

Prosinac 2021.

Upute za uporabu (priručnik) za komplet *artus*[®] CMV RG PCR Kit



24 (kataloški br. 4503263)



96 (kataloški br. 4503265)

Inačica 1

Kvantitativna in vitro dijagnostika

Za uporabu s instrumentima Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R7 **MAT**

1126759HR

Sadržaj

Namjena	5
Opis i načelo	5
Informacije o patogenima	6
Načelo postupka	6
Uključeni materijali	7
Sadržaj kompleta	7
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni	8
Reagensi	8
Potrošni materijali	8
Oprema	8
Upozorenja i mjere opreza	9
Sigurnosne informacije	9
Mjere opreza	9
Pohrana i rukovanje reagensima	10
Rukovanje ispitcima i pohrana ispitaka	10
Prikupljanje ispitaka	10
Pohrana uzoraka	11
Prijevoz uzoraka	11
Postupak	12
Izolacija DNK	12
Interna kontrola	13
Protokol: PCR i analiza podataka	14

Tumačenje rezultata	22
Kvantifikacija	22
Rezultati	23
Kontrola kvalitete	26
Ograničenja	26
Radne značajke	27
Analitička osjetljivost	27
Linearni raspon	29
Specifičnost	30
Preciznost	32
Interferirajuće tvari	34
Otpornost	36
Obnovljivost	36
Procjena dijagnostičke sposobnosti	38
Referencije	40
Vodič za rješavanje problema	41
Simboli	43
Informacije za naručivanje	44
Povijest revizija dokumenta	47

Namjena

Komplet *artus* CMV RG PCR Kit je in vitro test na temelju amplifikacije nukleinske kiseline za kvantifikaciju DNK citomegalovirusa (CMV) u humanoj plazmi. U ovom kompletu za dijagnostičko testiranje primjenjuje se lančana reakcija polimerazom (polymerase chain reaction, PCR) i namijenjen je za uporabu s instrumentima Rotor-Gene Q.

Komplet *artus* CMV RG PCR Kit namijenjen je za uporabu u skladu s kliničkom prezentacijom i ostalim laboratorijskim markerima za postupanje s infekcijom CMV-om u pacijenata kod kojih postoji rizik od razvijanja CMV bolesti.

Rezultati dobiveni s pomoću kompleta *artus* CMV RG PCR Kit moraju se tumačiti u kontekstu svih relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza.

Komplet *artus* CMV RG PCR Kit nije namijenjen za uporabu kao test probira za otkrivanje prisutnosti CMV-a u krvi ili krvnim proizvodima ili kao dijagnostički test za potvrđivanje prisutnosti infekcije CMV-om.

Opis i načelo

Komplet *artus* CMV RG PCR Kit čini sustav koji je odmah spreman za uporabu za detekciju DNK CMV-a primjenom lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction, PCR) na instrumentima Rotor-Gene Q MDx. CMV RG Master sadrži reagense i enzime za specifičnu amplifikaciju regije 105 bp glavnog neposrednog ranog gena (*Major Immediate Early Gene, MIE*) unutar CMV genoma (ispitivanjem se mogu otkriti CMV genotipovi gB1 – gB4) te za izravnu detekciju tog specifičnog ampikona u kanalu fluorescencije Cycling Green instrumenta Rotor-Gene Q MDx.

Osim toga, komplet *artus* CMV RG PCR Kit sadrži drugi heterologni sustav za amplifikaciju za detekciju moguće inhibicije PCR-a. Ta se detekcija odvija kao interna kontrola (internal control, IC) u kanalu fluorescencije Cycling Yellow instrumenta Rotor-Gene Q MDx. Isporučuju se vanjske pozitivne kontrole (CMV QS 1–4) koje omogućuju određivanje količine virusne DNK. Za dodatne informacije pogledajte „Kvantifikacija”, stranica 22.

Informacije o patogenima

Humani citomegalovirus (CMV) nalazi se u krvi, tkivima i gotovo svim tekućinama koje izlučuju zaražene osobe. Prijenos može biti oralnim putem, spolnim putem, putem transfuzije krvi ili transplantacije organa, intrauterino ili perinatalno (1–4). Testiranje virusnog opterećenja za CMV važna je pomoć pri procjeni rizika od bolesti, dijagnosticiranju bolesti i praćenju odgovora na terapiju (5).


Infekcija CMV-om često dovodi do asimptomatske infekcije praćene cjeloživotnom perzistencijom virusa u tijelu. Ako se simptomi pojave kod adolescenata ili odraslih osoba, oni nalikuju onima kod mononukleoze s vrućicom, slabim hepatitisom i općom slabošću (6). Ozbiljni tijek infekcije CMV-om opažen je osobito kod onih zaraženih intrauterino i kod imunodeficijentnih pacijenata (4,7).

Načelo postupka

Detekcija patogena lančanom reakcijom polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR) temelji se na amplifikaciji specifičnih regija genoma patogena. Prilikom real-time PCR amplificirani produkt detektira se s pomoću fluorescentnih boja. One su obično vezane s oligonukleotidnim probama koje se vežu specifično za amplificirani produkt. Praćenje intenziteta fluorescencije tijekom PCR-a (tj. u stvarnom vremenu) omogućuje detekciju i kvantifikaciju akumuliranog produkta, a da nije potrebno ponovno otvaranje reakcijskih epruveta nakon postupka PCR-a (8).

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

artus CMV RG PCR Kit			(24)	(96)
Kataloški br.			4503263	4503265
Broj reakcija			24	96
Plava	CMV RG Master (Taq 0,1 U/μl)		2 x 12 reakcija	8 x 12 reakcija
Žuta	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 μl	600 μl
Crvena	CMV QS 1‡ (1 x 104 kopije/μl)	QS	200 μl	200 μl
Crvena	CMV QS 2‡ (1 x 103 kopije/μl)	QS	200 μl	200 μl
Crvena	CMV QS 3‡ (1 x 102 kopije/μl)	QS	200 μl	200 μl
Crvena	CMV QS 4‡ (1 x 101 kopije/μl)	QS	200 μl	200 μl
Zelena	CMV RG IC‡	IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Bijela	Water (Voda) (za PCR)		1000 μl	1000 μl
	Upute za uporabu		1	1

* Otopina magnezija

† Standard za kvantifikaciju

‡ Interna kontrola

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Reagensi

- Komplet za izolaciju DNK (pogledajte „Izolacija DNK”, stranica 12)

Potrošni materijali

- Sterilni vrhovi pipeta s filtrima
- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, za uporabu sa 72-well rotor (kat. br. 981103 ili 981106)
- **Alternativno:** PCR Tubes, 0,2 ml, za uporabu s 36-well rotor (kat. br. 981005 ili 981008)

Oprema

- Pipete (podesive)*
- Vrtložna miješalica*
- Stolna centrifuga* s rotorom za reakcijske epruvete od 2 ml
- Instrumenti Rotor-Gene Q MDx* s kanalima fluorescencije za Cycling Green i Cycling Yellow
- Softver Rotor-Gene Q, inačica 2.3.5 ili novija
- Blok za hlađenje (Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes, kat. br. 9018901 ili Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes, kat. br. 9018905)

* Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti provjereni i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

Upozorenja i mjere opreza

Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi **www.qiagen.com/safety**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) za svaki komplet QIAGEN i komponentu kompleta.

Bacite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

Mjere opreza

Korisnik bi uvijek trebao obratiti pažnju na sljedeće:

- Upotrebljavajte sterilne vrhove pipeta s filtrima.
- Čuvajte i ekstrahirajte pozitivne materijale (ispitke, pozitivne kontrole i amplikone) odvojeno od svih drugih reagensa i dodajte ih u reakcijsku mješavinu u prostorno odvojenom objektu.
- Potpuno odmrznite sve komponente na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) prije početka ispitivanja.
- Kada se odmrznu, komponente promiješajte (uvlačenjem u pipetu i istiskanjem iz nje više puta ili pulsiranjem na vorteks miješalici) i kratko centrifugirajte.
- Radite brzo i držite komponente na ledu ili na bloku za hlađenje (blok za postavljanje sa 72 jažice / 96 jažica).

Pohrana i rukovanje reagensima

Komponente kompleta *artus* CMV RG PCR Kit moraju se čuvati na temperaturi od -30 °C do -15 °C i stabilne su do roka trajanja navedenog na naljepnici. Treba izbjegavati ponovljeno odmrzavanje i zamrzavanje (> 2 x) jer to može smanjiti osjetljivost ispitivanja. Ako se reagensi upotrebljavaju povremeno, treba ih zamrznuti u alikvotima. Ne smiju se čuvati na 2 – 8 °C dulje od 5 sati.

Rukovanje ispitcima i pohrana ispitaka

Napomena: sa svim uzorcima mora se postupati kao s potencijalno zaraznim materijalom.

Napomena: u analitičkim ispitivanjima provedenima kako bi se provjerila učinkovitost ovog kompleta plazma s EDTA navodi se kao najprikladniji materijal uzorka za detekciju CMV-a. Stoga preporučujemo uporabu tog materijala s kompletom *artus* CMV RG PCR Kit.

Provjera kompleta *artus* CMV RG PCR Kit provedena je s pomoću uzoraka humane plazme s EDTA. Drugi materijali uzorka nisu odobreni. Upotrebljavajte samo preporučeni komplet za izolaciju nukleinske kiseline (pogledajte „Izolacija DNK”, stranica 12) prilikom pripreme uzorka.

Kada se upotrebljavaju određeni materijali uzorka, potrebno je strogo se pridržavati posebnih uputa u vezi s prikupljanjem, prijevozom i pohranom.

Prikupljanje ispitaka

Svako vađenje krvi uzrokuje ozljedu krvnih žila (arterija, vena ili kapilara). Smije se upotrebljavati samo neškodljiv i sterilan materijal. Za vađenje krvi treba biti dostupan prikladan potrošni materijal. Prilikom venepunkcije ne smiju se upotrebljavati igle za kapilare koje su pretanke. Vađenje venske krvi treba provesti na odgovarajućim dijelovima unutrašnje strane lakta, podlaktice ili stražnje strane dlana. Krv se mora vaditi u standardne epruvete za prikupljanje ispitaka (s crvenim čepom, Sarstedt® ili ekvivalentna epruveta drugog proizvođača). Treba izvaditi volumen od 5 – 10 ml krvi u epruvetu s EDTA. Epruvete treba miješati preokretanjem odmah nakon prikupljanja uzorka (8 x, ne tresti).

Napomena: ne smiju se upotrebljavati heparinizirani uzorci.

Pohrana uzoraka

Punu krv treba odvojiti na plazmu i stanične komponente centrifugiranjem u trajanju od 20 minuta pri 800 – 1600 x g u roku od 6 sati (9,10). Izolirana plazma prenosi se u sterilne polipropilenske epruvete. Osjetljivost ispitivanja može se smanjiti ako rutinski zamrznete uzorke ili ih pohranite na dulje vremensko razdoblje.

Prijevoz uzoraka

Materijal uzorka načelno se treba prevoziti u transportnom spremniku otpornom na udarce. Na taj se način može izbjeći potencijalna opasnost od infekcije zbog istjecanja uzorka. Uzorke treba prevoziti u skladu s lokalnim i nacionalnim smjernicama za prijenos patogenog materijala.*

Isporuku uzoraka treba obaviti u roku od 6 sati. Ne preporuča se čuvati uzorke na mjestu prikupljanja. Moguće je poslati uzorke poštom u skladu sa zakonskim smjernicama za prijevoz patogenih materijala. Preporučamo prijevoz uzorka dostavnom službom. Uzorke krvi treba isporučiti ohlađene (2 – 8 °C), a odvojenu plazmu duboko zamrznutu (-30 do -15 °C).

* Međunarodna udruga za zračni prijevoz (International Air Transport Association, IATA). Propisi o prijevozu opasne robe.

Postupak

Izolacija DNK

Kompleti tvrtke QIAGEN navedeni u Tablica 1 odobreni su za pročišćavanje virusne DNK u indiciranim vrstama humanih uzoraka za primjenu u kombinaciji s kompletom *artus* CMV RG PCR Kit. Provedite pročišćavanje virusne DNK u skladu s uputama u odgovarajućim priručnicima kompleta.

Tablica 1. Kompleti za pročišćavanje odobreni za uporabu s kompletom *artus* CMV RG PCR Kit

Materijal uzorka	Količina uzorka	Komplet za izolaciju nukleinske kiseline	Kataloški broj	Nosač RNA
Plazma s EDTA	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Uključeno
Plazma s EDTA	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Uključeno

Napomena: Uporaba nosača RNK ključna je za učinkovitu ekstrakciju, a time i za prinos DNK/RNK. Kako biste povećali stabilnost nosača RNK isporučenog s kompletom QIAamp DSP Virus Kit, preporučujemo postupanje u skladu s informacijama o rekonstituciji i pohrani nosača RNK navedenima u odjeljku „Priprema reagensa i pufera” *priručnika QIAamp DSP Virus Kit*.

Napomena: interna kontrola kompleta *artus* CMV RG PCR Kit može se upotrebljavati izravno u postupku izolacije. Obavezno uključite jedan negativni uzorak plazme u postupak izolacije. Odgovarajući signal interne kontrole temelj je za procjenu izolacije (pogledajte odjeljak „Interna kontrola” u nastavku).

Interna kontrola

Interna kontrola (CMV RG IC) isporučuje se s ovim kompletom. To korisniku omogućuje kontrolu postupka izolacije DNK i provjeru moguće inhibicije PCR-a. Za ovu primjenu dodajte internu kontrolu u postupak izolacije u omjeru od 0,1 µl na volumen elucije od 1 µl. Na primjer, ako upotrebljavate QIAamp DSP Virus Kit, DNK se eluira u 60 µl pufera za eluciju (AVE). Stoga se na početku treba dodati 6 µl interne kontrole. Količina interne kontrole koja se koristi ovisi isključivo o volumenu elucije.

Napomena: interna kontrola i nosač RNK (pogledajte „Izolacija DNK”, stranica 12) smiju se dodati samo u mješavinu pufera za lizu i materijala uzorka ili izravno u pufer za lizu.

Interna kontrola ne smije se izravno dodati u materijal uzorka. Ako ste je dodali u pufer za lizu, imajte na umu da se mješavina interne kontrole, pufera za lizu i nosača RNA mora pripremiti svježa i upotrijebiti odmah (pohrana mješavine na sobnoj temperaturi ili u hladnjaku samo nekoliko sati može dovesti do neuspješnog rezultata interne kontrole i smanjene učinkovitosti ekstrakcije).

Napomena: nemojte dodavati internu kontrolu i nosač RNK izravno u materijal uzorka.

Kako bi se pročišćavanje smatralo uspješnim, vrijednost C_T interne kontrole negativnog uzorka plazme koja je provedena tijekom pročišćavanja (QIAamp DSP Virus Kit) mora dosegnuti $C_T = 27 \pm 3$ (prag: 0,03) na instrumentima Rotor-Gene Q (za više informacija pogledajte stranicu 25). Navedeni raspon vrijednosti temelji se na varijancama među instrumentima i pročišćavanjima. Veće odstupanje ukazuje na problem s pročišćavanjem. U tom slučaju treba provjeriti pročišćavanje te po potrebi drugi put potvrditi valjanost. Ako imate dodatna pitanja ili se susretnete s problemom, obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Opcionalno, interna kontrola može se upotrebljavati za provjeru moguće inhibicije PCR-a. Za tu primjenu internu kontrolu dodajte izravno u CMV RG Master i CMV Mg-Sol, kao što je opisano u koraku 2b protokola (stranica 15).

Protokol: PCR i analiza podataka

Važne točke prije započinjanja

- Uzmite si vremena za upoznavanje s instrumentom Rotor-Gene Q prije započinjanja protokola. Za više informacija pogledajte korisnički priručnik odgovarajućeg instrumenta.
- Pobrinite se da su barem jedan standard za kvantifikaciju i barem jedna negativna kontrola (voda, za PCR) uključeni u svaku PCR analizu. Za dobivanje standardne krivulje upotrijebite sva 4 isporučena standarda za kvantifikaciju (CMV QS 1–4) za svaku PCR analizu.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Pobrinite se da je blok za hlađenje (pribor za instrument Rotor-Gene Q) ohlađen na 2 – 8 °C.
- Prije svake uporabe reagense treba potpuno odmrznuti, promiješati (uvlačenjem u pipetu i istiskanjem iz nje više puta ili brzim miješanjem na vorteks miješalici) te kratko centrifugirati.

Postupak

1. Postavite željeni broj PCR epruveta u adaptere na bloku za hlađenje.
2. Ako upotrebljavate internu kontrolu za praćenje postupka izolacije DNK i provjeru moguće inhibicije PCR-a, pridržavajte se koraka 2a. Ako internu kontrolu upotrebljavate isključivo za provjeru inhibicije PCR-a, pridržavajte se koraka 2b.

Napomena: preporuča se dodati internu kontrolu u CMV RG Master i CMV Mg-Sol koji se koriste za standarde za kvantifikaciju. Za standarde za kvantifikaciju dodajte internu kontrolu izravno u CMV RG Master i CMV Mg-Sol, kao što je opisano u koraku 2b protokola i upotrebljavajte tu glavnu mješavinu za svaki standard za kvantifikaciju (CMV QS 1–4).

2a. Interna kontrola već je dodana prilikom izolacije (pogledajte *Interna kontrola*, stranica 13). U tom slučaju, pripremite glavnu mješavinu u skladu s tablicom 2 (sljedeća stranica).

Reakcijska mješavina obično sadrži sve komponente potrebne za PCR osim uzorka.

Tablica 2. Priprema glavne mješavine (interna kontrola koristi se za nadzor izolacije DNK i provjeru inhibicije PCR-a)

Broj uzoraka	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Ukupni volumen	30 µl	360 µl

2b. Interna kontrola mora se dodati izravno u mješavinu CMV RG Master i CMV Mg-Sol. U tom slučaju, pripremite glavnu mješavinu u skladu s tablicom 3. Reakcijska mješavina obično sadrži sve komponente potrebne za PCR osim uzorka.

Tablica 3. Priprema glavne mješavine (interna kontrola koristi se isključivo za provjeru inhibicije PCR-a)

Broj uzoraka	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Ukupni volumen	32 µl*	384 µl*

* Povećanje volumena uzrokovano dodavanjem interne kontrole zanemaruje se prilikom pripreme PCR ispitivanja. Nema negativan utjecaj na sustav za detekciju.

3. Pipetirajte 30 µl glavne mješavine u svaku PCR epruvetu, a zatim dodajte 20 µl eluiranog uzorka DNK (pogledajte tablicu 4). U skladu s time, 20 µl barem jednog standarda za kvantifikaciju (CMV QS 1–4) mora se upotrebljavati kao pozitivna kontrola, a 20 µl vode (voda za PCR) mora se upotrebljavati kao negativna kontrola.

Tablica 4. Priprema PCR ispitivanja

Broj uzoraka	1	12
Glavna mješavina	30 µl	30 µl za svaki
Uzorak	20 µl	20 µl za svaki
Ukupni volumen	50 µl	50 µl za svaki
Broj uzoraka	1	12

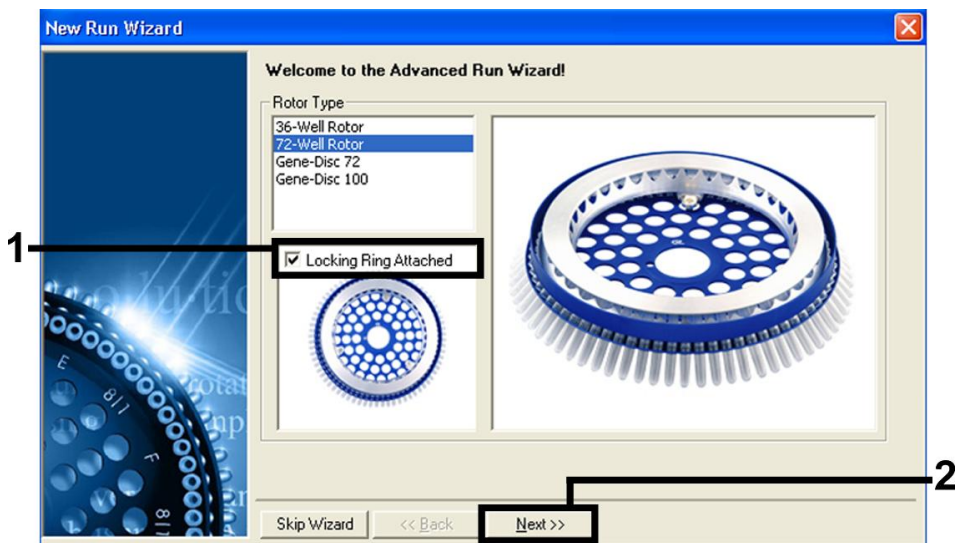
4. Zatvorite PCR epruvete. Pobrinite se da je prsten za zaključavanje (pribor instrumenta Rotor-Gene) postavljen na rotor kako bi se spriječilo slučajno otvaranje epruveta tijekom analize.

5. Za detekciju DNK CMV-a izradite temperaturni profil prema sljedećim koracima.

Postavljanje općih parametara ispitivanja	Slika 1, Slika 2 i Slika 3
Početna aktivacija enzima za <i>hot-start</i>	Slika 4
Amplifikacija DNK (<i>touchdown</i> PCR)	Slika 5
Prilagođavanje osjetljivosti kanala fluorescencije	Slika 6
Pokretanje postupka	Slika 7

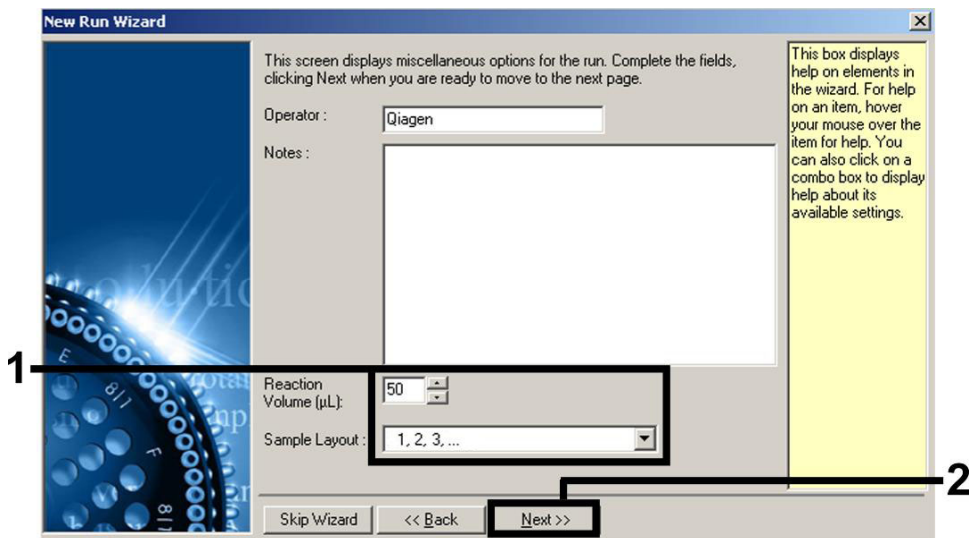
Sve specifikacije odnose se na softver za Rotor-Gene Q inačice 2.3.5 ili novije. Dodatne informacije o programiraju instrumenata Rotor-Gene potražite u korisničkom priručniku instrumenta. Na ilustracijama te su postavke označene podebljanim crnim okvirom. Uključene su ilustracije za instrumente Rotor-Gene Q.

6. Otvorite dijaloški okvir **New Run Wizard** (Čarobnjak za pokretanje novog postupka) (slika 1, sljedeća stranica). Označite okvir **Locking Ring Attached** (Prsten za zaključavanje pričvršćen) i kliknite **Next** (Sljedeće).



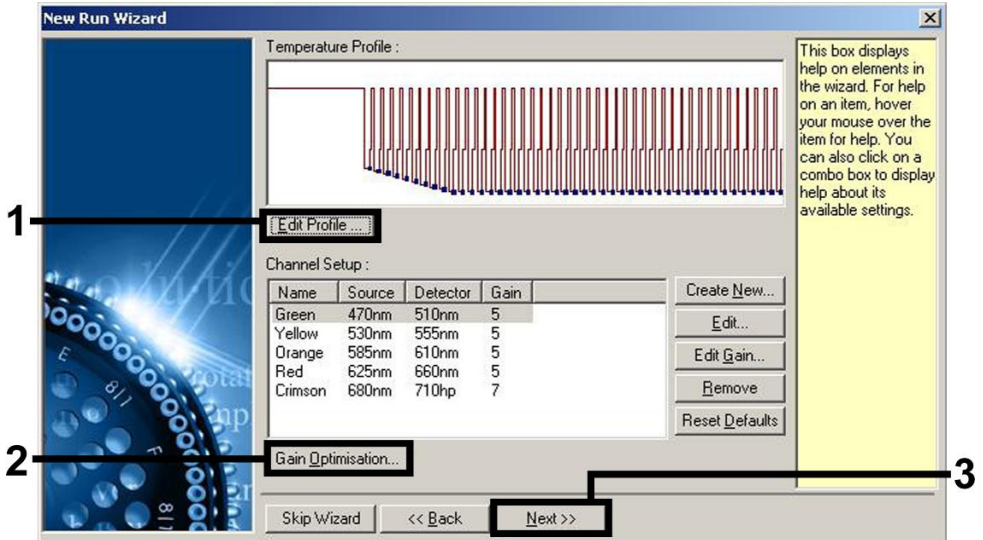
Slika 1. Dijaloški okvir „New Run Wizard” (Čarobnjak za pokretanje novog postupka).

7. Odaberite 50 kao reakcijski volumen za PCR pa kliknite **Next** (Sljedeće) (slika 2).

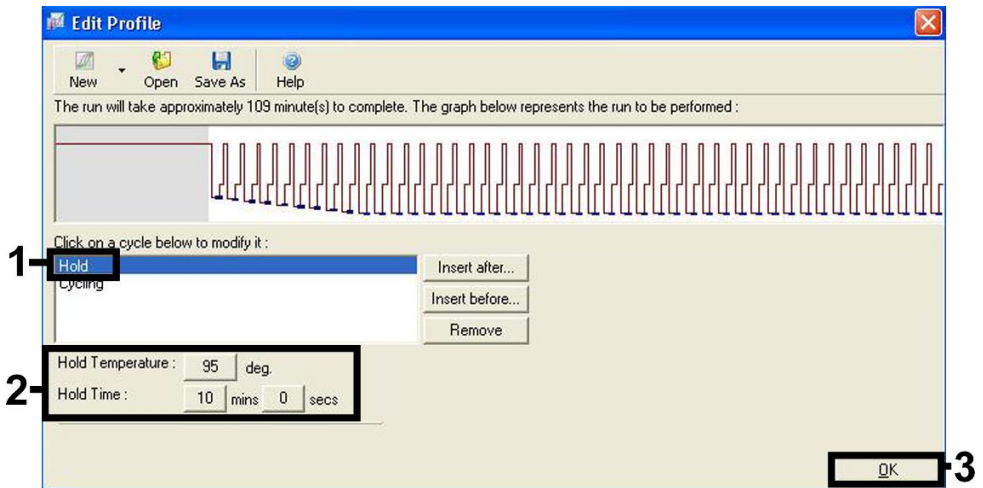


Slika 2. Postavljanje općih parametara ispitivanja.

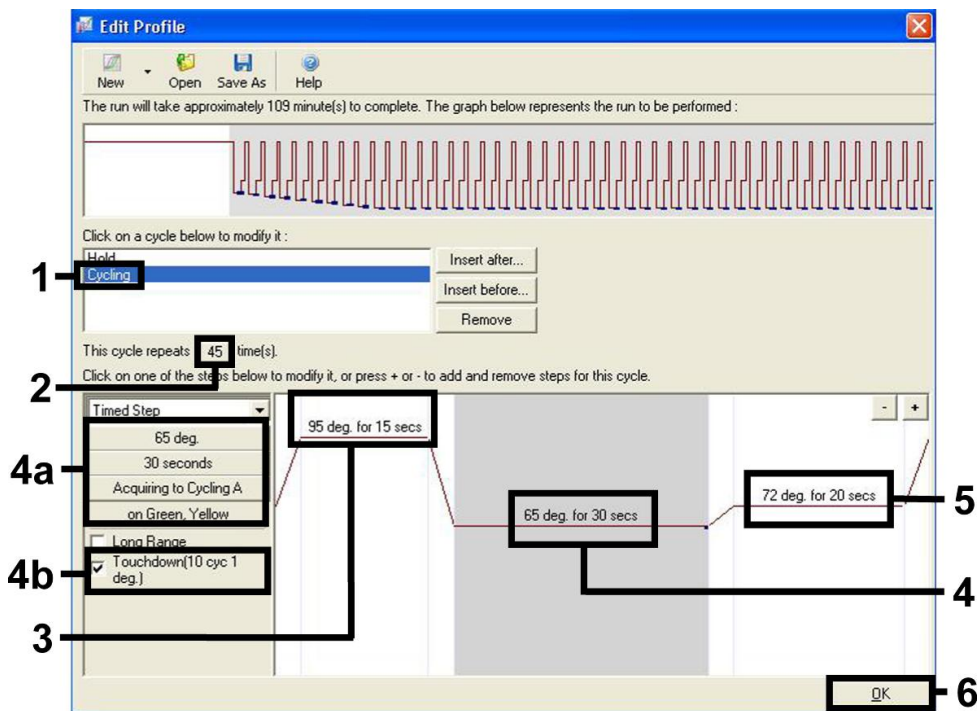
8. Kliknite gumb **Edit Profile** (Uredi profil) u sljedećem dijaloškom okviru **New Run Wizard** (Čarobnjak za pokretanje novog postupka) (slika 3) pa programirajte temperaturni profil kao što je prikazano od slike 3 do slike 5).



Slika 3. Uređivanje profila.

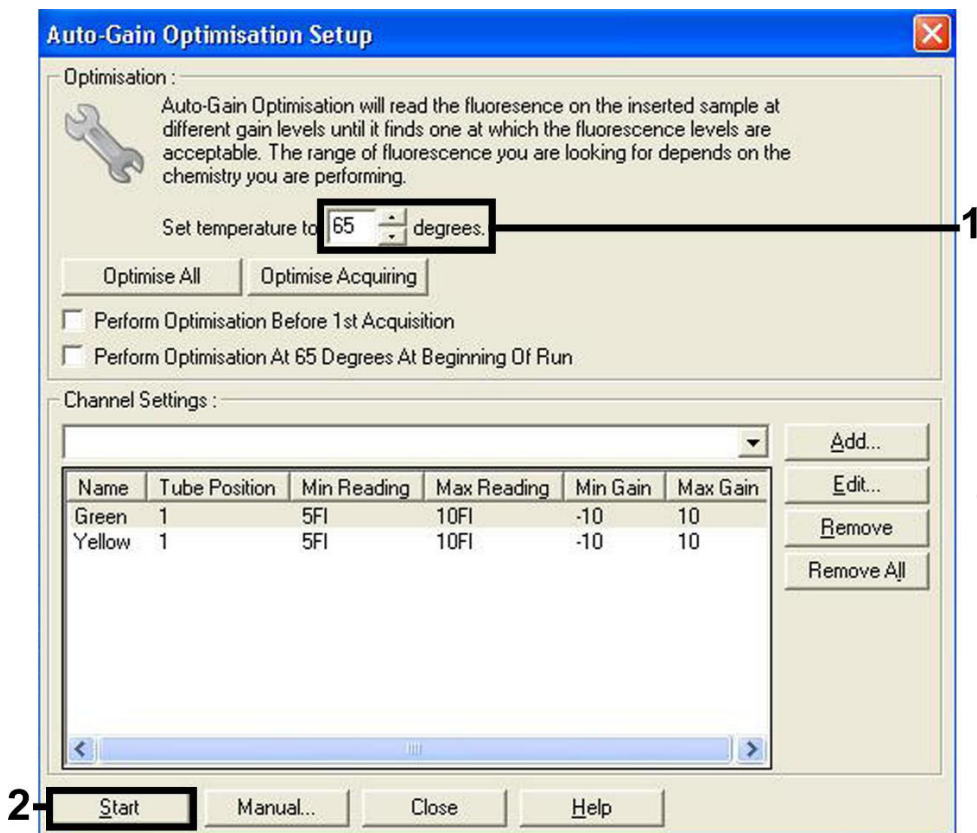


Slika 4. Početna aktivacija enzima za *hot-start*.



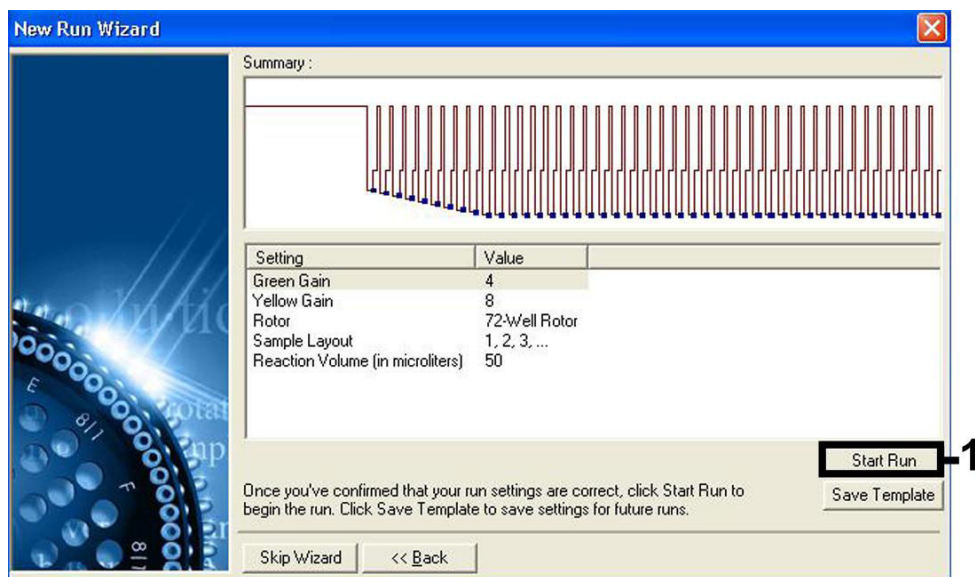
Slika 5. Amplifikacija DNK. Obavezno aktivirajte funkciju touchdown za 10 ciklusa u koraku sparivanja.

9. Raspon detekcije kanala fluorescencije mora se odrediti u skladu s intenzitetima fluorescencije u PCR epruветama. Kliknite **Gain Optimisation** (Optimizacija pojačanja) u dijaloškom okviru **New Run Wizard** (Čarobnjak za pokretanje novog postupka) (pogledajte sliku 3, prethodna stranica) za otvaranje dijaloškog okvira **Auto-Gain Optimisation Setup** (Postavke automatske optimizacije pojačanja). Postavite temperaturu optimizacije na 65 °C kako bi se podudarala s temperaturom sparivanja u sklopu programa amplifikacije (slika 6, sljedeća stranica).



Slika 6. Prilagođavanje osjetljivosti kanala fluorescencije.

- Vrijednosti pojačanja određene kalibracijom kanala automatski se spremaju i navode se u posljednjem prozoru izbornika u procesu programiranja postupka (slika 7, sljedeća stranica). Kliknite **Start run** (Pokreni postupak).



Slika 7. Pokretanje postupka.

Tumačenje rezultata

Kvantifikacija

Priloženi standardi za kvantifikaciju (CMV QS 1–4) obrađuju se kao prethodno pročišćeni uzorci i jednaki volumen od 20 µl upotrebljava se izravno u PCR-u (nema potrebe za daljnjom ekstrakcijom). Za generiranje standardne krivulje na instrumentima Rotor-Gene Q trebaju se upotrebljavati sva 4 standarda za kvantifikaciju te se u dijaloškom okviru **Edit Samples** (Uredi uzorke) trebaju definirati kao standardi s određenim koncentracijama (pogledajte korisnički priručnik odgovarajućeg instrumenta).

Napomena: kako bi se osigurala točna kvantifikacija, preporuča se dodati internu kontrolu u CMV RG Master i CMV Mg-Sol koji se koriste za standarde za kvantifikaciju. Za tu primjenu dodajte internu kontrolu izravno u CMV RG Master i CMV Mg-Sol, kao što je opisano u koraku 2b protokola (stranica 15) i upotrebljavajte tu glavnu mješavinu za svaki standard za kvantifikaciju (CMV QS 1–4).

Napomena: standardi za kvantifikaciju definiraju se kao kopije/µl. Za pretvaranje vrijednosti određenih s pomoću standardne krivulje u kopije/ml materijala uzorka treba primijeniti sljedeću jednadžbu:

$$\text{rezultat} \left(\frac{\text{kopije}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{rezultat (kopije/}\mu\text{l)} \times \text{volumen elucije (}\mu\text{l)}}{\text{volumen uzorka (ml)}}$$

U gornju jednadžbu načelno treba unijeti početni volumen uzorka. To treba razmotriti kada se volumen uzorka promijeni prije ekstrakcije nukleinske kiseline (npr. smanjenje volumena uslijed centrifugiranja ili povećanje volumena dodavanjem volumena potrebnog za izolaciju).

Napomena: standardi za kvantifikaciju kalibrirani su prema 1. međunarodnom standardu za humani citomegalovirus (NIBSC šifra: 09/162) koji je odredila Svjetska zdravstvena organizacija (SZO).

Za pretvaranje kopija/ml u IU/ml s obzirom na QIAamp DSP Virus Kit:

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

Napomena: za tijek rada QIAamp kvantificirani uzorci moraju se nalaziti unutar linearnog raspona od $QS 1 \times 10^1$ do 1×10^4 kopije/ μ l. Nije moguće osigurati kvantifikaciju izvan tog raspona.

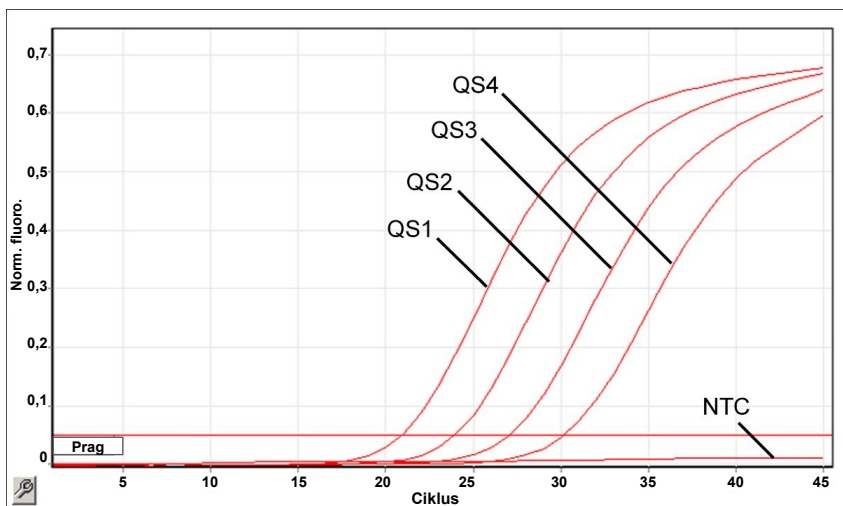
Za pretvaranje kopija/ml u IU/ml s obzirom na EZ1 DSP Virus Kit na instrumentu EZ1 Advanced XL:

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

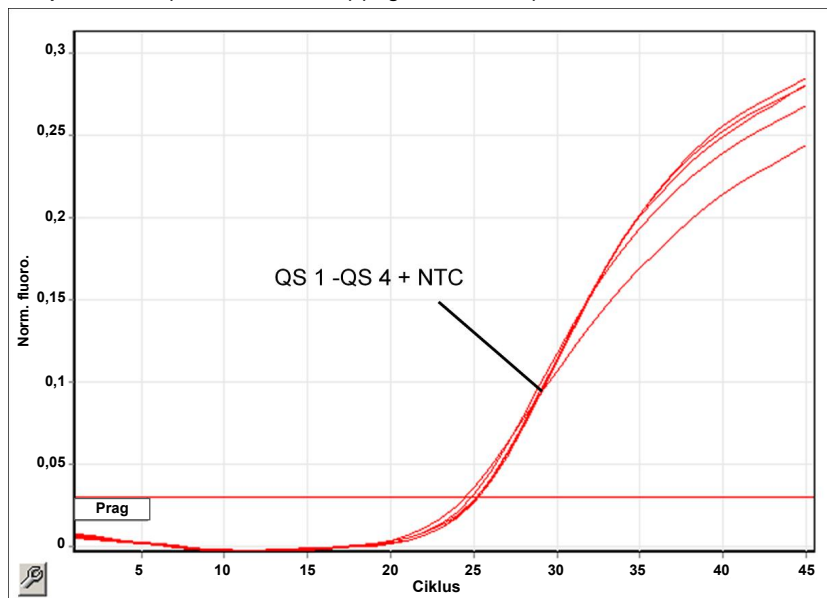
Napomena: za tijek rada EZ1 kvantificirani uzorci moraju se nalaziti unutar linearnog raspona od $3,16E+02$ do $1,00E+08$ kopije/ml. Nije moguće osigurati kvantifikaciju izvan tog raspona.

Rezultati

Primjeri pozitivnih i negativnih PCR reakcija prikazani su na slici 8 i slici 9, (sljedeća stranica).



Slika 8. Detekcija standarda za kvantifikaciju (CMV QS 1–4) u kanalu fluorescencije Cycling Green. NTC: no template control (kontrola bez uzorka) (negativna kontrola).



Slika 9. Detekcija interne kontrole (IC) u kanalu fluorescencije Cycling Yellow uz istovremenu amplifikaciju standarda za kvantifikaciju (CMV QS 1–4). NTC: no template control (kontrola bez uzorka) (negativna kontrola).

Signal se detektira u kanalu fluorescencije Cycling Green.

Rezultat analize pozitivan je: uzorak sadrži DNK CMV-a.

U tom slučaju, detekcija signala u kanalu Cycling Yellow nepotrebna je s obzirom na to da visoke početne koncentracije DNK CMV-a (pozitivni signal u kanalu Cycling Green) mogu dovesti do smanjenog ili odsutnog signala fluorescencije interne kontrole u kanalu Cycling Yellow (natjecanje).

U kanalu fluorescencije Cycling Green nije detektiran signal. Istovremeno, signal interne kontrole javlja se u kanalu Cycling Yellow.

U uzorku nije moguće detektirati DNK CMV-a. Uzorak se može smatrati negativnim.

U slučaju negativne PCR reakcije na CMV, detektirani signal interne kontrole isključuje mogućnost inhibicije PCR-a.

Signal se ne detektira ni u kanalu Cycling Green ni u kanalu Cycling Yellow.

Nije moguće utvrditi konačni rezultat.

Informacije koje se odnose na izvore i rješavanje pogrešaka možete pronaći u „Vodič za rješavanje problema”, stranica 41.

Kontrola kvalitete

U skladu sa sustavom za upravljanje kvalitetom društva QIAGEN certificiranim u skladu s normom ISO, svaka serija kompleta *artus* CMV RG PCR Kit ispituje se prema unaprijed određenim specifikacijama kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.

Ograničenja

Svi reagensi namijenjeni su samo za in vitro dijagnostičku upotrebu.

Proizvod bi trebalo upotrebljavati osoblje koje je primilo posebne upute i obuku za in vitro dijagnostičke postupke.

Strogo pridržavanje uputa iz korisničkog priručnika odgovarajućeg instrumenta neophodno je za dobivanje optimalnih rezultata PCR-a.

Potrebno je obratiti pozornost na rokove trajanja otisnute na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok trajanja.

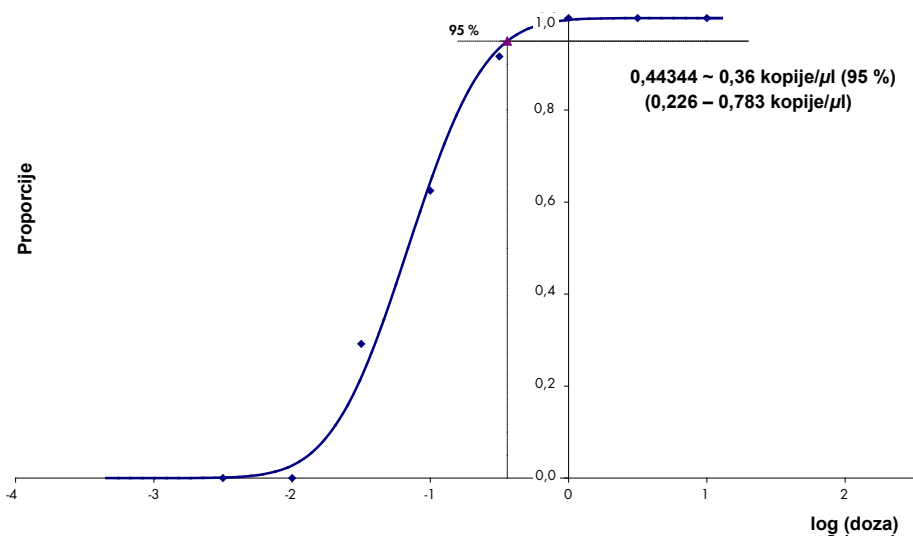
Iako rijetke, mutacije unutar visoko konzerviranih regija genoma virusa koje obuhvaćaju početnice i/ili probe kompleta mogu uzrokovati otkrivanje manje količine ili neotkrivanje prisutnosti virusa. Valjanost i učinkovitost ispitivanja revidiraju se u redovitim intervalima.

Radne značajke

Analitička osjetljivost

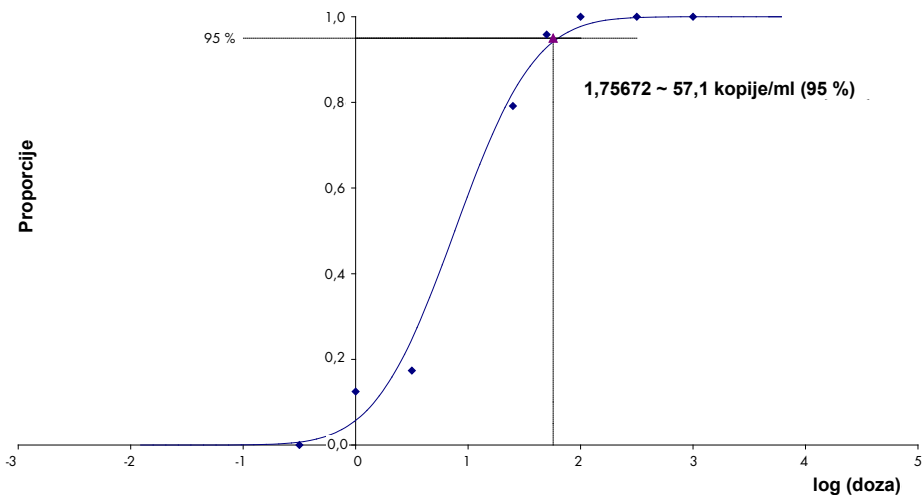
Za komplet *artus* CMV RG PCR Kit procijenjena je granica analitičke detekcije te granica analitičke detekcije s obzirom na pročišćavanje (granice osjetljivosti). Granica analitičke detekcije s obzirom na pročišćavanje određuje se s pomoću kliničkih ispitaka pozitivnih na CMV u kombinaciji s određenom metodom ekstrakcije. U usporedbi s time, granica analitičke detekcije određuje se neovisno o odabranoj metodi ekstrakcije, uz primjenu poznate koncentracije DNK CMV-a.

Za određivanje analitičke osjetljivosti kompleta *artus* CMV RG PCR Kit postavljen je niz razrjeđivanja genomske DNK CMV-a od 10 do nominalnih 0,00316 kopije/ μ l i analiziran na instrumentima Rotor-Gene u kombinaciji s kompletom *artus* CMV RG PCR Kit. Testiranje je izvedeno tijekom 3 različita dana u 8 ponavljanja. Rezultati su utvrđeni probit analizom. Grafički prikaz probit analize na instrumentu Rotor-Gene 6000 prikazan je na slici 10 (sljedeća stranica). Granica analitičke detekcije kompleta *artus* CMV RG PCR Kit u kombinaciji s Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 i Rotor-Gene 3000 iznosi 0,36 kopije/ μ l ($p = 0,05$) odnosno 0,24 kopije/ μ l ($p = 0,05$). To znači da je 95 % vjerojatno da će se detektirati 0,36 kopije/ μ l ili 0,24 kopije/ μ l.



Slika 10. Probit analiza: CMV (Rotor-Gene 6000). Analitička osjetljivost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit na instrumentu Rotor-Gene 6000.

Analitička osjetljivost s obzirom na pročišćavanje (QIAamp DSP Virus Kit) kompleta *artus* CMV RG PCR Kit na instrumentima Rotor-Gene određena je s pomoću niza razrjeđivanja materijala virusa CMV od 1000 do nominalnih 0,316 CMV kopije/ml dodanih u kliničke ispitke plazme. Oni su podvrgnuti ekstrakciji DNK s pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Kit (volumen ekstrakcije: 0,5 ml, volumen elucije: 60 μl). Svako od 8 razrjeđivanja analizirano je s pomoću kompleta *artus* CMV RG PCR Kit tijekom 3 različitih dana u 8 ponavljanja. Rezultati su utvrđeni probit analizom. Grafički prikaz probit analize prikazan je na slici 11 (sljedeća stranica). Granica analitičke detekcije s obzirom na pročišćavanje kompleta *artus* CMV RG PCR Kit na instrumentu Rotor-Gene 3000 iznosi 57,1 kopije/ml ($p = 0,05$). To znači da postoji 95 % vjerojatnosti da će se detektirati 57,1 kopije/ml.



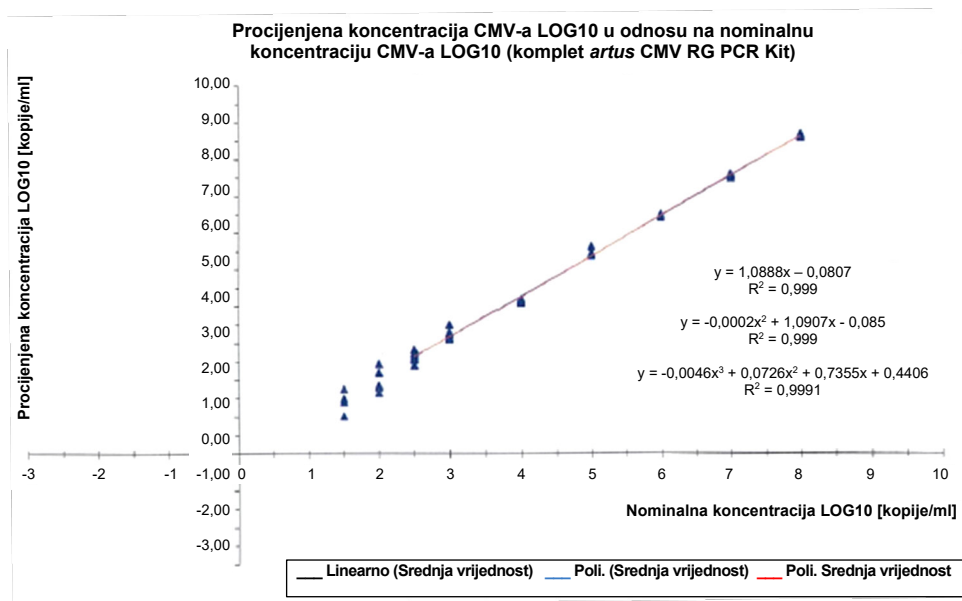
Slika 11. Probit analiza: CMV (Rotor-Gene 3000). Analitička osjetljivost s obzirom na pročišćavanje (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) kompleta *artus* CMV RG PCR Kit na instrumentu Rotor-Gene 3000.

Analitička osjetljivost s obzirom na pročišćavanje s pomoću EZ1 DSP Virus Kit (volumen ekstrakcije: 0,4 ml, volumen elucije: 60 µl) uporabom instrumenta EZ1 Advanced XL kompleta *artus* CMV RG PCR Kit na Rotor-Gene 6000 je 68,75 kopije/ml ($p = 0,05$). To znači da postoji 95 % vjerojatnosti da će se detektirati 68,75 kopije/ml.

Linearni raspon

Linearni raspon s obzirom na pročišćavanje s pomoću kompleta EZ1 DSP Virus Kit (volumen ekstrakcije: 0,4ml, volumen elucije: 60 µl) uporabom instrumenta EZ1 Advanced XL određen je testiranjem od 4 do 6 ponavljanja materijala virusa CMV-a u nizu razrjeđivanja od $3,16E+01$ do $1,00E+08$ kopije/ml.

Grafički prikaz probit analize prikazan je na slici 12 (sljedeća stranica).



Slika 12. Polinomna regresija skupa podataka za komplet *artus* CMV RG PCR Kit s obzirom na pročišćavanje (EZ1 DSP Virus Kit) na instrumentu EZ1 Advanced XL. Uključeni su modeli linearne, kvadratne i kubne regresije.

Linearni raspon kompleta *artus* CMV RG PCR Kit s obzirom na pročišćavanje s pomoću EZ1 DSP Virus Kit (volumen ekstrakcije: 0,4ml, volumen elucije: 60µl) uporabom instrumenta EZ1 Advanced XL je 3,16E+02 to 1,00E+08 kopije/ml.

Napomena: linearni raspon kompleta *artus* CMV RG PCR Kit, s obzirom na pročišćavanje s pomoću QIAamp DSP Virus Kit (volumen ekstrakcije: 0,4 ml, volumen elucije: 60 µl) je od 1,00E+01 do 1,00E+04 kopije/µl.

Specifičnost

Specifičnost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit prije svega se osigurava odabirom početnica i probi te uspostavljanjem strogih uvjeta reakcije. Početnice i probe provjerene su usporednom analizom sekvenci kako bi se utvrdilo ima li mogućih homologija sa svim sekvencama objavljenim u bankama gena. Time se osigurava mogućnost detektiranja svih relevantnih sojeva.

Osim toga, specifičnost je potvrđena s pomoću 100 različitih uzoraka plazme negativnih na CMV. 99 tih uzoraka nisu generirali nikakve signale s početnicama i probama specifičnima za CMV koji su uključeni u CMV RG Master.

Napomena: 1 uzorak koji je generirao signal u početnicama i probama specifičnima za CMV koji je bio i pozitivan na CMV u kompletima *artus* CMV LC i TM RG PCR Kit vjerojatno je pozitivan. Konačna specifičnost na temelju testiranja 100 pojedinačnih uzoraka davatelja potvrđena je na 99,00 % (99/100).

Provedeno je testiranje na potencijalnu križnu reaktivnost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit s pomoću grupe kontrola navedenih u tablici 5. Niti jedan od testiranih patogena nije bio reaktivan. Nije došlo do križne reaktivnosti miješanih infekcija.

Tablica 5. Testiranje specifičnosti kompleta s potencijalno križno reaktivnim patogenima

Grupa kontrola	CMV Cycling Green ili Cycling A.FAM	Interna kontrola (Cycling Yellow ili Cycling A.JOE)
Humani herpes virus 1 (virus herpesa simplex 1)	–	+
Humani herpes virus 2 (virus herpesa simplex 2)	–	+
Human herpes virus 3 (virus varicella-zoster)	–	+
Humani herpes virus 4 (Epstein-Barrov virus)	–	+
Humani herpes virus 6A	–	+
Humani herpes virus 6B	–	+
Humani herpes virus 7	–	+
Humani herpes virus 8 (herpes virus povezan s Kaposijevim sarkomom)	–	+
Virus hepatitisa A	–	+
Virus hepatitisa B	–	+
Virus hepatitisa C	–	+

(nastavak na sljedećoj stranici)

Tablica 5 (nastavak s prethodne stranice)

Grupa kontrola	CMV Cycling Green ili Cycling A.FAM	Interna kontrola (Cycling Yellow ili Cycling A.JOE)
Virus humane imunodeficijencije 1	–	+
Virus humane leukemije T stanica 1	–	+
Virus humane leukemije T stanica 2	–	+
Virus Zapadnog Nila	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+

Preciznost

Podaci o preciznosti kompleta *artus* CMV RG PCR Kit prikupljeni su na instrumentima Rotor-Gene i omogućuju određivanje ukupne varijance ispitivanja. Ukupna varijanca sastoji se od varijabilnosti unutar ispitivanja (varijabilnost višestrukih rezultata uzoraka iste koncentracije u jednom eksperimentu), varijabilnosti među ispitivanjima (varijabilnost višestrukih rezultata ispitivanja dobivenih na različitim instrumentima istog tipa s različitim rukovateljima unutar istog laboratorija) i varijabilnost među serijama (varijabilnost višestrukih rezultata ispitivanja dobivenih primjenom različitih serija). Dobiveni podaci upotrijebljeni su za određivanje standardne devijacije, varijance i koeficijenta varijacije za PCR specifičan za patogen i PCR interne kontrole.

Podaci o preciznosti proizvoda *artus* CMV RG PCR prikupljeni su s pomoću standarda za kvantifikaciju najniže koncentracije (QS 4; 10 kopije/μl). Testiranje je izvedeno u 8 ponavljanja. Podaci o preciznosti izračunati su na temelju vrijednosti C_T amplifikacijskih krivulja (C_T : ciklus praga, pogledajte tablicu 6, sljedeća stranica). Osim toga, podaci o preciznosti za kvantitativne rezultate izražene u kopijama/μl određeni su s pomoću odgovarajućih vrijednosti C_T (pogledajte tablicu 7, sljedeća stranica;). Na temelju tih rezultata, ukupni statistički raspon vrijednosti za svaki uzorak s navedenom koncentracijom iznosi 1,21 % (C_T) ili 14,38 % (koncentracija) te 1,93 % (C_T) za detekciju interne kontrole. Te vrijednosti temelje se na ukupnosti svih pojedinačnih vrijednosti određenih varijabilnosti.

Tablica 6. Podaci o preciznosti na temelju vrijednosti C_T

	Standardna devijacija	Varianca	Koeficijent varijacije (%)
Varijabilnost unutar ispitivanja: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Varijabilnost unutar ispitivanja: Interna kontrola	0,31	0,10	1,16
Varijabilnost među ispitivanjima: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Varijabilnost među ispitivanjima: Interna kontrola	0,47	0,22	1,77
Varijabilnost među serijama: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Varijabilnost među serijama: Interna kontrola	0,53	0,28	2,02
Ukupna varianca: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Ukupna varianca: Interna kontrola	0,51	0,26	1,93

Tablica 7. Podaci o preciznosti na temelju kvantitativnih rezultata (u kopije/ μ l)

	Standardna devijacija	Varianca	Koeficijent varijacije (%)
Varijabilnost unutar ispitivanja: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Varijabilnost među ispitivanjima: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Varijabilnost među serijama: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Ukupna varianca: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Interferirajuće tvari

U negativnu plazmu dodana je DNK CMV-a u različite komercijalno dostupne sustave za uzimanje krvi s različitim antikoagulansima. Izračunata koncentracija (kopije/ml, srednja vrijednost C_T , standardna devijacija, varijanca i % CV vrijednosti prikazani su u tablici 8. Standardna devijacija i koeficijent varijacije nalaze se unutar raspona od 5 %, a time i unutar raspona tolerancije. Nije utvrđen značajan utjecaj različitih tvari na PCR.

Tablica 8. Podaci o komercijalnim sustavima za uzimanje krvi i antikoagulansima

Tvar	Koncentracija (kopije/ml)	C_T srednja vrijednost	C_T standardna devijacija	C_T varijanca	C_T CV (%)
Kalijev EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Kalijev EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Kalijev EDTA Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Kalijev EDTA, Springe (referenca)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Kalijev EDTA, Sarstedt (referenca)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Kalijev EDTA (trudnoća)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Endogene tvari (tablica 9, sljedeća stranicu) dodane su u uzorke plazme s EDTA pozitivne na CMV pri 3 x LOD i 10 x LOD. Svi su uzorci uspješno detektirani i nije opažena interferencija za uzorke koji sadrže povišene razine endogenih inhibitora (bilirubin, hemoglobin, triglicerid i albumin).

Tablica 9. Testirane endogene tvari

Interferirajuće tvari	Koncentracija interferirajućih tvari
Bilirubin	30 mg/dl
Hemoglobin	2 g/dl
Triglicerid	1 g/dl
Albumin	6 g/dl

Uobičajeni lijekovi koji se upotrebljavaju u slučaju transplantacije testirani su u akutnoj vršnoj koncentraciji pri 3x nakon terapijskog liječenja lijekom kako je preporučeno u CLSI® smjernici EP07-A2 (11) (pogledajte tablicu 10). Svaka je od tih tvari dodana u uzorke negativne na CMV i pozitivne na CMV koji su testirani u 4 replikata.

Niti jedna ispitana egzogena tvar nije pokazala značajan utjecaj na učinkovitost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit.

Tablica 10. Popis lijekova ispitanih kao egzogenih tvari

Interferirajuće tvari	Testirana koncentracija
Antibiotici	
Sulfametoksazol	200 mg/l
Trimetoprim	5,2 mg/l
Claforan® (cefotaksim)	1 g/l
Tazobac® (piperacilin+tazobaktam)	Piperacilin: 1 g/l Tazobaktam: 125 mg/l
Tikarcilin	1 g/l
Augmentin® (amoksicilin + klavulanska kiselina)	Amoksicilin: 125 mg/l Klavulanska kiselina: 25 mg/l
Vankomicin	125 mg/l
Protugljivični lijekovi	
Flukonazol	1 mg/l
Imunosupresivni lijekovi	
Rapamicin	100 mg/l
Natrijev mikofenolat	80 mg/l

Otpornost

Provjera otpornosti omogućuje određivanje ukupne stope neuspješnosti kompleta *artus* CMV RG PCR Kit. U 100 uzoraka plazme negativnih na CMV dodan je CMV u konačnoj koncentraciji od 170 kopija/ml (približno trostruko veća koncentracija od granice analitičke osjetljivosti). Nakon ekstrakcije s pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Kit ti su uzorci analizirani s pomoću *artus* CMV RG PCR Kit. Za sve uzorke CMV-a stopa neuspješnosti iznosila je 0 %. Osim toga, otpornost interne kontrole procijenjena je pročišćavanjem i analizom 100 uzoraka plazme negativnih na CMV. Stoga otpornost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit iznosi ≥ 99 %.

Obnovljivost

Podaci o obnovljivosti omogućuju redovitu procjenu učinkovitosti kompleta *artus* CMV RG PCR Kit te učinkovitu usporedbu s drugim proizvodima. Ti su podaci dobiveni sudjelovanjem u uspostavljenim programima za ocjenjivanje učinkovitosti.

Osim sudjelovanja u uspostavljenim programima za ocjenjivanje učinkovitosti, u 3 vanjskim laboratorijima ispitan je panel za CMV od 10 sastavnica (tablica 11) s pomoću kompleta EZ1 DSP Virus Kit na instrumentu EZ1 Advanced XL za pročišćavanje nukleinske kiseline te kompleta *artus* RG PCR za testiranje eluata DNK.

Tablica 11. Sažetak sastavnica panela za CMV

Broj panela (vrsta sastavnice panela)	Sastavnica panela	Učinak razrjeđivanja
1001 (1)	Negativan	Negativan pool 1
1002 (1)	Negativan	Negativan pool 2
1003 (2)	Visoko negativan	50 % pozitivan
1004 (2)	Visoko negativan	50 % pozitivan
1005 (3)	Nisko pozitivan	200 kopije/ml
1006 (3)	Nisko pozitivan	200 kopije/ml
1007 (4)	Srednje pozitivan	2.000 kopije/ml
1008 (4)	Srednje pozitivan	2.000 kopije/ml
1009 (5)	Visoko pozitivan	200.000 kopije/ml
1010 (5)	Visoko pozitivan	200.000 kopije/ml

Panel od 10 sastavnica testiran je u duplikatu s 2 različita rukovatelja svakog dana tijekom 6 dana na svakoj lokaciji s 3 kompleta reagensa s istim serijskim brojem. Dakle, 20 uzoraka pomnoženo s 2 rukovateljima tijekom 6 dana na 3 lokacijama iznosi 720 podatkovnih točaka.

Pokazalo se da ukupna obnovljivost testa *artus* CMV RGQ MDx iznosi ≤ 12 % CV za uzorke s koncentracijom između 200 kopije/ml i 200.000 kopije/ml (tablica 12)

Tablica 12. Ukupni sažetak (vrsta svake sastavnice panela) – zabilježene srednje vrijednosti

vrsta_sastavnice_panela	Br. zabilježenih	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Postotak CV-a	Minimalno
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

Ukupni sažetak postotka varijance i standardne devijacije za vrijednosti log₁₀ IU/ml za svaki od 5 panela prema serijskom broju, lokaciji, rukovatelju, danu, između postupaka i unutar postupka prikazan je u tablici 13 (sljedeća stranica).

Tablica 13. Ukupni sažetak varijance i standardne devijacije

Uzorak	1	2	3	4	5	
Vrsta uzorka	negativan	visoko negativan	nisko pozitivan	srednje pozitivan	visoko pozitivan	
Zabilježena srednja vrijednost log₁₀ IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Br. testova	144	144	144	144	144	
Mjerenje	% varijance s.d.					
Komponenta varijance	Serija	0	3,10	0	0	3,00
		0	0,113	0	0	0,016
	Lokacija	0	0	0	0,90	0
		0	0	0	0,016	0
	Rukovatelj	4,3	4,6	0	18,8	15,4
		0,033	0,136	0	0,074	0,037
	Dan	0	0	8,60	6,00	48,10
		0	0	0,067	0,042	0,065
	Između postupaka	0	0	4,40	10,90	7,90
		0	0	0,048	0,057	0,026
Unutar postupka	95,7	92,3	87	63,40	25,60	
	0,155	0,611	0,212	0,136	0,048	
Ukupno	100	100	100	100	100	
	0,158	0,635	0,227	0,171	0,094	

Procjena dijagnostičke sposobnosti

Komplet *artus* CMV RG PCR Kit procijenjen je u studiji u kojoj se uspoređuju komplet *artus* CMV RG PCR Kit i test COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Analizirano je 156 retrospektivnih i prospektivnih kliničkih uzoraka plazme s EDTA. Svi su uzorci ispitaka prethodno analizirani s pomoću COBAS AMPLICOR CMV MONITOR za rutinsku dijagnostiku i utvrđeno je jesu li pozitivni ili negativni.

DNK CMV-a za testiranje kompleta *artus* CMV RG PCR Kit izolirana je s pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Kit, interna kontrola kompleta *artus* CMV RG PCR Kit dodana je prilikom izolacija, a analiza je provedena na instrumentu Rotor-Gene 3000. Ispitci za test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test obrađeni su i analizirani u skladu s uputama proizvođača koje su navedene u uputama za uporabu.

Svih 11 uzoraka koji su dali pozitivne rezultate ispitivanjem testom COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test također su dali pozitivne rezultate ispitivanjem kompletom *artus* CMV RG PCR Kit. 123 od 145 uzoraka koji su dali negativne rezultate ispitivanjem testom COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test također su dali negativne rezultate ispitivanjem kompletom *artus* CMV RG PCR Kit. Dobivena su 22 nepodudarna rezultata (Tablica 14).

Tablica 14. Rezultati komparativne studije za potvrdu valjanosti

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

Ako se rezultati testa COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test uzimaju kao referentni, dijagnostička osjetljivost rezultata svih uzoraka dobivenih kompletom *artus* CMV RG PCR Kit iznosi 100 %, a dijagnostička specifičnost iznosi 84,8 %.

Dodatno testiranje 22 nesukladna uzorka potvrdilo je točnost rezultata dobivenih *artus* kompletima za PCR. Stoga se može pretpostaviti da je uzrok nepodudarnosti veća osjetljivost kompleta *artus* CMV RG PCR Kit.

Referencije

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).

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Komentari i prijedlozi

Nije dobiven signal s pomoću pozitivnih kontrola (CMV QS 1–4) u kanalu fluorescencije Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Odabrani kanal fluorescencije za analizu PCR podataka nije u skladu s protokolom | Za analizu podataka odaberite kanal fluorescencije Cycling Green za PCR analizu CMV-a i kanal fluorescencije Cycling Yellow za PCR interne kontrole. |
| b) Neispravno programiranje temperaturnog profila na instrumentu Rotor-Gene | Usporedite temperaturni profil s protokolom. Pogledajte „Protokol: PCR i analiza podataka“, stranica 14. |
| c) Neispravna konfiguracija PCR-a | Provjerite svoje radne korake prema shemi pipetiranja te po potrebi ponovite PCR. Pogledajte „Protokol: PCR i analiza podataka“, stranica 14. |
| d) Uvjeti pohrane za jednu komponentu kompleta ili više njih nisu bili u skladu s uputama navedenima u „Pohrana i rukovanje reagensima“, stranica 10) | Provjerite uvjete pohrane i rok trajanja (proučite naljepnicu kompleta) reagensa i po potrebi upotrijebite novi komplet. |
| e) Kompletu <i>artus</i> CMV RG PCR Kit istekao je rok trajanja | Provjerite uvjete pohrane i rok trajanja (proučite naljepnicu kompleta) reagensa i po potrebi upotrijebite novi komplet. |

Slabi signal ili odsustvo signala interne kontrole negativnog uzorka plazme podvrgnutog pročišćavanju s pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Kit ($C_T = 27 \pm 3$; prag, 0,03) u kanalu fluorescencije Cycling Yellow te istovremeno odsustvo signala u kanalu Cycling Green

- | | |
|--|---|
| a) Uvjeti PCR-a nisu u skladu s protokolom | Provjerite uvjete PCR-a (gore navedene) i po potrebi ponovite PCR uz ispravne postavke. |
| b) PCR reakcija je inhibirana | Pobrinite se da koristite preporučene metode izolacije i strogo se pridržavate uputa proizvođača. |
| c) DNK je izgubljena tijekom ekstrakcije | Ako je interna kontrola dodana prilikom ekstrakcije, odsustvo signala interne kontrole može ukazivati na gubitak DNK tijekom ekstrakcije. Pobrinite se da koristite preporučene metode izolacije (pogledajte „Izolacija DNK“, stranica 12) i strogo se pridržavate uputa proizvođača. |

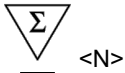
Komentari i prijedlozi

- | | |
|---|--|
| d) Uvjeti pohrane za jednu komponentu kompleta ili više njih nisu bili u skladu s uputama navedenima u „Pohrana i rukovanje reagensima“, stranica 10) | Provjerite uvjete pohrane i rok trajanja (proučite naljepnicu kompleta) reagensa i po potrebi upotrijebite novi komplet. |
| e) Kompletu <i>artus</i> CMV RG PCR Kit istekao je rok trajanja | Provjerite uvjete pohrane i rok trajanja (proučite naljepnicu kompleta) reagensa i po potrebi upotrijebite novi komplet. |

Signali dobiveni negativnim kontrolama u kanalu fluorescencije *Cycling Green* tijekom PCR analize

- | | |
|---|---|
| a) Došlo je do kontaminacije tijekom pripreme PCR-a | Ponovite PCR s novim reagensima u ponavljanjima.
Ako je moguće, zatvorite PCR epruvete neposredno nakon dodavanja uzorka za testiranje.
Pozitivne kontrole obavezno pipetirajte posljednje.
Obavezno dekontaminirajte radni prostor i instrumente u redovitim intervalima. |
| b) Došlo je do kontaminacije tijekom ekstrakcije | Ponovite ekstrakciju i PCR uzorka koji će se testirati s novim reagensima.
Obavezno dekontaminirajte radni prostor i instrumente u redovitim intervalima. |

Simboli



Sadržava reagensa dovoljno za <N> testova



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala



Komponente



Sadržava



Broj



Globalni broj trgovačke jedinice



Ograničenja temperature



Proizvođač



Pročitajte upute za uporabu

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	Za 24 reakcije: glavna mješavina, otopina magnezija, 4 standarda za kvantifikaciju, interna kontrola, voda (za PCR)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	Za 96 reakcija: glavna mješavina, otopina magnezija, 4 standarda za kvantifikaciju, interna kontrola, voda (za PCR)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit — za automatizirano, istovremeno pročišćavanje DNK i RNK virusa od 1–14 uzoraka seruma, plazme ili cerebrospinalne tekućine		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Za 48 priprema nukleinskih kiselina virusa: unaprijed napunjeni ulošci reagensa, držači jednokratnih vrhova, jednokratni vrhovi s filtrima, epruvete za uzorke, epruvete za eluciju, puferi, nosač RNK	62724
QIAamp DSP Virus Kit — za pročišćavanje nukleinskih kiselina virusa iz humane plazme za in vitro dijagnostičke svrhe		
QIAamp DSP Virus Kit	Za 50 pripremanja: QIAamp MinElute® spin kolone, puferi, reagensi, epruvete, proširivači kolona i priključci VacConnectors	60704
Instrument Rotor-Gene Q MDx i pribor		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cikler za real-time PCR s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni), prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka nisu uključene	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cikler za real-time PCR s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni), prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove te rad, instalaciju i obuku	9002023

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cikler za real-time PCR i analizator taljenja velike razlučivosti s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka nisu uključene	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cikler za real-time PCR i analizator taljenja velike razlučivosti s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove te rad, instalaciju i obuku	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrument za real-time PCR s 6 kanala (plavi, zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni) kanal, uključujući prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka nisu uključene	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrument za real-time PCR sa 6 kanala (plavi, zeleni, žuti, narančasti, crveni, tamnocrveni), uključujući prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Cikler za real-time PCR s 2 kanala (zeleni, žuti), prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka nisu uključene	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Cikler za real-time PCR s 2 kanala (zeleni, žuti), prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove te rad, instalaciju i obuku	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Cikler za real-time PCR i analizator taljenja velike razlučivosti s 2 kanala (zeleni, žuti) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad, instalacija i obuka nisu uključene	9002012

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Cikler za real-time PCR i analizator taljenja velike razlučivosti s 2 kanala (zeleni, žuti) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove te rad, instalaciju i obuku	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije s jednokanalnom pipetom sa 72 epruvete od 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije sa standardnim rasporedom 8 x 12 s 96 epruveta od 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripova od 4 epruvete i čepova za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripova od 4 epruvete i čepova za 10.000 reakcija	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 epruveta s tankim stijenkama za 1000 reakcija	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 epruveta s tankim stijenkama za 10.000 reakcija	981008

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplete tvrtke QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

Povijest revizija dokumenta

Revizija	Izmjene
R6, ožujak 2021.	Dodani odjeljci Linearni raspon, Interferirajuće tvari i Obnovljivost. Ažurirani odjeljci Namjena i Kvantifikacija. Uklonjene reference na instrumente tvrtke QIAGEN koji više nisu podržani.
R7, prosinac 2021.	Ispravak odjeljka Sadržaj kompleta dodavanjem pojedinosti o formatu kompleta s 24 testa

Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet *artus* CMV RG PCR Kit

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamci da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na adresi www.qiagen.com.

Kupnjom ovog proizvoda kupcu se omogućuje korištenje proizvoda za izvođenje dijagnostičkih postupaka za humanu in vitro dijagnostiku. Ovim se ne daje pravo na opći patent ili bilo koja druga licencija osim specifičnog prava uporabe ostvarenog kupnjom.

Zaštitni znakovi: 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-0046-009 1126759 R7 12/2021© 2021 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Web-mjesto www.qiagen.com