

Märts 2021

Komplekti *artus*[®] CMV RG PCR Kit kasutusjuhend (käsiraamat)



24 (katalooginr 4503263)



96 (katalooginr 4503265)

1. versioon

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Kasutamiseks seadmetega Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSAMAA

R6 **MAT**

1123965EE

Sample to Insight



Sisukord

Sihtotstarve	5
Kirjeldus ja põhimõte	5
Teave haigustekitajate kohta	6
Protseduuri põhimõte	6
Kaasasolevad materjalid	7
Komplekti sisu	7
Vajalikud, kuid mitte kaasasolevad materjalid	8
Reaktiivid	8
Kulumaterjalid	8
Seadmed	8
Hoiatused ja ettevaatusabinõud	9
Ohutusteave	9
Ettevaatusabinõud	9
Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine	10
Käsitsemise ja säilitamise näidis	10
Proovivõtt	10
Proovi hoiustamine	11
Proovi transportimine	11
Protseduur	12
DNA eraldamine	12
Sisemine kontroll	13
Protokoll: PCR ja andmeanalüüs	14

Tulemuste tõlgendamine	22
Määramine.....	22
Tulemused	23
Kvaliteedikontroll	26
Piirangud.....	26
Sooritusnäitajad	27
Analüütiline tundlikkus.....	27
Lineaarvahemik.....	29
Spetsiifilisus	30
Täpsus	32
Segavad ained	34
Vastupidavus	36
Reprodutseeritavus.....	36
Diagnostiline hindamine.....	38
Viited	40
Tõrkeotsingujuhend	41
Tähised	43
Tellimisteave	44
Dokumendi redaktsioonijalugu	47

Sihtotstarve

Komplekt *artus* CMV RG PCR Kit on *in vitro* nukleiinhappe amplifikatsioonianalüüs tsütomegaloviiruse (CMV) DNA kvantitatiivseks määramiseks inimese plasmas. See diagnostilise analüüsi komplekt kasutab polümeraasi ahelreaktsiooni (Polymerase Chain Reaction, PCR) ja on konfigureeritud kasutamiseks seadmetega Rotor-Gene Q Instruments.

Komplekt *artus* CMV RG PCR Kit on ette nähtud kasutamiseks koos kliinilise esitlus- ja muude laboratoorsete markeritega CMV-nakkuse raviks haigusriskiga patsientidel.

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit tulemusi tuleb tõlgendada kõigi vastavate kliiniliste ja laboratoorsete leidude kontekstis.

Komplekt *artus* CMV RG PCR Kit ei ole ette nähtud kasutamiseks CMV esinemise sõeluuringuna veres ega veretoodetes ega diagnostilise testina CMV nakkuse olemasolu kinnitamiseks.

Kirjeldus ja põhimõte

Komplekt *artus* CMV RG PCR Kit on kasutusvalmis süsteem CMV DNA tuvastamiseks, kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (Polymerase Chain Reaction, PCR) seadmetel Rotor-Gene Q MDx Instruments. Põhisegu CMV RG Master sisaldab reaktiive ja ensüüme CMV genoomi 105 bp Major Immediate Early Gene (MIE) piirkonna (analüüs on võimeline tuvastama CMV genotüüpe gB1–gB4) spetsiifiliseks amplifitseerimiseks ja spetsiifilise amplikoni otseseks tuvastamiseks Rotor-Gene Q MDx fluorestsentskanalis Cycling Green.

Lisaks sisaldab komplekt *artus* CMV RG PCR Kit teist heteroloogset amplifikatsioonisüsteemi võimaliku PCR-i inhibeerimise tuvastamiseks. See tuvastatakse sisemise kontrollina (Internal Control, IC) Rotor-Gene Q MDx fluorestsentskanalis Cycling Yellow. Tarnitakse välised positiivsed kontrollid (CMV QS 1–4), mis võimaldavad määrata viiruse DNA kogust. Lisateavet leiate jaotisest „Määramine“, lk 22.

Teave haigustekitajate kohta

Inimese tsütomegaloviirust (CMV) leidub nakatunud inimestel veres, kudedes ja peaaegu kõigis sekretoorsetes vedelikes. Nakatumine võib olla oraalsel, seksuaalsel, vereülekande või elundisiirdamise, emakasisesel või perinataalsel viisil (1–4). CMV viirusosakeste hulga testimine on oluline haiguste riski hindamisel, haiguse diagnoosimisel ja ravivastuse jälgimisel (5).


CMV-ga nakatumine viib sageli asümptomaatilise infektsioonini, millele järgneb viiruse eluaegne püsimine kehas. Kui sümptomid ilmnevad teismelistel või täiskasvanutel, sarnanevad need palavikuga mononukleoosi, nõrga hepatiidi ja üldise halva enesetundega (6). Raskeid CMV-nakkuse kulgu on täheldatud eriti emakasisestel nakatunud ja immuunpuudulikkusega patsientidel (4,7).

Protseduuri põhimõte

Patogeeni tuvastamine polümeraasi ahelreaktsiooni (Polymerase Chain Reaction, PCR) abil põhineb patogeeni genoomi spetsiifiliste piirkondade amplifitseerimisel. Real-time PCR-iga tuvastatakse amplifitseeritud produkt fluorestsentsvärvide abil. Need on tavaliselt seotud oligonukleotiidsondidega, mis seonduvad spetsiifiliselt amplifitseeritud produktiga. Fluorestsentsi intensiivsuse jälgimine PCR-i ajal (st reaalsajas) võimaldab akumuleeruvat produkti tuvastada ja kvantifitseerida, ilma et peaks pärast PCR-i käivitamist reaktsioonikatsuteid uuesti avama (8).

Kaasasolevad materjalid

Komplekti sisu

<i>artus</i> CMV RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalooginumber		4503263	4503265
Reaktsioonide arv		24	96
Sinine	CMV RG Master (Taq 0,1 ühikut/ μ l)		2 x 12 reaktsiooni
Kollane	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 μ l
Punane	CMV QS 1 [†] (1 x 104 koopiat/ μ l)	QS	200 μ l
Punane	CMV QS 2 [†] (1 x 103 koopiat/ μ l)	QS	200 μ l
Punane	CMV QS 3 [†] (1 x 102 koopiat/ μ l)	QS	200 μ l
Punane	CMV QS 4 [†] (1 x 101 koopiat/ μ l)	QS	200 μ l
Roheline	CMV RG IC [‡]	IC	1000 μ l
Valge	Water (Vesi) (PCR-klass)		1000 μ l
	Kasutusjuhised		1

* Magneesiumilahus

[†] Kvantifitseerimise standard

[‡] Sisemine kontroll

Vajalikud, kuid mitte kaasasolevad materjalid

Reaktiivid

- DNA eraldamise komplekt (vt „DNA eraldamine“, lk 12)

Kulumaterjalid

- Steriilsed filtritega pipetiotsikud
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, kasutamiseks rootoriga 72-Well Rotor (katalooginr 981103 või 981106)
- **Teise võimalusena:** PCR Tubes, 0.2 ml, kasutamiseks rootoriga 36-Well Rotor (katalooginr 981005 või 981008)

Seadmed

- Pipetid (reguleeritavad)*
- Keerissegisti*
- Lauatsentrifuug* rootoriga 2 ml reaktsioonikatsutitele
- Seadmed Rotor-Gene Q MDx Instruments* fluorestsentskanalitega Cycling Green ja Cycling Yellow
- Rotor-Gene Q tarkvara versioon 2.3.5 või uuem
- Jahutusplokk (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, katalooginr 9018901, või Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, katalooginr 9018905)

* Enne kasutamist veenduge, et seadmed oleksid kontrollitud ja vastavalt tootja soovitudele kalibreeritud.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Ohutusteave

Kemikaalidega töötamise korral kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge vastavate ohutuskaartidega (Safety Data Sheet, SDS). Need on saadaval mugavas ja kompaktses PDF-vormingus veebiaadressil **www.qiagen.com/safety**, kus saate vaadata kõiki QIAGENi komplekti ja selle osade ohutuskaarte ning need välja printida.

Hävitage proovivõtu- ja analüüsijäätmed vastavalt kohalikele ohutusnõuetele.

Ettevaatusabinõud

Kasutaja peaks alati tähelepanu pöörama järgmisele.

- Kasutage filtritega steriilseid pipetiotsikuid.
- Hoidke ja ekstraheerige positiivseid materjale (proovid, positiivsed kontrollid ja amplikonid) kõigist muudest reaktiividest eraldi ja lisage need reaktsioonisegusse ruumiliselt eraldatud rajatises.
- Enne analüüsi alustamist sulatage kõik komponendid hoolikalt toatemperatuuril (15–25 °C).
- Sulanult segage komponendid (korduvalt pipeteerides üles ja alla või pulseerides keerissegistil) ja tsentrifuugige korraks.
- Töötage kiiresti ja hoidke komponente jääl või jahutusplokis (72/96 süvendiga laadimisplokis).

Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit komponente tuleb hoida temperatuuril $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja need on stabiilsed etiketil märgitud kõlblikusaja lõpuni. Vältida tuleks korduvat sulatamist ja külmumist ($> 2\times$), kuna see võib vähendada analüüsi tundlikkust. Kui reaktiive tuleb kasutada vahelduvalt, tuleb need alikvootidena külmutada. Säilitamine temperatuuril $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ei tohiks ületada 5 tundi.

Käsitsemise ja säilitamise näidis

Märkus. Kõiki proove tuleb käsitleda potentsiaalselt nakkusohtliku materjalina.

Märkus. Selle komplekti toimivuse kontrollimiseks läbi viidud analüütilistes uuringutes viidatakse EDTA plasmale kui CMV tuvastamiseks sobivaimale proovimaterjalile. Seetõttu soovime seda materjali kasutada koos komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit.

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit valideerimine on tehtud inimese EDTA plasmaproovide abil. Teisi näidismaterjale ei valideerita. Proovi ettevalmistamiseks kasutage ainult soovitatud nukleiinhappe eraldamise komplekti (vt „DNA eraldamine“, lk 12).

Teatud näidismaterjalide kasutamisel tuleb rangelt järgida konkreetseid juhiseid kogumise, transportimise ja ladustamise kohta.

Proovivõtt

Iga verevõtt põhjustab veresoonte (arterite, veenide või kapillaaride) vigastusi. Kasutada tohib ainult tervet ja steriilset materjali. Verevõtuks peaksid olema saadaval sobivad ühekordsed vahendid. Veenipunktsioonide korral ei tohiks kasutada liiga peeneid kapillaarnõelu. Venosne verevõtt tuleb läbi viia küünarnuki siseosast, käsivarre või käe tagakülje asjakohastes osades. Veri tuleb võtta standardsete proovide kogumiskatsutitesse (punane kork, Sarstedt® või muu tootja samaväärne katsuti). EDTA katsutisse tuleks lisada 5–10 ml verd. Katsutid tuleks segada neid teistpidi keerates pärast proovide kogumist ($8\times$, ärge segage).

Märkus. Hepariniseeritud proove ei tohi kasutada.

Proovi hoiustamine

Täisveri tuleks lahutada plasmaks ja rakukomponentideks, tsentrifugeerides 20 minutit kiirusega 800–1600 × g 6 tunni jooksul (9,10). Eraldatud plasma kantakse steriilsetesse polüpropüleenkatsutisse. Analüüsi tundlikkust saab vähendada, kui proove rutiinselt külmutatakse või säilitatakse pikemat aega.

Proovi transportimine

Proovimaterjali tuleks põhimõtteliselt transportida purunemiskindlas transpordikonteineris. Seega on võimalik proovi lekkest tingitud potentsiaalset nakkusohtu vältida. Proove tuleb transportida vastavalt kohalikule ja riiklikule patogeense materjali transportimise juhendile.*

Proovid tuleks transportida sihtkohta 6 tunni jooksul. Proove ei soovitata hoida seal, kus need on kogutud. Proove on võimalik postiga saata, järgides patogeense materjali transportimise seaduslike juhiseid. Soovitame proovivedu kulleriga. Vereproovid tuleb saata jahutatult (2–8 °C) ja eraldatud plasma sügavkülmutada (–30...–15 °C).

* International Air Transport Association (IATA). Ohtrlike kaupade eeskirjad.

Protseduur

DNA eraldamine

Tabel 1 toodud komplektid ettevõttelt QIAGEN viiruse DNA puhastamiseks valitud inimese proovituüpidest on kinnitatud kasutamiseks komplektiga *artus CMV RG PCR Kit*. Puhastage viiruse DNA vastava komplekti käsiraamatutes antud juhistele.

Tabel 1. Puhastamiskomplektid, mis on kinnitatud kasutamiseks komplektiga *artus CMV RG PCR Kit*

Proovimaterjal	Proovi maht	Nukleiinhappe eraldamiskomplekt	Katalooginumber	Kandur-RNA
EDTA-plasma	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Komplektis
EDTA-plasma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Komplektis

Märkus. Kandur-RNA kasutamine on kriitiline ekstraheerimise efektiivsuse ja sellest tulenevalt DNA/RNA saagise jaoks. Komplektiga QIAamp DSP Virus Kit kaasas oleva kandja RNA stabiilsuse suurendamiseks soovime jätkata vastavalt kandja RNA lahustamise ja säilitamise teabele, mis on toodud komplekti *QIAamp DSP Virus Kit käsiraamatu* jaotises „Reaktiivide ja puhvrite ettevalmistamine“.

Märkus. Komplekti *artus CMV RG PCR Kit* sisemist kontrolli saab kasutada otse eraldamisprotseduuris. Lisage isoleerimisprotseduuri kindlasti üks negatiivne plasmaproov. Sisemiste kontrollide vastav signaal on isolatsiooni hindamise aluseks (vt allpool jaotist „Sisemine kontroll“).

Sisemine kontroll

Sisemine kontroll (CMV RG IC) tarnitakse antud komplektiga. See võimaldab kasutajal kontrollida nii DNA eraldamise protseduuri kui ka võimaliku PCR-i inhibeerimist. Selle rakenduse jaoks lisage sisemine kontroll isoleeritud materjalile suhtega 0,1 µl 1 µl elueerimismahu kohta. Näiteks kasutades komplekti QIAamp DSP Virus Kit, elueeritakse DNA 60 µl elueerimispuhvriga (AVE). Seega tuleks esialgu lisada 6 µl sisemist kontrolli. Kasutatava sisemise kontrolli kogus sõltub ainult elueerimise mahust.

Märkus. Sisemine kontroll ja kandur-RNA (vt jaotist „DNA eraldamine“, lk 12) tuleks lisada ainult lüüsimispuhvri ja proovimaterjali segule või otse lüüsimispuhvriks.

Sisemist kontrolli ei tohi otse proovimaterjalile lisada. Kui see lisatakse lüüsimispuhvriks, pidage meeles, et sisemise kontrolli ja lüüsimispuhvri-kandja-RNA segu tuleb värskest valmistada ja kohe ära kasutada (segu säilitamine toatemperatuuril või külmkapis vaid paar tundi võib viia sisemise kontrolli ebaõnnestumiseni ja vähendatud ekstraheerimise tõhusus).

Märkus. Ärge lisage sisemist kontrolli ega kandur-RNA-d otse proovimaterjalile.

Edukaks puhastamiseks peab puhastamise käigus töödeldud negatiivse plasmaproovi sisemise kontrolli C_T väärtus (QIAamp DSP Virus Kit) jõudma $C_T = 27 \pm 3$ (lävi: 0,03) kasutades seadmeid Rotor-Gene Q Instruments (lisateavet vt lk 25). Toodud jaotus põhineb seadme dispersioonil ja puhastamisel. Suurem kõrvalekalle osutab puhastusprobleemile. Sellisel juhul tuleb puhastust kontrollida ja vajadusel üks kord veel valideerida. Kui teil on lisaküsimusi või kui teil on probleeme, pöörduge QIAGENi tehnilise teenistuse poole.

Valikuliselt saab sisemist kontrolli kasutada ainult PCR võimaliku inhibeerimise kontrollimiseks. Selle rakenduse jaoks lisage sisemine kontroll otse põhisegule CMV RG Master ja lahusele CMV Mg-Sol, nagu on kirjeldatud protokollis etapis 2b (lk 15).

Protokoll: PCR ja andmeanalüüs

Enne alustamist pidage silmas järgmist

- Enne protokolliga alustamist võtke aega seadmega Rotor-Gene Q Instrument tutvumiseks. Lisateavet leiate vastava seadme kasutusjuhendist.
- Veenduge, et iga PCR-analüüsi kohta oleks kaasas vähemalt üks kvantitatiivne standard ja üks negatiivne kontroll (vesi, PCR-klass). Standardkõvera loomiseks kasutage kõiki 4 kaasasolevat kvantifitseerimisstandardit (CMV QS 1–4) iga PCR-analüüsi jaoks.

Mida on vaja teha enne alustamist

- Veenduge, et jahutusplakk (seadme Rotor-Gene Q Instrument lisavarustus) on eeljahutatud temperatuurini 2–8 °C.
- Enne iga kasutamist tuleb kõik reaktiivid täielikult sulatada, segada (korduva üles-alla pipeteerimise või kiire keeristamisega) ja lühikese aja jooksul tsentrifugeerida.

Protseduur

1. Asetage soovitud arv PCR-katsuteid jahutusplaki adapteritesse.
2. Kui kasutate DNA eraldamise protseduuri jälgimiseks ja võimaliku PCR-i inhibeerimise kontrollimiseks sisemist kontrolli, järgige etappi 2a. Kui kasutate sisemist kontrolli ainult PCR-i inhibeerimise kontrollimiseks, järgige etappi 2b.

Märkus. On väga soovitatav lisada kvantitatiivsete standardite jaoks põhisegule CMV RG Master ja lahusele CMV Mg-Sol sisemine kontroll. Kvantitatiivsete standardite jaoks lisage sisemine kontroll otse põhisegule CMV RG Master ja lahusele CMV Mg-Sol, nagu on kirjeldatud protokollis etapis 2b ja kasutage põhisegu iga kvantitatiivse standardi jaoks (CMV QS 1–4).

- 2a. Sisemine kontroll on eraldamisele juba lisatud (vt jaotist *Sisemine kontroll*, lk 13). Sel juhul valmistage põhisegu vastavalt tabelile 2 (järgmine lk).
Reaktsioonisegu sisaldab tavaliselt kõiki PCR-i jaoks vajalikke komponente, välja arvatud proov.

Tabel 2. Põhisegu valmistamine (sisemine kontroll, mida kasutatakse DNA eraldamise jälgimiseks ja PCR-i inhibeerimise kontrollimiseks)

Proovide arv	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Lõppmaht	30 µl	360 µl

2b. Sisemine kontroll tuleb lisada otse põhisegule CMV RG Master ja lahusele CMV Mg-Sol. Sel juhul valmistage põhisegu vastavalt tabelile 3.

Reaktsioonisegu sisaldab tavaliselt kõiki PCR-i jaoks vajalikke komponente, välja arvatud proov.

Tabel 3. Põhisegu valmistamine (sisemist kontrolli kasutatakse ainult PCR-i inhibeerimise kontrollimiseks)

Proovide arv	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Lõppmaht	32 µl*	384 µl*

*PCR-analüüsi ettevalmistamisel eiratakse sisemise kontrolli lisamisega põhjustatud mahu suurenemist. Tuvastamissüsteemi tundlikkust ei kahjustata.

3. Pipeteerige igasse PCR-katsutisse 30 µl põhisegu, seejärel lisage 20 µl elueeritud proovi DNA-d (vt tabel 4). Vastavalt tuleb positiivse kontrollina kasutada 20 µl vähemalt ühte kvantifitseerimise standardit (CMV QS 1–4) ja negatiivse kontrollina 20 µl vett (vesi, PCR-klass).

Tabel 4. PCR-analüüsi ettevalmistamine

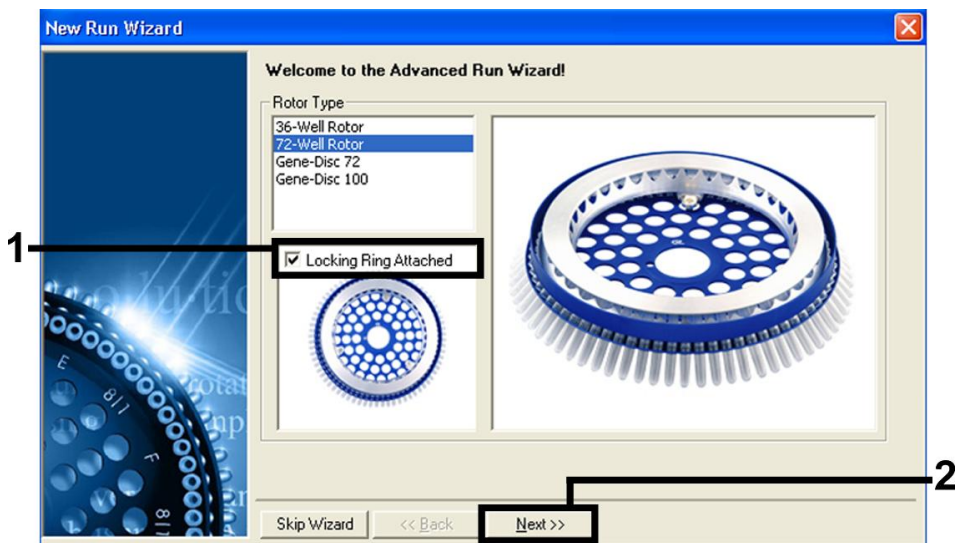
Proovide arv	1	12
Põhisegu	30 µl	30 µl iga
Proov	20 µl	20 µl iga
Lõppmaht	50 µl	50 µl iga
Proovide arv	1	12

4. Sulgege PCR-katsutid. Veenduge, et lukustusrõngas (seadme Rotor-Gene tarvik) asub rootori peal, et vältida katsutite avanemist analüüsi ajal.
5. CMV DNA tuvastamiseks looge järgmiste etappide abil temperatuuriprofiil.

Üldiste analüüsiparameetrite seadmine	Joonis 1, joonis 2 ja joonis 3
Hot-starti ensüümi algne aktiveerimine	Joonis 4
DNA amplifikatsioon (touchdown PCR)	Joonis 5
Fluorestsentskanali tundlikkuse kohandamine	Joonis 6
Töotsükli käivitamine	Joonis 7

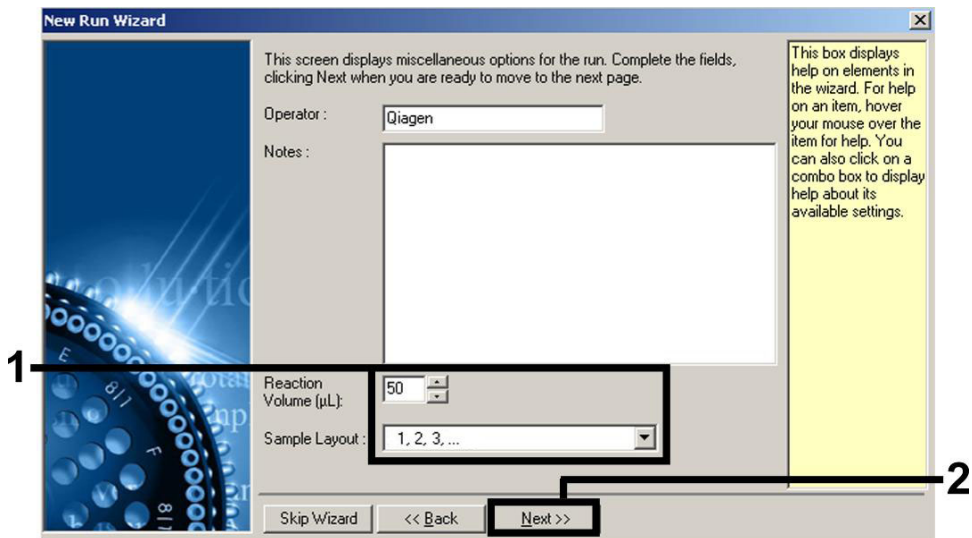
Kõik tehnilised andmed vastavad Rotor-Gene Q tarkvaraversioonile 2.3.5 või uuem. Lisateavet seadmete Rotor Gene programmeerimise kohta leiate vastava seadme kasutusjuhendist. Illustratsioonides on need sätted paksu musta raamiga esile toodud. Illustratsioonid on seadmega Rotor-Gene Q Instruments kaasas.

6. Avage dialoogiaken **New Run Wizard** (Uus käivitusviisard) (joonis 1, järgmine lk). Märkige ruut **Locking Ring Attached** (Lukustusrõngas kinnitatud) ja klõpsake nuppu **Next** (Edasi).



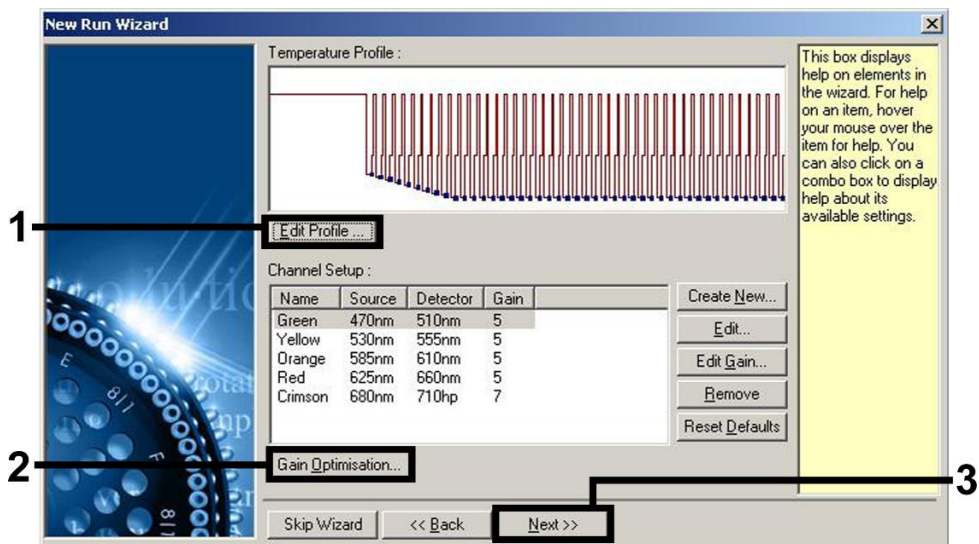
Joonis 1. Dialoogiboks New Run Wizard (Uue tööseeria viisard).

7. Valige PCR reaktsiooni mahu jaoks 50 ja klõpsake nuppu **Next** (Edasi) (joonis 2).

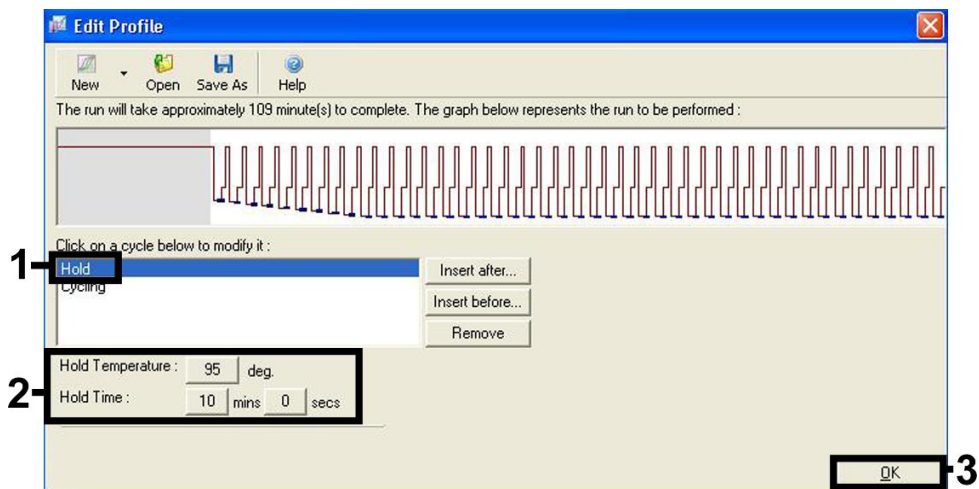


Joonis 2. Üldiste analüüsiparameetrite seadmine.

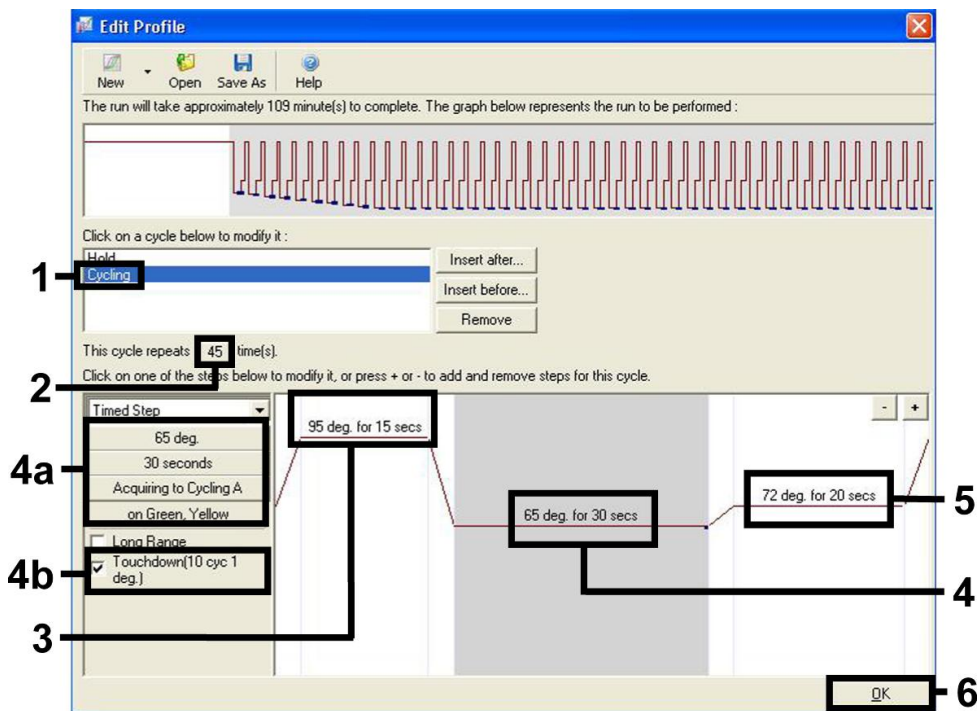
8. Klõpsake dialoogiboksis **New Run Wizard** (Uue tööseeria viisard) nuppu **Edit Profile** (Redigeeri profiili) (joonis 3) ning programmeerige temperatuuriprofiil joonisel 3 ja joonisel 5 kirjeldatud juhiste järgi).



Joonis 3. Profili redigeerimine.

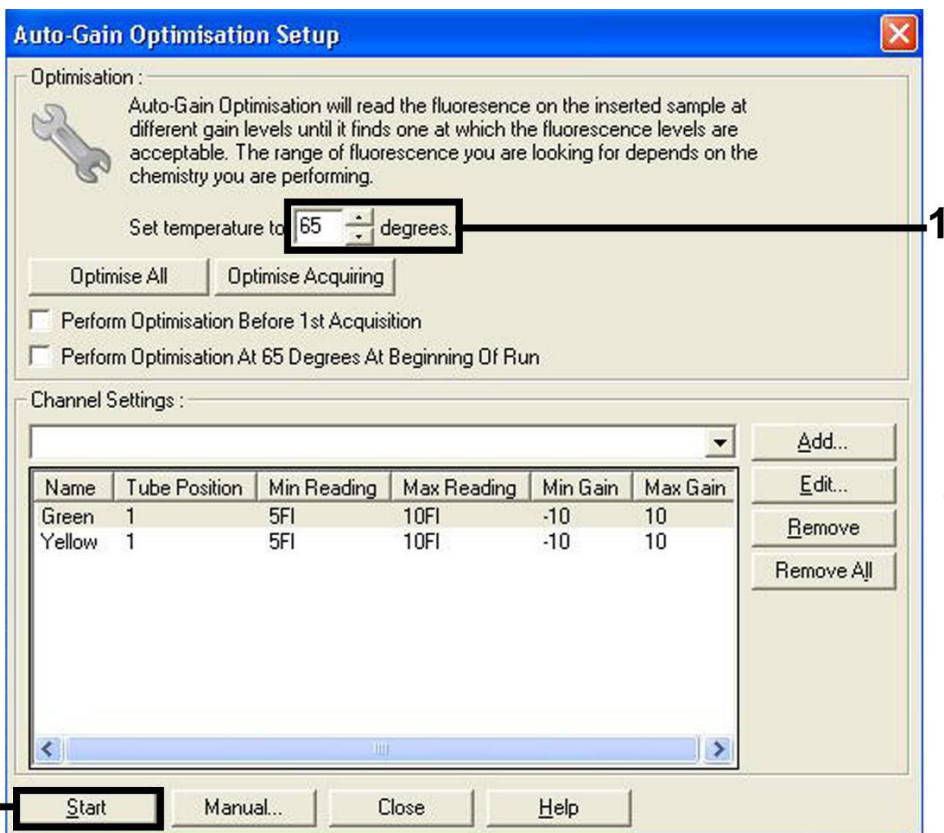


Joonis 4. Hot-starti ensüümi algne aktiveerimine.



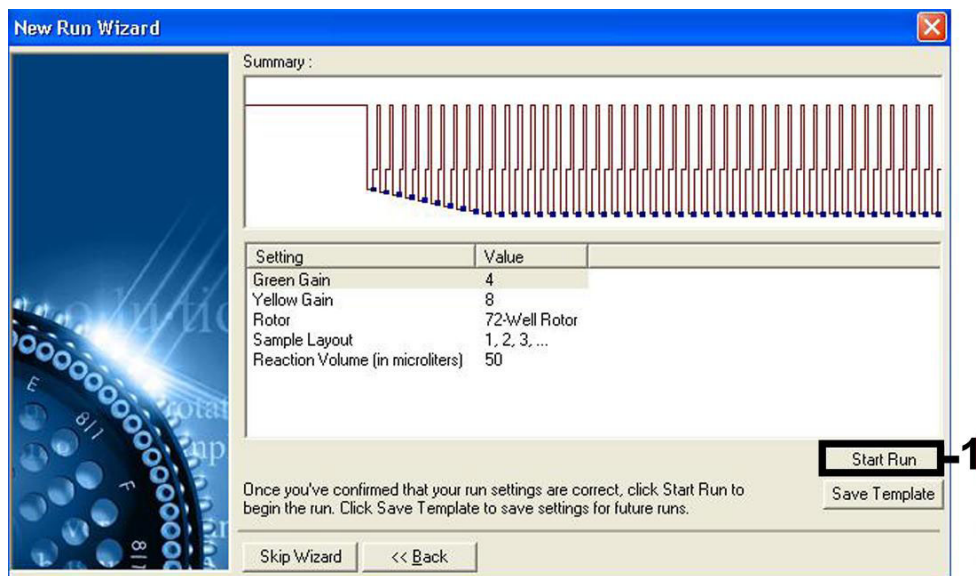
Joonis 5. DNA amplifitseerimine. Veenduge, et touchdowni funktsioon on aktiveeritud anniilimisetapi 10 tsüklis.

9. Fluorestsentskanalite tuvastamisvahemik tuleb määrata vastavalt PCR-katsutite fluorestsentsi intensiivsustele. Dialoogiboksi **Auto-Gain Optimisation Setup** (Automaatse kogumise optimeerimise seadistamine) avamiseks klõpsake dialoogiboksis **New Run Wizard** (Uue tööseeria viisard) (vt joonis 3, eelmine lk) olevat nuppu **Gain Optimisation** (Optimeeri kogumist). Seadke kalibreerimistemperatuur väärtusele 65 °C, et see sobiks amplifitseerimisprogrammi anniilimistemperatuuriga (joonis 6, järgmine lk).



Joonis 6. Fluorestsentskanali tundlikkuse kohandamine.

10. Kanali kalibreerimisega määratud väärtused salvestatakse automaatselt ning kuvatakse programmeerimistoimingu viimases menüüaknas (joonis 7, järgmine lk). Klõpsake nuppu **Start Run** (Käivita tööseeria)



Joonis 7. Töotsükli käivitamine

Tulemuste tõlgendamine

Määramine

Lisatud kvantitatiivseid standardeid (CMV QS 1–4) töödeldakse samal moel ja samas mahus (20 µl) kui varem puhastatud proove kasutatakse otse PCR-analüüsi jaoks (edasine ekstraheerimine pole vajalik). Standardkõvera loomiseks seadmetel Rotor-Gene Q Instruments tuleb kasutada kõiki 4 kvantitatiivset standardit ja defineerida need dialoogiboksis **Edit Samples** (Proovide redigeerimine) kui standardid konkreetsete kontsentratsioonidega (vt vastava seadme kasutusjuhendit).

Märkus. Täpse kvantifitseerimise tagamiseks on väga soovitatav lisada kvantitatiivsete standardite jaoks kasutatav põhisegusse CMV RG Master ja lahusesse CMV Mg-Sol sisemine kontroll. Selle rakenduse jaoks lisage sisemine kontroll otse põhisegule CMV RG Master ja lahusele CMV Mg-Sol, nagu on kirjeldatud protokollis etapis 2b (lk 15) ja kasutage seda põhisegu iga kvantitatiivse standardi jaoks (CMV QS 1–4).

Märkus. Kvantitatiivsed standardid on defineeritud kui koopiat/µl. Standardkõvera abil määratud väärtuste konverteerimiseks nii, et neid saaks esitada suhtarvuna koopiat/ml proovimaterjali kohta, tuleb rakendada järgmist võrrandit.

$$\text{Tulemus} \left(\frac{\text{koopiat}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{tulemus (koopiat/}\mu\text{l)} \times \text{elutsiooni maht (}\mu\text{l)}}{\text{proovi maht (ml)}}$$

Põhimõtteliselt tuleb ülaltoodud võrrandisse sisestada algne proovi maht. Seda tuleb silmas pidada, kui proovi mahtu on muudetud enne nukleiinhappe ekstraheerimist (nt mahtu on tsentrifuugimise teel vähendatud või eraldamiseks vajamineva mahu saavutamiseks on proovi mahtu suurendatud).

Märkus. Kvantitatiivsed standardid on kalibreeritud vastavalt inimese tsütomegaloviiruse 1. rahvusvahelisele standardile (NIBSC kood: 09/162), nagu on kindlaks määranud Maailma Terviseorganisatsioon (WHO).

Koopiat/ml teisendamiseks RÜ/ml pidades silmas komplekti QIAamp DSP Virus Kit tehke järgmist.

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

Märkus. QIAampi töövoos peavad kvantifitseeritud proovid jääma QS lineaarsesse vahemikku 1×10^1 kuni 1×10^4 koopiat/ μ l. Kvantiteeti ei saa tagada väljaspool seda vahemikku.

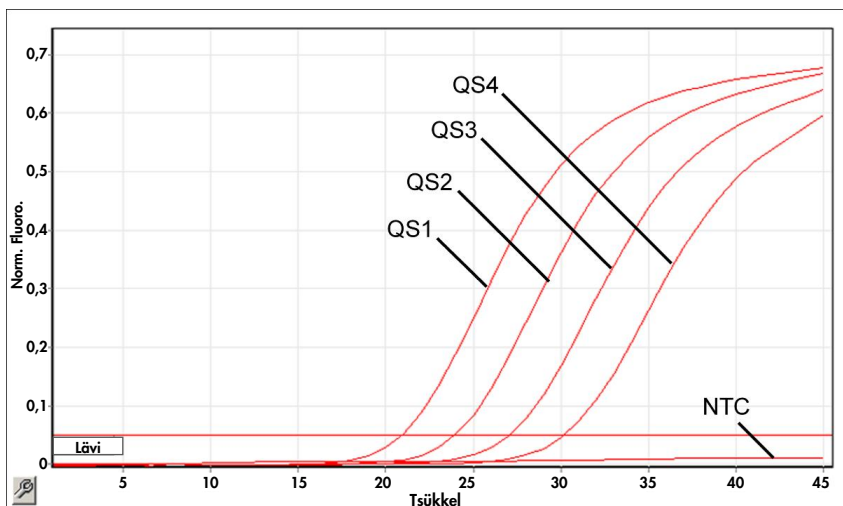
Koopiat/ml teisendamiseks RÜ/ml, võttes arvesse EZ1 Advanced XL seadme komplekti EZ1 DSP Virus Kit, tehke järgmist.

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

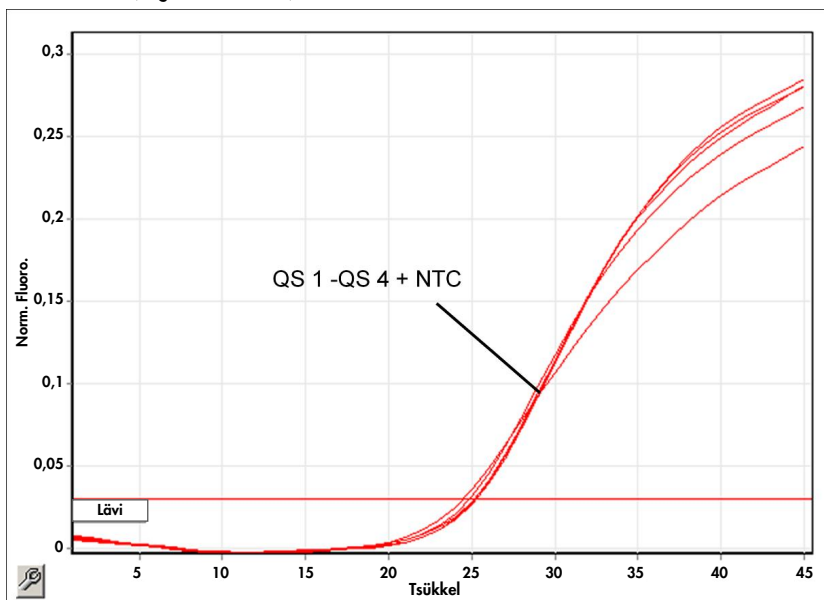
Märkus. EZ1 töövoos peavad kvantifitseeritud proovid jääma lineaarsesse vahemikku $3,16E+02$ kuni $1,00E+08$ koopiat/ml. Kvantiteeti ei saa tagada väljaspool seda vahemikku.

Tulemused

Positiivsete ja negatiivsete PCR-reaktsioonide näited on toodud joonisel 8 ja joonisel 9 (järgmine lk).



Joonis 8. Kvantitatiivsete standardite (CMV QS 1–4) tuvastamine fluorestsentskanalis Cycling Green. NTC: matriitsita kontroll (negatiivne kontroll).



Joonis 9. Sisemise kontrolli (IC) tuvastamine fluorestsentskanalis Cycling Yellow koos kvantitatiivsete standardite samaaegse amplifitseerimisega (CMV QS 1–4). NTC: matriitsita kontroll (negatiivne kontroll).

Signaal tuvastatakse fluorestsentskanalis Cycling Green.

Analüüsi tulemus on positiivne: proov sisaldab CMV DNA-d.

Sellisel juhul pole signaali tuvastamine kanalis Cycling Yellow vajalik, sest CMV DNA algsed suured kontsentratsioonid (positiivne signaal kanalis Cycling Green) võivad põhjustada sisemise kontrolli fluorestsentssignaali vähenemist või kadu kanalis Cycling Yellow (konkurents).

Signaali fluorestsentskanalis Cycling Green ei tuvastata. Samas on tuvastatav sisemise kontrolli signaal kanalis Cycling Yellow.

CMV DNA pole proovis tuvastatav. Tulemuse võib lugeda negatiivseks.

Negatiivse CMV PCR-i puhul välistab tuvastatud sisemise kontrolli signaal PCR-i inhibeerimise võimaluse.

Kanalites Cycling Green ega Cycling Yellow ei ole signaal tuvastatav.

Tulemust ei ole võimalik määrata.

Teavet võimalike vigade allikate ja lahenduste kohta võib leida jaotises „Tõrkeotsingjuhend“ lk 41.

Kvaliteedikontroll

QIAGEN-i ISO sertifikaadiga kvaliteedihalduse süsteemi kohaselt on iga komplekti *artus* CMV RG PCR Kit partiid testitud eelnevalt määratud nõuete kohaselt, et tagada toote ühtlane kvaliteet.

Piirangud

Kõik reagentid on kasutamiseks ainult *in vitro* diagnostikas.

Toodet võib käsitseda spetsiaalselt *in vitro* diagnostika protseduuride kohta väljaõppe saanud personal.

Optimaalsete PCR-i tulemuste saavutamiseks on tähtis vastava seadme kasutusjuhendis välja toodud juhiste range järgimine.

Pöörake tähelepanu karbile ja komponentide siltidele prinditud kõlblikkusajale. Ärge kasutage kõlblikkusaja ületanud komponente.

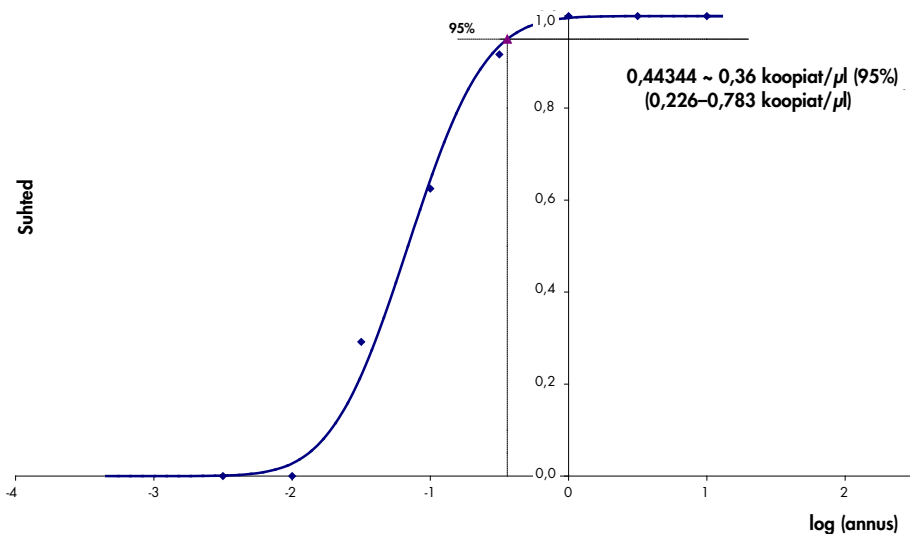
Harvaesinevad mutatsioonid viiruse genoomi suurel määral konserveerunud piirkondades, mis kattuvad komplekti praimerite ja/või sondide järjestustega, võivad tekitada olukorra, kus nõrga signaali tõttu viiruse sisaldust alahinnatakse või signaali puudumisel viiruse tuvastamine ebaõnnestub. Analüüsi ülesehituse kehtivust ja toimivust hinnatakse korrapäraste ajavahemike tagant.

Sooritusnäitajad

Analüütiline tundlikkus

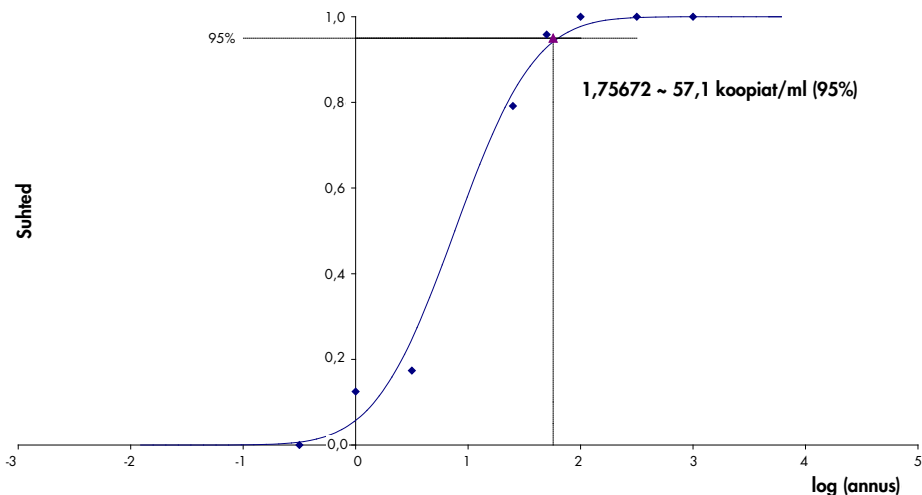
Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit puhul hinnati nii puhastamise analüütilist avastamiskiiri kui ka analüütilist avastamiskiiri (tundlikkuse piirid). Analüütiline avastamiskiir puhastamisel arvestatakse CMV-positiivsete kliiniliste proovidega kasutades konkreetset ekstraheerimismeetodit. Seevastu määratakse analüütiline avastamiskiir valitud ekstraksioonimeetodist sõltumatult kasutades teadaoleva kontsentratsiooniga CMV DNA-d.

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit analüütilise tundlikkuse määramiseks loodi CMV genoomse DNA lahjendusrida vahemikus 10 kuni 0,00316 koopiat/ μ l ja analüüsiti seadmetel Rotor-Gene Instruments koos komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit. Testimine viidi läbi 3 erineval päeval 8 kordusega. Tulemused määrati probit-analüüsiga. Rotor-Gene 6000 probit-analüüsi graafiline illustatsioon on toodud joonisel 10 (järgmine lk). Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit analüütilise tuvastamise piir koos seadmetel Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 ja Rotor-Gene 3000 on vastavalt 0,36 koopiat/ μ l ($p = 0,05$) ja 0,24 koopiat/ μ l ($p = 0,05$). See tähendab, et 95% tõenäosusega tuvastatakse 0,36 koopiat/ μ l või 0,24 koopiat/ μ l.



Joonis 10. Probit-analüüs: CMV (Rotor-Gene 6000). Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit analüütiline tundlikkus seadmel Rotor-Gene 6000.

Seadmetel Rotor-Gene Instruments kasutatava komplekti *artus* CMV RG PCR Kit puhastamise (QIAamp DSP Virus Kit) analüütiline tundlikkus määrati kliiniliste plasmaproovidega seotud CMV viirusmaterjalist lahjendussarjaga 1000 kuni 0,316 CMV koopiat/ml. Neile tehti DNA ekstraheerimine, kasutades QIAamp DSP Virus Kit komplekti (ekstraheerimismaht: 0,5 ml, elueerimismaht: 60 μl). Kõiki 8 lahjendust analüüsiti komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit 3 erineval päeval 8 kordusel. Tulemused määrati probit-analüüsiga. Probit-analüüsi graafiline illustatsioon on toodud joonisel 11 (järgmine lk). Analüütiline avastamispiir komplekti *artus* CMV RG PCR Kit puhastamisel koos Rotor-Gene 3000 seadmega on 57,1 koopiat/ml ($p = 0,05$). See tähendab, et 95% tõenäosusega tuvastatakse 57,1 koopiat/ml.



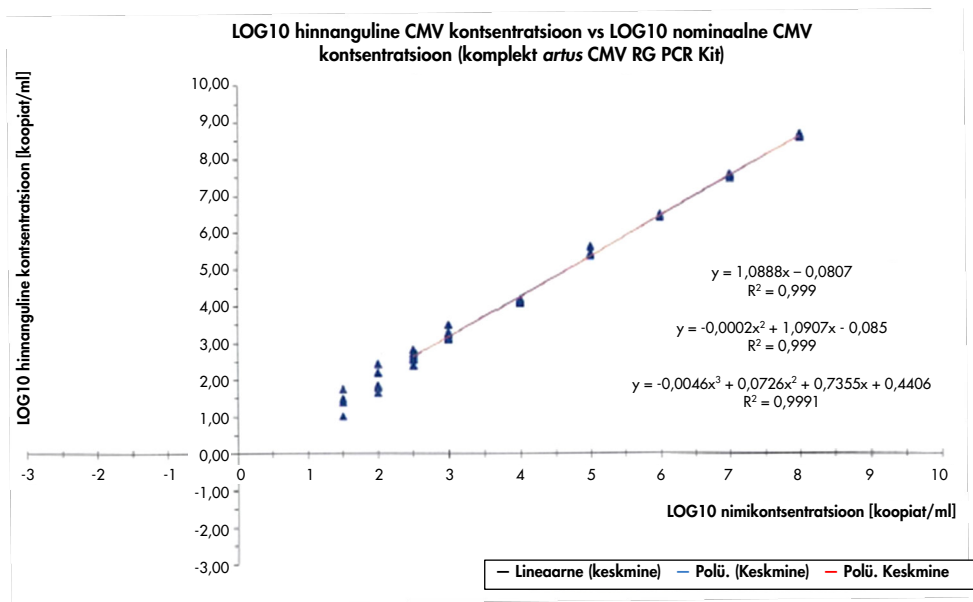
Joonis 11. Probit-analüüs: CMV (Rotor-Gene 3000). Analüütiline tundlikkus, võttes arvesse Rotor-Gene 3000 komplekti artus CMV RG PCR Kit puhastamist (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN).

Analüüsitundlikkus komplekti EZ1 DSP Virus Kit puhastamisel (ekstraheerimismaht: 0,4 ml, elueerimismaht: 60 µl), kasutades komplekti artus CMV RG PCR Kit EZ1 Advanced XL seadet Rotor-Gene 6000 68,75 koopiat/ml ($p = 0,05$). See tähendab, et 95% tõenäosusega tuvastatakse 68,75 koopiat/ml.

Lineaarvahemik

Komplekti EZ1 DSP Virus Kit puhastamise lineaarvahemik (ekstraheerimismaht: 0,4 ml, elueerimismaht: 60 µl) määrati EZ1 Advanced XL seadme abil, testides 4 kuni 6 CMV viiruse materjali replikatsiooni lahjendusseries 3,16E+01 kuni 1,00E+08 koopiat/ml.

Probit-analüüsi graafiline illustratsioon on toodud joonisel 12 (järgmine lk).



Joonis 12. Komplekti artus CMV RG PCR Kit andmekogumi polünoomne regressioon, pidades silmas puhastamist (komplekt EZ1 DSP Virus Kit) EZ1 Advanced XL seadmel. Lisatud on lineaar-, ruut- ja kuupregressioonimudelid.

Komplekti artus CMV RG PCR Kit lineaarvahemik, pidades silmas puhastamist komplektiga EZ1 DSP Virus Kit (ekstraheerimismaht: 0,4 ml, elueerimismaht: 60 µl), kasutades EZ1 Advanced XL seadet, on 3,16E+02 kuni 1,00E+08 koopiat/ml.

Märkus. Komplekti artus CMV RG PCR Kit lineaarvahemik, pidades silmas puhastamist komplektiga QIAamp DSP Virus Kit (ekstraheerimismaht: 0,4 ml, elueerimismaht: 60 µl), on 1,00E+01 kuni 1,00E+04 koopiat/µl.

Spetsiifilisus

Komplekti artus CMV RG PCR Kit spetsiifilisus tagatakse ennekõike praimerite ja sondide valikuga, samuti rangete reaktsioonitingimuste valimisega. Praimereid ja sonde kontrolliti võimalike homoloogiate suhtes kõigi avaldatud järjestustega geenipankades järjestuste võrdluse analüüsi abil. Seega on tagatud kõigi asjakohaste tüvede tuvastatavus.

Lisaks valideeriti spetsiifilisus 100 erineva CMV-negatiivse plasmaprooviga. 99 neist proovidest ei genereerinud signaale CMV-spetsiifiliste praimerite ega sondidega, mis sisalduvad põhisegus CMV RG Master.

Märkus. 1 proov, mis genereeris signaali CMV-spetsiifiliste praimeritega ja sondidega, mis testisid CMV positiivseks komplektidega *artus* CMV LC ja TM RG PCR Kit. 100 üksiku doonoriproovi testimisel põhinev lõplik spetsiifilisus kinnitati 99,00% (99/100).

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit võimalikku ristreaktiivsust testiti tabelis 5 loetletud kontrollrühma abil. Ükski testitud patogeen ei ole olnud reaktiivne. Segainfektsioonide korral ei ilmnenud ristreaktiivsust.

Tabel 5. Komplekti spetsiifilisuse testimine potentsiaalselt ristreaktiivsete patogeenidega

Kontrollrühm	CMV (Cycling Green or Cycling A.FAM) (Tsükel Roheline või Tsükel A.FAM)	Sisemine kontroll (Cycling Yellow or Cycling A.JOE) (Tsükel Kollane või Tsükel A.JOE)
Inimese herpesviirus 1 (lihterpeseviiruse 1. tüüp)	–	+
Inimese herpesviirus 2 (lihterpeseviiruse 2. tüüp)	–	+
Inimese herpesviirus 3 (Varicella-zoster viirus)	–	+
Inimese herpesviirus 4 (Epstein-Barri viirus)	–	+
Inimese herpesviirus 6A	–	+
Inimese herpesviirus 6B	–	+
Inimese herpesviirus 7	–	+
Inimese herpesviirus 8 (Kaposi sarkoomiga seotud herpesviirus)	–	+
A-hepatiit	–	+
B-hepatiit	–	+
C-hepatiit	–	+

(jätkub järgmisel leheküljel)

Tabel 5 (tabeli algus eelmisel leheküljel)

Kontrollrühm	CMV (Cycling Green or Cycling A.FAM) (Tsükkel Roheline või Tsükkel A.FAM)	Sisemine kontroll (Cycling Yellow or Cycling A.JOE) (Tsükkel Kollane või Tsükkel A.JOE)
HIV 1	–	+
Inimese T-raku leukeemia viirus 1	–	+
Inimese T-raku leukeemia viirus 2	–	+
Lääne-Niiluse viirus	–	+
Enteroviirus	–	+
Parvoviirus B19	–	+

Täpsus

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit täpsusandmed on kogutud seadmete Rotor-Gene Instruments abil ja need võimaldavad määrata analüüsi kogu dispersiooni. Kogu dispersioon koosneb analüüsisisestest varieeruvustest (sama kontsentratsiooniga proovide mitme tulemuse varieeruvus ühe analüüsi jooksul), analüüsivahelisest varieeruvusest (erinevate kasutajate poolt sama tüüpi, aga erinevatel seadmetel loodud analüüsi mitme tulemuse varieeruvus ühe labori piires) ja partiidevahelisest varieeruvusest (analüüsi mitme tulemuse varieeruvus erinevate partiidega). Saadud andmeid kasutati patogeeni spetsiifilise ja sisemise kontrolli PCR standardhälbe, dispersiooni ja variatsioonikordaja määramiseks.

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit täpsusandmed koguti madalaima kontsentratsiooni (QS 4; 10 koopiat/ μ l) kvantitatiivse standardi abil. Analüüs oli teostatud 8 replikandiga. Täpsusandmed arvutati amplifitseerimise kõverate C_T -väärtuste põhjal (C_T : läve tsükkel, vt tabel 6, järgmine lk). Lisaks määrati kvantitatiivsete tulemuste täpsusandmed koopiat/ μ l kohta, kasutades vastavaid C_T -väärtusi (vt tabel 7, järgmine leht). Nende tulemuste põhjal on mis tahes antud proovi ja nimetatud kontsentratsiooni statistiline levik 1,21% (C_T) või 14,38% (kontsentratsioon) ja 1,93% (C_T) sisemise kontrolli tuvastamiseks. Need väärtused põhinevad kindlaksmääratud muutujate kõigi üksikute väärtuste koguarvul.

Tabel 6. Täpsusandmed C: väärtuste põhjal

	Standardhälve	Dispersioon	Variatsioonikordaja (%)
Analüüsisisene varieeruvus: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Analüüsisisene varieeruvus: Sisemine kontroll	0,31	0,10	1,16
Analüüsidevaheline varieeruvus: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Analüüsidevaheline varieeruvus: Sisemine kontroll	0,47	0,22	1,77
Partiidevaheline varieeruvus: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Partiidevaheline varieeruvus: Sisemine kontroll	0,53	0,28	2,02
Kogu dispersioon: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Kogu dispersioon: Sisemine kontroll	0,51	0,26	1,93

Tabel 7. Täpsusandmed kvantitatiivsete tulemuste põhjal (koopiat/µl)

	Standardhälve	Dispersioon	Variatsioonikordaja (%)
Analüüsisisene varieeruvus: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Analüüsidevaheline varieeruvus: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Partiidevaheline varieeruvus: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Kogu dispersioon: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Segavad ained

CMV DNA lisati negatiivsesse plasmasse erinevates kaubanduslikult kättesaadavates vere kogumissüsteemides koos erinevate antikoagulantidega. Arvutatud kontsentratsioon (koopiat/ml, C_T keskmine, standardhälve, dispersioon ja CV%) on toodud tabelis 8. Standardhälve ja dispersioonikordaja jäävad 5% piiridesse ja seega tolerantsivahemikku. Erinevate ainete mõju PCR-ile olulist ei tuvastatud.

Tabel 8. Kaubanduslikud verekogumissüsteemid ja antikoagulandid

Aine	Kontsentratsioon (koopiat/ml)	C_T keskmine	C_T standardhälve	C_T dispersioon	C_T CV (%)
Kaalium-EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Kaalium-EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Kaalium-EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Kaalium-EDTA, Springe (referents)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Kaalium-EDTA, Sarstedt (referents)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Kaalium-EDTA (rasedus)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Endogeensed ained (tabel 9, järgmine lk) lisati CMV-positiivsete EDTA plasmaproovidesse 3 x LOD ja 10 x LOD juures. Kõik proovid tuvastati edukalt ja endogeensete inhibiitorite (bilirubiin, hemoglobiin, triglütseriid ja albumiin) kõrge sisaldusega proovide puhul ei täheldatud häiret.

Tabel 9. Analüüsitud endogeensed ained

Segavad ained	Segavate ainete kontsentratsioon
Bilirubiin	30 mg/dl
Hemoglobiin	2 g/dl
Triglütseriid	1 g/dl
Albumiin	6 g/dl

Siirdamiskeskonnas kasutatavaid levinud ravimeid testiti pärast ravimi manustamist 3-kordse kõrgeima kontsentratsiooniga nagu soovitati CLSI® juhendis EP07-A2 (11) (vt tabelit 10). Kõik need ained lisati nii CMV-negatiivsetesse kui ka CMV-positiivsetesse proovidesse, mida testiti 4 korduses.

Kõik testitud eksogeensed ained ei näidanud olulist mõju komplekti *artus* CMV RG PCR Kit toimimisele.

Tabel 10. Eksogeensete ainetena testitud ravimite loetelu

Segavad ained	Testkontsentratsioon
Antibiootikumid	
Sulfametoksasool	200 mg/l
Trimethoprim	5,2 mg/l
Claforan® (Tsefotaksiim)	1 g/l
Tazobac® (piperatsilliin + tasobaktaam)	Piperatsilliin 1 g/l Tasobaktaam, 125 mg/l
Tikartsilliin	1 g/l
Augmentin® (amokitsilliin + klavulaanhape)	Amokitsilliin: 125 mg/l Klavulaanhape: 25 mg/l
Vankomütsiin	125 mg/l
Seenevastane	
Flukonasool	1 mg/l
Immunosupressiivsed ravimid	
Rapamütsiin	100 mg/l
Mükofenolaatnaatrium	80 mg/l

Vastupidavus

Vastupidavuse kontrollimine võimaldab määrata komplekti *artus* CMV RG PCR Kit kõikide ebaõnnestumiste määra. 100 CMV negatiivset plasmaproovi lisati CMV-ga lõppkontsentratsioonil 170 koopiat/ml (umbes kolmekordse analüütilise tundlikkuse piiri kontsentratsioon). Pärast ekstraheerimist komplektiga QIAamp DSP Virus Kit analüüsiti neid proove komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit. Kõigi CMV proovide puhul oli rikke protsent 0%. Lisaks hinnati sisemise kontrolli usaldusväärsust 100 CMV-negatiivse plasmaproovi puhastamise ja analüüsimisega. Seega on komplekt *artus* CMV RG PCR Kit vastupidavus $\geq 99\%$.

Reprodutseeritavus

Reprodutseeritavuse andmed võimaldavad komplekti *artus* CMV RG PCR Kit regulaarset toimivuse hindamist ning tõhususe võrdlust teiste toodetega. Need andmed saadakse osalemisel kehtestatud tasemeprogrammides.

Lisaks osalemisele kehtestatud tasemeõppeprogrammides testiti kolmes välises laboris 10-liikmelist CMV paneeli (tabel 11), kasutades nukleiinhappe puhastamiseks EZ1 Advanced XL seadmel olevat komplekti EZ1 DSP Virus Kit ja DNA eluaadi testimiseks komplekti *artus* RG PCR Kit.

Tabel 11. CMV paneeli liikmete kokkuvõte

Paneeli number (paneeliliikme tüüp)	Paneeli liige	Lahjendusefekt
1001 (1)	Negatiivne	Negatiivne kogum 1
1002 (1)	Negatiivne	Negatiivne kogum 2
1003 (2)	Tugevalt negatiivne	50% positiivne
1004 (2)	Tugevalt negatiivne	50% positiivne
1005 (3)	Nõrgalt positiivne	200 koopiat/ml
1006 (3)	Nõrgalt positiivne	200 koopiat/ml
1007 (4)	Mõõdukalt positiivne	2000 koopiat/ml
1008 (4)	Mõõdukalt positiivne	2000 koopiat/ml
1009 (5)	Tugevalt positiivne	200 000 koopiat/ml
1010 (5)	Tugevalt positiivne	200 000 koopiat/ml

10-liikmelist paneeli testiti kahes eksemplaris 2 erineva kasutaja poolt iga päev 6 päeva jooksul igas kohas 3 reaktiivikomplekti partiiga. Seetõttu võrdub 20 valimit, korrutades 2 kasutaja 6 päeva jooksul 3 saidil, 720 andmepunkti.

Leiti, et testi *artus CMV RGQ MDx* täisreprodutseeritavus oli $\leq 12\%$ CV proovide puhul, mille kontsentratsioon oli vahemikus 200 koopiat/ml kuni 200 000 koopiat/ml (tabel 12).

Tabel 12. Üldine kokkuvõte (iga paneeliliikme tüüp) – täheldatud keskmised

panel_member_type	Uuringute arv	Keskmine	Mediaan	Standardhälve	CV%	Minimaalne
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

Log₁₀ RÜ/ml väärtuste dispersiooniprotsentide ja standardhälbe üldine kokkuvõte kõigi viie paneeli kohta kogu partii, saidi, kasutaja, päeva, katse vahel ja jooksul on esitatud tabelis 13 (järgmine lk).

Tabel 13. Üldine dispersiooni ja standardhälbe kokkuvõte

Proov	1	2	3	4	5	
Proovitüüp	negatiivne	tugevalt negatiivne	nõrgalt positiivne	mõõdukalt positiivne	tugevalt positiivne	
Jälgitud keskmine log10 RÜ/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Katsete arv	144	144	144	144	144	
Mõõdik	%dispersioon Sh					
Dispersioonikomponent	Partii	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	Kasutuskoht	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	Kasutaja	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	Päev	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	Tööseeriade vahel	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	Tööseeriade ajal	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	Kokku	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

Diagnostiline hindamine

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit hinnati uuringus, milles võrreldi komplekti *artus* CMV RG PCR Kit testiga COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Analüüsiti 156 retrospektiivset ja tulevast kliinilist EDTA plasmaproovi. Kõiki proove oli eelnevalt analüüsitud positiivseks või negatiivseks, kasutades rutiinseks diagnostikaks COBAS AMPLICOR CMV MONITOR seadet.

CMV DNA komplekti *artus* CMV RG PCR Kit testimiseks eraldati komplekti QIAamp DSP Virus Kit abil, eraldamisele lisati komplekti *artus* CMV RG PCR Kit sisemine kontroll ja analüüs viidi läbi seadme Rotor-Gene 3000 abil. Testi COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test proovid töödeldi ja analüüsiti pakendi infolehes antud tootja juhiste kohaselt.

Kõik 11 proovi, mis said testiga COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test positiivse tulemuse, andsid positiivse tulemuse ka komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit. 123 proovist 145-st, mis olid negatiivsed testiga COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test, olid negatiivsed ka komplektiga *artus* CMV RG PCR Kit. Saadi 22 vastuolulist tulemust (tabel 14).

Tabel 14. Võrdleva valideerimisuuringu tulemused

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

Kui võtta aluseks testi COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test tulemused, on kõigi komplekti *artus* CMV RG PCR Kit proovide diagnostiline tundlikkus 100% ja diagnostiline spetsiifilisus 84,8%.

22 ebakõlaga proovi edasine testimine kinnitas komplektide *artus* PCR Kit tulemusi. Seetõttu võib eeldada, et lahknevus põhineb komplekti *artus* CMV RG PCR Kit suuremal tundlikkusel.

Viited

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. *J. Clin. Virol.* **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).

Tõrkeotsingujuhend

See tõrkeotsingujuhend võib olla abiks tekkinud probleemide lahendamisel. Lisateabe saamiseks vaadake meie tehnilise toe veebilehel olevat korduma kippuvate küsimuste lehte: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Kommentaariid ja ettepanekud

Positiivsete kontrollide (CMV QS 1–4) signaal fluorestsentskanalis Cycling Green puudub

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) PCR-i andmeanalüüsiks valitud fluorestsentskanal ei vasta protokollile | Andmeanalüüsiks valige analüütilise CMV PCR-i korral fluorestsentskanal Cycling Green ja sisemise kontrolli PCR-i jaoks fluorestsentskanal Cycling Yellow. |
| b) Seadme Rotor-Gene Instrument temperatuuriprofiili ebakorrektno programmeerimine | Võrrelge temperatuuriprofiili protokolliga. Vt jaotist „Protokoll: PCR ja andmeanalüüs”, lk 14. |
| c) PCR-i ebakorrektno konfiguratsioon | Kontrollige töötetappide pipeteerimisskeemi ja vajaduse korral korrake PCR-i. Vt jaotist „Protokoll: PCR ja andmeanalüüs”, lk 14. |
| d) Komplekti ühe või rohkema komponendi säilitamistingimused ei vasta juhistele jaotises „Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine”, lk 10) | Kontrollige säilitamistingimusi ja reaktiivide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ning kasutage vajaduse korral uut komplekti. |
| e) Komplekt <i>artus</i> CMV RG PCR Kit on aegunud | Kontrollige säilitamistingimusi ja reaktiivide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ning kasutage vajaduse korral uut komplekti. |

Komplekti QIAamp DSP Virus Kit abil puhastatud negatiivse plasmaproovi sisemise kontrolli signaal on nõrk või puudub signaal ($C_T = 27 \pm 3$; lävi, 0,03) fluorestsentskanalis Cycling Yellow ja signaali samaaegne puudumine Cycling Green kanalil

- | | |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) PCR-i tingimused ei vasta protokollile | Kontrollige PCR-i tingimusi (vt eespool) ja vajaduse korral korrake PCR-i parandatud seadetega. |
| b) PCR oli inhibeeritud | Veenduge, et te kasutate soovitatud eraldamisemeetodit, ja järgige täpselt tootja juhiseid. |
| c) DNA kadu ekstraheerimise käigus | Kui ekstraheerimissegule on lisatud sisemine kontroll, võib sisemise kontrolli signaali puudumine viidata DNA kaole ekstraheerimise käigus. Veenduge, et te kasutate soovitatud eraldamisemeetodit (vt jaotist „DNA eraldamine”, lk 12), ja järgige täpselt tootja juhiseid. |

Kommentaariid ja ettepanekud

- d) Komplekti ühe või rohkema komponendi säilitamistingimused ei vasta juhistele jaotises „Reaktiivide hoiustamine ja käsitsemine“, lk 10) Kontrollige säilitamistingimusi ja reaktiivide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ning kasutage vajaduse korral uut komplekti.
- e) Komplekt *artus CMV RG PCR Kit* on aegunud Kontrollige säilitamistingimusi ja reaktiivide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ning kasutage vajaduse korral uut komplekti.

Negatiivsete kontrollide signaalid analüütilise PCR-i fluorestsentskanalis *Cycling Green*

- a) PCR-i ettevalmistamise käigus toimus saastumine Korrake PCR-i uute reaktiividega, paralleelproovidega. Võimaluse korral sulgege PCR-i katsutid vahetult pärast analüüsitava proovi lisamist. Pipeteerige positiivsed kontrollid alati viimasena. Veenduge, et tööruume ja seadmeid puhastatakse saastusest korrapäraste ajavahemike tagant.
- b) Saastumine toimus ekstraheerimisel Korrake analüüsitava proovi ekstraheerimist ja PCR-i, kasutades uusi reaktiive. Veenduge, et tööruume ja seadmeid puhastatakse saastusest korrapäraste ajavahemike tagant.

Tähised



Sisaldab reaktiive, millest piisab <N> analüüsi jaoks



Kõlblik kuni



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



Katalooginumber



Partii number



Materjali number



Komponendid



Sisaldab



Number



Globaalne kaubaartikli number



Temperatuuripiirangud



Tootja



Kasutamiseks tutvuge kasutusjuhistega

Tellimisteave

Toode	Sisukord	Katalooginr
artus CMV RG PCR Kit (24)	24 reaktsiooni jaoks: põhisegu, magneesiumilahus, 4 kvaliteedistandardit, sisemine kontroll, vesi (PCR-klass)	4503263
artus CMV RG PCR Kit (96)	96 reaktsiooni jaoks: põhisegu, magneesiumilahus, 4 kvaliteedistandardit, sisemine kontroll, vesi (PCR-klass)	4503265
Komplekt EZ1 DSP Virus Kit – komplekt automatiseeritud, samaaegseks viiruse DNA ja RNA puhastamiseks 1–14 seerumi, plasma või CSF-i proovist		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	48 viiruse nukleiinhappe preparaadi jaoks: eeltäidetud reaktiivikassetid, ühekordselt kasutatavad otsikuhoidjad, ühekordselt kasutatavad filtriga otsikud, proovikatsutid, elueerimiskatsutid, puhvrid, kandur-RNA	62724
QIAamp DSP Virus Kit – viiruslike nukleiinhapete puhastamiseks inimese plasmast <i>in vitro</i> diagnostilistel eesmärkidel		
QIAamp DSP Virus Kit	50 ettevalmistuseks: QIAamp MinElute® katsutid, puhvrid, reagentid, katsutid, kolonnipikendid ja VacConnectors	60704
Seade Rotor-Gene Q MDx ja tarvikud		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR-tsükler 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimine ning koolitus ei kuulu komplekti	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR-tsükler 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimist ning koolitust	9002023

Toode	Sisukord	Katalooginr
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimine ning koolitus ei kuulu komplekti	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimist ning koolitust	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR-seade 6 kanaliga (sinine, roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimine ning koolitus ei kuulu komplekti	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR-seade 6 kanaliga (sinine, roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimist ning koolitust	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR-tsükler 2 kanaliga (roheline, kollane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimine ning koolitus ei kuulu komplekti	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR-tsükler 2 kanaliga (roheline, kollane), sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimist ning koolitust	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt 2 kanaliga (roheline, kollane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimine ning koolitus ei kuulu komplekti	9002012

Toode	Sisukord	Katalooginr
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR-tsükler ja analüsaator High Resolution Melt 2 kanaliga (roheline, kollane), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, tarvikud: hõlmab 1-aastast garantiid osadele ja tööle, installimist ning koolitust	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiiniumist plokk reaktsiooni seadistamiseks käsitsi ühekanalilise pipetiga 72 x 0,1 ml katsutites	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Alumiiniumist plokk reaktsiooni seadistamiseks käsitsi standardises 8 x 12 süvendiga mikroplaadiribades, kasutades 96 x 0,2 ml katsuteid	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 riba 4 katsutiga ja korkidega 1000 reaktsiooni läbiviimiseks	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 riba 4 katsutiga ja korkidega 10 000 reaktsiooni läbiviimiseks	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 õhukeseseinalist katsutit 1000 reaktsiooni läbiviimiseks	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 õhukeseseinalist katsutit 10 000 reaktsiooni läbiviimiseks	981008

Ajakohastatud teavet litsentsimise ja tootespetsiifiliste kohustustest loobumise kohta saate vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel www.qiagen.com või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikult müügiesindajalt.

Dokumendi redaktsiooniajalugu

Redaktsioon	Muudatused
R6, märts 2021	Lisaks jaotised Lineaarvahemik, Segavad ained ja Reprodutseeritavus. Uuendatud jaotisi Sihtotstarve ja Määramine. Mittetoetatud QIAGENi seadmete viidete eemaldamine

Komplekti *artus* CMV RG PCR Kit piiratud litsentsileping

Selle toote kasutamine tähendab, et toote ostja või kasutaja nõustub järgmiste tingimustega.

1. Toodeid lohib kasutada ainult vastavalt tootega kaasas olevatele protokollidele ja sellele käsiraamatule ning ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna oma intellektuaalse omandi all-litsentse komplekti komponentide kasutamiseks või ühendamiseks sellesse komplekti mittekuuluvate komponentidega, välja arvatud toote protokollides, selles käsiraamatus ja veebisaidil www.qiagen.com kirjeldatud juhtudel. Mõne neist lisaprotokollidest on lisanud QIAGEN-i kasutajate jaoks teised QIAGEN-i kasutajad. QIAGEN pole neid protokolle põhjalikult testinud ega optimeerinud. QIAGEN ei garanteeri, et need ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
2. QIAGEN ei anna garantiid, et komplekt ja/või selle kasutus ei riku kolmandate osapoolte õigusi, v.a selgesõnalised litsentsid.
3. Komplekt ja selle osad on litsentsitud ühekordseks kasutuseks ning neid ei tohi korduskasutada, parandada ega edasi müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti muudest otsestest või kaudsetest litsentsidest, v.a selgesõnalistest litsentsidest.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustuvad, et ei tee ise ega luba kellelgi teisel teha midagi, mis võiks kaasa aidata või viia üllatunud keelatud toiminguteni. QIAGEN võib selle piiratud litsentsilepingu keelde jõustada mis tahes kohtus ning taotlema tagasi kõik piiratud litsentsilepingu või komplekti ja/või selle komponentidega seotud mis tahes intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks kulunud juurdlus- ja kohtukulud, sh advokaaditasud.

Uuendatud litsentsitingimused leiate veebilehelt www.qiagen.com.

Selle toote ostmise võimaldab ostjal seda kasutada inimese *in vitro* diagnostikas diagnostikateenuste osutamiseks. Käesolevaga ei anta ühtegi muud üldist patenti ega muud litsentsi peale selle konkreetse kasutusõiguse.

Kaubamärgid: 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. Kõik õigused on kaitstud.

Tellimine www.qiagen.com/shop | Tehniline tugi support.qiagen.com | Veebisait www.qiagen.com