

Prosinec 2021

# Návod k použití sady *artus*<sup>®</sup> CMV RG PCR Kit (příručka)



24 (kat. čís. 4503263)



96 (kat. čís. 4503265)

Verze 1

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

K použití s přístroji Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx

**IVD**

**CE** 0197

**REF**

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R7 **MAT**

1126759CS



# Obsah

Účel použití.....	5
Popis a principy .....	5
Informace o patogenech .....	6
Princip testu .....	6
Dodávané materiály .....	7
Obsah sady .....	7
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky .....	8
Reagencie .....	8
Spotřební materiály .....	8
Vybavení .....	8
Varování a bezpečnostní opatření.....	9
Informace o bezpečnosti .....	9
Bezpečnostní opatření .....	9
Skladování reagensů a manipulace s nimi .....	10
Manipulace se vzorky a jejich skladování.....	10
Odběr vzorků.....	10
Skladování vzorků.....	11
Přeprava vzorků .....	11
Postup .....	12
Izolace DNA .....	12
Interní kontrola .....	13
Protokol: PCR a analýza dat .....	14

---

Interpretace výsledků .....	22
Kvantifikace.....	22
Výsledky.....	23
Kontrola kvality .....	26
Omezení.....	26
Charakteristika funkčních vlastností .....	27
Analytická citlivost.....	27
Lineární oblast kvantifikace.....	29
Specificita.....	30
Přesnost.....	32
Interferující látky.....	34
Robustnost.....	36
Reprodukovatelnost.....	36
Diagnostické hodnocení.....	38
Literatura .....	40
Návod na řešení potíží .....	41
Symboly.....	43
Informace pro objednání.....	44
Historie revízi dokumentu .....	47

# Účel použití

Sada *artus* CMV RG PCR Kit je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci DNA cytomegaviru (CMV) v lidské plazmě. Tato diagnostická testovací sada využívá polymerázovou řetězovou reakci (Polymerase Chain Reaction, PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji Rotor-Gene Q.

Sada *artus* CMV RG PCR Kit je určena k použití ve spojení s klinickým obrazem a dalšími laboratorními markery pro léčbu infekce CMV u pacientů s rizikem onemocnění CMV.

Výsledky získané pomocí sady *artus* CMV RG PCR Kit je nutné interpretovat v kontextu veškerých relevantních klinických a laboratorních nálezů.

Sada *artus* CMV RG PCR Kit není určena k použití jako screeningový test na přítomnost CMV v krvi či krevních produktech ani jako diagnostický test k potvrzení přítomnosti infekce CMV.

## Popis a principy

Sada *artus* CMV RG PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz DNA viru CMV pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) na přístrojích Rotor-Gene Q MDx. Směs CMV RG Master obsahuje reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci 105 bp dlouhého úseku hlavního bezprostředně časného genu (Major Immediate Early Gene, *MIE*) v genomu CMV (analýza dokáže detekovat genotypy CMV gB1–gB4) a také pro přímou detekci tohoto specifického amplikonu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q MDx.

Kromě toho sada *artus* CMV RG PCR Kit obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Je detekován jako interní kontrola (Internal Control, IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow přístrojů Rotor-Gene Q MDx. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (CMV QS 1–4), s jejichž pomocí lze určit množství virové DNA. Další informace uvádí část „Kvantifikace“, strana 22.

---

## Informace o patogenech

Lidský cytomegalovirus (CMV) se vyskytuje v krvi, tkáních a téměř ve všech sekrečních tekutinách infikovaných osob. K přenosu viru může dojít perorálně, pohlavním stykem, krevní transfuzí nebo při transplantaci orgánů, dále nitroděložně nebo perinatálně (1–4). Testování virové nálože CMV je důležitou pomůckou pro posouzení rizika onemocnění, diagnostiku onemocnění a sledování reakce na léčbu (5).


Infekce CMV často vede k asymptomatické infekci, po které virus v těle celoživotně přetrvává. Pokud se u dospívajících nebo dospělých vyskytnou příznaky, jsou podobné příznakům mononukleózy s horečkou, slabé hepatitidy a celkové indispozice. (6) Těžký průběh infekce CMV byl pozorován zejména u pacientů infikovaných nitroděložně a u imunodeficientních pacientů. (4, 7)

## Princip testu

Průkaz patogenu pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je založen na amplifikaci specifických oblastí genomu patogenu. Amplifikát je při real-time PCR detekován pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se vážou specificky na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR (tj. v reálném čase) umožňuje průkaz a kvantifikaci kumulujícího se produktu, aniž by bylo nutné po běhu PCR znovu otevírat reakční zkumavky. (8)

# Dodávané materiály

## Obsah sady

<b>Sada artus CMV RG PCR Kit</b>			<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>Katalogové č.</b>			<b>4503263</b>	<b>4503265</b>
<b>Počet reakcí</b>			<b>24</b>	<b>96</b>
Blue	CMV RG Master (Taq 0,1 U/μl)		2 × 12 reakcí	8 × 12 reakcí
Yellow	CMV Mg-Sol*	<b>Mg-Sol</b>	600 μl	600 μl
Red	CMV QS 1 <sup>†</sup> (1 × 104 kopii/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Red	CMV QS 2 <sup>†</sup> (1 × 103 kopii/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Red	CMV QS 3 <sup>†</sup> (1 × 102 kopii/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Red	CMV QS 4 <sup>†</sup> (1 × 101 kopii/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Zelená	CMV RG IC‡	<b>IC</b>	1 000 μl	2 × 1 000 μl
Bílá	Water (Voda) (v kvalitě vhodné pro PCR)		1 000 μl	1 000 μl
	Návod k použití		1	1

\* Roztok hořčičku

† Kvantifikační standard

‡ Interní kontrola

# Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

## Reagencie

- Sada k izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 12)

## Spotřební materiály

- Sterilní pipetovací špičky s filtry
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pro použití s 72-Well Rotor (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- **Alternativně:** PCR Tubes, 0.2 ml, pro použití s 36-Well Rotor (kat. č. 981005 nebo 981008)

## Vybavení

- Pipety (nastavitelné)\*
- Vířivý mixér\*
- Stolní odstředivka\* s rotorem na reakční zkumavky o objemu 2 ml
- Přístroj Rotor-Gene Q MDx\* s fluorescenčními kanály Cycling Green a Cycling Yellow
- Software Rotor-Gene Q, verze 2.3.5 nebo vyšší
- Chladicí blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901, případně Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. č. 9018905)

\* Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.



---

# Varování a bezpečnostní opatření

## Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech sad a komponent sad QIAGEN.

Alikvoty a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

## Bezpečnostní opatření

Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, pozitivní kontroly (Positive Control, PC) a amplikony) do reakční směsi na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15-25 °C).
- Po rozmrazení složky promíchejte (opakováním pipetováním nahoru a dolů nebo na pulsní třepačce) a krátce odstředte.
- Pracujte rychle a udržujte komponenty na ledu nebo v chladicím bloku (72- / 96jamkový plnicí blok).

# Skladování reagensí a manipulace s nimi

Komponenty sady *artus* CMV RG PCR Kit se skladují při teplotě  $-30$  až  $-15$  °C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení ( $> 2\times$ ), snižuje se tím citlivost analýzy. Pokud se reagensie mají používat pouze občasně, je nutné je zmrazit v alikvotních podílech. Uchovávání při teplotě  $2-8$  °C by nemělo překročit dobu 5 hodin.

## Manipulace se vzorky a jejich skladování

**Poznámka:** Se všemi alikvoty se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

**Poznámka:** Analytické studie provedené za účelem ověření účinnosti této sady uvádějí EDTA plazmu jako nejvhodnější materiál vzorku pro detekci CMV. Doporučujeme tedy používat se sadou *artus* CMV RG PCR Kit tento materiál.

Validace sady *artus* CMV RG PCR Kit byla provedena pomocí vzorků lidské EDTA plazmy. Jiné materiály vzorku validovány nejsou. Pro přípravu vzorků používejte prosím pouze doporučenou sadu k izolaci nukleových kyselin (viz „Izolace DNA“, strana 12).

Při použití určitých materiálů vzorku je třeba dodržovat zvláštní předpisy pro odběr, skladování a přepravu.

### Odběr vzorků

Každý odběr krve je podmíněn narušením krevních cév (tepny, žíly či kapiláry). Používat se smí pouze nezávadný a sterilní materiál. Pro odběr krve by měly být k dispozici odpovídající jednorázové pomůcky. K punkci žil by se neměly používat příliš jemné kapilární jehly. Odběr žilní krve by měl být proveden na vhodných místech v oblasti loketní jamky, předloktí nebo na hřbetu ruky. Krev odebírejte do standardních odběrových zkumavek (červený uzávěr, Sarstedt® nebo ekvivalentní zkumavky jiných výrobců). Mělo by být odebráno 5–10 ml krve do zkumavky s EDTA. Zkumavky by měly být bezprostředně po odběru vzorku promíchány opakovaným obrácením ( $8\times$ , netřepat).

**Poznámka:** Nesmí se používat heparinizované vzorky.

## Skladování vzorků

Plná krev by měla být během 6 hodin rozdělena na plazmu a buněčné elementy, a to centrifugací při  $800\text{--}1\,600 \times g$  po dobu 20 minut (9, 10). Oddělená plazma se přenáší do sterilních polypropylenových zkumavek. Citlivost analýzy může být snížena, pokud jsou vzorky rutinně zmrazovány nebo skladovány po delší dobu.

## Přeprava vzorků

Vzorky by měly být přepravovány zásadně v nerozbitných transportních nádobách, aby se zabránilo eventuálnímu nebezpečí infekce při úniku vzorku. Vzorky musejí být přepravovány podle platných místních a státních předpisů pro přepravu látek vyvolávajících nákazu.\*

Přeprava vzorků nesmí trvat déle než 6 hodin. Skladování vzorků v místě odběru se nedoporučuje. Zaslání vzorků poštou je možné, musí se však dbát na zákonné předpisy pro přepravu látek vyvolávajících nákazu. Doporučujeme přepravu vzorků kurýrem. Krevní vzorky by měly být zasílány chlazené ( $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a oddělená plazma hluboce zmrazená ( $-30$  až  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

\* Mezinárodní asociace leteckých dopravců (International Air Transport Association, IATA). Předpisy pro přepravu nebezpečného zboží.

# Postup

## Izolace DNA

Sady společností QIAGEN, které uvádí Tabulka 1, jsou validovány pro purifikaci virové DNA z uvedených typů vzorků lidské tkáně pro použití se sadou *artus* CMV RG PCR Kit. Purifikaci virové DNA provádějte podle pokynů v příslušné příručce k jednotlivým sadám.

**Tabulka 1. Purifikační sady validované pro použití se sadou *artus* CMV RG PCR Kit**

Materiál vzorku	Objem vzorku	Sada k izolaci nukleových kyselin	Katalogové číslo	Nosič RNA
EDTA plazma	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Obsažena
EDTA plazma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Obsažena

**Poznámka:** Užití nosiče RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace, a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Pro vyšší stabilitu nosiče RNA, dodávaného spolu se sadou QIAamp DSP Virus Kit, doporučujeme postupovat podle údajů o rekonstituci a skladování nosiče RNA, které jsou uvedeny v části „Příprava reagensií a pufrů“ *příručky k sadě QIAamp DSP Virus Kit*.

**Poznámka:** Interní kontrolu sady *artus* CMV RG PCR Kit lze použít přímo v postupu izolace. Dbejte na to, aby byl při izolaci zpracován také jeden negativní vzorek plazmy. Odpovídající signál interní kontroly je základem pro vyhodnocení izolace (viz níže uvedená část „Interní kontrola“).

## Interní kontrola

Interní kontrola (CMV RG IC) se dodává spolu s touto sadou. Uživatel má tak možnost kontrolovat postup izolace DNA i možnou inhibici PCR. Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci interní kontrolu v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže používáte například sadu QIAamp DSP Virus Kit a eluujete DNA v 60 µl elučního pufru (AVE), přidejte na začátku 6 µl interní kontroly. Množství vkládané interní kontroly závisí pouze na elučním objemu.

**Poznámka:** Interní kontrola a nosič RNA (viz část „Izolace DNA“, strana 12) by měly být přidávány pouze ke směsi lyzačního pufru a materiálu vzorku nebo přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidávána přímo k materiálu vzorku. Upozorňujeme, že při přidávání k lyzačnímu pufru musíte směst interní kontroly a lyzačního pufru / nosiče RNA připravit vždy čerstvou a použít ji ihned (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k selhání interní kontroly a ke snížení efektivity izolace).

**Poznámka:** Interní kontrolu a nosič RNA nepřidávejte přímo do materiálu vzorku.

Aby byla purifikace hodnocena jako úspěšná, musí hodnota  $C_T$  interní kontroly negativního vzorku plazmy zpracovávaného při purifikaci (sada QIAamp DSP Virus Kit) za použití přístrojů Rotor-Gene Q dosahovat  $C_T = 27 \pm 3$  (mezní hodnota: 0,03) (více informací je uvedeno na straně 25). Uvedená variabilita je podmíněná variabilitou přístroje a purifikace. Větší odchylka poukazuje na problémy s purifikací. V tomto případě musí být purifikace přezkoušena a v případě potřeby nově validována. Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím technickou podporu společnosti QIAGEN.

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol, jak popisuje krok 2b protokolu (strana 15).

# Protokol: PCR a analýza dat

## Důležité body před zahájením používání

- Před spuštěním protokolu získejte základní informace o přístroji Rotor-Gene Q. Další informace naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.
- Dbejte na to, aby byl do každého běhu PCR zahrnut alespoň jeden kvantifikační standard a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR). Pro vytvoření standardní křivky použijte u každého běhu PCR všechny 4 kvantifikační standardy (CMV QS 1–4) dodávané spolu s produktem.

## Co je třeba udělat, než začnete

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8 °C.
- Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety, případně krátký vortex) a následně centrifugovány.

## Postup

1. Umístěte požadovaný počet zkumavek PCR do adaptérů chladicího bloku.
2. Chcete-li pomocí interní kontroly sledovat jak postup izolace DNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Chcete-li interní kontrolu použít výhradně ke kontrole inhibice PCR, postupujte podle kroku 2b.

**Poznámka:** Důrazně doporučujeme přidávat interní kontrolu do směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol použité pro kvantifikační standardy. U kvantifikačních standardů přidejte interní kontrolu přímo do směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol, jak je popsáno v kroku 2b protokolu. Tento master mix použijte pro každý kvantifikační standard (CMV QS 1–4).

- 2a. Interní kontrola již byla přidána k izolaci (viz část „*Interní kontrola*“, strana 13). V tomto případě připravte master mix podle tabulky 2 (na další straně). Reakční směs obvykle obsahuje kromě vzorku všechny komponenty nutné k provedení PCR.

**Tabulka 2. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá ke sledování izolace DNA a ke kontrole inhibice PCR)**

Počet vzorků	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Celkový objem	30 µl	360 µl

- 2b. Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol. V tomto případě připravte master mix podle tabulky 3. Reakční směs obvykle obsahuje kromě vzorku všechny komponenty nutné k provedení PCR.

**Tabulka 3. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá výhradně ke kontrole inhibice PCR)**

Počet vzorků	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Celkový objem	32 µl*	384 µl*

\* Zvýšení objemu podmíněně přidáním interní kontroly se při přípravě reakce PCR nezohledňuje. Citivost detekčního systému není ovlivněna.

3. Do každé zkumavky pro PCR napipetujte 30 µl master mixu a poté přidejte 20 µl vzorku eluované DNA (viz tabulka 4). Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 20 µl alespoň jednoho kvantifikačního standardu (CMV QS 1–4) a jako negativní kontrolu 20 µl vody (v kvalitě vhodné pro PCR).

**Tabulka 4. Příprava analýzy PCR**

Počet vzorků	1	12
Master mix	30 µl	po 30 µl
Vzorek	20 µl	po 20 µl
Celkový objem	50 µl	po 50 µl
Počet vzorků	1	12

4. Uzavřete zkumavky PCR. Zkontrolujte, zda pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene) je umístěn v horní části rotoru a během zpracování brání náhodnému otevření zkumavek.

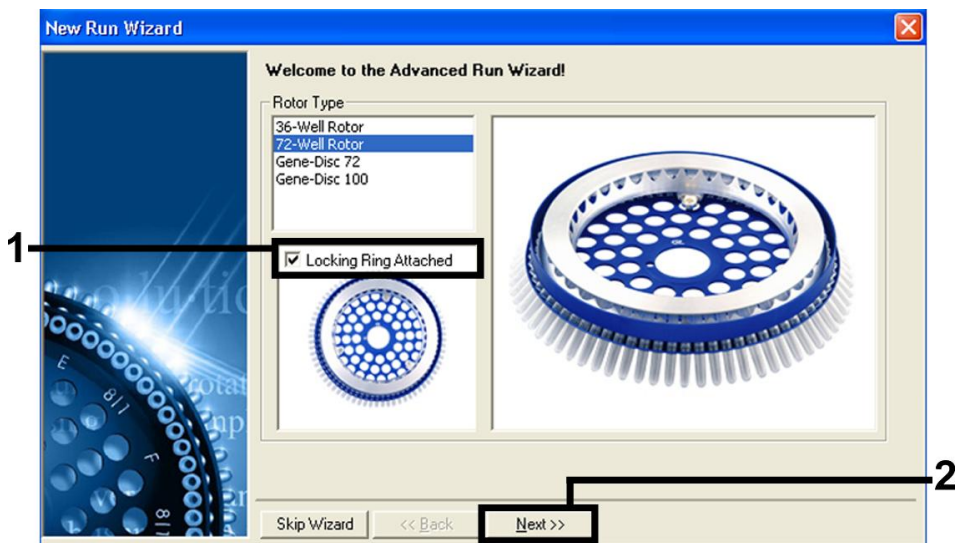
5. Po detekci CMV DNA vytvořte teplotní profil podle následujících kroků:

Nastavení obecných parametrů analýzy	<b>Obrázek 1, obrázek 2 a obrázek 3</b>
Počáteční aktivace enzymu se spuštěním za tepla	<b>Obrázek 4</b>
Amplifikace DNA (touchdown PCR)	<b>Obrázek 5</b>
Nastavení citlivosti fluorescenčních kanálů	<b>Obrázek 6</b>
Spuštění běhu	<b>Obrázek 7</b>

Všechny specifikace se vztahují k softwaru Rotor-Gene Q, verze 2.3.5 a vyšší. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v příslušné uživatelské příručce k přístroji. Na obrázku jsou tato nastavení orámována silnou černou čarou. Uvedeny jsou ilustrace vztahující se k přístrojům Rotor-Gene Q.

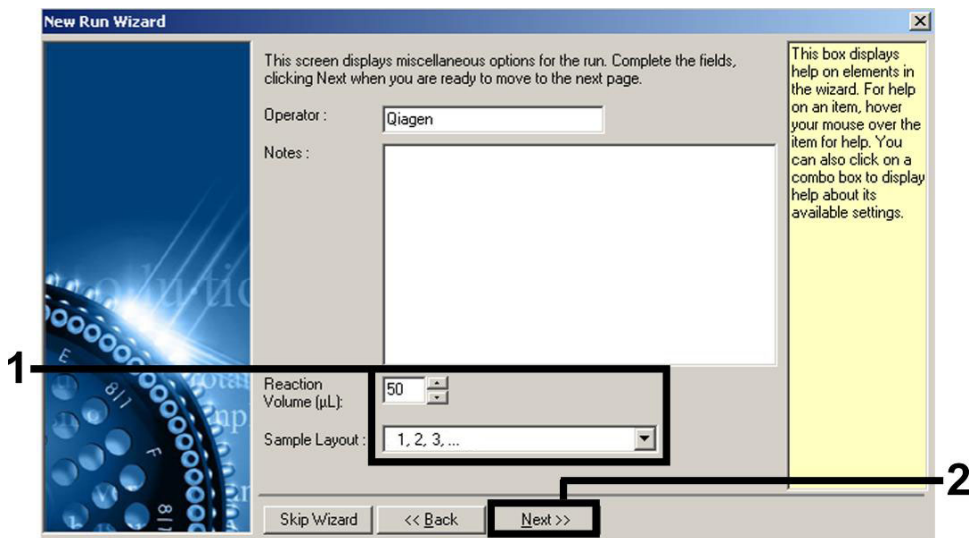
6. Otevřete dialogové okno **New Run Wizard** (Průvodce novým během) (obrázek 1, další stránka). Zaškrtněte políčko **Locking Ring Attached** (Přípevněn pojistný kroužek) a klikněte na tlačítko **Next** (Další).





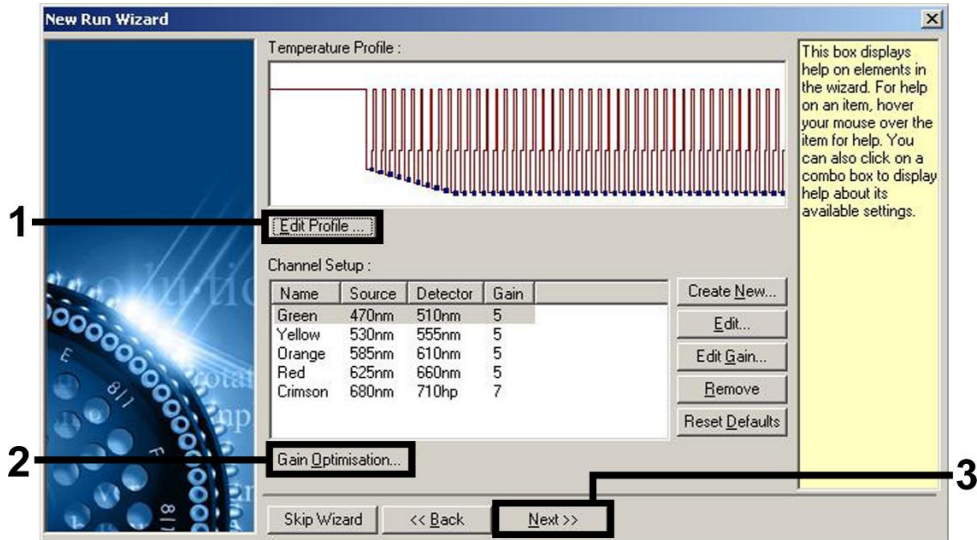
Obrázek 1. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým během).

7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na tlačítko **Next (Další)** (Obrázek 2).

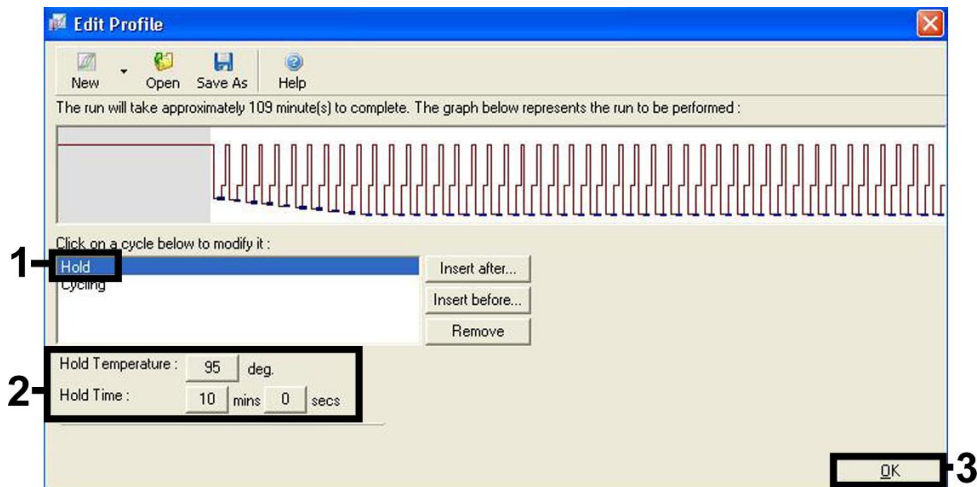


Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů analýzy.

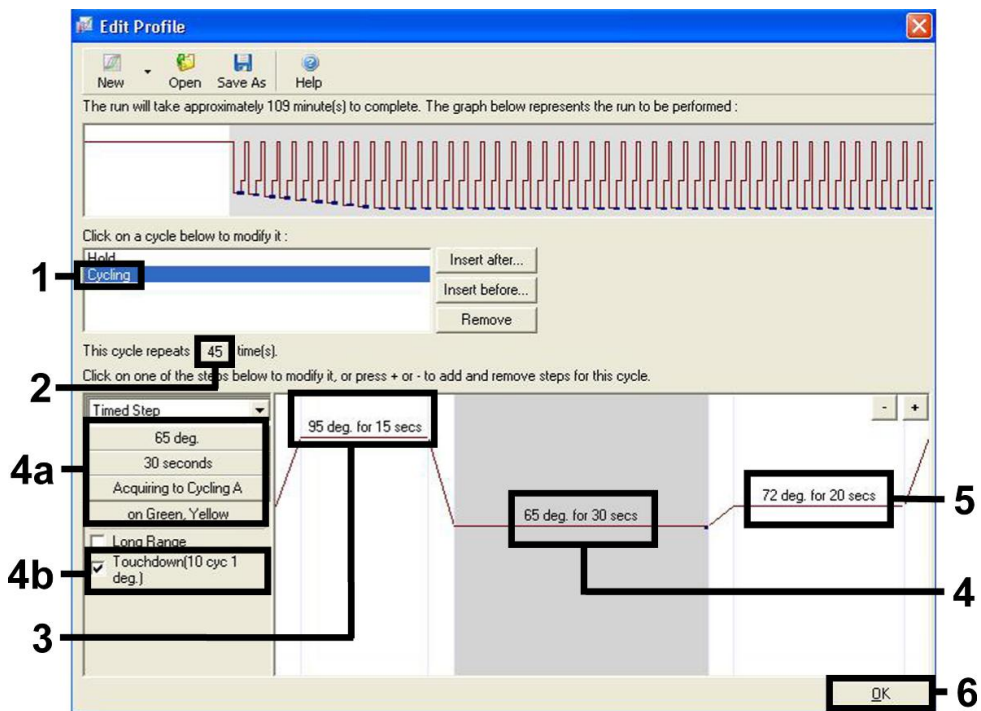
8. Klikněte na tlačítko **Edit Profile** (Upravit profil) v dalším okně **New Run Wizard** (Průvodce novým během) (obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil podle obrázku 3 až obrázku 5.



Obrázek 3. Úprava profilu.

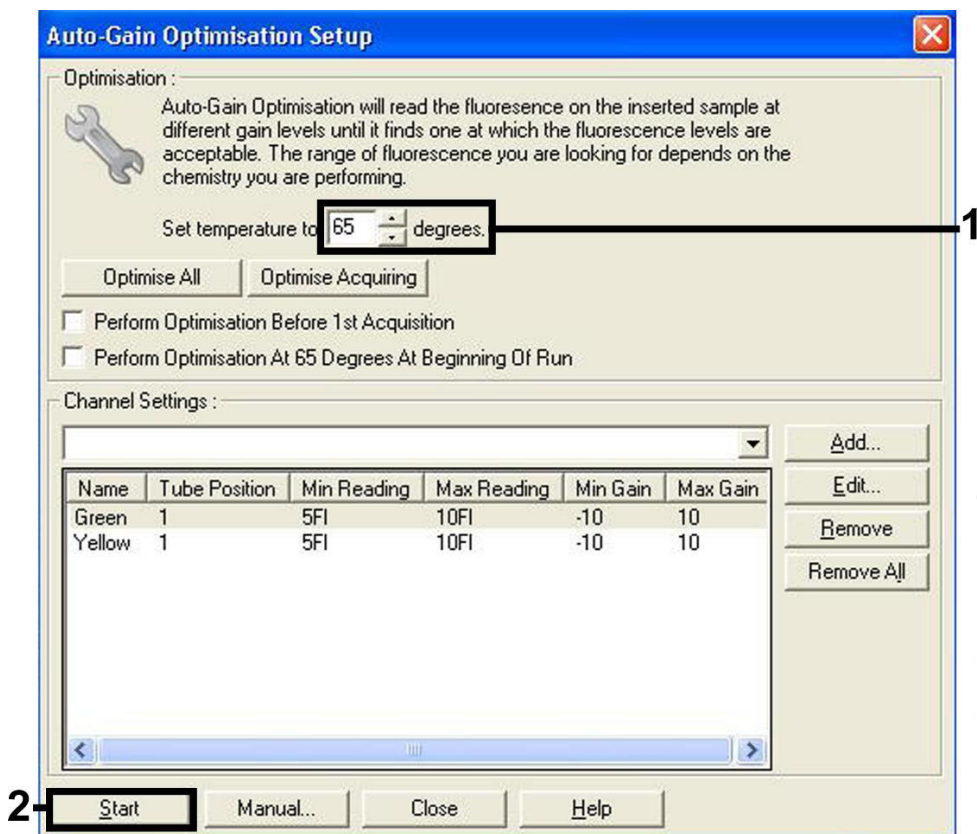


Obrázek 4. Počáteční aktivace enzymu se spuštěním za tepla.



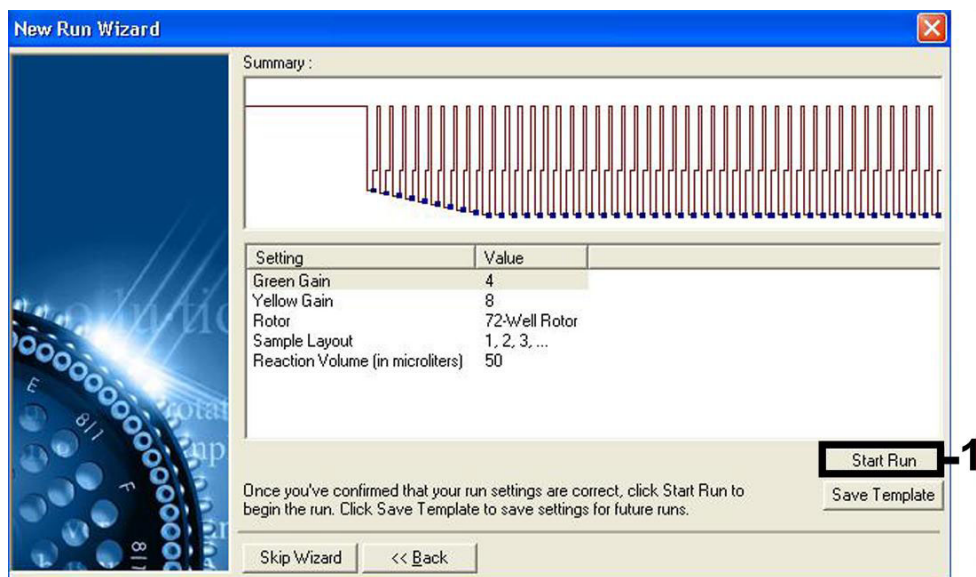
Obrázek 5. Amplifikace DNA. Ujistěte se, že je dotyková funkce u kroku hybridizace aktivována pro 10 cyklů.

9. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenčních intenzit ve zkumavkách PCR. Klikněte na tlačítko **Gain Optimisation** (Optimalizace zisku) v dialogovém okně **New Run Wizard** (Průvodce novým během) (viz obrázek 3, předchozí stránka) pro otevření dialogového okna **Auto-Gain Optimisation Setup** (Nastavení automatické optimalizace zisku). Nastavte kalibrační teplotu na 65 °C, aby odpovídala hybridizační teplotě amplifikačního programu (obrázek 6, další stránka).



Obrázek 6. Nastavení citlivosti fluorescenčních kanálů.

- Hodnoty zisku determinované kalibračními kanály se automaticky uloží a jsou uvedeny v seznamu v posledním okně nabídky programovací procedury (obrázek 7, další stránka). Klikněte na tlačítko **Start run** (Zahájit běh).



Obrázek 7. Spuštění běhu.

# Interpretace výsledků

## Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (CMV QS 1–4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a v PCR se používají přímo o stejném objemu 20 µl (není nutná žádná další extrakce). Standardní křivku na přístrojích Rotor-Gene Q vytvoříte tak, že použijete všechny 4 kvantifikační standardy, definujete je v dialogovém okně **Edit Samples** (Upravit vzorky) jako standardy a zadáte odpovídající koncentrace (viz uživatelská příručka k příslušnému přístroji).

**Poznámka:** K zaručení přesné kvantifikace důrazně doporučujeme přidávat interní kontrolu do směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol použité pro kvantifikační standardy. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo do směsi CMV RG Master a CMV Mg-Sol, jak je popsáno v kroku 2b protokolu (stránka 15). Tento master mix použijte pro každý kvantifikační standard (CMV QS 1–4).

**Poznámka:** Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml alikvotu se používá následující vzorec:

$$\text{Výsledek} \left( \frac{\text{kopie}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l}) \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem alikvotu před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu odstředěním nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

**Poznámka:** Kvantifikační standardy byly kalibrovány podle 1. mezinárodního standardu pro lidský cytomegalovirus (kód NIBSC: 09/162), jenž stanovila Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO).

---

Přepoččet kopií/ml na IU/ml s ohledem na sadu QIAamp DSP Virus Kit:

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

**Poznámka:** Pro pracovní postup QIAamp musejí být kvantifikované vzorky v lineárním rozsahu QS  $1 \times 10^1$  až  $1 \times 10^4$  kopií/ $\mu$ l. Mimo tento rozsah nelze kvantifikaci zajistit.

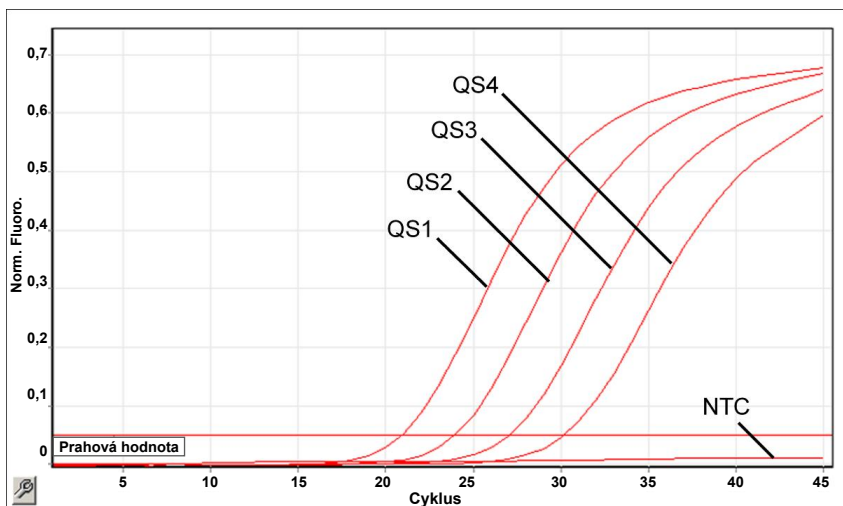
Přepoččet kopií/ml na IU/ml s ohledem na sadu EZ1 DSP Virus Kit na přístroji EZ1 Advanced XL:

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

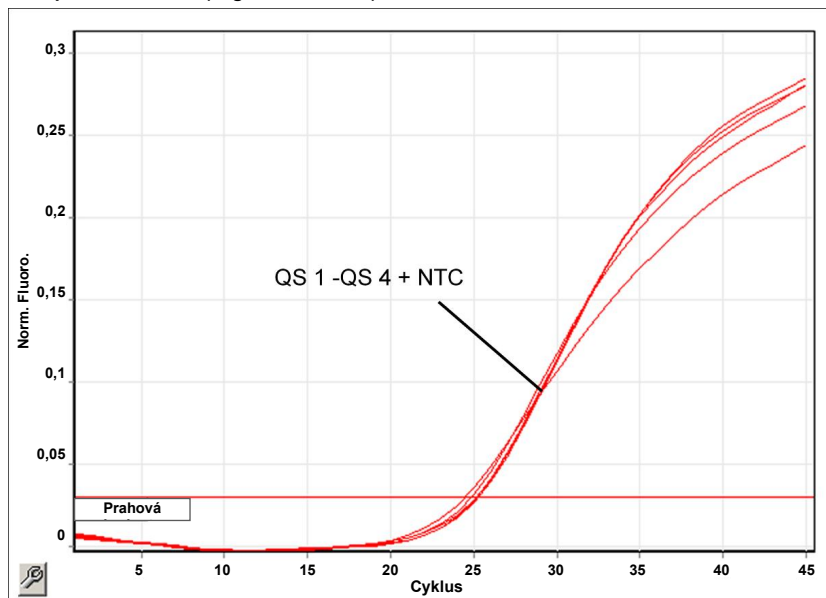
**Poznámka:** Pro pracovní postup EZ1 musejí být kvantifikované vzorky v lineárním rozsahu  $3,16E+02$  až  $1,00E+08$  kopií/ml. Mimo tento rozsah nelze kvantifikaci zajistit.

## Výsledky

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázku 8 a obrázku 9, (další stránka).



Obrázek 8. Průkaz kvantifikačních standardů (CMV QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: Bezteplátová kontrola (negativní kontrola).



Obrázek 9. Průkaz interní kontroly (Internal Control, IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow při současné amplifikaci kvantifikačních standardů (CMV QS 1–4). NTC: Bezteplátová kontrola (negativní kontrola).



---

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green je detekován signál.

Výsledek analýzy je pozitivní: vzorek obsahuje DNA viru CMV.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Yellow podružná, protože vysoké výchozí koncentrace DNA viru CMV (pozitivní signál v kanálu Cycling Green) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Yellow (kompetice).

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green není detekován žádný signál. Současně se v kanálu Cycling Yellow objevuje signál interní kontroly.

Ve vzorku není detekovatelná žádná DNA viru CMV. Lze jej proto považovat za negativní.

Při PCR negativní na CMV vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost inhibice PCR.

Signál není detekován ani v kanálu Cycling Green, ani v kanálu Cycling Yellow.

Není možné učinit závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole „Návod na řešení potíží“ na stránce 41.

---

# Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* CMV RG PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

## Omezení

Všechny reagenty jsou určeny pouze pro diagnostiku *in vitro*.

Produkt by měli používat pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky *in vitro*.

Pro dosažení optimálních výsledků PCR je nutné přísně dodržovat pokyny v uživatelské příručce k příslušnému přístroji.

Dbejte na dobu expirace uvedenou na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Komponenty po datu expirace nepoužívejte.

V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami sady, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost analýzy jsou pravidelně kontrolovány.

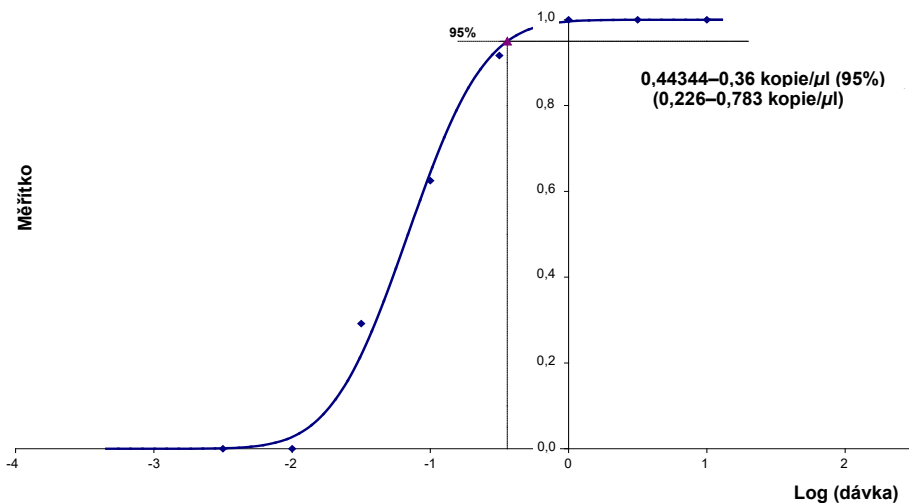
---

# Charakteristika funkčních vlastností

## Analytická citlivost

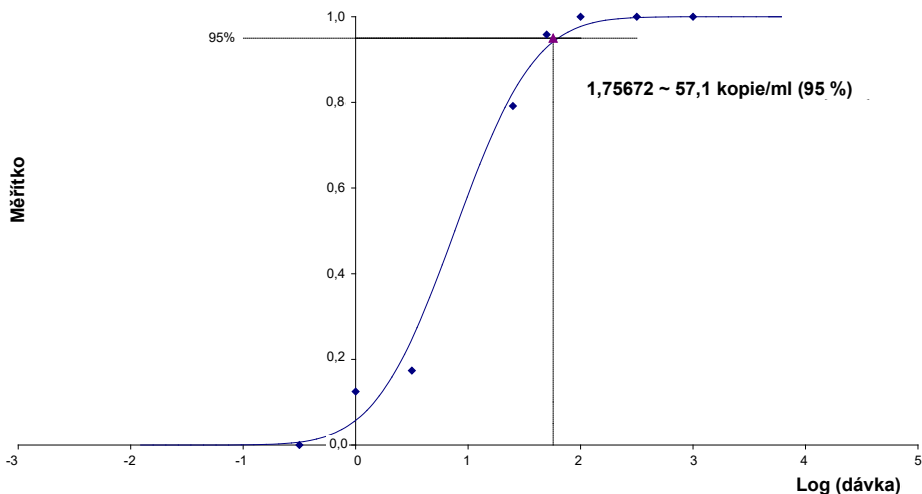
U sady *artus* CMV RG PCR Kit byly určeny analytická mez detekce i analytická mez detekce s přihlédnutím k purifikaci (limity citlivosti). Analytická mez detekce s přihlédnutím k purifikaci byla určena s použitím klinických vzorků pozitivních na CMV spolu se zvláštní metodou extrakce. Analytická mez detekce byla naproti tomu určena nezávisle na zvolené metodě extrakce s použitím DNA viru CMV o známé koncentraci.

Ke stanovení analytické citlivosti sady *artus* CMV RG PCR Kit byla vytvořena řada ředění genomové DNA viru CMV od 10 do jmenovité 0,00316 kopie/ $\mu$ l. Ta byla následně analyzována na přístrojích Rotor-Gene spolu se sadou *artus* CMV RG PCR Kit. Experimenty byly provedeny ve 3 různých dnech s 8 replikáty. Výsledky byly stanoveny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy u přístroje Rotor-Gene 6000 naleznete na obrázku 10 (další stránka). Analytická mez detekce sady *artus* CMV RG PCR Kit za použití přístrojů Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 a Rotor-Gene 3000 je 0,36 kopie/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ), respektive 0,24 kopie/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 0,36 kopie/ $\mu$ l, případně 0,24 kopie/ $\mu$ l.



**Obrázek 10. Probitová analýza: CMV (Rotor-Gene 6000). Analytická citlivost sady *artus* CMV RG PCR Kit na přístroji Rotor-Gene 6000.**

Analytická citlivost s ohledem na purifikaci (sada QIAamp DSP Virus Kit) sady *artus* CMV RG PCR na přístrojích Rotor-Gene byla určena řadou ředění z materiálu viru CMV od 1 000 do nominálně 0,316 kopie CMV/ml přidaného do klinických vzorků plazmy. Tyto vzorky byly podrobeny extrakci DNA pomocí sady QIAamp DSP Virus Kit (extrakční objem: 0,5 ml, eluční objem: 60 μl). Každé z 8 ředění bylo analyzováno za užití sady *artus* CMV RG PCR Kit ve 3 různých dnech s 8 replikáty. Výsledky byly stanoveny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy naleznete na obrázku 11 (na další stránce). Analytická mez detekce s ohledem na purifikaci sady *artus* CMV RG PCR Kit v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene 3000 je 57,1 kopií/ml ( $p = 0,05$ ). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 57,1 kopií/ml.



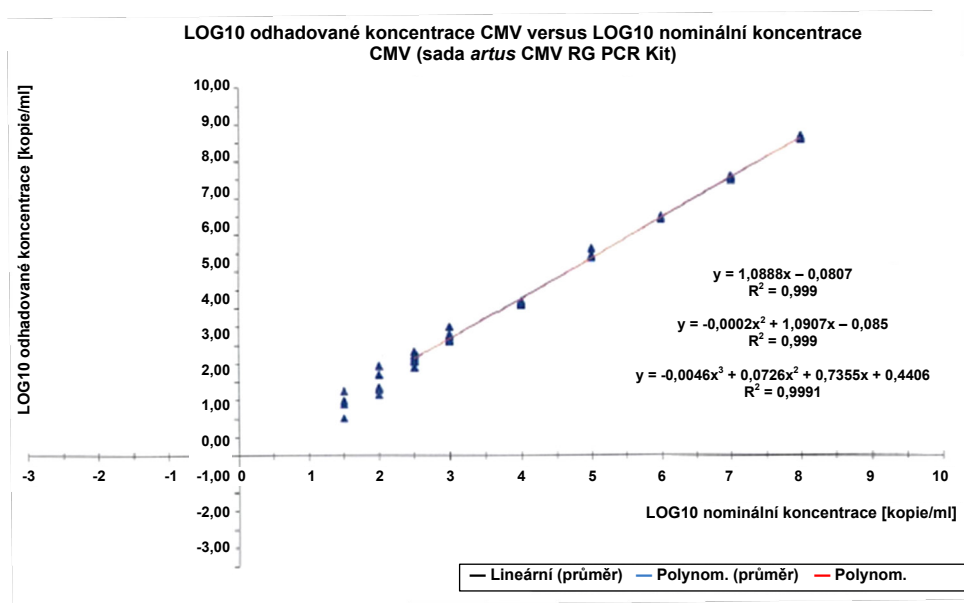
**Obrázek 11. Probitová analýza: CMV (Rotor-Gene 3000). Analytická citlivost s ohledem na purifikaci (sada QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) sady artus CMV RG PCR Kit na přístroji Rotor-Gene 3000.**

Analytická citlivost s ohledem na purifikaci pomocí soupravy EZ1 DSP Virus Kit (objem extrakce: 0,4 ml, eluční objem: 60  $\mu$ l) s použitím přístroje EZ1 Advanced XL sady *artus* CMV RG PCR Kit u přístroje Rotor-Gene 6000 je 68,75 kopií/ml ( $p = 0,05$ ). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 68,75 kopií/ml.

## Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace s ohledem na purifikaci pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit (objem extrakce: 0,4 ml, eluční objem: 60  $\mu$ l) s použitím přístroje EZ1 Advanced XL bylo stanoveno testováním 4 až 6 replikátů materiálu viru CMV v řadě ředění od  $3,16E+01$  do  $1,00E+08$  kopií/ml.

Grafické znázornění probitové analýzy naleznete na obrázku 12 (na další stránce).



**Obrazek 12.** Polynomická regrese datového souboru sady *artus* CMV RG PCR Kit s ohledem na purifikaci (sada EZ1 DSP Virus Kit) na přístroji EZ1 Advanced XL. Zahrnuty jsou lineární, kvadratické a kubické regresní modely.

Lineární oblast kvantifikace sady *artus* CMV RG PCR Kit s ohledem na purifikaci pomocí sady EZ1 DSP Virus Kit (objem extrakce: 0,4 ml, eluční objem: (60 µl) při použití přístroje EZ1 Advanced XL je 3,16E+02 až 1,00E+08 kopií/ml.

**Poznámka:** Lineární oblast kvantifikace sady *artus* CMV RG PCR Kit s ohledem na purifikaci pomocí sady QIAamp DSP Virus Kit (objem extrakce: 0,4 ml, eluční objem: 60 µl) je 1,00E+01 až 1,00E+04 kopií/µl.

## Specifická

Specifická sady *artus* CMV RG PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tím byla zajištěna detekovatelnost všech relevantních kmenů.

Specifická byla navíc validována pomocí 100 různých CMV negativních vzorků plazmy. 99 z těchto vzorků nevytvářelo spolu s primery a sondami specifickými pro CMV, které byly obsaženy ve směsi CMV RG Master, žádný signál.

**Poznámka:** 1 vzorek, který generoval signál v primerech a sondách specifických pro CMV, které byly rovněž pozitivní na CMV v sadách *artus* CMV LC Kit a TM RG PCR Kit, je pravděpodobně pozitivní. Konečná specifita na základě testování 100 jednotlivých vzorků od dárců byla ověřena jako 99,00 % (99/100).

Potenciální křížová reaktivita sady *artus* CMV RG PCR Kit byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 5. Žádný z testovaných patogenů nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

**Tabulka 5. Testování specifity diagnostické sady pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů**

Kontrolní skupina	CMV (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)	Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina-Barrové)	–	+
Lidský herpesvirus 6A	–	+
Lidský herpesvirus 6B	–	+
Lidský herpesvirus 7	–	+
Lidský herpesvirus 8 □ (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem)	–	+
Virus hepatitidy A	–	+
Virus hepatitidy B	–	+
Virus hepatitidy C	–	+

(pokračování na další straně)

Tabulka 5 (pokračování z předchozí strany)

Kontrolní skupina	CMV (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)	Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)
Virus lidské imunodeficiency 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+
Virus západonilské horečky	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+

## Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* CMV RG PCR Kit, které byly získány s využitím přístrojů Rotor-Gene, umožňují určit celkovou variabilitu analýzy. Tato celková variabilita se skládá z variability v rámci jedné analýzy (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), variability mezi analýzami (variabilita výsledků analýzy generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a z variability mezi různými šaržemi (variabilita výsledků analýzy za užití různých šarží). Získaná data byla použita k vypočítání standardní odchylky, variance a koeficientu variace jak pro PCR specifickou pro patogen, tak i pro PCR interní kontroly.

Údaje o přesnosti byly pro sadu *artus* CMV RG PCR Kit stanoveny na základě kvantifikačního standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/μl). Experimenty byly provedeny u 8 replikátů. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě hodnot  $C_T$  amplifikačních křivek ( $C_T$ : prahový cyklus, viz tabulka 6, další stránka). Pomocí odpovídajících hodnot  $C_T$  byly navíc určeny údaje o přesnosti pro kvantitativní výsledky v kopiích/μl (viz tabulka 7, další stránka). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl daného vzorku o uvedené koncentraci 1,21 % ( $C_T$ ), resp. 14,38 % (koncentrace), a 1,93 % ( $C_T$ ) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.



**Tabulka 6. Data o přesnosti na základě hodnot C<sub>T</sub>**

	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Rozptyl</b>	<b>Variační koeficient (%)</b>
Variabilita v rámci jedné analýzy: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Variabilita v rámci jedné analýzy: Interní kontrola	0,31	0,10	1,16
Variabilita mezi analýzami: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Variabilita mezi analýzami: Interní kontrola	0,47	0,22	1,77
Variabilita mezi různými šaržemi: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Variabilita mezi různými šaržemi: Interní kontrola	0,53	0,28	2,02
Celková variabilita: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Celková variabilita: Interní kontrola	0,51	0,26	1,93

**Tabulka 7. Údaje o přesnosti na základě kvantitativních výsledků (v kopiích/μl).**

	<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>Rozptyl</b>	<b>Variační koeficient (%)</b>
Variabilita v rámci jedné analýzy: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Variabilita mezi analýzami: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Variabilita mezi různými šaržemi: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Celková variabilita: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

## Interferující látky

DNA viru CMV byla přidána do negativní plazmy v různých komerčně dostupných systémech pro odběr krve s různými antikoagulanty. Vypočtené koncentrace (kopie/ml, průměr  $C_T$ , směrodatná odchylka, variance a CV% jsou uvedeny v tabulce 8. Směrodatná odchylka a koeficient variace jsou v rozsahu 5 %, a tedy v tolerančním pásmu. Žádný významný vliv různých látek na PCR nebyl zjištěn.

**Tabulka 8. Komerční systémy pro odběr krve a údaje o antikoagulantech**

Látka	Koncentrace (kopie/ml)	$C_T$ – průměr	$C_T$ – směrodatná odchylka	$C_T$ – variance	$C_T$ CV (%)
Draselná sůl EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Draselná sůl EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Draselná sůl EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Draselná sůl EDTA, Springe (reference)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Draselná sůl EDTA, Sarstedt (reference)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Draselná sůl EDTA (těhotenství)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Endogenní látky (tabulka 9, další stránka) byly přidávány do vzorků EDTA plazmy pozitivní na CMV, a to v koncentracích  $3 \times \text{LOD}$  a  $10 \times \text{LOD}$ . Všechny vzorky byly úspěšně detekovány a u vzorků obsahujících zvýšené hladiny endogenních inhibitorů (bilirubinu, hemoglobinu, triglyceridů a albuminu) nebyla pozorována žádná interference.

**Tabulka 9. Testované endogenní látky**

<b>Interferující látky</b>	<b>Koncentrace interferujících látek</b>
Bilirubin	30 mg/dl
Hemoglobin	2 g/dl
Triglycerid	1 g/dl
Albumin	6 g/dl

Běžné léky používané při transplantacích byly testovány při trojnásobku akutní maximální koncentrace po léčebném ošetření, jak je doporučeno ve směrnici CLSI® EP07-A2 (11) (viz tabulka 10). Každá z těchto látek byla přidána do vzorků negativních na CMV i pozitivních na CMV, které byly testovány ve 4 replikátech.

Všechny testované exogenní látky nevykázaly žádný významný vliv na výkon sady *artus* CMV RG PCR Kit.

**Tabulka 10. Seznam léků testovaných jako exogenní látky**

<b>Interferující látky</b>	<b>Koncentrace testu</b>
<b>Antibiotika</b>	
Sulfamethoxazol	200 mg/l
Trimethoprim	5,2 mg/l
Claforan® (cefotaxim)	1 g/l
Tazobac® (piperacilin + tazobaktam)	Piperacilin: 1 g/l Tazobaktam: 125 mg/l
Ticarcillin	1 g/l
Augmentin® (amoxicillin + kyselina klavulanová)	Amoxicillin: 125 mg/l Kyselina klavulanová: 25 mg/l
Vankomycin	125 mg/l
<b>Antimykotikum</b>	
Flukonazol	1 mg/l
<b>Imunosupresivní léky</b>	
Rapamycin	100 mg/l
Mykofenolát sodný	80 mg/l

## Robustnost

Ověření robustnosti slouží ke stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* CMV RG PCR Kit. 100 vzorků plazmy negativních na CMV bylo smíšeno s virem CMV na konečnou koncentraci 170 kopií/μl (přibližně trojnásobná koncentrace limitu analytické citlivosti). Po extrakci pomocí sady QIAamp DSP Virus Kit byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus* CMV RG PCR Kit. Četnost chyb činila u všech vzorků s CMV 0 %. Robustnost interní kontroly byla dodatečně posouzena pomocí purifikace a analýzy 100 vzorků plazmy negativních na CMV. Robustnost sady *artus* CMV RG PCR Kit činí tedy  $\geq 99$  %.

## Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* CMV RG PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účasti v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

Kromě účasti v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení byl testován 10prvkový panel CMV (tabulka 11) ve 3 externích laboratořích s použitím sady EZ1 DSP Virus Kit na přístroji EZ1 Advanced XL k purifikaci nukleové kyseliny a sady *artus* RG PCR Kit k testování eluátu DNA.

Tabulka 11. Přehled prvků panelu CMV

Číslo panelu (typ prvku panelu)	Prvek panelu	Ředící efekt
1 001 (1)	Negativní	Negativní soubor 1
1 002 (1)	Negativní	Negativní soubor 2
1 003 (2)	Vysoce negativní	50 % pozitivní
1 004 (2)	Vysoce negativní	50 % pozitivní
1 005 (3)	Nízko pozitivní	200 kopií/ml
1 006 (3)	Nízko pozitivní	200 kopií/ml
1 007 (4)	Středně pozitivní	2 000 kopií/ml
1 008 (4)	Středně pozitivní	2 000 kopií/ml
1 009 (5)	Vysoce pozitivní	200 000 kopií/ml
1 010 (5)	Vysoce pozitivní	200 000 kopií/ml

10prvkový panel byl testován duplicitně 2 různými pracovníky každý den po dobu 6 dnů na každém pracovišti se 3 šaržemi reagenčních sad. 20 vzorků vynásobených 2 pracovníky po dobu 6 dnů na 3 místech se tak rovná 720 datovým bodům.

Bylo zjištěno, že celková reprodukovatelnost testu *artus* CMV RGQ MDx je  $\leq 12\%$  CV pro vzorky s koncentrací mezi 200 kopiemi/ml a 200 000 kopiemi/ml (tabulka 12).

**Tabulka 12. Celkové shrnutí (jednotlivé typy prvků panelu) – pozorované průměry**

typ_prvku_panelu	Počet poz.	Průměr	Medián	Směrodatná odchylka	Procent. CV	Minimální
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

Celkový souhrn procentuální variance a směrodatné odchylky pro hodnoty  $\log_{10}$  IU/ml pro každý z 5 panelů napříč šaržemi, pracovišti, pracovníky, dnem, mezi běhy a v rámci běhu je uveden v tabulce 13 (další stránka).

Tabulka 13. Celkový přehled variance a směrodatné odchylky

Vzorek	1	2	3	4	5	
<b>Typ vzorku</b>	negativní	vysoce negativní	nízko pozitivní	středně pozitivní	vysoce pozitivní	
<b>Pozorovaný průměrný log<sub>10</sub> IU/ml</b>	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
<b>Počet testů</b>	144	144	144	144	144	
<b>Míra</b>	<b>%variance Směr. odchylka</b>					
<b>Složka variance</b>	<b>Šarže</b>	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	<b>Pracoviště</b>	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	<b>Pracovník</b>	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	<b>Den</b>	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	<b>Mezi běhy</b>	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	<b>V rámci běhu</b>	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	<b>Celkem</b>	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

## Diagnostické hodnocení

Sada *artus* CMV RG PCR Kit byla hodnocena ve studii porovnávající sadu *artus* CMV RG PCR Kit s testem COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Bylo analyzováno 156 retrospektivních a prospektivních klinických vzorků EDTA plazmy. Všechny alikvoty vzorků byly předběžně v rámci rutinní diagnostiky analyzovány s pozitivním, resp. negativním nálezem pomocí testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR.

DNA viru CMV pro testování sady *artus* CMV RG PCR Kit byla izolována pomocí sady QIAamp DSP Virus Kit, k izolaci byla přidána interní kontrola sady *artus* CMV RG PCR Kit a analýza byla provedena na přístroji Rotor-Gene 3000. Vzorky určené pro test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test byly zpracovány a analyzovány podle pokynů výrobce uvedených v příbalových informacích.

Všech 11 vzorků, jejichž analýza s využitím testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test byla pozitivní, vyšlo pozitivních i při testu pomocí sady *artus* CMV RG PCR Kit. 123 ze 145 vzorků, jejichž analýza s využitím testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test byla negativní, vyšlo negativních i při testu pomocí sady *artus* CMV RG PCR Kit. 22 výsledků se neshodovalo (tabulka 14).

**Tabulka 14. Výsledky srovnávací validační studie**

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

Použijeme-li výsledky testu COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test jako referenci, diagnostická citlivost všech vzorků sady *artus* CMV RG PCR Kit činí 100 % a diagnostická specifická 84,8 %.

Další analýza 22 neshodných vzorků potvrdila výsledky sady *artus* PCR Kit. Lze tudíž předpokládat, že neshoda je podmíněna vyšší citlivostí sady *artus* CMV RG PCR Kit.

---

# Literatura

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).



# Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

## Komentáře a návrhy

### Žádný signál u pozitivních kontrol (CMV QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green

- |  |   |
|--|---|
| a) Vybraný fluorescenční kanál pro analýzu dat PCR neodpovídá protokolu.   | Pro analýzu dat vyberte fluorescenční kanál Cycling Green pro analytické CMV PCR a fluorescenční kanál Cycling Yellow pro interní kontroly PCR. |
| b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene.  | Porovnejte teplotní profil s protokolem. Viz „Protokol: PCR a analýza dat“, strana 14.  |
| c) Nesprávná konfigurace PCR   | Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem, případně PCR zopakujte. Viz „Protokol: PCR a analýza dat“, strana 14.                  |
| d) Podmínky skladování jedné nebo více komponent sady neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Skladování reagensií a manipulace s nimi“ (strana 10). | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek sady) reagensií a případně použijte novou sadu.                                   |
| e) Doba životnosti sady <i>artus</i> CMV RG PCR Kit vypršela.  | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek sady) reagensií a případně použijte novou sadu.                                   |

### Slabý nebo chybějící signál interní kontroly negativního vzorku plazmy podrobeného purifikaci pomocí sady QIAamp DSP Virus Kit ( $C_T = 27 \pm 3$ ; mezní hodnota: 0,03) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green

- |  |   |
|--|---|
| a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu.  | Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.  |
| b) Došlo k inhibici PCR  | Ujistěte se, že používáte doporučený postup izolace a držte se přesně pokynů výrobce.   |
| c) Během extrakce došlo k úbytku DNA.  | Byla-li k izolaci přidána interní kontrola, může nepřítomnost signálu interní kontroly znamenat úbytek DNA během extrakce. Ujistěte se, že používáte doporučenou izolační metodu (viz „Izolace DNA“, strana 12) a držte se přesně pokynů výrobce. |
| d) Podmínky skladování jedné nebo více komponent sady neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Skladování reagensií a manipulace s nimi“ (strana 10). | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek sady) reagensií a případně použijte novou sadu.   |

## Komentáře a návrhy

---

- e) Doba životnosti sady *artus* CMV RG PCR Kit vypršela. Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek sady) reagensí a případně použijte novou sadu.

### Signály s negativními kontrolami ve fluorescenčním kanálu *Cycling Green* analytického PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci
- Zopakujte PCR s novými reagensii.  
Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného alikvotu.  
Pozitivní kontroly pipetujte zásadně jako poslední.  
Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány.
- b) Během extrakce došlo ke kontaminaci.
- Zopakujte extrakci a PCR testovaných vzorků za užití nových reagensí.  
Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány.

# Symbols



Obsahuje dostatek reagensů pro <N> testů



Použijte do



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



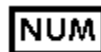
Číslo materiálu



Komponenty



Obsahuje



Číslo



Globální číslo obchodní položky



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití

# Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, roztok hořčičku, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, roztok hořčičku, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4503265
<b>Sada EZ1 DSP Virus Kit – pro automatizovanou souběžnou purifikaci virové DNA a RNA z 1–14 vzorků séra, plazmy nebo likvoru</b>		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin: Předplněné kazety s reagensiemi, jednorázové držáky na špičky, jednorázové špičky s filtrem, zkumavky na alikvoty, eluční zkumavky, pufry, nosič RNA	62724
<b>QIAamp DSP Virus Kit – pro purifikaci virových nukleových kyselin z lidské plazmy pro účely diagnostiky in vitro</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 příprav: QIAamp MinElute® Spin Columns, pufry, reagentie, zkumavky, nástavce kolonek a vakuové konektory VacConnectors	60704
<b>Přístroj Rotor-Gene Q MDx a příslušenství</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklér pro real-time PCR s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, bez instalace a školení	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklér pro real-time PCR s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002023

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklér pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, bez instalace a školení	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklér pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Přístroj pro real-time PCR s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, bez instalace a školení	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Přístroj pro real-time PCR s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Cyklér pro real-time PCR s 2 kanály (zelený, žlutý), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Cyklér pro real-time PCR s 2 kanály (zelený, žlutý), notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Cyklér pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt, HRM) s 2 kanály (zelený, žlutý) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002012

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Cyklér pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt, HRM) s 2 kanály (zelený, žlutý) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok k ručnímu nastavení reakce pomocí jednonábové pipety ve zkumavkách 72 × 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce ve standardní sestavě 8 × 12 s využitím zkumavek 96 × 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 1 000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky na 10 000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 tenkostěnných zkumavek pro 1 000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 × 1 000 tenkostěnných zkumavek pro 10 000 reakcí	981008

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k sadám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

# Historie revizí dokumentu

Revize	Změny
R6, březen 2021	Doplnění částí Lineární oblast kvantifikace, Interferující látky a Reprodukovatelnost. Aktualizace částí Účel použití a Kvantifikace. Odstranění odkazů na přístroje QIAGEN, které již nejsou podporovány.
R7, prosinec 2021	Oprava oddílu Obsah soupravy doplněním údajů o formátu s 24 testovacími soupravami.

## Omezená licenční smlouva pro sadu *artus* CMV RG PCR Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponentami dodanými v sadě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění komponent, které jsou obsaženy v této sadě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této sadě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživatelům výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se sadou a/nebo jejími komponentami.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Koupě tohoto výrobku opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní diagnostiku in vitro. Tímto není udělen žádný všeobecný patent ani jiná licence jakéhokoliv druhu, s výjimkou tohoto specifického práva k použití po koupi.

Ochranné známky: 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, všechna práva vyhrazena.

---

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)