ei voida taata tämän alueen ulkopuolella.

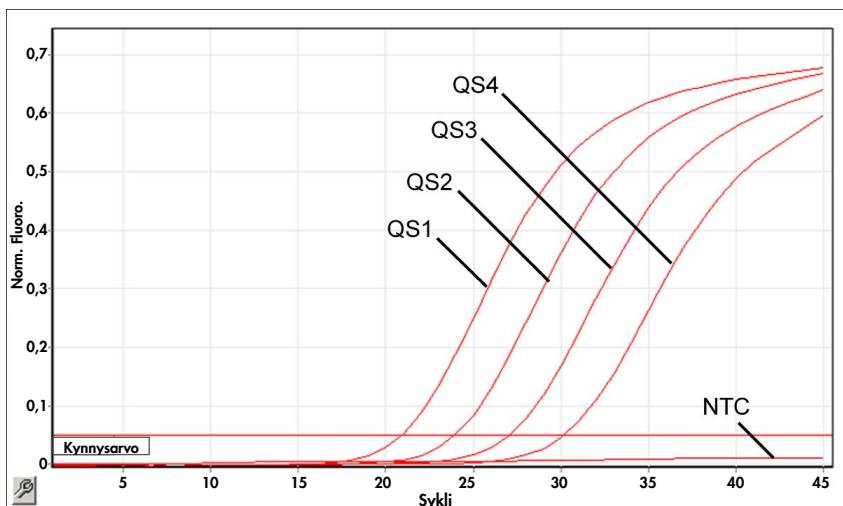
Seuraavan kaavan avulla voit muuntaa arvot muodosta kopiota/ml muotoon IU/ml ottaen huomioon QIAamp EZ1 DSP Virus Kit -sarjan käytettäessä EZ1 Advanced XL -laitetta.

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

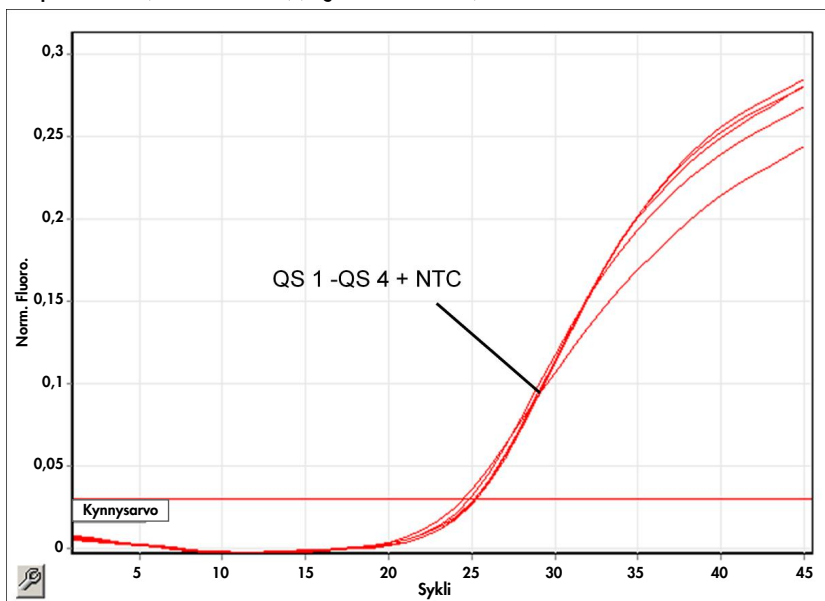
Huomautus: EZ1-työnkulussa kvantifioitujen näytteiden on oltava seuraavalla lineaarisella alueella: $3,16 \times 10^2 \dots 1,00 \times 10^8$ kopiota/ml. Kvantifiointia ei voida taata tämän alueen ulkopuolella.

Tulokset

Esimerkkejä positiivisista ja negatiivisista PCR-reaktioista on kuvassa 8 ja kuvassa 9, (seuraava sivu).



Kuva 8. Kvantitointistandardien tunnistus (CMV QS 1–4) fluoresenssikanavassa, Cycling Green.
 NTC: No template control (Malliton kontrolli) (negatiivinen kontrolli).



Kuva 9. Sisäisen kontrollin (Internal Control, IC) tunnistus fluoresenssikanavassa Cycling Yellow monistettaessa samanaikaisesti kvantitointistandardeja (CMV QS 1–4). NTC: No template control (Malliton kontrolli) (negatiivinen kontrolli).

Signaali havaitaan fluoresenssikanavassa Cycling Green.

Analyysin tulos on positiivinen: näyte sisältää CMV-DNA:ta.

Tällaisessa tapauksessa signaalin tunnistaminen Cycling Yellow -kanavassa jää tarpeettomaksi, koska CMV-DNA:n suuri alkupitoisuus (positiivinen signaali Cycling Green -kanavassa) saattaa johtaa sisäisen kontrollin fluoresenssisignaalin heikkenemiseen tai poisjäämiseen Cycling Yellow -kanavassa (kilpailu).

Fluoresenssikanavassa Cycling Green ei havaita signaalia. Samaan aikaan sisäisen kontrollin signaali ilmenee Cycling Yellow -kanavassa.

Näytteessä ei havaittu CMV-DNA:ta. Näytettä voidaan pitää negatiivisena.

Negatiivisen CMV-PCR:n tapauksessa sisäisen kontrollin havaittu signaali sulkee pois PCR-inhibition mahdollisuuden.

Signaalia ei havaita kanavassa Cycling Green eikä kanavassa Cycling Yellow.

Tuloksia ei voi määrittää.

Lisätietoa virheiden syistä ja ratkaisumahdollisuuksista saat luvusta Vianmääritysopas sivulla 41.

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunhallintajärjestelmän mukaisesti jokainen *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan erä testataan määritettyjen spesifikaatioiden mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Kaikki reagenssit on tarkoitettu vain in vitro -diagnostiikkaan.

Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen in vitro -diagnostisiin toimenpiteisiin.

Optimaalisten PCR-tulosten takaaminen edellyttää laitteen käyttöoppaan tarkkaa noudattamista.

Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

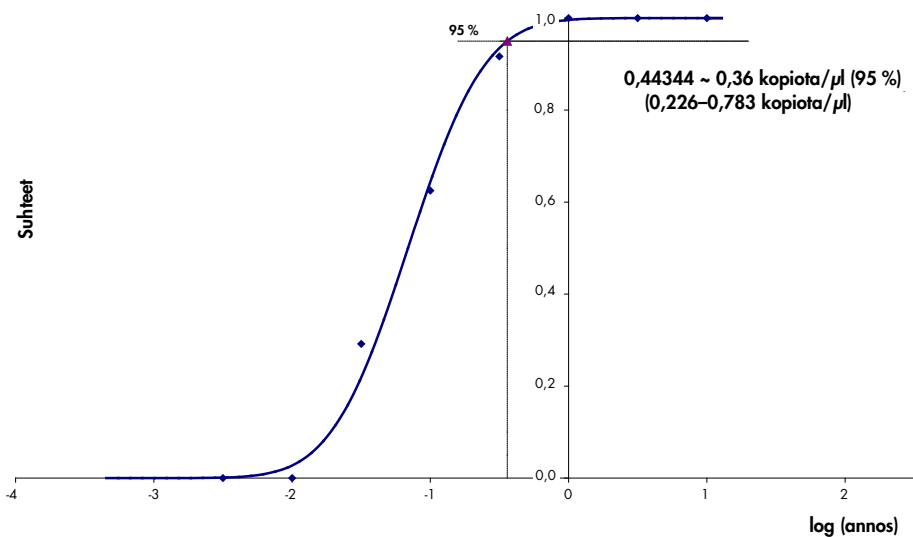
Harvinaisissa tapauksissa mutaatiot virusgenomin erittäin konservoiduilla alueilla sarjan alukkeissa ja/tai koettimessa saattavat johtaa alikvantitointiin tai kyvyttömyyteen havaita virukset näissä tapauksissa. Määrityksen mallin hyväksyttävyyys ja suorituskyky tarkistetaan säännöllisesti.

Suorituskykyominaisuudet

Analyyttinen herkkyys

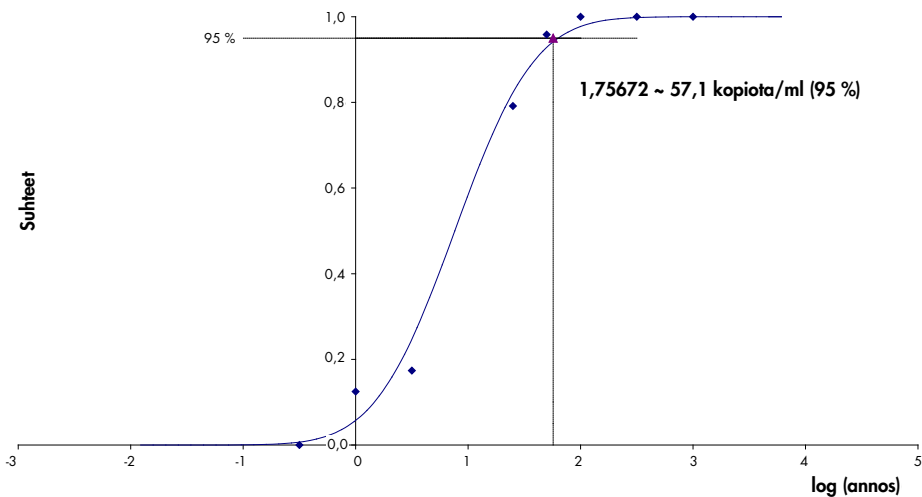
artus CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen havaitsemisraja sekä analyttinen havaitsemisraja otettaessa huomioon puhdistus (herkkyysrajat) arvioitiin. Analyttinen havaitsemisraja otettaessa huomioon puhdistus on määritetty käyttämällä CMV-positiivisia kliinisiä näytteitä yhdessä tietyn eristysmenetelmän kanssa. Analyttinen havaitsemisraja puolestaan on määritetty erikseen valitusta eristysmenetelmästä käyttämällä tunnettua CMV-DNA:n pitoisuutta.

artus CMV RG PCR Kit -sarjan analyttisen herkkyden määrittämiseksi valmisteltiin CMV-viruksen genomisen DNA:n laimennussarja arvosta 10 nimelliseen arvoon 0,00316 kopiota/ μ l, ja se analysoitiin Rotor-Gene-laitteilla *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan avulla. Testaus suoritettiin kahdeksalle (8) replikaatille kolmena (3) eri päivänä. Tulokset määritettiin probiittianalyysillä. Rotor-Gene 6000 -laitteen probiittianalyysi on esitetty graafisessa muodossa kuvassa 10 (seuraavalla sivulla). *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen havaitsemisraja Rotor-Gene Q MDx-/Q-/6000- ja Rotor-Gene 3000 -laitteissa on 0,36 kopiota/ μ l ($p = 0,05$) ja 0,24 kopiota/ μ l ($p = 0,05$). Tämä tarkoittaa, että on olemassa 95 %:n todennäköisyys, että 0,36 kopiota/ μ l tai 0,24 kopiota/ μ l havaitaan.



Kuva 10. Probiittianalyysi: CMV (Rotor-Gene 6000). *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen herkkyys Rotor-Gene 6000 -laitteella.

Otettaessa puhdistus huomioon *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen herkkyys (QIAamp DSP Virus Kit) Rotor-Gene-laitteilla määritettiin käyttämällä CMV-virusmateriaalin laimennussarjaa 1 000:sta nimelliseen 0,316 CMV-kopioon/ml, joka lisättiin kliinisiin plasmanäytteisiin. Näistä näytteistä DNA eristettiin QIAamp DSP Virus Kit -sarjan avulla (eristämismäärä: 0,5 ml, eluotiotilavuus: 60 µl). Kaikki 8 laimennusta analysoitiin *artus* CMV RG PCR Kit -sarjalla kolmena (3) eri päivänä kahdeksasta (8) replikaatista. Tulokset määritettiin probiittianalyysillä. Probiittianalyysi on esitetty graafisessa muodossa kuvassa 11 (seuraava sivu). *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen havaitsemisraja otettaessa puhdistus huomioon Rotor-Gene 3000 -laitteessa on 57,1 kopiota/ml ($p = 0,05$). Tämä tarkoittaa, että on olemassa 95 %:n todennäköisyys, että 57,1 kopiota/ml havaitaan.



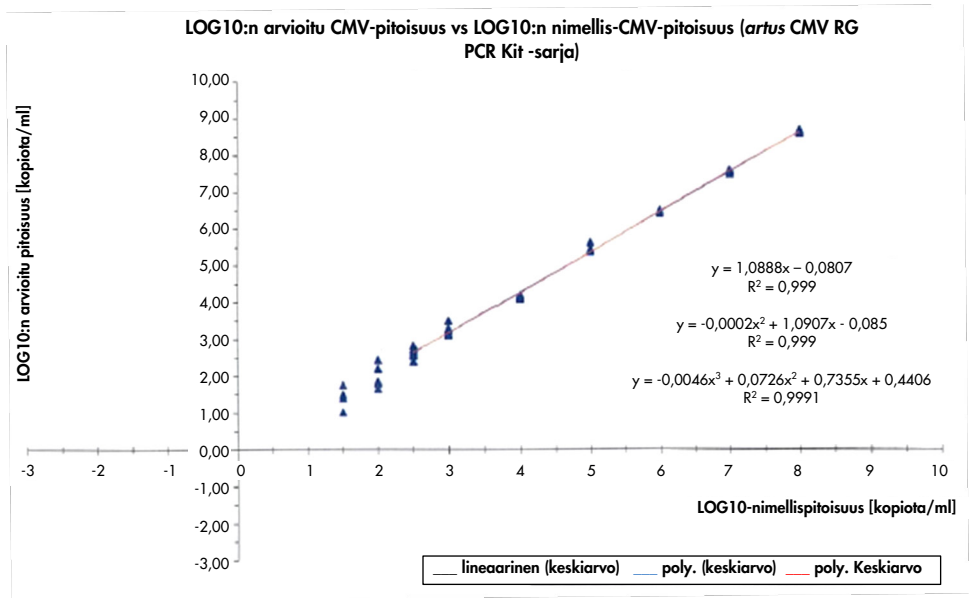
Kuva 11. Probiittianalyysi: CMV (Rotor-Gene 3000). *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan analyttinen herkkyys otettaessa huomioon puhdistus (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) Rotor-Gene 3000 -laitteella

EZ1 DSP Virus Kit -sarjan analyttinen herkkyys ottaen huomioon puhdistus (eristystilavuus: 0,4 ml, eluutiotilavuus: 60 µl) käytettäessä EZ1 Advanced XL -laitetta tai *artus* CMV RG PCR Kit -sarjaa Rotor-Gene 6000 -laitteella on 68,75 kopiota/ml ($p = 0,05$). Tämä tarkoittaa, että on olemassa 95 %:n todennäköisyys, että 68,75 kopiota/ml havaitaan.

Lineaarinen alue

EZ1 DSP Virus Kit -sarjan lineaarinen alue ottaen huomioon puhdistus (eristystilavuus: 0,4 ml, eluutiotilavuus: 60 µl) käytettäessä EZ1 Advanced XL -laitetta määritettiin testaamalla 4–6 CMV-virusmateriaalin kahdennusta laimennussarjassa arvoilla $3,16E+01 \dots 1,00E+08$ kopiota/ml.

Probiittianalyysi on esitetty graafisessa muodossa kuvassa 12 (seuraava sivu).



Kuva 12. *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan tietojoukon polynominen regressio otettaessa huomioon puhdistus (EZ1 DSP Virus Kit) käytettäessä EZ1 Advanced XL -laitetta. Mukana ovat lineaariset, neliölliset ja kuutiolliset regressiomallit.

artus CMV RG PCR Kit -sarjan lineaarinen alue otettaessa huomioon puhdistus EZ1 DSP Virus Kit -sarjalla (eristystilavuus): 0,4 ml, eluutiotilavuus: 60 µl) käyttämällä EZ1 Advanced XL -laitetta on $3,16E+02 \dots 1,00E+08$ kopiota/ml.

Huomautus: *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan lineaarinen alue ottaen huomioon puhdistus QIAamp DSP Virus Kit -sarjalla (eristystilavuus: 0,4 ml, eluutiotilavuus: 60 µl), on $1,00E+01 \dots 1,00E+04$ kopiota/µl.

Spesifisyys

artus CMV RG PCR Kit -sarjan spesifisyys varmistetaan ennen kaikkea alukkeiden ja koettimien sekä erittäin vaativien reaktio-olosuhteiden valinnalla. Alukkeiden ja koettimien mahdollinen homologia kaikkien geenipankeissa julkaistujen sekvenssien kanssa tarkistettiin sekvenssivertailuanalyyseilla. Kaikkien relevanttien kantojen havaittavuus on siis täten varmistettu.

Lisäksi spesifisyys validoitiin 100 erilaisella CMV-negatiivisella plasmanäytteellä. 99 näistä näytteistä ei antanut mitään signaalia CMV RG Masteriin kuuluvien CMV-spesifien alukkeiden ja koettimien kanssa.

Huomautus: 1 näyte, joka tuotti signaalin CMV-spesifien alukkeiden ja koettimien kanssa ja joka sai positiivisen CMV-testituloksen *artus* CMV LC- ja TM RG PCR Kit -sarjoilla, on todennäköisesti positiivinen. 100 yksittäisen luovuttajanäytteen testauksen perusteella lopulliseksi spesifisyydeksi todettiin 99,00 % (99/100).

artus CMV RG PCR Kit -sarjan mahdollinen ristiinreagointi testattiin taulukossa 5 mainitulla kontrolliryhmällä. Yksikään testatuista patogeeneistä ei ollut reaktiivinen. Sekoitetuissa infektioissa ei ilmennyt ristiinreagointia.

Taulukko 5. Sarjan spesifisyyden testaus mahdollisesti ristiinreagoivilla patogeeneillä

Kontrolliryhmä	CMV (Cycling Green tai Cycling A.FAM)	Sisäinen kontrolli (Cycling Yellow tai Cycling A.JOE)
Ihmisen herpesvirus 1 (Herpes simplex -virus 1)	–	+
Ihmisen herpesvirus 2 (Herpes simplex -virus 2)	–	+
Ihmisen herpesvirus 3 (Varicella-zostervirus)	–	+
Ihmisen herpesvirus 4 (Epstein-Barr-virus)	–	+
Ihmisen herpesvirus 6A	–	+
Ihmisen herpesvirus 6B	–	+
Ihmisen herpesvirus 7	–	+
Ihmisen herpesvirus 8 (Kaposin sarkoomaan liittyvä herpesvirus)	–	+
Hepatiitti A -virus	–	+
Hepatiitti B -virus	–	+
Hepatiitti C -virus	–	+

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 5 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Kontrolliryhmä	CMV (Cycling Green tai Cycling A.FAM)	Sisäinen kontrolli (Cycling Yellow tai Cycling A.JOE)
Ihmisen immuunikatovirus 1	–	+
Ihmisen T-solun leukemiovirus 1	–	+
Ihmisen T-solun leukemiovirus 2	–	+
Länsi-Niilin virus	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+

Tarkkuus

artus CMV RG PCR -sarjan tarkkuustiedot on kerätty Rotor-Gene-laitteella, ja sen avulla määrittämisen kokonaisvarianssi on mahdollista määrittellä. Kokonaisvarianssi koostuu määrittämisen sisäisestä vaihtelusta (samat pitoisuudet sisältävien näytteiden useiden tulosten välisestä vaihtelusta samalla laitteella), määrittämisen välisestä vaihtelusta (saman laboratorion eri käyttäjien samantyyppisillä mutta eri laitteilla luoman määrittämisen useiden tulosten välisestä vaihtelusta) sekä erien välisestä vaihtelusta (eri erinä käytettävän määrittämisen useiden tulosten välisestä vaihtelusta). Saadun datan avulla määritettiin keskihajonta, varianssi ja variaatiokerroin patogeenispesifille PCR:lle sekä sisäisen kontrollin PCR:lle.

artus CMV RG PCR -sarjan tarkkuusdata on kerätty käyttämällä kvantitointistandardia pienimmällä pitoisuudella (QS 4; 10 kopiota/ μ l). Testaus tehtiin käyttämällä kahdeksaa replikaattia. Tarkkuustiedot laskettiin monistumiskäyrän C_T -arvojen perusteella (C_T : raja-arvojakso, katso taulukko 6, seuraava sivu). Lisäksi määritettiin kopioina mikrolitraa kohden ilmaistavien kvantitatiivisten tulosten tarkkuustiedot käyttämällä vastaavia C_T -arvoja (katso taulukko 7, seuraava sivu). Näiden tulosten perusteella kaikkien mainitun pitoisuuden näytteiden tilastollinen kokonaisjakautuma on 1,21 % (C_T) tai 14,38 % (pitoisuus) ja 1,93 % (C_T) sisäisen kontrollin havaitsemisen osalta. Arvot perustuvat määritettyjen vaihteluiden kaikkien yksittäisten arvojen kokonaisuuteen.

Taulukko 6. Tarkkuustiedot C_T-arvojen perusteella

	Keskihajonta	Varianssi	Variatiokerroin (%)
Määrityksen sisäinen vaihtelu: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Määrityksen sisäinen vaihtelu: Sisäinen kontrolli	0,31	0,10	1,16
Määritysten välinen vaihtelu: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Määritysten välinen vaihtelu: Sisäinen kontrolli	0,47	0,22	1,77
Erien välinen vaihtelu: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Erien välinen vaihtelu: Sisäinen kontrolli	0,53	0,28	2,02
Kokonaisvarianssi: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Kokonaisvarianssi: Sisäinen kontrolli	0,51	0,26	1,93

Taulukko 7. Tarkkuustiedot kvantitatiivisten tulosten perusteella (kopioita/µl)

	Keskihajonta	Varianssi	Variatiokerroin (%)
Määrityksen sisäinen vaihtelu: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Määritysten välinen vaihtelu: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Erien välinen vaihtelu: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Kokonaisvarianssi: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Häiritsevät aineet

CMV-DNA lisättiin negatiiviseen plasmaan erilaisissa kaupallisesti saatavilla olevissa verinäytejärjestelmissä, joissa oli erilaisia antikoagulantteja. Laskettu pitoisuus (kopioita/ml, C_T -keskiarvo, keskihajonta, varianssi ja CV%) on esitetty taulukossa 8. Keskihajonta ja variaatiokerroin ovat 5 %:n rajoissa ja siten toleranssialueella. Eri aineiden aiheuttamaa merkittävää vaikutusta PCR:ään ei havaittu.

Taulukko 8. Kaupalliset verinäytejärjestelmät ja antikoagulanttien tiedot

Aine	Pitoisuus (kopioita/ml)	C_T -keskiarvo	C_T -keskihajonta	C_T -varianssi	C_T -CV (%)
Kalium-EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Kalium-EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Kalium-EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Kalium-EDTA, Springe (viite)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Kalium-EDTA, Sarstedt (viite)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Kalium-EDTA (raskaus)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Endogeenisiä aineita (taulukko 9, seuraava sivu) lisättiin CMV-positiivisiin EDTA-plasmanäytteisiin 3 x LOD ja 10 x LOD. Kaikki näytteet havaittiin onnistuneesti, eikä häiriöitä havaittu näytteissä, jotka sisälsivät kohonneita endogeenisten inhibiittoreiden (bilirubiini, hemoglobiini, triglyseridi ja albumiini) tasoja.

Taulukko 9. Testatut endogeeniset aineet.

Häiritsevät aineet	Häiritsevien aineiden pitoisuus
Bilirubiini	30 mg/dl
Hemoglobiini	2 g/dl
Triglyseridi	1 g/dl
Albumiini	6 g/dl

Kudossiirroissa käytettyjä yleisiä lääkkeitä testattiin kolminkertaisella akuutilla huippupitoisuudella lääkeshoidon jälkeen CLSI®-ohjeen EP07-A2 (11) suositusten mukaan (katso taulukko 10). Näitä aineita lisättiin sekä CMV-negatiivisiin että CMV-positiivisiin näytteisiin, jotka testattiin 4 replikaatteina.

Minkään testatun eksogeenisen aineen ei havaittu vaikuttavan merkittävästi *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan suorituskykyyn.

Taulukko 10. Luettelo eksogeenisina aineina testatuista lääkkeistä

Häiritsevät aineet	Testipitoisuus
Antibiootit	
Sulfametoksatsoli	200 mg/l
Trimetopriimi	5,2 mg/l
Claforan® (kefotaksiimi)	1 g/l
Tazobac® (piperasilliini + tatsobaktaami)	Piperasilliini: 1 g/l Tatsobaktaami: 125 mg/l
Tikarsilliini	1 g/l
Augmentin® (amoksisilliini + klavulaanihappo)	Amoksisilliini: 125 mg/l Klavulaanihappo: 25 mg/l
Vankomysiini	125 mg/l
Sienilääke	
Flukonatsoli	1 mg/l
Immunosuppressiiviset lääkkeet	
Rapamysiini	100 mg/l
Mykofenolaattinatrium	80 mg/l

Varmuus

Varmuuden todennuksen avulla voidaan määrittää *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan koko virhetodennäköisyys. 100 CMV-negatiiviseen plasmanäytteeseen lisättiin CMV-virusta loppupitoisuudella 170 kopiota/ml (noin kolminkertainen pitoisuus verrattuna analyttiseen herkkyysrajaan). QIAamp DSP Virus Kit -sarjalla tehdyn eristämisen jälkeen nämä näytteet analysoitiin *artus CMV RG PCR Kit* -sarjalla. Kaikkien CMV-näytteiden virhetiheys oli 0 %. Lisäksi sisäisen kontrollin varmuus arvioitiin 100 CMV-negatiivisen plasmanäytteen puhdistamisen ja analysoinnin jälkeen. Tästä syystä *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan varmuus on ≥ 99 %.

Uusittavuus

Uusittavuustietojen avulla *artus CMV RG PCR Kit* -sarjan suorituskykyä ja tehokkuutta verrattuna muihin tuotteisiin voidaan arvioida säännöllisesti. Nämä tiedot on saatu osallistumalla tunnettuihin pätevyysohjelmiin.

Tunnettuihin pätevyysohjelmiin osallistumisen lisäksi 10-osaista CMV-paneelia (taulukko 11) testattiin 3 ulkoisessa laboratoriossa käyttämällä EZ1 DSP Virus Kit -sarjaa EZ1 Advanced XL -laitteessa nukleiinihappojen puhdistamiseksi ja *artus RG PCR Kit* -sarjaa DNA-eluatiin testaamiseksi.

Taulukko 11. Yhteenveto CMV-paneelin osista

Paneelin numero (paneelin osan tyyppi)	Paneelin osa	Laimennusvaikutus
1001 (1)	Negatiivinen	Negatiivinen yhdistelmä 1
1002 (1)	Negatiivinen	Negatiivinen yhdistelmä 2
1003 (2)	Voimakkaasti negatiivinen	50-prosenttisesti positiivinen
1004 (2)	Voimakkaasti negatiivinen	50-prosenttisesti positiivinen
1005 (3)	Heikosti positiivinen	200 kopiota/ml
1006 (3)	Heikosti positiivinen	200 kopiota/ml
1007 (4)	Kohtuullisen positiivinen	2 000 kopiota/ml
1008 (4)	Kohtuullisen positiivinen	2 000 kopiota/ml
1009 (5)	Voimakkaasti positiivinen	200 000 kopiota/ml
1010 (5)	Voimakkaasti positiivinen	200 000 kopiota/ml

10-osainen paneeli testattiin kaksoiskappaleina 2 eri käyttäjän toimesta päivittäin 6 päivän ajan kussakin tutkimuskeskuksessa 3 reagenssisarjaerällä. Kun kerrotaan 20 näytettä 2 operaattorilla, 6 päivällä ja 3 tutkimuskeskuksella, saadaan 720 datapistettä.

artus CMV RGQ MDx -testin kokonaisuusittavuus oli $\leq 12\%$ CV sellaisten näytteiden osalta, joiden pitoisuus oli 200–200 000 kopiota/ml (taulukko 12)

Taulukko 12. Kokonaisyhteenveto (jokaisesta paneelin osan tyypistä) – havaitut keskiarvot

paneeli_osa_tyyppi	Hav. määrä	Keskiarvo	mediaani	Keskihajonta	CV:n prosentti	Vähintään
1	144	0,02	0,00	0,158	849,84	0,00
2	144	0,68	0,83	0,630	92,19	-0,10
3	144	1,91	1,95	0,226	11,83	0,98
4	144	2,96	2,96	0,168	5,68	2,16
5	144	5,03	5,03	0,091	1,80	4,75

Kokonaisyhteenveto log₁₀ IU/ml -arvojen prosenttiarvojen varianssista ja keskihajonnasta kunkin 5 osan osalta erien, testauspaikkojen, käyttäjien, päivien ja ajojen välillä ja ajon sisällä on esitetty taulukossa 13 (seuraava sivu).

Taulukko 13. Kokonaisyhteenveto varianssista ja keskihajonnasta

Näyte	1	2	3	4	5	
Näytetyyppi	negatiivinen	voimakkaasti negatiivinen	heikosti positiivinen	kohtuullisen positiivinen	voimakkaasti positiivinen	
Havaittu keskiarvo log₁₀ IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Testien määrä	144	144	144	144	144	
Mittari	%varianssi S.D.					
Varianssikomponentti	Erä	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	Paikka	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	Käyttäjä	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	Päivä	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	Kokeiden välillä	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	Ajon sisällä	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	Yhteensä	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

Diagnostinen arviointi

artus CMV RG PCR Kit -sarja arvioitiin tutkimuksessa, jossa verrattiin artus CMV RG PCR Kit -sarjaa COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test -testiin. 156 retrospektiivistä ja prospektiivistä kliinistä EDTA-plasmanäytettä analysoitiin. Kaikki näytteet oli aiemmin analysoitu positiivisiksi tai negatiivisiksi COBAS AMPLICOR CMV MONITOR -laitteella rutiinidiagnostiikalla.

CMV-DNA *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan testausta varten eristettiin QIAamp DSP Virus Kit -sarjalla, *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan sisäistä kontrollia lisättyä isolaattiin, ja analyysi tehtiin Rotor-Gene 3000 -laitteella. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test -testin näytteet käsiteltiin ja analysoitiin mukana tulleiden valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Kaikki 11 COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test -testissä positiiviseksi määritettyä näytettä määritettiin positiiviseksi myös *artus* CMV RG PCR Kit -sarjalla. 123 näytettä 145:stä COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test -testissä negatiiviseksi määritettyä näytettä määritettiin negatiiviseksi myös *artus* CMV RG PCR Kit -sarjalla. Ristiriitaisia tuloksia saatiin 22 (taulukko 14).

Taulukko 14. Vertailevan validointitutkimuksen tulokset

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

Jos COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test -testin tulokset otetaan viitteeksi, *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan kaikkien näytteiden diagnostinen herkkyys on 100 % ja diagnostinen spesifisyys 84,8 %.

22 ristiriitaisen näytteen lisättestaus vahvisti *artus* PCR Kit -sarjan tulokset. Siksi voidaan olettaa, että ristiriitaisuus perustuu *artus* CMV RG PCR Kit -sarjan suurempaan herkkyyteen.

Lähdeviitteet

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

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Katso myös usein kysytyjä kysymyksiä (Frequently Asked Questions, FAQ) teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Ei signaalia positiivisilla kontrolleilla (CMV QS 1–4) fluoresenssikanavassa Cycling Green.

- | | |
|---|--|
| a) PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole yhdenmukainen protokollan kanssa | Datan analysoimisessa pitää valita Cycling Green - fluoresenssikanava analyttistä CMV:n PCR:ää varten ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava sisäisen kontrollin PCR:ää varten. |
| b) Rotor-Gene-laitteen lämpötilaprofiilin virheellinen ohjelmointi | Vertaa lämpötilaprofiilia protokollaan. Katso ”Protokolla: PCR ja datan analysointi”, sivu 14. |
| c) PCR on määritetty väärin | Tarkista, noudattavatko työskentelyvaiheesi pipetointitapaa, ja toista PCR tarvittaessa. Katso ”Protokolla: PCR ja datan analysointi”, sivu 14. |
| d) Yhden tai useamman sarjan osan säilytysolosuhteet eivät vastanneet kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 10 annettuja ohjeita | Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) <i>artus</i> CMV RG PCR Kit -sarjan käyttöaika on umpeutunut | Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |

QIAamp DSP Virus Kit -sarjalla ($C_T = 27 \pm 3$; kynnys, 0,03) puhdistetun negatiivisen plasmanäytteen sisäisen kontrollin heikko signaali tai signaalin puuttuminen fluoresenssikanavassa Cycling Yellow ja signaalin puuttuminen samanaikaisesti kanavassa Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) PCR-olosuhteet eivät ole yhdenmukaiset protokollan kanssa | Tarkista PCR-olosuhteet (katso edellä) ja tarvittaessa toista PCR oikeilla asetuksilla. |
| b) PCR inhiboitui | Varmista, että käytät suositeltua eristysmenetelmää ja pitäydyt tarkasti valmistajan ohjeissa. |
| c) DNA katosi eristämisen aikana | Jos erotustoimenpiteessä lisättiin sisäinen kontrolli, sisäisen kontrollin signaalin puuttuminen saattaa merkitä, että DNA menetettiin erotuksen aikana. Varmista käyttäväsi suositeltua eristysmenetelmää (katso DNA:n eristäminen, sivu 12) ja noudata valmistajan ohjeita tarkasti. |

Huomautuksia ja ehdotuksia

- | | |
|---|---|
| d) Yhden tai useamman sarjan osan säilytysolosuhteet eivät vastanneet kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 10 annettuja ohjeita | Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) <i>artus</i> CMV RG PCR Kit -sarjan käyttöaika on umpeutunut | Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |

Negatiivisten kontrollien signaaleja analyttisen PCR:n Cycling Green -fluoresenssikanavassa

- | | |
|--|---|
| a) PCR:n valmistelun aikana tapahtui kontaminaatio | Toista PCR uusilla reagensseilla replikaateissa.
Jos mahdollista, sulje PCR-putket heti testattavan näytteen lisäämisen jälkeen.
Muista pipetoida positiiviset kontrollit viimeiseksi.
Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. |
| b) Eristämisen aikana tapahtui kontaminaatio | Toista testattavan näytteen eristäminen ja PCR uusilla reagensseilla.
Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. |

Symbolit



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> testiin



Viimeinen käyttöpäivämäärä



Diagnostinen in vitro -lääketieteellinen laite



Tuotenumero



Eränumero



Materialinumero



Komponentit



Sisältö



Numero



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet

Tilastiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
artus CMV RG PCR Kit (24)	24 reaktioon: PCR-reagenssit, magnesiumliuos, 4 kvantitointistandardia, IC, vettä (PCR-laatu)	4503263
artus CMV RG PCR Kit (96)	96 reaktioon: PCR-reagenssit, magnesiumliuos, 4 kvantitointistandardia, IC, vettä (PCR-laatu)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit – automaattiseen, samanaikaiseen viruksen DNA:n ja RNA:n puhdistamiseen 1–14 seerumi-, plasma- tai aivoselkäydinnesteenäytteestä		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	48 viruksen nukleiinihappopreparaatiota varten: Esitäytetyt reagenssikasetit, kertakäyttöiset kärkipidikkeet, kertakäyttöiset suodatinkärjet, näyteputket, eluutioputket, puskurit, kantaja-RNA	62724
QIAamp DSP Virus Kit – virusten nukleiinihappojen puhdistamiseen ihmisen plasmasta in vitro -diagnostiikkaa varten		
QIAamp DSP Virus Kit	50 preparaatiota varten: QIAamp MinElute® Spin Column -putkia, puskureita, reagensseja, putkia, putkien jatkokappaleita ja VacConnector-liittimiä	60704
Rotor-Gene Q MDx ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR -syklilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR -syklilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen	9002023

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR -laite ja High Resolution Melt (HRM) - analysointilaitte, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1- vuotisen takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR -jakso ja HRM-analysointilaitte, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR -syklilaitte, jossa on 6 kanavaa (sininen, vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, muttei asennusta ja koulutusta	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR -syklilaitte, jossa on 6 kanavaa (sininen, vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR -syklilaitte, jossa on 2 kanavaa (vihreä, keltainen), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR -syklilaitte, jossa on 2 kanavaa (vihreä, keltainen), kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää yhden vuoden takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR -laite ja HRM-analysointilaitte, jossa on 2 kanavaa (vihreä, keltainen) sekä HRM-kanava, kannettava	9002012

Tuote	Sisältö	Tuotenro
	tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR -jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 2 kanavaa (vihreä, keltainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 x 0,1 ml:n putkia	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Alumiininen levy manuaalisen reaktion valmisteluun standardina 8 x 12 -ryhmänä käyttämällä 96 x 0,2 ml:n putkea	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neljän putken liuskaa ja korkit 1 000 reaktiota varten	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 ohutseinäistä putkea 1 000 reaktioon	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 ohutseinäistä putkea 10 000 reaktioon	981008

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Versio	Muutokset
R6, maaliskuu 2021	Lisättiin kohdat Lineaarinen alue, Häiritsevät aineet ja Uusittavuus. Päivitykset kohtiin Käyttötarkoitus ja Kvantitointi. Poistettiin viittaukset QIAGEN-laitteisiin, joita ei enää tueta.

artus CMV RG PCR Kit -tarvikesarjan rajoitettu käyttöoikeussopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käsikirjan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käsikirjassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttö eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Hankittuaan tämän tuotteen ostajalla on oikeus käyttää sitä diagnostiisiin palveluihin ihmisten in vitro -diagnostiikassa. Tämän erityisen käyttöoikeuden lisäksi osto ei oikeuta mihinkään muuhun yleiseen patenttiin tai käyttöoikeuteen.

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

HB-0046-008 1123965 R6 03/2021© 2021 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com