

2021. december

artus[®] CMV RG PCR Kit használati útmutató (kézikönyv)



24 (katalógusszám: 4503263)



96 (katalógusszám: 4503265)

1-es verzió

Kvantitatív in vitro diagnosztikai használatra

Rotor-Gene[®] Q MDx készülékekkel való használatra

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, NÉMETORSZÁG

R7 **MAT**

1126759HU

Tartalom

Alkalmazási terület	5
Leírás és működési elv	5
Kórokozókkal kapcsolatos információk	6
Az eljárás elve	6
Szállított anyagok	7
A kit tartalma	7
Szükséges, de nem biztosított anyagok	8
Reagensek	8
Fogyóeszközök	8
Felszerelés	8
Figyelmeztetések és óvintézkedések	9
Biztonsági információk	9
Óvintézkedések	9
A reagensek tárolása és kezelése	10
A minták kezelése és tárolása	10
Mintagyűjtés	10
Mintatárolás	11
Mintaszállítás	11
Eljárás	12
DNS izolálás	12
Belső kontroll	13
Protokoll: PCR és adatelemzés	14

Az eredmények értelmezése	23
Kvantifikálás	23
Eredmények	24
Minőség-ellenőrzés	27
Korlátozások	27
Teljesítményjellemzők	28
Analitikai érzékenység	28
Lineáris tartomány	30
Specifitás	31
Pontosság	33
Zavaró anyagok	35
M megbízhatóság	37
Reprodukálhatóság	37
Diagnosztikai kiértékelés	39
Irodalomjegyzék	41
Hibaelhárítási útmutató	42
Szimbólumok	44
Rendelési információk	45
A dokumentum átdolgozási előzményei	49

Alkalmazási terület

Az *artus* CMV RG PCR Kit a citomegalovírus (CMV) DNS mennyiségének humán plazmából való meghatározására szolgáló in vitro nukleinsav amplifikációs teszt. Ez a diagnosztikai teszt kit polimeráz láncreakciót (Polymerase Chain Reaction, PCR) alkalmaz, és Rotor-Gene Q készülékekkel történő alkalmazásra tervezték.

Az *artus* CMV RG PCR Kit a klinikai jelekkel és a CMV fertőzés kezelésének más laboratóriumi jeleivel együtt alkalmazandó a CMV betegség kockázatának kitett betegek esetében.

Az *artus* CMV RG PCR Kit teszttel kapott eredményeket valamennyi kapcsolódó klinikai és laboratóriumi eredmény figyelembevételével kell értelmezni.

Az *artus* CMV RG PCR Kit nem használható a CMV vérben, illetve vérkészítményben való jelenlétének szűrésére, sem a CMV fertőzés meglétének megerősítésére szolgáló diagnosztikai tesztként.

Leírás és működési elv

Az *artus* CMV RG PCR Kit egy használatra kész CMV DNS detektálási rendszer, amely polimeráz láncreakciót (Polymerase Chain Reaction, PCR) alkalmaz Rotor-Gene Q MDx készülékeken. A CMV RG Master tartalmazza a reagenseket és az enzimeket a CMV genomon belüli fő közvetlen korai gén (Major Immediate Early Gene; *MIE*) 105 bázispár hosszúságú régiójának specifikus amplifikálásához (az assay a gB1–gB4 CMV genotípusokat tudja kimutatni), valamint a specifikus ampikon direkt kimutatásához a Rotor-Gene Q MDx „Cycling Green” fluoreszcens csatornájában.

Emellett az *artus* CMV RG PCR Kit egy második heterológ amplifikációs rendszert is tartalmaz a PCR esetleges gátlásának kimutatására. Ezt belső kontrollként (Internal Control, IC) a Rotor-Gene Q MDx készülék Cycling Yellow fluoreszcens csatornája detektálja. A mellékelt külső pozitív kontrollok (CMV QS 1–4) lehetővé teszik a vírus DNS mennyiségének meghatározását. További információért lásd: „Kvantifikálás”, 23. oldal.

Kórokozókkal kapcsolatos információk

A humán citomegalovírusok (CMV) a fertőzött személyek vérében, szöveteiben és szinte minden váladékában megtalálhatóak. A vírus orális, szexuális úton, illetve vértranszfúzióval, szervtranszplantációval, intrauterin és perinatális módon is terjed (1–4). A CMV vírusterhelés tesztelése fontos segítséget jelent a betegség kockázatának felmérése, a betegség diagnosztizálása, valamint a terápiás válasz monitorozása során (5).


A CMV-fertőzés gyakran tünetmentes, amit a vírus élethosszig tartó jelenléte követ a szervezetben. Ha tizenéveseknél és felnőtteknél tünetek jelentkeznek, ezek hasonlítanak a mononukleózis tüneteire: láz, enyhe hepatitis és általános gyengeség (6). Súlyos lefolyású CMV-fertőzés különösen az intrauterin fertőződött, illetve immunhiányos betegek körében figyelhető meg (4,7).

Az eljárás elve

A kórokozó kimutatása polimeráz láncreakcióval (Polymerase Chain Reaction, PCR) történik, amely a kórokozó genom specifikus szakaszának amplifikációján alapszik. Real-time PCR esetén az amplifikált terméket fluoreszcens festék mutatja ki. A festék általában olyan oligonukleotidhoz van kapcsolva, amely specifikusan kötődik az amplifikált termékhez. A fluoreszcencia intenzitásának a PCR futtatása alatti (azaz valós idejű) követése lehetővé teszi a felhalmozódó termék kimutatását és kvantifikálását anélkül, hogy a PCR-reakció végén újra ki kelljen nyitni a csöveket (8).

Szállított anyagok

A kit tartalma

artus CMV RG PCR Kit			(24)	(96)
Katalógusszám			4503263	4503265
Reakciók száma			24	96
Kék	CMV RG Master (Taq 0,1 U/μl)		2 x 12 reakció	8 x 12 reakció
Sárga	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 μl	600 μl
Piros	CMV QS 1† (1 x 104 kópia/μl)	QS	200 μl	200 μl
Piros	CMV QS 2† (1 x 103 kópia/μl)	QS	200 μl	200 μl
Piros	CMV QS 3† (1 x 102 kópia/μl)	QS	200 μl	200 μl
Piros	CMV QS 4† (1 x 101 kópia/μl)	QS	200 μl	200 μl
Zöld	CMV RG IC‡	IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Fehér	Water (PCR grade) (Víz (PCR-szintű))		1000 μl	1000 μl
	Használati útmutató		1	1

* Magnézium-oldat

† Kvantifikációs standard

‡ Belső kontroll

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Reagensek

- DNS-izoláló kit (lásd: „DNS izolálás”, 12. oldal)

Fogyóeszközök

- Steril, szűrős pipettahegyek
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, 72-Well Rotor (katalógusszám: 981103 vagy 981106)
- **Vagy:** PCR Tubes, 0.2 ml, 36-Well Rotor (katalógusszám: 981005 vagy 981008)

Felszerelés

- Pipetták (állítható)*
- Vortex keverő*
- Asztali centrifuga* 2 ml-es reakciócsöveknek megfelelő rotorral
- Rotor-Gene Q MDx készülék* Cycling Green és Cycling Yellow fluoreszcens csatornákkal
- Rotor-Gene Q szoftver (2.3.5-ös verziójú vagy frissebb)
- Hűtőblokk (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, katalógusszám: 9018901, vagy Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, katalógusszám: 9018905)

* Használat előtt ellenőrizze, hogy a műszereket a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizték és kalibrálták-e.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Biztonsági információk

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

A mintát és az assay hulladékait a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani és eltávolítani.

Óvintézkedések

A felhasználónak mindig figyelnie kell a következőkre:

- Szűrővel rendelkező steril pipettahegyeket használjon.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és térben elkülönített helyen adja hozzá a reakcióelegyhez.
- Az assay futtatása előtt a komponensek hőmérsékletét szobahőmérsékletre (15–25 °C) kell hozni.
- Feloldás után keverje meg (pipettázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja a komponenseket.
- Dolgozzon gyorsan, és tartsa a PCR-reagenseket bemérés előtt jégen vagy a hűtőblokkban (72/96 mintahelyes betöltőblokk).

A reagensek tárolása és kezelése

Az *artus* CMV RG PCR Kit részegységeit $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten kell tárolni, így a címkén szereplő lejárati időig stabilak maradnak. Kerülni kell az ismételt (> 2-szer elvégzett) felolvasztást és lefagyasztást, mivel ez ronthatja az assay szenzitivitását. Ha a reagenseket alkalmasszerűen, megszakításokkal használja, akkor alikvotokban, fagyasztva tárolja őket. A $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás ne haladja meg az 5 órát.

A minták kezelése és tárolása

Megjegyzés: Minden mintát potenciálisan fertőző anyagnak kell tekinteni.

Megjegyzés: A jelen kit teljesítményének ellenőrzése céljából elvégzett analitikai tanulmányok az EDTA-s plazmára hivatkoznak a CMV kimutatására legalkalmasabb mintaanyagtipusként. Ezért mi is ezt az anyagot ajánljuk az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel való alkalmazásra.

Az *artus* CMV RG PCR Kit validálását EDTA-s humán plazmamintákon végezték. Más mintákra nem végezték el a validálást. Kérjük, csak az ajánlott nukleinsav-izoláló kitet használja a minta előkészítéséhez (lásd: „DNS izolálás”, 12. oldal).

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

Mintagyűjtés

Minden vérvétel az erek (artériák, vénák vagy kapillárisok) sérülésével jár. Csak tiszta és steril eszközöket szabad használni. A vérvételhez megfelelő eldobható eszközöknek kell rendelkezésre állniuk. A véna punkciójához nem alkalmasak a túl vékony kapilláris tűk. A vénás vért a megfelelő helyről, a könyökhajlatból, az alkarból vagy a kézfejből kell venni. A vért szabványos mintavevő csővel kell levenni (pl. piros kupakos Sarstedt®, vagy ezzel egyenértékű, más gyártótól származó cső). Kb. 5–10 ml vért kell levenni EDTA-s csőbe. A csövek tartalmát mintavétel után közvetlenül annak 8-szor történő átforgatásával kell összekeverni (ne rázza).

Megjegyzés: Heparinizált minták nem használhatók.

Mintatárolás

A teljes vért 6 órán belül 20 perces 800–1600 x g-s centrifugálással szeparálni kell sejtes összetevőkre és plazmára (9,10). Az elválasztott plazmát át kell pipettázni steril polipropilén csövekbe. A minták rutinszerű fagyasztása és hosszabb tárolása csökkentheti az assay szenzitivitását.

Mintaszállítás

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

A mintákat 6 órán belül el kell szállítani. Nem ajánlott a minták gyűjtőhelyen történő tárolása. Ha lehetséges, a mintákat levélben a patogén anyagokra vonatkozó előírásoknak megfelelően szállítsa. A mintaszállításához ajánlott futár igénybevétele. A vérmintákat hűtve (2–8 °C között), az elválasztott plazmát mélyfagyasztva (–30 és –15 °C között) kell szállítani.

* International Air Transport Association (Nemzetközi Légi Szállítási Szövetség) (IATA). Veszélyes árukkal kapcsolatos előírások.

Eljárás

DNS izolálás

Az 1. tételei között található QIAGEN termékek validálva vannak virális DNS tisztítására a megadott humán mintatípusokból, az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel történő alkalmazásra. A virális DNS tisztítását a kitek saját kézikönyveiben leírtaknak megfelelően végezze el.

1. táblázat: Az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel való alkalmazásra validált tisztítási kitek

Mintaanyag	Minta mennyisége	Nukleinsav izolációs kit	Katalógusszám	Hordozó RNS
EDTA-s plazma	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Tartalmaz
EDTA-s plazma	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Tartalmaz

Megjegyzés: A hordozó RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonysága, és ennek következtében a DNS/RNS hozam szempontjából. A QIAamp DSP Virus Kit készletben lévő hordozó RNS stabilitásának növelése érdekében ajánlott a *QIAamp DSP Virus Kit kézikönyvben* a hordozó RNS rekonstitúciójára és tárolására vonatkozó információknak („Reagensek és pufferek előkészítése” fejezet) megfelelően eljárni.

Megjegyzés: Az *artus* CMV RG PCR Kit belső kontrollja közvetlenül az izolálási eljárás során adható hozzá. Ügyeljen arra, hogy egy negatív plazmaminta is legyen az izolálási eljárásban. A belső kontroll megfelelő jele az izolálás értékelésének alapja lehet (lásd az alábbi „Belső kontroll” fejezetet).

Belső kontroll

A kitnek a belső kontroll (CMV RG IC) is részét képezi. Ez lehetővé teszi a felhasználónak mind a DNS-izolálási eljárás kontrollálását, mind az esetleges PCR-gátlás ellenőrzését. Ilyen esetben 0,1 µl per 1 µl elúciós térfogat mennyiségben kell hozzáadni a belső kontrollt az izolációhoz. Például a QIAamp DSP Virus Kit használata esetén a DNS 60 µl eluáló pufferben (AVE) kerül eluálásra. Ezért az eljárás elején 6 µl belső kontrollt kell hozzáadni. A belső kontroll mennyisége csak az eluáló térfogattól függ.

Megjegyzés: A belső kontrollt és hordozó RNS-t (lásd: „DNS izolálás”, 12. oldal) csak a lízispuffer és a minta keverékéhez vagy közvetlenül a lízispufferhez szabad hozzáadni.

A belső kontrollt nem szabad a mintához közvetlenül hozzáadni. Ha a lízispufferhez adja hozzá, vegye figyelembe, hogy a belső kontroll + lízispuffer + hordozó RNS elegyet frissen kell elkészíteni, és azonnal fel kell használni (ha a keveréket szobahőmérsékleten vagy hűtőszekrényben tárolja, a belső kontroll néhány óra alatt tönkremehet, és az extrakció hatékonysága is csökkenhet).

Megjegyzés: Ne adja a belső kontrollt és a hordozó RNS-t közvetlenül a mintaanyaghoz.

A tisztítás eredményességének megállapításához a tisztításon átesett (QIAamp DSP Virus Kit) negatív plazmaminta belső kontroll C_T -értékének el kell érnie a $C_T = 27 \pm 3$ értéket (küszöbérték: 0,03) Rotor-Gene Q készülékek használata mellett (további információkért lásd a 26. oldalt). Az eloszlás a készülék és a tisztítás szórásnégyzetén alapul. Nagyobb eltérés tisztítási problémát jelezhet. Ilyen esetben ellenőrizni kell a tisztítást, és szükség esetén újra kell validálni. Ha további kérdései vannak, vagy problémát tapasztal, kérjük, vegye fel a kapcsolatot a QIAGEN műszaki szolgálatával.

Opcionálisan a belső kontroll kizárólag az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére is alkalmazható. Ilyen esetben a belső kontrollt közvetlenül a CMV RG Master és CMV Mg-Sol elegyéhez adja, a protokoll 2b. lépésének (15. oldal) megfelelően.

Protokoll: PCR és adatelemzés

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Az eljárás indítása előtt hagyjon arra időt, hogy megismerje a Rotor-Gene Q készüléket. További információkért lásd a megfelelő készülék felhasználói kézikönyvét.
- Figyeljen arra, hogy a PCR-eljárásban legalább egy kvantifikációs standard, valamint egy negatív kontroll (PCR minőségű víz) is szerepeljen. A standard görbe meghatározásához minden egyes PCR-futtatásnál használja mind a 4 mellékelt kvantifikációs standardot (CMV QS 1–4).

Kezdés előtti teendők

- Ellenőrizze, hogy a hűtőblokk (a Rotor-Gene Q készülék kiegészítője) le van-e hűtve 2–8 °C-ra.
- Minden használat előtt az összes reagenst teljesen olvassza fel, ezután keverje meg (pipettázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd centrifugálja röviden.

Eljárás

1. Helyezze a szükséges mennyiségű PCR-csővet a hűtőblokk adaptereibe.
2. Ha belső kontrollt használ a DNS-izolálási eljárás monitorozására és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére, lépjen a 2a. lépésre. Ha belső kontrollt csak az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére használja, kövesse a 2b. lépést.

Megjegyzés: Nagyon ajánlott a belső kontrollt közvetlenül a kvantifikációs standardokhoz használt CMV RG master és CMV Mg-Sol keverékéhez adni. A kvantifikációs standardok esetében közvetlenül a CMV RG Master és CMV Mg-Sol elegyéhez adja a belső kontrollt, a protokoll 2b. lépésének megfelelően, és ezt a mesterkeveréket használja az összes a kvantifikációs standardhoz (CMV QS 1–4).

- 2a. A belső kontroll már az izolációhoz lett adva (lásd: *Belső kontroll*, 13. oldal). Ilyen esetben készítse el a mesterkeveréket a 2. táblázat szerint (a következő oldalon). A reakcióelegy tartalmazza a PCR-reakcióhoz szükséges összes komponenst, a mintát kivéve.

2. táblázat: A mesterkeverék elkészítése (belső kontroll a DNS-izolálási eljárás kontrollálására és a PCR-gátlás ellenőrzésére)

Mintaszám	1	12
CMV RG master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
Teljes térfogat	30 µl	360 µl

- 2b. A belső kontrollt közvetlenül a CMV RG Master és a CMV Mg-Sol keverékéhez kell hozzáadni. Ilyen esetben készítse el a mesterkeveréket a 3. táblázat szerint. A reakcióelegy tartalmazza a PCR-reakcióhoz szükséges összes komponenst, a mintát kivéve.

3. táblázat: A mesterkeverék elkészítése (belső kontroll csak a PCR-gátlás ellenőrzésére)

Mintaszám	1	12
CMV RG master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	2 µl	24 µl
Teljes térfogat	32 µl*	384 µl*

* A belső kontroll hozzáadása okozta térfogat-növekedést a PCR assay előkészítése során figyelmen kívül lehet hagyni. A detektálórendszer szenzitivitását ez nem befolyásolja.

3. Pipetázzon 30 µl mesterkeveréket minden egyes PCR csőbe, majd adjon hozzá 20 µl-t az eluált minta DNS-ből (lásd: 4. táblázat). Ennek megfelelően hozzá kell adni 20 µl-t legalább az egyik kvantifikációs standardból (CMV QS 1–4) pozitív kontrollként, és 20 µl vizet (víz, PCR-szintű) negatív kontrollként.

4. táblázat: A PCR assay előkészítése

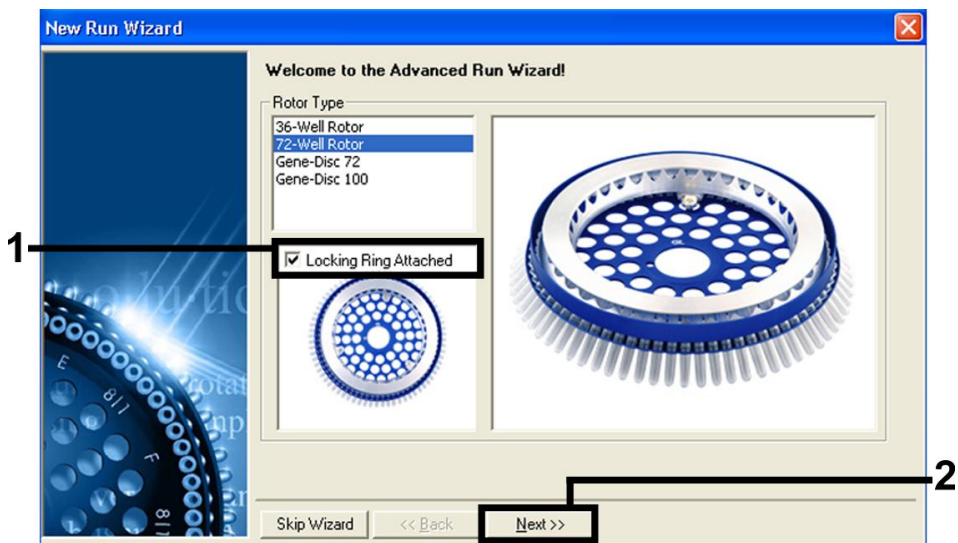
Mintaszám	1	12
Mesterkeverék	30 µl	egyenként 30 µl
Minta	20 µl	egyenként 20 µl
Teljes térfogat	50 µl	egyenként 50 µl
Mintaszám	1	12

4. Zárja le a PCR-csőveket. Ellenőrizze, hogy a zárógyűrű (a Rotor-Gene készülék kiegészítője) a rotor tetején helyezkedik-e el, hogy megakadályozza a csövek véletlen kinyílását a futás során.
5. A CMV DNS kimutatásához hozzon létre egy hőmérsékletprofilot az alábbi lépéseknek megfelelően.

Az általános assay-paraméterek beállítása	1. ábra, 2. ábra és 3. ábra
A hot-start enzim kezdeti aktiválása	4. ábra
A DNS amplifikálása (touchdown PCR)	5. ábra
A fluoreszcens csatorna szenzitivitásának beállítása	6. ábra
A futtatás indítása	7. ábra

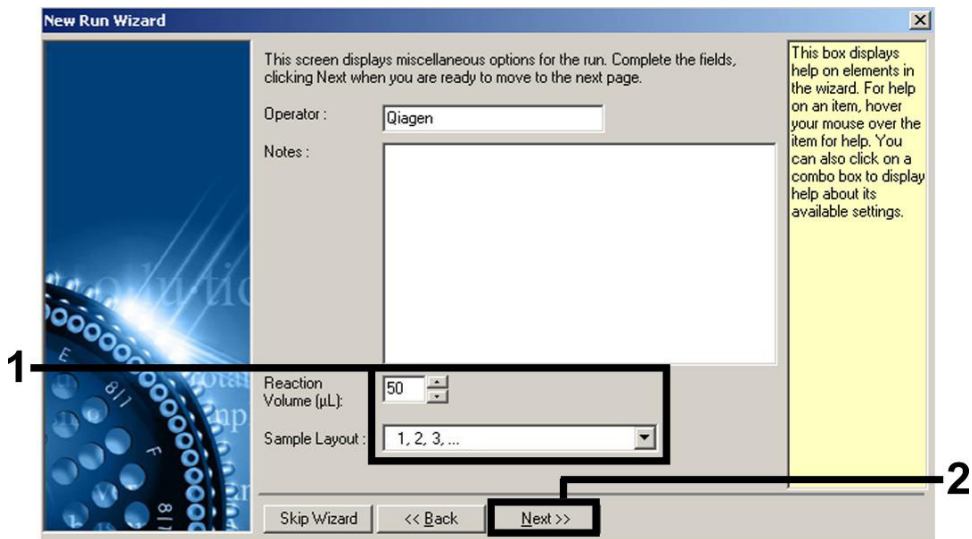
Minden specifikáció a Rotor-Gene Q szoftver 2.3.5-ös vagy frissebb verziójára vonatkozik. A Rotor-Gene készülékek programozásáról az adott készülék felhasználói kézikönyvében talál további információkat. Az ábrákon ezek a beállítások vastag fekete keretben találhatóak. A mellékelt ábrák a Rotor-Gene Q készülékekre vonatkoznak.

6. Nyissa meg a **New Run Wizard** (Új futtatás varázsló) párbeszédpanelt (1. ábra, a következő oldalon). Pipálja ki a **Locking Ring Attached** (Zárógyűrű csatlakoztatva) jelölőnégyzetet, és kattintson a **Next** (Tovább) gombra.



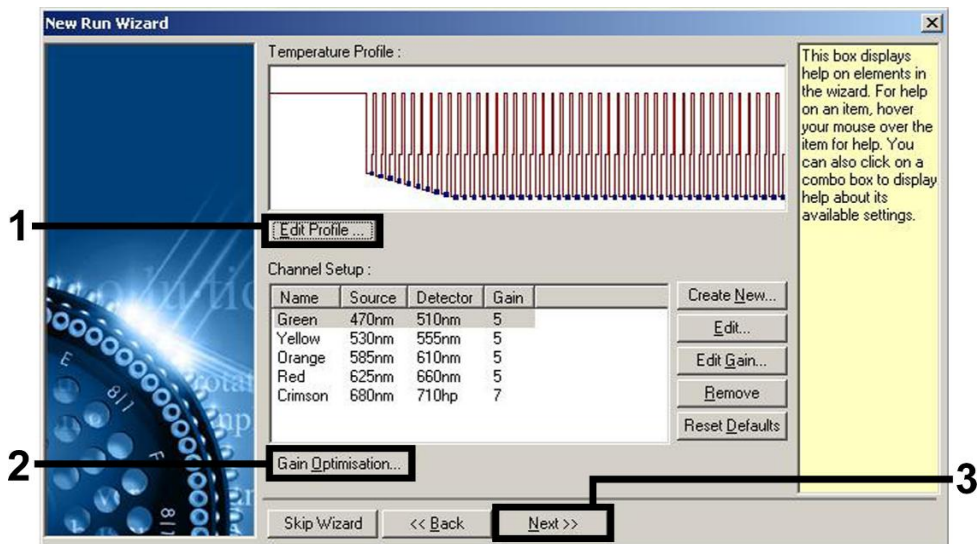
1. ábra: A „New Run Wizard” (Új futtatás varázsló) párbeszédpanel.

7. Válassza ki az „50” lehetőséget a PCR-reakció térfogatának, és kattintson a **Next** (Tovább) gombra (2. ábra).

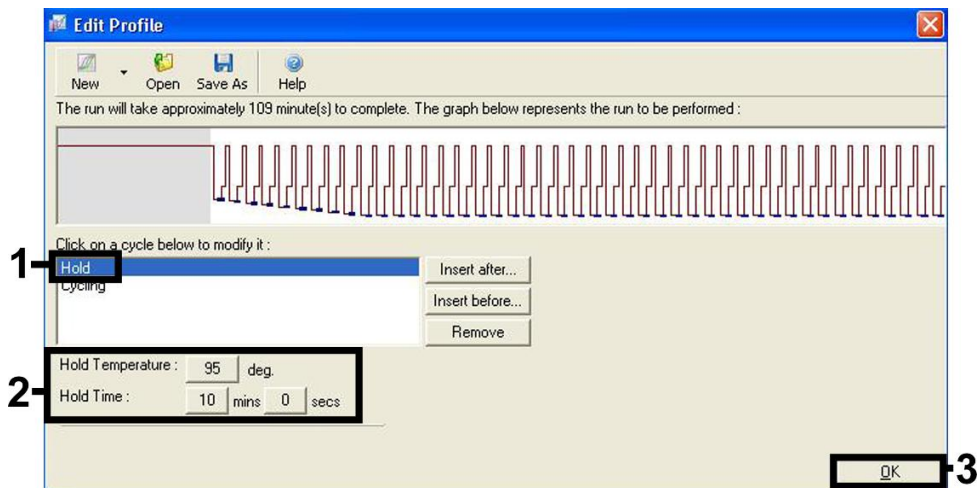


2. ábra: Az általános assay paraméterek beállítása.

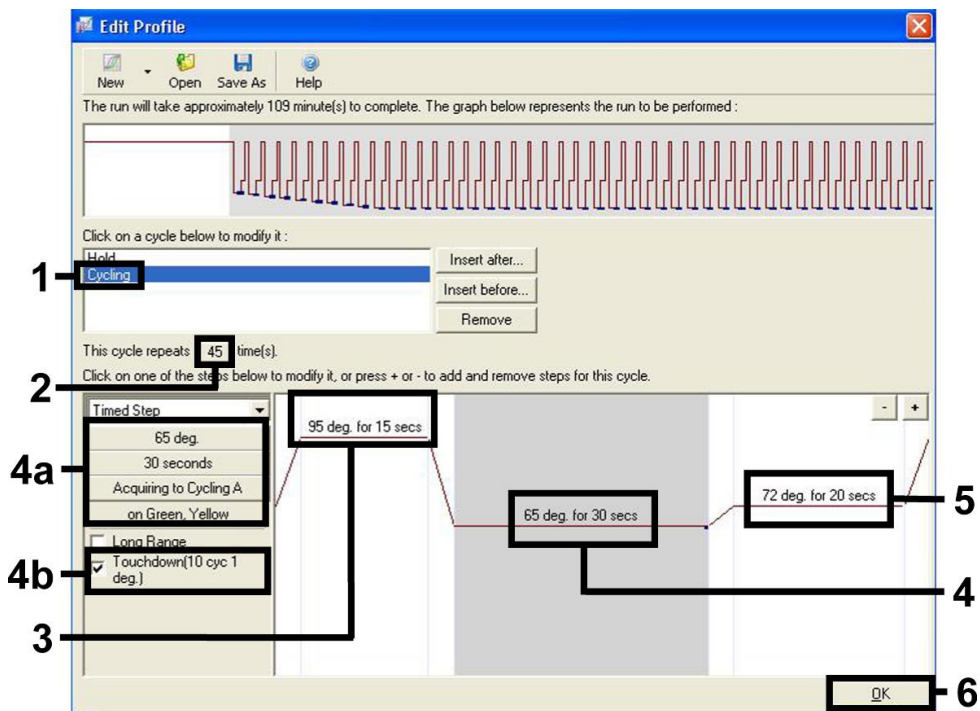
8. Kattintson az **Edit Profile** (Profil szerkesztése) gombra a következő **New Run Wizard** párbeszédpanelen (3. ábra), és programozza be a hőmérsékletprofil a 3. ábra – 5. ábra alapján.



3. ábra: A profil szerkesztése.

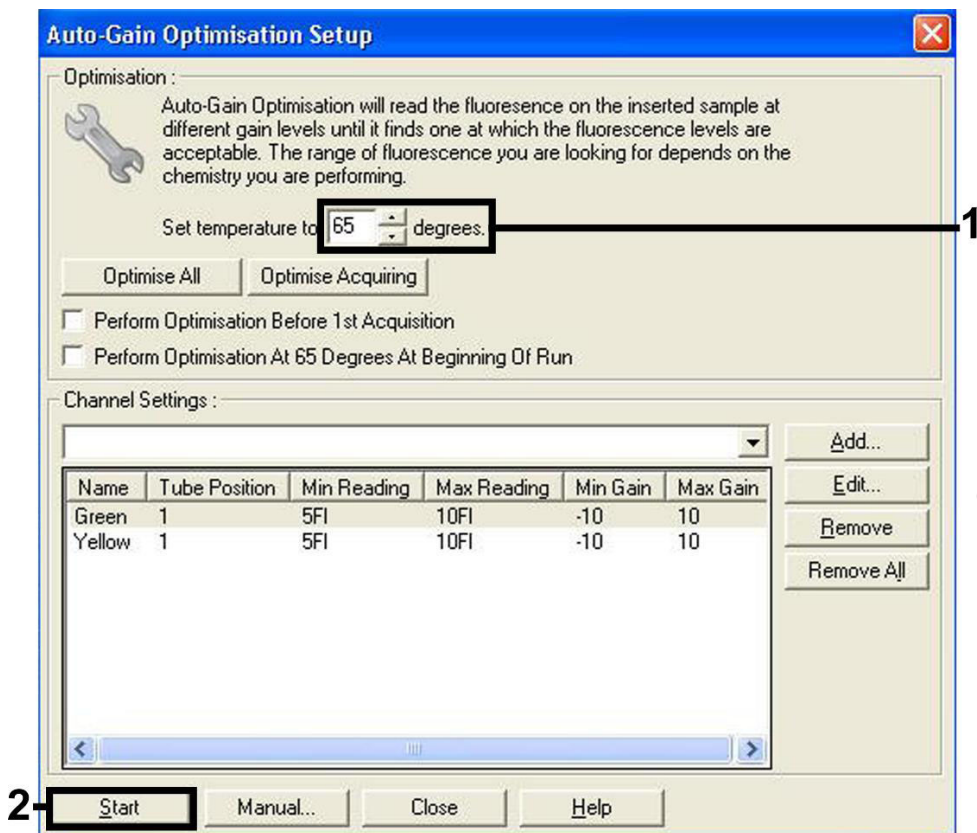


4. ábra: A hot-start enzim kezdeti aktiválása.



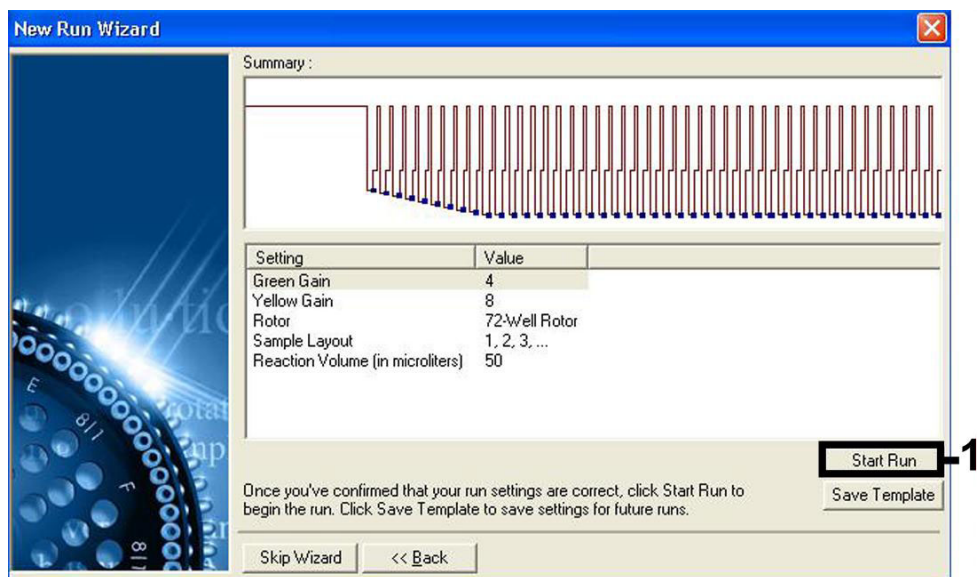
5. ábra: A DNS amplifikálása. Ügyeljen arra, hogy az anneáláson belül 10 ciklusra aktiválja a touchdown funkciót.

9. A fluoreszcens csatornák érzékelési tartományát a PCR-csövekben található fluoreszcencia intenzitása alapján kell meghatározni. Kattintson a **Gain Optimisation** (Jelerősség-optimalizálás) gombra a **New Run Wizard** (Új futtatás varázsló) párbeszédpanelen (lásd 3. ábra, az előző oldalon) az **Auto-Gain Optimisation Setup** (Automatikus jelerősség-optimalizálás beállítása) párbeszédpanel megnyitásához. Állítsa a kalibrálási hőmérsékletet 65 °C-ra az amplifikációs program annealing (hevítési) hőmérsékletének megfelelően (6. ábra, a következő oldalon).



6. ábra: A fluoreszcens csatorna szenzitivitásának beállítása.

10. A csatornkalibrálás által szolgáltatott jelerősségértékek automatikusan mentésre kerülnek, és a programozási eljárás utolsó menüablakában is megjelennek (7. ábra, a következő oldalon). Kattintson a **Start Run** (Futtatás indítása) gombra.



7. ábra: A futtatás indítása.

Az eredmények értelmezése

Kvantifikálás

A mellékelt kvantifikációs standardok (CMV QS 1–4) a korábban már megtisztított mintáknak megfelelően kerülnek kezelésre, és a PCR reakcióban ugyanazt a 20 µl térfogatot kell közvetlenül felhasználni (további extrakcióra nincs szükség). A standard görbe Rotor-Gene Q készülékeken történő létrehozásához mind a 4 kvantifikációs standardot használni kell, valamint az **Edit Samples** (Minták szerkesztése) párbeszédpanelen standardként, a megadott koncentrációval együtt kell definiálni azokat (lásd az adott készülék felhasználói kézikönyvét).

Megjegyzés: A pontos kvantifikációhoz nagyon ajánlott a belső kontrollt közvetlenül a kvantifikációs standardokhoz használt CMV RG Master és CMV Mg-Sol keverékéhez adni. Ehhez az alkalmazáshoz közvetlenül a CMV RG Master és CMV Mg-Sol keverékéhez adja a belső kontrollt, a protokoll 2b. lépésének megfelelően (15. oldal), és ezt a mesterkeveréket használja az összes a kvantifikációs standardhoz (CMV QS 1–4).

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

$$\text{eredmény} \left(\frac{\text{kópia}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{eredmény (kópia/}\mu\text{l)} \times \text{elúciós térfogat (}\mu\text{l)}}{\text{mintatérfogat (ml)}}$$

Alapelvként a fenti egyenletbe a kezdeti mintatérfogatot kell beírni. Ezt akkor kell felülvizsgálni, ha a minta térfogata a nukleinsav-extrakció előtt változott (pl. csökkenés centrifugálás miatt, vagy növekedés az izoláció miatt hozzáadott térfogat következtében).

Megjegyzés: A kvantifikációs standardokat a „1st International Standard for Human Cytomegalovirus” (A humán citomegalovírus 1. nemzetközi szabványa) használatával kalibrálták (NIBSC kód: 09/162), az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization; WHO) meghatározása szerint.

A kópia/ml és IU/ml közötti mértékegység-váltás képlete a QIAamp DSP Virus Kit esetében:

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

Megjegyzés: A QIAamp munkafolyamatban a számszerűsített minták kópiaszámának a $QS 1 \times 10^1 - 1 \times 10^4$ kópia/ μ l lineáris tartományon belül kell lenniük. Az ezen tartományon kívüli kvantifikálás nem tekinthető biztosnak.

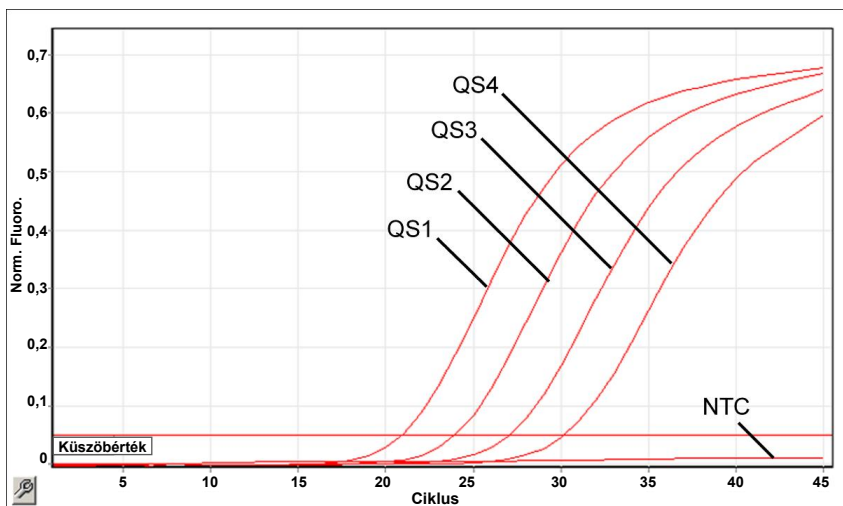
A kópia/ml és IU/ml közötti mértékegységváltás képlete az EZ1 DSP Virus Kit esetében, az EZ1 Advanced XL készüléken:

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

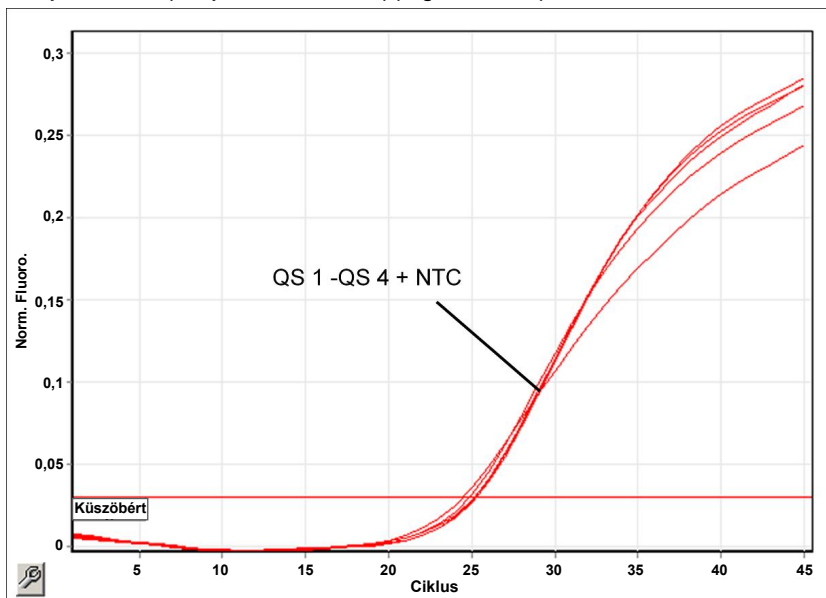
Megjegyzés: Az EZ1 munkafolyamatban a számszerűsített minták kópiaszámának a $3,16E+02 - 1,00E+08$ kópia/ml lineáris tartományon belül kell lenniük. Az ezen tartományon kívüli kvantifikálás nem tekinthető biztosnak.

Eredmények

A pozitív és negatív PCR-reakciók példái a 8. és 9. ábrán találhatóak (a következő oldalon).



8. ábra: A kvantifikálási standardok (CMV QS 1–4) detekciója a Cycling Green fluoreszcencia-csatornában. NTC: No template control (Templát nélküli kontroll) (negatív kontroll).



9. ábra: A belső kontroll (Internal Control, IC) detektálása a Cycling Yellow fluoreszcencia-csatornában a kvantifikálási standardok (CMV QS 1–4) amplifikációja mellett. NTC: No template control (Templát nélküli kontroll) (negatív kontroll).

A jelet a Cycling Green fluoreszcens csatorna érzékeli.

A mérés eredménye pozitív: a minta CMV DNS-t tartalmaz.

Ilyen esetben a Cycling Yellow csatorna jelétől el lehet tekinteni, mivel a CMV DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a Cycling Green csatornában) a belső kontroll fluoreszcencia-jelének csökkenéséhez vagy hiányához vezethet a Cycling Yellow csatornában (kompetíció).

A Cycling Green fluoreszcens csatornában jel nem található. Ezzel párhuzamosan a belső kontroll jele megjelenik a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában.

Nem mutatható ki CMV DNS a mintában. A minta negatívnak tekinthető.

A negatív CMV PCR esetén a belső kontroll érzékelt jele zárja ki a PCR-reakció gátlásának lehetőségét.

Nincs jel sem a Cycling Yellow, sem a Cycling Green fluoreszcens csatornában.

Nem határozható meg eredmény.

A hibák okai és megoldásuk módjai a „Hibaelhárítási útmutató” fejezetben található, a 42. oldalon.

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően az *artus* CMV RG PCR Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

Korlátozások

Minden reagens csak in vitro diagnosztikai célra használható.

Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki külön képzett és gyakorlott in vitro diagnosztikai eljárások területén.

Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a megfelelő felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.

Figyeljen oda a dobozon és az egyes összetevők címkéjén feltüntetett lejárati időkre. Ne használjon lejárt reagenst.

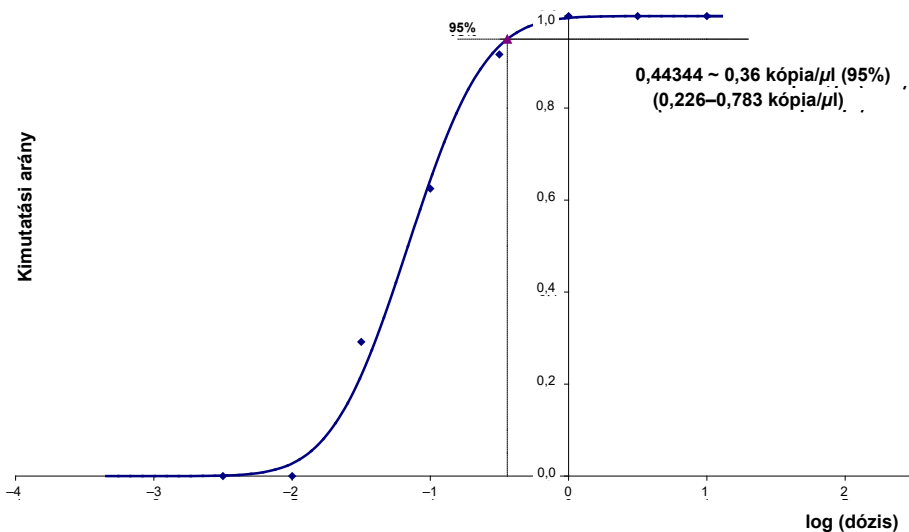
Bár ez ritka jelenség, a virális genom nagyon konzervatív régióiban a kitben található primerek és/vagy próbák által lefedett területeken kialakuló mutációk a vírusszám alulbecslését, vagy a vírusjelenlét kimutatásának hibáját eredményezheti. Az assay érvényességét és teljesítményét rendszeres időközönként felülvizsgálják.

Teljesítményjellemzők

Analitikai érzékenység

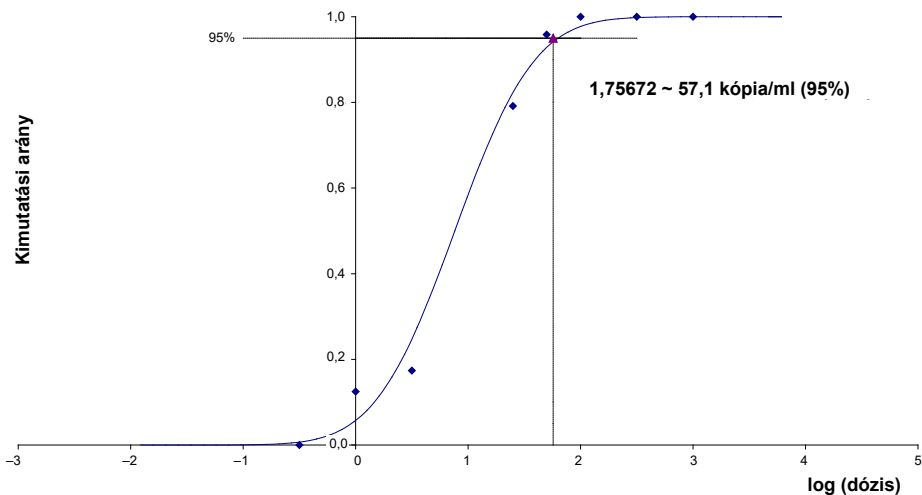
Az *artus* CMV RG PCR Kit analitikai kimutatási szintje, illetve a tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási szintje (szenzitivitási szintek) kerültek meghatározásra. A tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási szint CMV-pozitív klinikai minták adott extrakciós eljárással történő feldolgozásával került meghatározásra. Ezzel szemben az analitikai kimutatási szint az extrakció módszerétől függetlenül került meghatározásra, mert ismert koncentrációjú CMV DNS-t használtak.

Az *artus* CMV RG PCR Kit analitikai szenzitivitásának meghatározásához Rotor-Gene készülékeken egy $10^{-0,00316}$ névleges kópia/ μ l-nek megfelelő standard hígítási sort készítettek a CMV genomi DNS-ből, és ezt vizsgálták meg *artus* CMV RG PCR Kit készlettel. A vizsgálatot 3 különböző napon 8 párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. A Rotor-Gene 6000 készüléken végzett probit-elemzés grafikai megjelenítése a 10. ábrán található (a következő oldalon). Az *artus* CMV RG PCR Kit analitikai kimutatási határa Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 készülékkel 0,36 kópia/ μ l ($p = 0,05$), míg Rotor-Gene 3000 készülékkel 0,24 kópia/ μ l ($p = 0,05$). Ez azt jelenti, hogy a 0,36, illetve 0,24 kópia/ μ l koncentrációjú minták 95%-os valószínűséggel detektálásra kerülnek.



10. ábra: Probit-elemzés: CMV (Rotor-Gene 6000). Az *artus* CMV RG PCR Kit analitikai érzékenysége Rotor-Gene 6000 készülékkel.

Az *artus* CMV RG PCR Kit tisztítást (QIAamp DSP Virus Kit) is figyelembe vevő analitikai szenzitivitásának (kimutatási szintjének) meghatározásához Rotor-Gene készülékeken a CMV vírusanyag olyan hígítássorát készítették el, amely névleges 1000 – 0,316 CMV kópia/ml klinikai plazmamintákhoz adásával készült. Ezután DNS-extrakciót végeztek QIAamp DSP Virus Kit segítségével (extrakciós térfogat: 0,5 ml; elúciós térfogat: 60 μl). Mind a 8 hígítási mintát az *artus* CMV RG PCR Kit segítségével, 3 különböző napon, 8 párhuzamos mintával elemezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. A probit-elemzés grafikai megjelenítése a 11. ábrán található (a következő oldalon). Az *artus* CMV RG PCR Kit tisztítást is figyelembe vevő analitikai kimutatási határa Rotor-Gene 3000 készülékkel 57,1 kópia/ml ($p = 0,05$). Ez azt jelenti, hogy a 57,1 kópia/ml koncentrációjú minták 95%-os valószínűséggel detektálásra kerülnek.



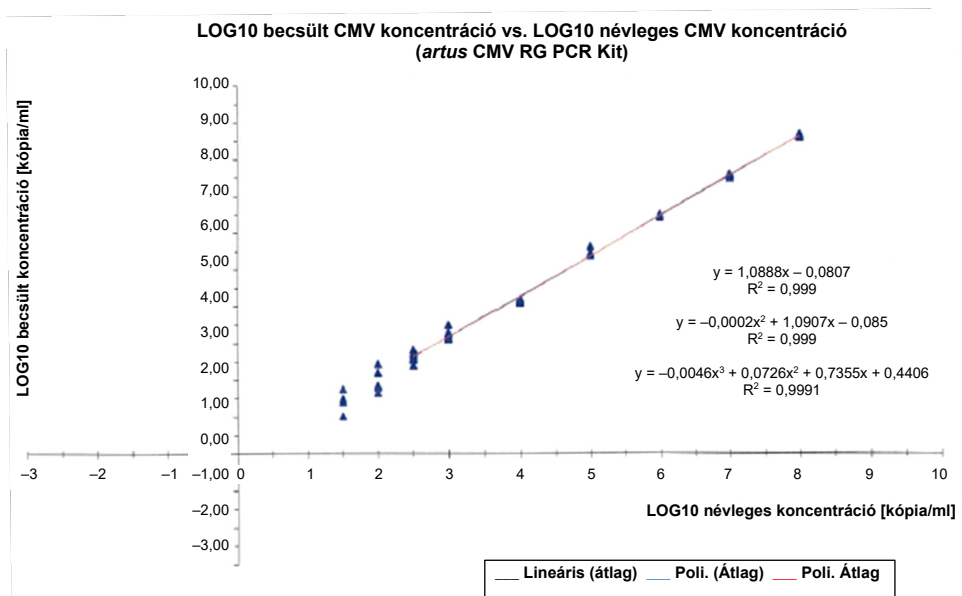
11. ábra: Probit-elemzés: CMV (Rotor-Gene 3000). Az *artus* CMV RG PCR Kit tisztítást is figyelembe vevő (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) analitikai szenzitivitása Rotor-Gene 3000 készülékkel.

A tisztítást is figyelembe vevő analitikai érzékenység EZ1 DSP Virus Kit esetén (extrakciós térfogat: 0,4 ml; elúciós térfogat: 60 µl) az EZ1 Advanced XL készülék, *artus* CMV RG PCR Kit használata esetén Rotor-Gene 6000 készülékkel 68,75 kópia/ml ($p = 0,05$). Ez azt jelenti, hogy a 68,75 kópia/ml koncentrációjú minták 95%-os valószínűséggel detektálásra kerülnek.

Lineáris tartomány

A tisztítást is figyelembe vevő lineáris tartományt EZ1 DSP Virus Kit esetén (extrakciós térfogat: 0,4 ml; elúciós térfogat: 60 µl), az EZ1 Advanced XL készülék használatával úgy határozták meg, hogy a CMV vírusanyag 4–6 párhuzamosát tesztelték egy $3,16E+01$ – $1,00E+08$ kópia/ml közötti hígítási sorozatban.

A probit-elemzés grafikai megjelenítése a 12. ábrán található (a következő oldalon).



12. ábra: Az *artus* CMV RG PCR Kit adatsor tisztítást is figyelembe vevő (EZ1 DSP Virus Kit) polinom regressziója az EZ1 Advanced XL készüléken. A lineáris, négyzetes és köbös regressziós modellek egyaránt szerepelnek.

Az *artus* CMV RG PCR Kit EZ1 DSP Virus Kit készletes tisztítást is figyelembe vevő lineáris tartománya (extrakciós térfogat: 0,4 ml; elúciós térfogat: 60 µl) az EZ1 Advanced XL készülék használatával: 3,16E+02 – 1,00E+08 kópia/ml.

Megjegyzés: Az *artus* CMV RG PCR Kit QIAamp DSP Virus Kit készletes tisztítást is figyelembe vevő lineáris tartománya (extrakciós térfogat: 0,4 ml; elúciós térfogat: 60 µl): 1,00E+01 – 1,00E+04 kópia/µl.

Specifitás

Az *artus* CMV RG PCR Kit specifitását elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztása, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételek biztosítják. A primerek és próbák lehetséges homológiáját szekvencia-összehasonlítási elemzéssel ellenőrizték minden génbankban publikált szekvenciával szemben. Ezáltal minden releváns genotípus kimutathatósága biztosítva van.

Emellett a specificitást 100 különböző CMV-negatív plazmamintán is validálták. Ezen minták közül 99 nem adott jelet a CMV RG Master CMV-specifikus primereivel és próbáival.

Megjegyzés: 1 minta, amely jelet generált a CMV-specifikus primerekkel és próbákkal, amelyek tesztelése szintén CMV-pozitív az *artus* CMV LC és TM RG PCR Kitekben, valószínűleg pozitív. A 100 db egyedi donor minta tesztelése alapján a végső specificitás igazoltan 99,00% (99/100).

Az *artus* CMV RG PCR Kit lehetséges keresztreaktivitása az 5. táblázat tételei között felsorolt kontrollcsoporttal lett tesztelve. A tesztelt kórokozók egyike sem mutatott keresztreaktivitást. Nem mutatkozott keresztreaktivitás kevert fertőzések esetén.

5. táblázat: A kit specificitásának vizsgálata potenciálisan keresztreaktív kórokozókkal

Kontrollcsoport	CMV (Cycling Green vagy Cycling A.FAM)	Belső kontroll (Cycling Yellow vagy Cycling A.JOE)
Humán herpeszvírus 1 (Herpes simplex vírus 1)	–	+
Humán herpeszvírus 2 (Herpes simplex vírus 2)	–	+
Humán herpeszvírus 3 (Varicella-zoster vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 4 (Epstein-Barr vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 6A	–	+
Humán herpeszvírus 6B	–	+
Humán herpeszvírus 7	–	+
Humán herpeszvírus 8 (Kaposi-szarkómával kapcsolatos herpeszvírus)	–	+
Hepatitis-A vírus	–	+
Hepatitis-B vírus	–	+
Hepatitis-C vírus	–	+

(a következő oldalon folytatódik)

5. táblázat (az előző oldalon lévő táblázat folytatása)

Kontrollcsoport	CMV (Cycling Green vagy Cycling A.FAM)	Belső kontroll (Cycling Yellow vagy Cycling A.JOE)
Humán immunodeficiencia vírus 1 (HIV)	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 1	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 2	–	+
Nyugat-Nílus vírus	–	+
Enterovírus	–	+
Parvovírus B19	–	+

Pontosság

Az assay teljes szórásnégyzetének meghatározásához az *artus* CMV RG PCR Kit pontossági adatait Rotor-Gene készülék segítségével határozták meg. A teljes szórásnégyzet három összetevője: az assay-n belüli variabilitás (azonos koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), assay-k közötti variabilitás (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több kezelő által végzett assay-k eredményeinek variabilitása), és a gyártási tételek közötti variabilitás (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett assay-k eredményeinek variabilitása). A mért adatok alapján meghatározásra került a patogénspecifikus, illetve a belső kontroll PCR eredmények szórása, szórásnégyzete és variációs koefficiense.

Az *artus* CMV RG PCR Kit pontossági adatait a legkisebb koncentrációjú kvantifikációs standarddal (QS 4, 10 kópia/μl) határozták meg. A vizsgálatot 8 párhuzamos mintával végezték. A pontossági adatokat az amplifikációs görbe C_T -értéke alapján határozták meg (C_T : küszöbciklus, lásd: 6. táblázat, a következő oldalon). Emellett a kvantitatív eredmények pontossági adatai (kópia/μl) a megfelelő C_T -értékek alapján lett meghatározva (lásd: 7. táblázat, a következő oldalon). Ezen eredmények alapján a bármely, a fenti koncentrációjú adott minta átlagos statisztikai eloszlása 1,21% (C_T) vagy 14,38% (koncentráció), míg a belső kontroll esetében 1,93% (C_T). Ezen értékek a meghatározott variabilitás minden egyes értékén alapszanak.

6. táblázat: Pontossági adatok a C_T-értékek alapján

	Szórás	Variancia	Variációs koefficiens (%)
Assay-n belüli variabilitás: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Assay-n belüli variabilitás: Belső kontroll	0,31	0,10	1,16
Assay-k közötti variabilitás: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Assay-k közötti variabilitás: Belső kontroll	0,47	0,22	1,77
Gyártási tételek közötti variabilitás: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Gyártási tételek közötti variabilitás: Belső kontroll	0,53	0,28	2,02
Teljes variancia: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Teljes variancia: Belső kontroll	0,51	0,26	1,93

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

	Szórás	Variancia	Variációs koefficiens (%)
Assay-n belüli variabilitás: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Assay-k közötti variabilitás: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Gyártási tételek közötti variabilitás: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Teljes variancia: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Zavaró anyagok

CMV DNS-t adtak negatív plazmához különböző kereskedelmi forgalomban lévő, különböző véralvadás-gátlókat alkalmazó vérvételi rendszerekben. A számított koncentrációt (kópia/ml), a C_T átlagot, a szórást, a szórásnégyzetet és a CV%-értéket a 8. táblázat tartalmazza. A szórás és a variációs koefficiens 5%-os értéken belüli, vagyis az elfogadhatósági tartományon belül marad. Nem azonosítottak a különféle anyagoknak tulajdonítható jelentős PCR-befolyásoló hatást.

8. táblázat: Kereskedelmi forgalomban lévő, különböző véralvadás-gátlókat alkalmazó vérvételi rendszerek adatai

Vegyület	Koncentráció (kópia/ml)	C_T átlag	C_T Szórás	C_T szórásnégyzet	C_T CV (%)
Kálium-EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Kálium-EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Kálium-EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Kálium-EDTA, Springe (referenciaanyag)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Kálium-EDTA, Sarstedt (referenciaanyag)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Kálium-EDTA (terhesség)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Endogén anyagokat (9. táblázat, a következő oldalon) adtak CMV-pozitív EDTA-s plazmamintákhoz 3 x LOD és 10 x LOD koncentrációban. Minden mintát sikeresen kimutattak, és az endogén inhibitorokat (bilirubin, hemoglobin, triglicerid és albumin) magas koncentrációban tartalmazó minták esetében nem figyeltek meg semmilyen interferenciát.

9. táblázat: Tesztelt endogén anyagok

Zavaró anyagok	A zavaró anyagok koncentrációja
Bilirubin	30 mg/dl
Hemoglobin	2 g/dl
Triglicerid	1 g/dl
Albumin	6 g/dl

A transzplantációs helyzetekben általánosan használt gyógyszereket tesztelték az akut csúcskoncentráció 3x-os értéken gyógyszeres terápiás kezelés után, a CLSI® Guideline EP07-A2 (11) irányelvének javaslatai alapján (lásd: 10. táblázat). Ezen vegyületek mindegyikét hozzáadták CMV-negatív és CMV-pozitív mintákhoz, amelyeket 4 párhuzamosban teszteltek.

Egyetlen tesztelt exogén anyag sem befolyásolta szignifikánsan az *artus* CMV RG PCR Kit teljesítményét.

10. táblázat: Az exogén anyagokként tesztelt gyógyszerek listája

Zavaró anyagok	Tesztkoncentráció
Antibiotikumok	
Szulfametoxazol	200 mg/l
Trimetoprim	5,2 mg/l
Claforan® (Cefotaxim)	1 g/l
Tazobac® (Piperacillin+Tazobaktám)	Piperacillin: 1 g/l Tazobaktám: 125 mg/l
Tikarcillin	1 g/l
Augmentin® (Amoxicillin + klavulánsav)	Amoxicillin: 125 mg/l Klavulánsav: 25 mg/l
Vankomicin	125 mg/l
Antifungális	
Flukonazol	1 mg/l
Immunszuppresszív gyógyszerek	
Rapamicin	100 mg/l
Mikofenolát-nátrium	80 mg/l

Megbízhatóság

A megbízhatóság verifikálása lehetővé teszi az *artus* CMV RG PCR Kit teljes hibaarányának meghatározását. 100 CMV-negatív plazmamintához adtak CMV-t úgy, hogy a végkoncentrációja 170 kópia/ml lett (az analitikai érzékenységi határ kb. háromszorosa). A QIAamp DSP Virus Kit készlettel végzett extrakció után a mintákat *artus* CMV RG PCR Kit segítségével vizsgálták meg. Az összes CMV-minta esetében 0% volt a hibaarány. Emellett a belső kontroll megbízhatóságát 100 db CMV-negatív plazmaminta tisztításával és vizsgálatával mérték fel. Ezek alapján az *artus* CMV RG PCR Kit megbízhatósága $\geq 99\%$.

Reprodukálhatóság

A reprodukálhatósági adatok lehetővé teszik az *artus* CMV RG PCR Kit teljesítményjellemzőinek rendszeres mérését, valamint a más termékekkel történő hatékonysági összehasonlítást. Ezek az adatok laboratóriumi szakmai alkalmassági programokban történő részvételből származnak.

A fennálló proficiencia-programokban való részvétel mellett egy 10 tagú CMV panelt (11. táblázat) is teszteltek 3 külső laboratóriumban az EZ1 DSP Virus Kit segítségével, az EZ1 Advanced XL készüléken a nukleinsav-tisztításhoz, és az *artus* RG PCR Kittel a DNS-eluátum teszteléséhez.

11. táblázat: A CMV panel tagjai

Panelszám (Paneltag típusa)	Paneltag	Hígítás hatása
1001 (1)	Negatív	1. negatív pool
1002 (1)	Negatív	2. negatív pool
1003 (2)	Erősen negatív	50%-os pozitív
1004 (2)	Erősen negatív	50%-os pozitív
1005 (3)	Gyengén pozitív	200 kópia/ml
1006 (3)	Gyengén pozitív	200 kópia/ml
1007 (4)	Mérsékelten pozitív	2000 kópia/ml
1008 (4)	Mérsékelten pozitív	2000 kópia/ml
1009 (5)	Erősen pozitív	200 000 kópia/ml
1010 (5)	Erősen pozitív	200 000 kópia/ml

A 10 tagú panelt két példányban tesztelte 2 külön szaktechnikus 6 napon át, minden nap, minden egyes vizsgálati helyszínen a reagensek és kitek 3 gyártási tételével. Ennélfogva a 20 minta és a 2 szaktechnikus, a 6 nap és a 3 helyszín szorzata összesen 720 adatpontot eredményez.

Az *artus* CMV RGQ MDx teszt teljes reprodukálhatósága $\leq 12\%$ CV-t adott 200 kópia/ml és 200 000 kópia/ml közötti koncentrációjú minták esetén (lásd 12. táblázat)

12. táblázat: Átfogó összegzés (minden egyes paneltag típus) – megfigyelt átlagok

panel_tag_típus	Megfigyelések száma	Átlag	Középérték	Szórás	CV százalék	Minimum
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

A százalékos variancia és a szórás átfogó összegzését a log₁₀ IU/ml értékekre, mind az 5 panel esetén (az alábbi szempontok szerint: gyártási tétel, helyszín, szaktechnikus, nap, futtatások között és egy futtatáson belül) a 13. táblázat tartalmazza (a következő oldalon).

13. táblázat: A szórásnégyszet és a szórási átfogó összegzése

Minta	1	2	3	4	5	
Mintatípus	Negatív	Erősen negatív	Gyengén pozitív	Mérsékelt pozitív	Erősen pozitív	
Megfigyelt átlag log₁₀ IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Tesztek száma	144	144	144	144	144	
Mérés	%-os variancia SD					
Szórásnégyszet összetevője	Tétel	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	Hely	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	Szaktechnikus	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	Nap	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	Futtatások között	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	Egy futtatáson belül	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	Összesen	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

Diagnosztikai kiértékelés

Az *artus* CMV RG PCR Kit kiértékelését az *artus* CMV RG PCR Kit és a COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test összehasonlításával végezték. 156 db retrospektív és prospektív klinikai EDTA-s plazmamintát vizsgáltak. Előzetesen a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR segítségével rutin diagnosztika keretein belül megvizsgáltak, és pozitívnak vagy negatívnak találtak minden vizsgálati mintát.

Az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel történő vizsgálathoz a CMV DNS-t a QIAamp DSP Virus Kit készlettel izolálták. Az izoláláshoz az *artus* CMV RG PCR Kit belső kontrollját is hozzáadták. A vizsgálatot Rotor-Gene 3000 készüléken végezték. A mintákat a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test teszttel a gyártó által a terméktájékoztatóban megadott utasításoknak megfelelően dolgozták fel és vizsgálták meg.

Mind a 11 olyan minta, melyet a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test pozitívnak talált, pozitívnak bizonyult az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel is. A 145 mintából, melyet a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test teszt negatívnak talált, 123 negatívnak bizonyult az *artus* CMV RG PCR Kit készlettel is. 22 nem egyező minta volt (14. táblázat).

14. táblázat: Az összehasonlító validálási vizsgálat eredményei

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

Ha a COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test tesztet referenciának tekintjük, az *artus* CMV RG PCR Kit minden mintára vonatkozó érzékenysége 100%, a diagnosztikai specificitása pedig 84,8%.

A 22 diszkordáns minta további vizsgálata az *artus* PCR Kitek eredményét erősítette meg. Ezek alapján valószínű, hogy a különbséget az *artus* CMV RG PCR Kit magasabb érzékenysége okozta.

Irodalomjegyzék

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).

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Megjegyzések és javaslatok

A pozitív kontrollok (CMV QS 1–4) nem adnak jelet a Cycling Green fluoreszcens csatornában

- | | |
|--|---|
| a) A PCR-adatok elemzésére kiválasztott fluoreszcens csatorna nem felel meg a protokollnak | Az adatelemzéshez válassza ki a Cycling Green fluoreszcens csatornát az analitikai CMV PCR-hez és a Cycling Yellow fluoreszcens csatornát a belső kontroll PCR-hez. |
| b) A Rotor-Gene készülék hőmérsékletprofilja nem megfelelően van programozva | Hasonlítsa össze a hőmérsékletprofilát a protokollal. Lásd: „Protokoll: PCR és adatelemzés”, 14. oldal. |
| c) A PCR konfigurációja nem megfelelő | Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási séma alapján, és szükség esetén ismétélje meg a PCR-t. Lásd: „Protokoll: PCR és adatelemzés”, 14. oldal. |
| d) A készlet egy vagy több részegysége esetében a tárolási körülmények nem feleltek meg a „A reagensek tárolása és kezelése” fejezetben, 10. oldalon találhatóaknak. | Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratí idejét (lásd a kit címkéjét), és szükség esetén használjon új kitet. |
| e) Az <i>artus</i> CMV RG PCR Kit lejárt | Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratí idejét (lásd a kit címkéjét), és szükség esetén használjon új kitet. |

A QIAamp DSP Virus Kit készlettel tisztított negatív plazmaminta belső kontrollja esetében gyenge jel, vagy nincs jel ($C_T = 27 \pm 3$; küszöbérték, 0,03) a Cycling Yellow fluoreszcens csatornában, és ezzel párhuzamosan nincs jel a Cycling Green csatornában

- | | |
|--|---|
| a) A PCR-paraméterek nem felelnek meg a protokollnak | Ellenőrizze a PCR körülményeket (lásd fentebb) és szükség esetén ismétélje meg a PCR futtatást a helyes beállításokkal. |
| b) A PCR gátolva volt | Ügyeljen rá, hogy a megfelelő izolálási protokollt alkalmazza, és szorosan kövesse a gyártó utasításait. |
| c) A DNS a kinyerés során elveszett | Amennyiben a belső kontrollt az extrakcióhoz adták hozzá, a belső kontroll jelenek hiánya a DNS-nek az extrakció során történő elvesztését mutathatja. Ügyeljen rá, hogy az ajánlott izolálási protokollt alkalmazza (lásd: „DNS izolálás”, 12. oldal), és szorosan kövesse a gyártó utasításait. |

Megjegyzések és javaslatok

- d) A készlet egy vagy több részegysége esetében a tárolási körülmények nem feleltek meg a „A reagensek tárolása és kezelése” fejezetben, 10. oldalon találhatóaknak. Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratí idejét (lásd a kit címkéjét), és szükség esetén használjon új kitet.
- e) Az artus CMV RG PCR Kit lejárt Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményeit és a lejáratí idejét (lásd a kit címkéjét), és szükség esetén használjon új kitet.

A negatív kontroll esetében jelek találhatóak az analitikai PCR Cycling Green fluoreszcens csatornájában.

- a) Szennyeződés történt a PCR előkészítése során Ismétlje meg a PCR reakciót párhuzamos új reagensekkel. Amennyiben lehetséges, zárja le a PCR csövet közvetlenül a vizsgálati minta hozzáadása után. Ügyeljen arra, hogy a pozitív kontrollokat utolsóként pipettázza. Ügyeljen rá, hogy a munkafelület és a készülékek fertőtlenítése rendszeres időközönként megtörténjen.
- b) Szennyeződés történt az extrakció során Ismétlje meg az extrakciót és PCR-reakciót a vizsgálni kívánt mintával és új reagensekkel. Ügyeljen rá, hogy a munkafelület és a készülékek fertőtlenítése rendszeres időközönként megtörténjen.

Szimbólumok



<N>

<N> teszthez elegendő reagenst tartalmaz



Lejárat dátum



In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló gyógyászati eszköz



Katalógusszám



Tételszám



Anyagszám



Összetevők



Tartalom



Szám



Globális kereskedelmi áruazonosító szám



Hőmérsékleti határértékek



Gyártó



Lásd a használati útmutatót

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	24 reakcióhoz: Master, magnézium-oldat, 4 kvantifikációs standard, belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	96 reakcióhoz: Master, magnézium-oldat, 4 kvantifikációs standard, belső kontroll, víz (PCR-szintű)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit — a virális DNS és RNS automatizált, párhuzamos tisztításához 1–14 szérum-, plazma- vagy liquormintából		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	48 virális nukleinsav preparáláshoz: Előtöltött reagenszettek, eldobható hegytartók, eldobható szűrős hegyek, mintacsövek, eluáló csövek, pufferek, hordozó RNS	62724
QIAamp DSP Virus Kit — a virális nukleinsavak tisztításához humán plazmamintából in vitro diagnosztikai célra		
QIAamp DSP Virus Kit	50 preparáláshoz: QIAamp MinElute® Spin Columns, pufferek, reagensek, csövek, oszloptoldalékok, és VacConnectors csatlakozók	60704
Rotor-Gene Q MDx és kiegészítők		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz.	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), laptop, szoftver, tartozékok: az	9002023

Termék	Tartalom	Katalógusszám
	alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást tartalmaz.	
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra és nagy felbontású olvadáspont-analizátor (HRM – High Resolution Melt) 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), HRM-csatorna, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra és nagy felbontású olvadáspont-analizátor (HRM – High Resolution Melt) 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), HRM-csatorna, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát, üzembe helyezést és oktatást is tartalmaz.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR (valós idejű PCR) berendezés 6 csatornával (kék, zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), laptop és szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz.	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR (valós idejű PCR) berendezés 6 csatornával (kék, zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), laptop és szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást tartalmaz.	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra 2 csatornával (zöld, sárga), laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz.	9002002

Termék	Tartalom	Katalógusszám
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra 2 csatornával (zöld, sárga), laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást tartalmaz.	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra és nagy felbontású olvadáspont-analizátor (HRM – High Resolution Melt) 2 csatornával (zöld, sárga), HRM-csatorna, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz.	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR (valós idejű PCR) hőkamra és nagy felbontású olvadáspont-analizátor (HRM – High Resolution Melt) 2 csatornával (zöld, sárga), HRM-csatorna, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást tartalmaz.	9002013
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Alumíniumblokk a reakciók manuális összeállítására egycsatornás pipettával 72 db 0,1 ml-es csőbe	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Alumíniumblokk a reakciók manuális összeállítására standard 8 x 12-es elrendezésben 96 db 0,2 ml-es csőbe	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strip 4 csővel és kupakkal 1000 reakcióhoz	981103

Termék	Tartalom	Katalógusszám
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strip 4 csővel és kupakkal 10 000 reakcióhoz	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 vékonyfalú cső 1000 reakcióhoz	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 vékonyfalú cső 10 000 reakcióhoz	981008

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

A dokumentum átdolgozási előzményei

Átdolgozás	Módosítások
6. átdolgozás, 2021. március	A Lineáris tartomány, Zavaró anyagok és Reprodukálhatóság című fejezetek hozzáadása. Az Alkalmazási terület és Kvantifikálás című szakaszok frissítése. A többé már nem támogatott QIAGEN berendezésekre való hivatkozások eltávolítása.
R7, 2021. december	„A kit tartalma” című szakasz helyesbítése a 24 tesztes kit formátumára vonatkozó részletek hozzáadásával

Korlátozott licencszerződés az *artus* CMV RG PCR Kit esetében

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

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

A legújabb licencc feltételekről a www.qiagen.com oldalon tájékozódhat.

Ennek a terméknek a megvásárlása feljogosítja a vevőt a kit humán in vitro diagnosztikai szolgáltatások végrehajtása céljából való használatára. A vásárlással megszerzett használati jogon kívül semmilyen általános szabaddalmi vagy bármilyen más licenc engedélyre nem jogosít ez a megállapodás.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, EZ1®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); CLS® (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 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/shop | Műszaki támogatás: support.qiagen.com | Webhely: www.qiagen.com