

2014 年 12 月

artus[®] CMV RG PCR Kit 使用手冊



24 (目錄編號 4503263)



96 (目錄編號 4503265)

版本 1

IVD

定量體外診斷

可供與 Rotor-Gene[®] Q 儀器搭配使用

CE
0197

REF

4503263, 4503265

HB

1046908



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德國

R5

MAT

1046908TW



Sample & Assay Technologies

QIAGEN 樣本製備與檢測技術

QIAGEN 是創新性樣本製備與檢測技術的領先供應商，可分離和檢測任何生物樣本的內含物。我們先進的高品質產品和服務可在從樣本製備到取得結果的整個流程中提供保障，確保取得成功。

QIAGEN 在下列領域設立了標準：

- DNA、RNA 和蛋白質純化
- 核酸和蛋白質檢測
- microRNA 研究和 RNAi
- 樣本製備與檢測技術自動化

我們的使命是幫助您取得卓越的成功和突破。詳細資訊請瀏覽 www.qiagen.com。

目錄

適用範圍	5
摘要與說明	5
病原體資訊	5
程序原理	6
提供的材料	6
試劑組內容物	6
需要但並未提供的材料	7
警告和注意事項	8
一般注意事項	8
試劑儲存與處理	8
檢體處理與儲存	8
程序	10
DNA 分離	10
內部對照劑	10
操作程序：PCR 和資料分析	12
結果判讀	18
定量	18
結果	19
疑難排解指南	20
品質控制	22
限制	22
效能特性	23
分析靈敏度	23
特定	24
精確度	26
穩健性	26
再現性	26
診斷評估	28
參考資料	29

符號	29
聯絡資訊	30
訂購資訊	31

適用範圍

artus CMV RG PCR Kit 是一項體外核酸擴增檢驗，可用於定量人類血漿中的巨細胞病毒 (CMV) DNA。本診斷試劑組利用聚合酶鏈式反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，並且配置為配合 Rotor-Gene Q 儀器使用。

摘要與說明

artus CMV RG PCR Kit 是即用式系統，在 Rotor-Gene Q 儀器進行聚合酶鏈式反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，以檢測 CMV DNA。CMV RG Master 包含試劑和酵素，可特定擴增 CMV 基因體的特定 105 bp 區域，並可使用 Rotor-Gene Q MDx、Rotor-Gene Q 或 Rotor-Gene 6000 的螢光通道 Cycling Green 或 Rotor-Gene 3000 的 Cycling A.FAM™，直接檢測特定擴增子。

此外，*artus* CMV RG PCR Kit 還包含另一個異源擴增系統，用於識別可能的 PCR 抑制。在 Rotor Gene Q MDx、Rotor-Gene Q 或 Rotor-Gene 6000 的螢光通道 Cycling Yellow，或 Rotor-Gene 3000 的 Cycling A.JOE™ 中，這會作為內部對照劑 (internal control, IC) 進行檢測。分析 CMV PCR 的檢測限值（參閱第 23 頁的「分析靈敏度」）未下降。提供外部陽性對照組 (CMV QS 1 - 4)，用於定量病毒 DNA。有關詳細資訊，請參閱第 18 頁的「定量」。

病原體資訊

人類巨細胞病毒 (CMV) 會出現在感染者的血液、組織，以及幾乎所有分泌液中，可能透過口腔、性行為、輸血或器官移植、子宮內或周產期傳播。CMV 感染經常導致無症狀感染，後續體內終生帶有此病毒。青少年或成人若有症狀，會出現類似單核細胞增多症的發燒、輕微肝炎、全身性不適。曾觀察到重度 CMV 感染病程，較常發生於子宮內感染或免疫不全患者。

程序原理

透過聚合酶鏈式反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 檢測病原體的依據是病原體基因組特定區段的擴增。在 *real-time* PCR 中，擴增產物透過熒光染料進行檢測。這些染料通常和明確與擴增產物結合的寡核苷酸關聯。由於是在 PCR 運行期間監測螢光強度（即即時監測），因此在 PCR 運行後，不必再次打開反應試管，便可檢測和定量累積產物。*

提供的材料

試劑組內容物

artus CMV RG PCR Kit			(24)	(96)
目錄編號			4503263	4503265
反應次數			24	96
藍色	CMV RG Master		2 x 12 個 反應	8 x 12 個反 應
黃色	CMV Mg-Sol [†]	Mg-Sol	600 µl	600 µl
紅色	CMV QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ 副本/µl)	QS	200 µl	200 µl
紅色	CMV QS 2 [‡] (1 x 10 ³ 副本/µl)	QS	200 µl	200 µl
紅色	CMV QS 3 [‡] (1 x 10 ² 副本/µl)	QS	200 µl	200 µl
紅色	CMV QS 4 [‡] (1 x 10 ¹ 副本/µl)	QS	200 µl	200 µl
綠色	CMV RG IC [§]	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
白色	水 (PCR 級)		1000 µl	1000 µl
	使用手冊		1	1

[†] 鎂溶液。

[‡] 定量標準品。

[§] 內部對照劑。

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

需要但並未提供的材料

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和防護眼鏡。如需瞭解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (Safety Data Sheets, SDS)，其可從產品供應商處獲得。

試劑

- DNA 隔離試劑組（參閱第 10 頁上的「DNA 分離」）

耗材

- 帶過濾器的無菌移液吸頭
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml（管條和蓋，0.1 ml），與 72 孔轉子搭配使用（目錄編號 981103 或 981106）
- 或者：PCR 試管，0.2 ml，與 36 孔轉子搭配使用（目錄編號 981005 或 981008）

設備

- 移液管（可調節）*
- 振盪混合器*
- 帶轉子的桌上型離心機*，用於 2 ml 反應管
- Rotor-Gene Q MDx、Rotor-Gene Q 或 Rotor-Gene 儀器*，配備 Cycling Green 和 Cycling Yellow 熒光通道，或配備 Cycling A.FAM 和 Cycling A.JOE 熒光通道
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q 軟體版本 1.7.94 或更高（Rotor-Gene 6000 軟體版本 1.7.65、1.7.87、1.7.94；Rotor-Gene 3000 軟體版本 6.0.23）
- 冷卻塊（載入塊 72 x 0.1 ml 試管，目錄編號 9018901；或載入塊 96 x 0.2 ml 試管，目錄編號 9018905）

* 確保按照製造商的建議檢查並校準儀器。

警告和注意事項

供體外診斷使用

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和防護眼鏡。如需了解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (Safety Data Sheets, SDS)。這些安全資料表以簡潔方便的 PDF 格式在線上提供：www.qiagen.com/safety，您可以從中搜尋、瀏覽並列印每種 QIAGEN® 試劑組及其內含成分的安全資料表。

根據當地安全規定丟棄樣本和檢測廢棄物。

一般注意事項

使用者應始終注意以下事項：

- 使用帶過濾器的無菌移液吸頭。
- 將陽性材料（檢體、陽性對照和擴增子）與所有其他試劑分開儲存和提取，在空間分隔區域中將其加入反應混合液中。
- 在室溫 (15 – 25°C) 下將所有成分徹底解凍，然後再開始檢測。
- 解凍時，混合成分（透過反復上下吸取或透過間歇振蕩）並進行短暫的離心分離。
- 動作迅速地將成分存放在冰上或冷卻塊（72/96 孔載入塊）中。

試劑儲存與處理

artus CMV RG PCR Kit 的成分應存放在 -15°C 至 -30°C 環境中，可在標籤上所示的到期日期前保持穩定。應避免反復（超過 2 次）解凍和冷凍，因為這可能會降低檢測靈敏度。如果只是間歇性使用試劑，應將它們等量分裝冷凍。在 2 – 8°C 下的存放時間不應超過 5 小時。

檢體處理與儲存

備註：所有樣本必須視為潛在感染性材料。

備註：目前研究顯示，最適合用於檢測 CMV 的樣本材料是乙二胺四乙酸 (EDTA) 或檸檬酸鹽血漿。因此，使用 *artus* CMV RG PCR Kit 時，建議採用這類材料。

artus CMV RG PCR Kit 已使用 EDTA 血漿樣本進行驗證，但其他樣本材料尚未驗證。請務必使用建議的核酸分離試劑組來製備樣本（參閱第 10 頁的「DNA 分離」）。

使用特定樣本材料時，請務必遵循特定的收集、運送及儲存說明。

檢體收集

每次採血都會造成血管 (動脈、靜脈、微血管) 損傷，請務必使用無毒且無菌的材料，目前已可使用適當的拋棄式器材進行採血。靜脈穿刺時切勿使用過細的毛細管針頭，靜脈血應在肘窩、前臂或手背的適當部位採集。應使用標準檢體收集管 (紅蓋，Sarstedt 或其他製造商供應的等效試管) 採血。必須採集約 5 – 10 ml EDTA 血液，樣本收集後應立即將試管上下翻轉混合 (8 次，不可搖動)。

備註：不得使用肝素化人類樣本 (參閱第 9 頁的「干擾物質」)。

樣本儲存

全血應在 6 小時內，以 800 – 1600 x g 的轉速離心 20 分鐘，分離為血漿及細胞成分。將分離的血漿移至無菌聚丙烯試管，如果樣本依常規冷凍或長時間儲存，可能會降低檢測靈敏度。

樣本運送

原則上，應使用防破碎運送容器來運送樣本材料，如此可避免樣本滲漏所引起的潛在感染風險。樣本應依據當地及國家的病原體材料運送指示運送。*

樣本應在 6 小時內運送，不建議將樣本保存在樣本採集處。若符合病原體材料運送指示的法律規定，樣本可郵寄運送。我們建議以快遞運送樣本，血液樣本應低溫運送 (2 至 8°C)，而分離的血漿應採冷凍運送 (-15 至 -30°C)。

干擾物質

較高濃度的膽紅素 (≤ 4.5 mg/dl) 和脂質 (≤ 1000 mg/dl)，以及溶血樣本都不會影響本系統。肝素會影響 PCR 反應，因此不得使用肝素 (抗凝劑) 試管所採集的樣本。此外，也不得使用肝素化人類樣本。

* 國際航空運輸協會 (IATA)。危險貨品規範。

程序

DNA 分離

表 1 中所示的 QIAGEN 試劑組經過驗證，可以配合 *artus* CMV RG PCR Kit 使用，從指定類型的人類樣本中萃取病毒 DNA。按照試劑組使用手冊中的說明純化病毒 DNA。

表 1：經驗證可配合 *artus* CMV RG PCR Kit 使用的純化試劑組

樣本材料	樣本量	核酸隔離試劑組	目錄編號 (QIAGEN)	載體 RNA
EDTA 血漿	500 μ l	QIAamp [®] DSP Virus Kit	60704	包含
EDTA 血漿	400 μ l	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62724	包含

* EZ1 DSP Virus Kit 還以 CE-IVD 標記的 EASYartus[®] CMV RG PCR Kit 形式提供，與 *artus* CMV RG PCR Kit 組合使用（參閱第 31 頁的訂購資訊）。

備註：使用載體 RNA 對萃取效率並因此對 DNA/RNA 產量至關重要。我們建議依據使用說明書（「試劑及緩衝液製備」）的資訊配製及儲存載體 RNA，以增加 QIAamp DSP Virus Kit 內載體 RNA 的穩定性。

備註：*artus* CMV RG PCR Kit 的內部對照劑可直接在分離程序中使用。請確認在分離程序中納入一份陰性血漿樣本。內部對照劑對應的訊號是可評估分離情況的依據（參閱下方「內部對照劑」）。

內部對照劑

本產品提供內部對照劑劑 (CMV RG IC)。這樣一來，使用者既可以控制 DNA 分離程序，又可檢查有無可能發生的 PCR 抑制。對於該應用，以每 1 μ l 溶析體積 0.1 μ l 的比例，添加內部對照劑到分離物。例如，使用 QIAamp DSP Virus Kit 時，以 60 μ l 析出緩衝液 (AVE) 來溶析 DNA。因此，開始時應添加 6 μ l 的內部對照劑。內部對照劑的使用量僅取決於溶析體積。

備註：只應將內部對照劑和載體 RNA（參閱第 10 頁的「DNA 分離」）添加到裂解緩衝液與樣本材料的混合物，或直接添加到裂解緩衝液。

不得將內部對照劑直接添加到樣本材料。如果添加到裂解緩衝液，請注意，內部對照劑與裂解緩衝液 - 載體 RNA 的混合物必須在新鮮製備後立即使用（在室溫或冰箱內存放混合物僅幾小時就可能導致內部對照失效以及提取效率下降）。

備註：請勿直接向樣本材料中添加內部對照劑和載體 RNA。

純化過程 (QIAamp DSP Virus Kit) 處理之陰性血漿樣本的內部對照劑，使用 Rotor-Gene Q 儀器所得的 C_T 值必須達到 $C_T = 27 \pm 3$ (閾值：0.03)，才是成功的純化。上述的分布是依據儀器及純化的變異，較大的偏差表示純化過程有問題，必須檢查純化過程，若有需要，需進行第二次驗證。如果您有其他疑問或遇到問題，請聯絡 QIAGEN 技術服務部。

可以選擇性地僅使用內部對照劑，檢查有無可能發生的 PCR 抑制。對於該應用，請按照操作程序步驟 2b (第 13 頁) 所述將內部對照劑直接添加到 CMV RG Master 及 CMV Mg-Sol。

操作程序：PCR 和資料分析

開始前要點

- 在開始操作程序前，花時間熟悉 Rotor-Gene Q 儀器。請參閱儀器的使用者手冊。
- 確保每次 PCR 分析至少包括一個定量標樣以及一個陰性對照（水，PCR 級）。要繪製標準曲線，請在每次 PCR 分析時使用試劑組內的所有 4 個定量標準品 (CMV QS 1 - 4)。

開始前需完成的事項

- 確保將冷卻塊（Rotor-Gene Q 儀器的配件）預先冷卻至 2 - 8°C。
- 每次使用前，所有試劑都需要完全解凍、混合（透過反復上下吸取或透過快速振蕩）並進行短暫的離心分離。

程序

1. 將所需數量的 PCR 試管放入冷卻塊的適配器。
2. 如果您使用內部對照劑來監控 DNA 分離程序以及檢查有無可能發生 PCR 抑制，請執行步驟 2a。如果您僅使用內部對照劑來檢查有無可能發生的 PCR 抑制，請執行步驟 2b。

備註：強烈建議將內部對照劑加入定量標準品所使用之 CMV RG Master 及 CMV Mg-Sol。關於定量標準品，請按照操作程序步驟 2b 所述，將內部對照劑直接加入 CMV RG Master 及 CMV Mg-Sol，每個定量標準品 (CMV QS 1 - 4) 都使用這個主混合液進行反應。

- 2a. 內部對照劑已添加到分離液（參閱第 10 頁的「內部對照劑」）。在此情況下，請按照表 2 製備主混合液。

反應混合液通常包含除樣本外 PCR 所需的所有成分。

表 2：製備主混合液（內部對照劑用於監控 DNA 分離及檢查 PCR 抑制）

樣本數量	1	12
CMV RG Master	25 µl	300 µl
CMV Mg-Sol	5 µl	60 µl
CMV RG IC	0 µl	0 µl
總體積	30 µl	360 µl

- 2b.** 內部對照劑必須直接添加到 **CMV RG Master** 及 **CMV Mg-Sol** 的混合液。在此情況下，請按照 **表 3** 製備主混合液。

反應混合液通常包含除樣本外 PCR 所需的所有成分。

表 3：製備主混合液（內部對照劑僅用於檢查有無 **PCR** 抑制）

樣本數量	1	12
CMV RG Master	25 μ l	300 μ l
CMV Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
CMV RG IC	2 μ l	24 μ l
總體積	32 μl*	384 μl*

* 準備 PCR 檢測時，添加內部對照劑造成的體積增加將忽略不計。檢測系統的靈敏度不受影響。

- 3.** 將 **30 μ l** 主混合液移液至每個 **PCR** 試管。然後添加 **20 μ l** 的溶析樣本 **DNA**（參閱 **表 4**）。相對地，至少必須使用其中一個定量標準品 (**CMV QS 1 - 4**) 的 **20 μ l** 作為陽性對照組，使用 **20 μ l** 的水（水，**PCR** 級）作為陰性對照組。

表 4：準備 **PCR** 檢測

樣本數量	1	12
Master mix（主混合液）	30 μ l	各 30 μ l
樣本	20 μ l	各 20 μ l
總體積	50 μl	各 50 μl

- 4.** 封閉 **PCR** 試管。確保密封圈（**Rotor-Gene** 儀器的配件）放置在轉子頂部，以防止試管在分析期間意外打開。

5. 為檢測 **CMV DNA**，請按照下列步驟建立溫度曲線。

設定一般檢測參數	圖 1、2、3
熱態啟動酶的初始活化	圖 4
DNA 擴增 （下降 PCR）	圖 5
調整螢光通道靈敏度	圖 6
開始運行	圖 7

有關所有規格，請參閱 Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q 軟體版本 1.7.94、Rotor-Gene 6000 軟體版本 1.7.65、1.7.87、1.7.94 以及 Rotor-Gene 3000 軟體版本 6.0.23。有關 Rotor-Gene 儀器程式設計的更多資訊，請參閱儀器使用者手冊。插圖中使用粗黑體將這些設定框出。提供了適用於 Rotor-Gene Q 儀器的插圖。如果 Rotor-Gene 3000 需要使用不同的值，正文會對這些差異作出說明。

6. 首先，開啟「**New Run Wizard**」（新執行精靈）對話方塊（圖 1）。選中「**Locking Ring Attached**」（已連接鎖環）核取方塊，然後按一下「**Next**」（下一步）。

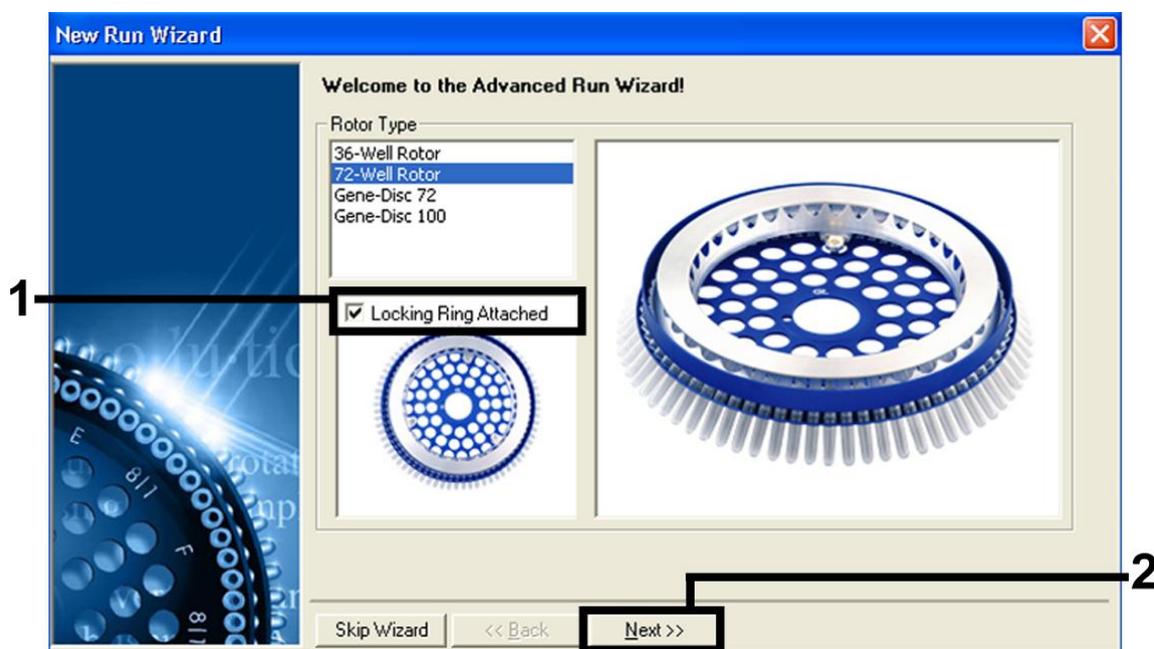


圖 1：「**New Run Wizard**」（新執行精靈）對話方塊。

7. 選取 **50** 作為 PCR 反應體積，並按一下「**Next**」（下一步）（圖 2）。

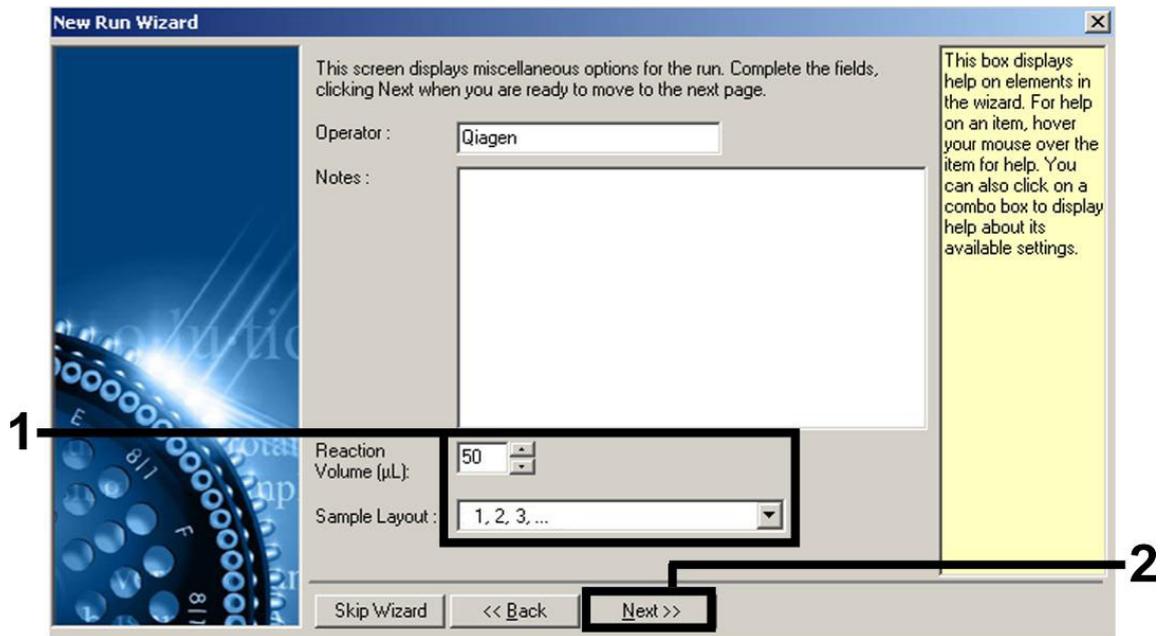


圖 2：設定一般檢測參數。

8. 按一下下一個「**New Run Wizard**」（新執行精靈）對話方塊（圖 3）中的「**Edit Profile**」（編輯曲線）按鈕，並按圖 3 - 5 所示設定溫度曲線。

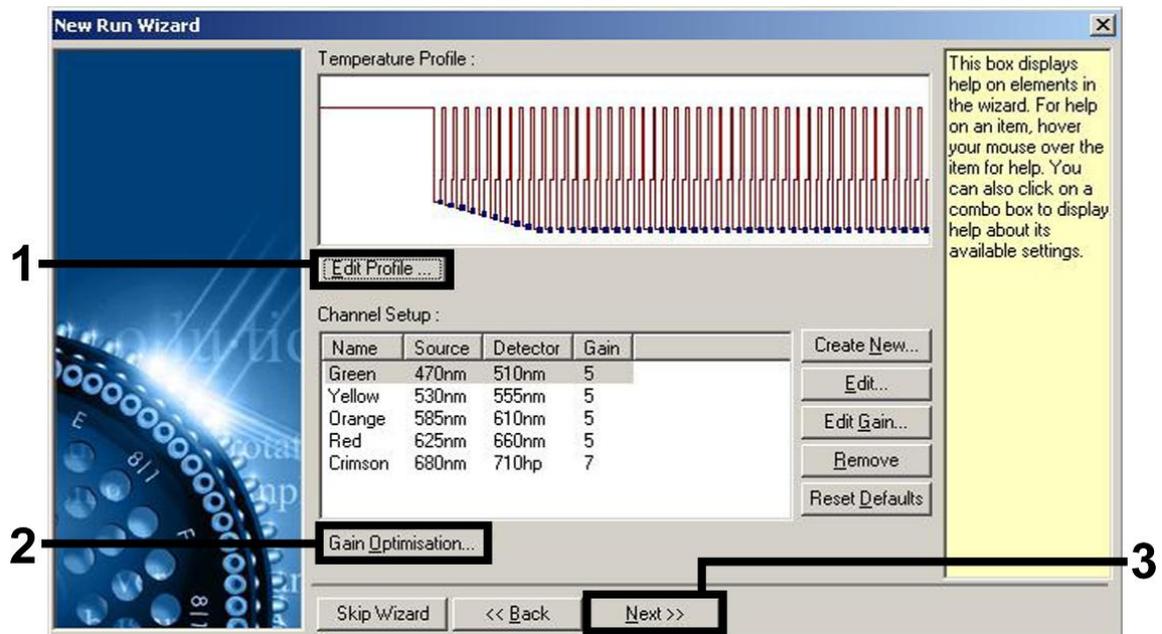


圖 3：編輯曲線。

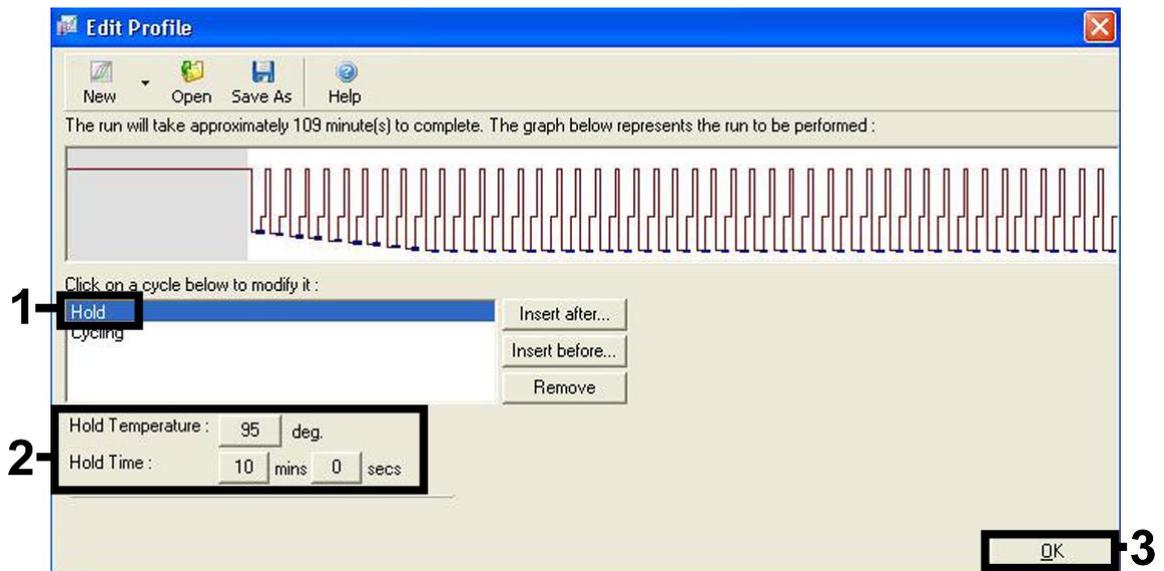


圖 4：熱態啟動酶的初始活化。

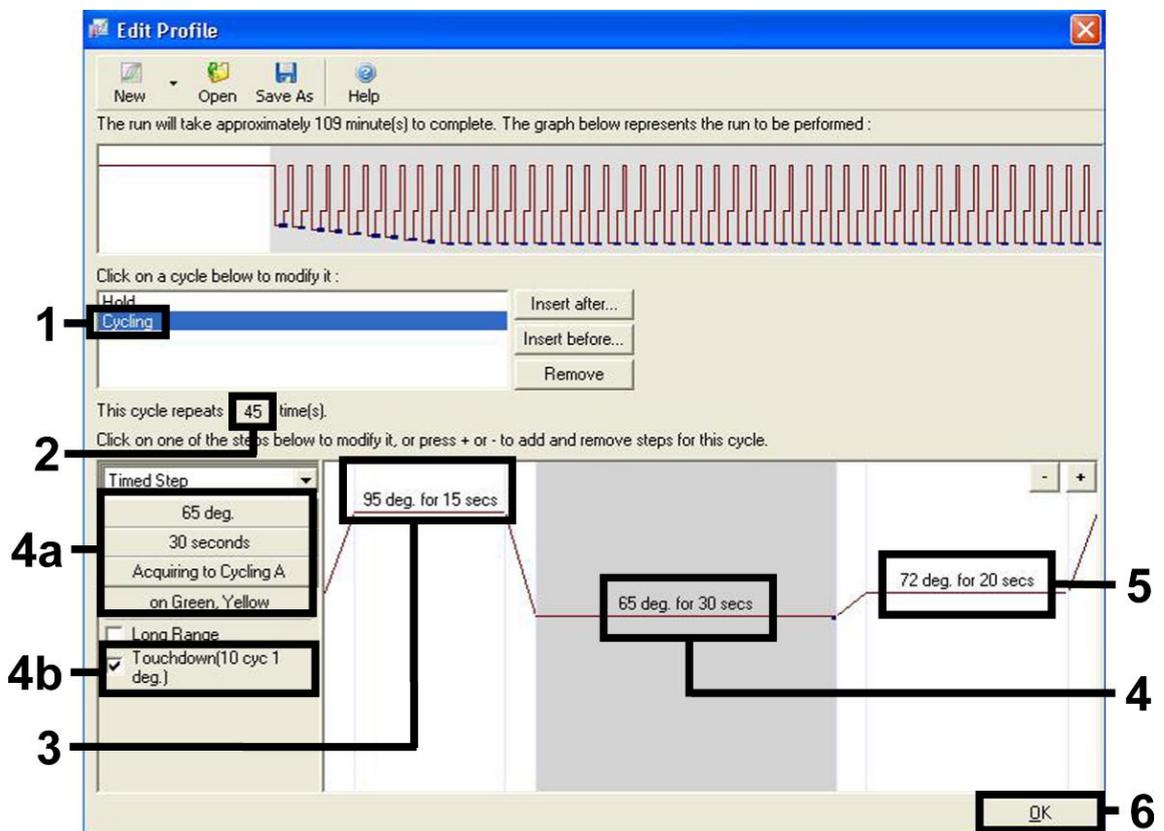


圖 5：擴增 DNA。確保在退火步驟將下降功能啟用 10 個循環。請注意，在 Rotor-Gene 3000 上，軟體會將熒光染料定義為「FAM/Sybr, JOE」。

9. 需要按照 PCR 試管內的熒光強度確定熒光通道的檢測範圍。按一下「New Run Wizard」（新執行精靈）對話方塊中的「Gain Optimisation」（增益最佳化）（參見圖 3），開啟「Auto-Gain Optimisation Setup」（自動增益最佳化設定）對話方塊。將校準溫度設定為 65 以符合擴增程序的黏合溫度（圖 6）。

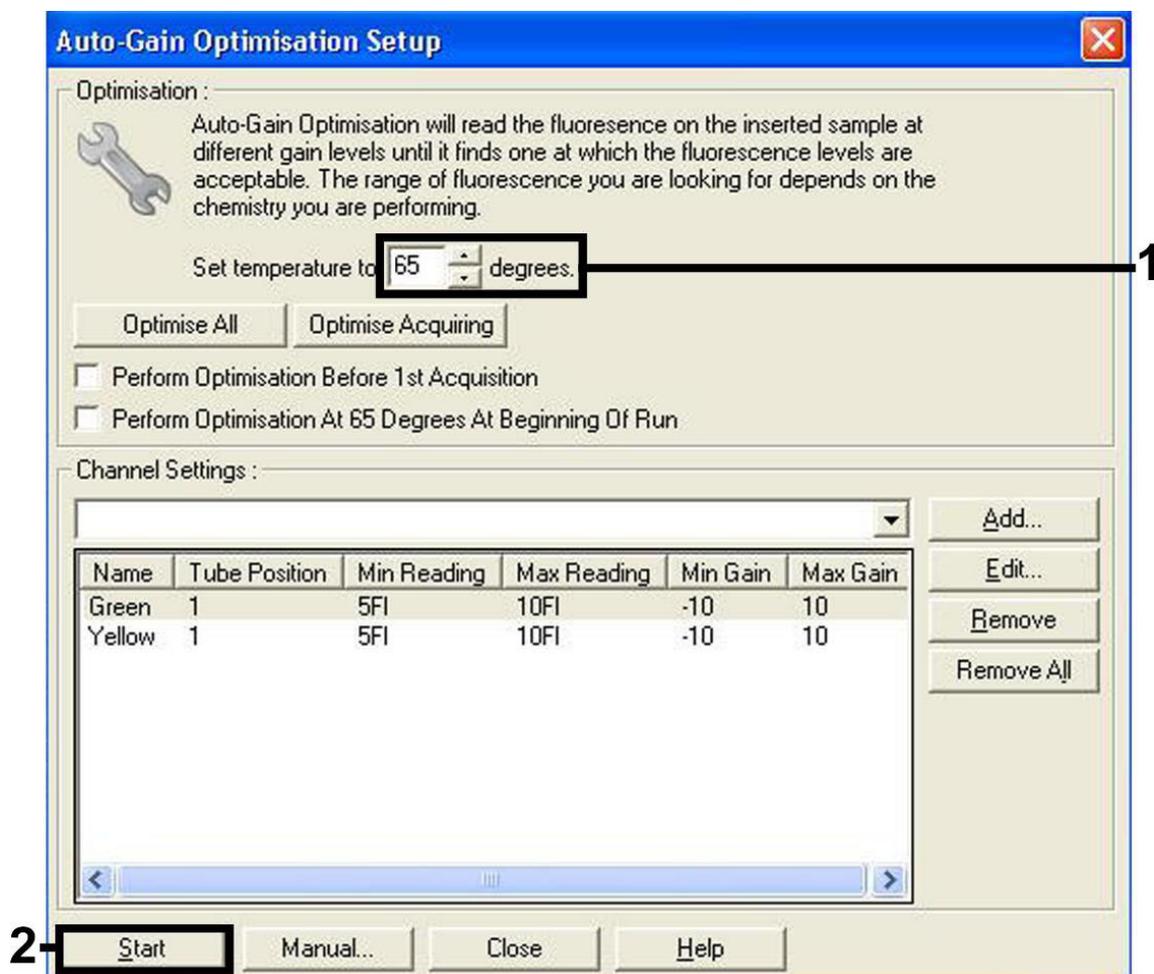


圖 6：調整熒光通道靈敏度。請注意，在 Rotor-Gene 3000 上，軟體會將熒光染料定義為「FAM/Sybr」和「JOE」。

10. 通道校準確定的增益值會自動儲存，並列在設定程序的最後一個選單視窗中（圖 7）。按一下「Start Run」（開始運行）。

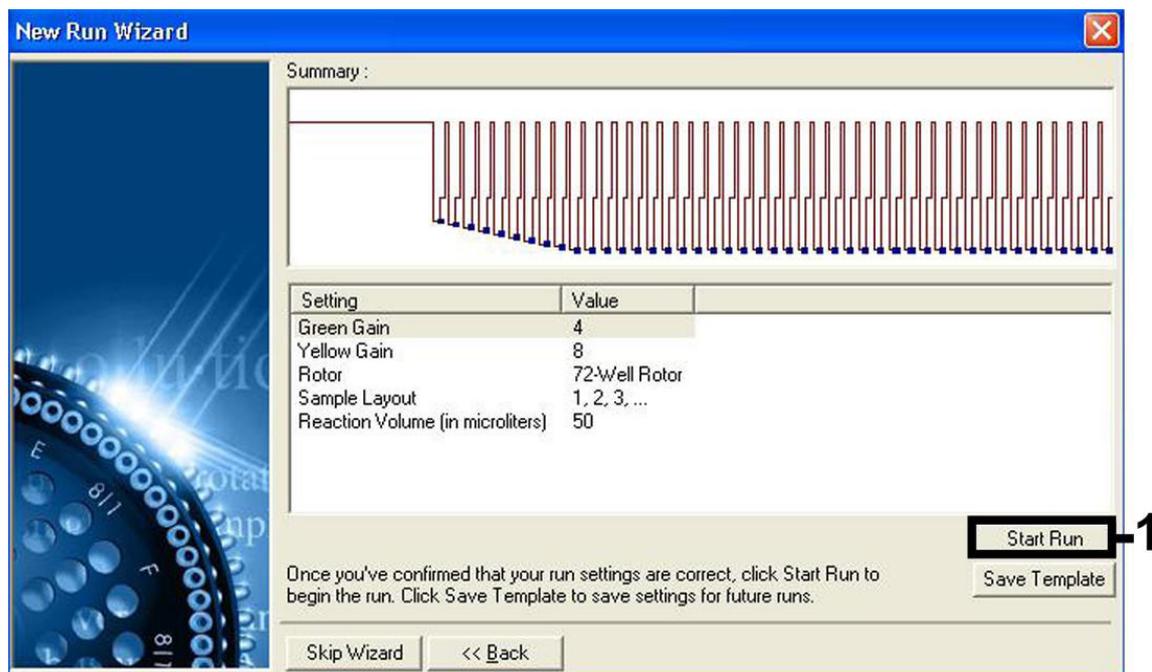


圖 7：開始運行。請注意，在 Rotor-Gene 3000 上，軟體會將熒光染料定義為「FAM/Sybr」和「JOE」。

結果判讀

定量

隨附的定量標準品 (CMV QS 1 - 4) 視為之前純化的樣本，並使用相同的體積 (20 μ l)。要在 Rotor-Gene Q 儀器上繪製標準曲線，所有 4 個定量標準品都應使用，並在「Edit Samples」（編輯樣本）對話方塊中定義為具有指定濃度的標準品（參閱儀器的使用者手冊）。

備註：為了確保準確定量，強烈建議將內部對照劑加入定量標準品所使用之 CMV RG Master 及 CMV Mg-Sol。對於這項應用，請按照操作程序步驟 2b 所述（第 13 頁），將內部對照劑直接加入 CMV RG Master 及 CMV Mg-Sol，每個定量標準品 (CMV QS 1 - 4) 都使用這個主混合液進行反應。

備註：定量標準品定義為副本/ μ l。應運用以下公式將使用標樣曲線確定的值轉換為樣本材料的副本/ml：

$$\text{結果 (副本/ml)} = \frac{\text{結果 (副本/}\mu\text{l)} \times \text{溶析體積 (}\mu\text{l)}}{\text{樣本體積 (ml)}}$$

原則上，應在以上公式中輸入初始樣本體積。當樣本體積在核酸提取前發生變化時（例如，透過離心減少體積，或透過向隔離所需的體積進行添加增加體積），需要將此考慮在內。

結果

圖 8 和 圖 9 為陽性和陰性 PCR 反應的範例。

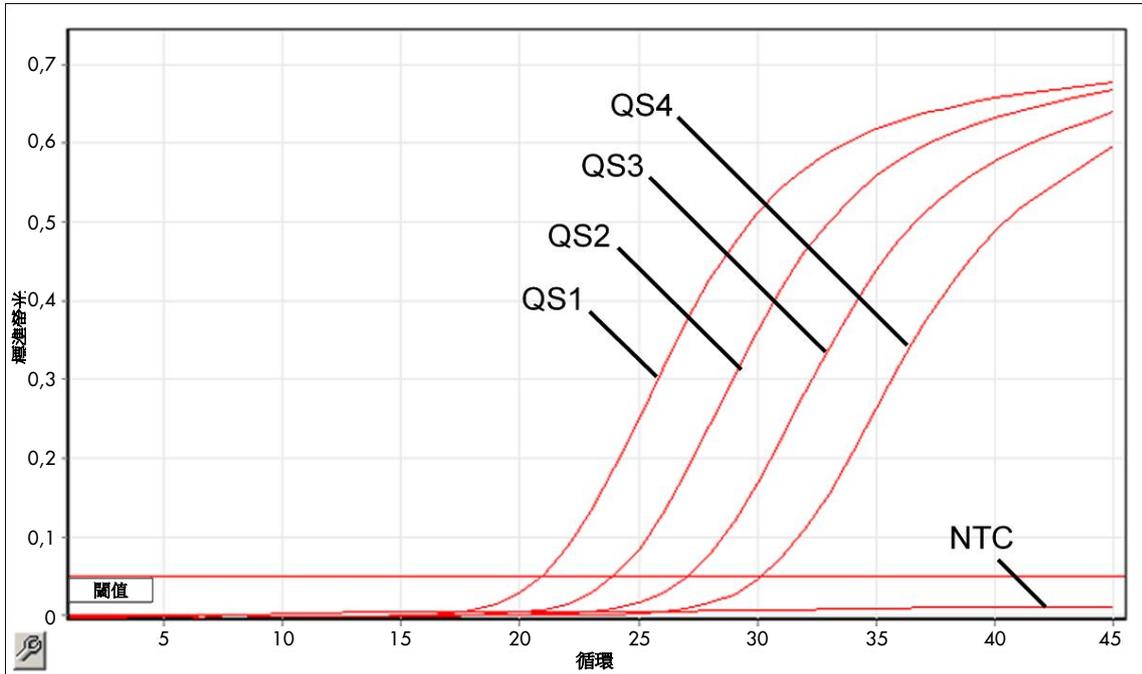


圖 8：檢測螢光通道 **Cycling Green** 中的定量標準品 (CMV QS 1 - 4)。NTC：無模板對照組 (陰性對照組)。

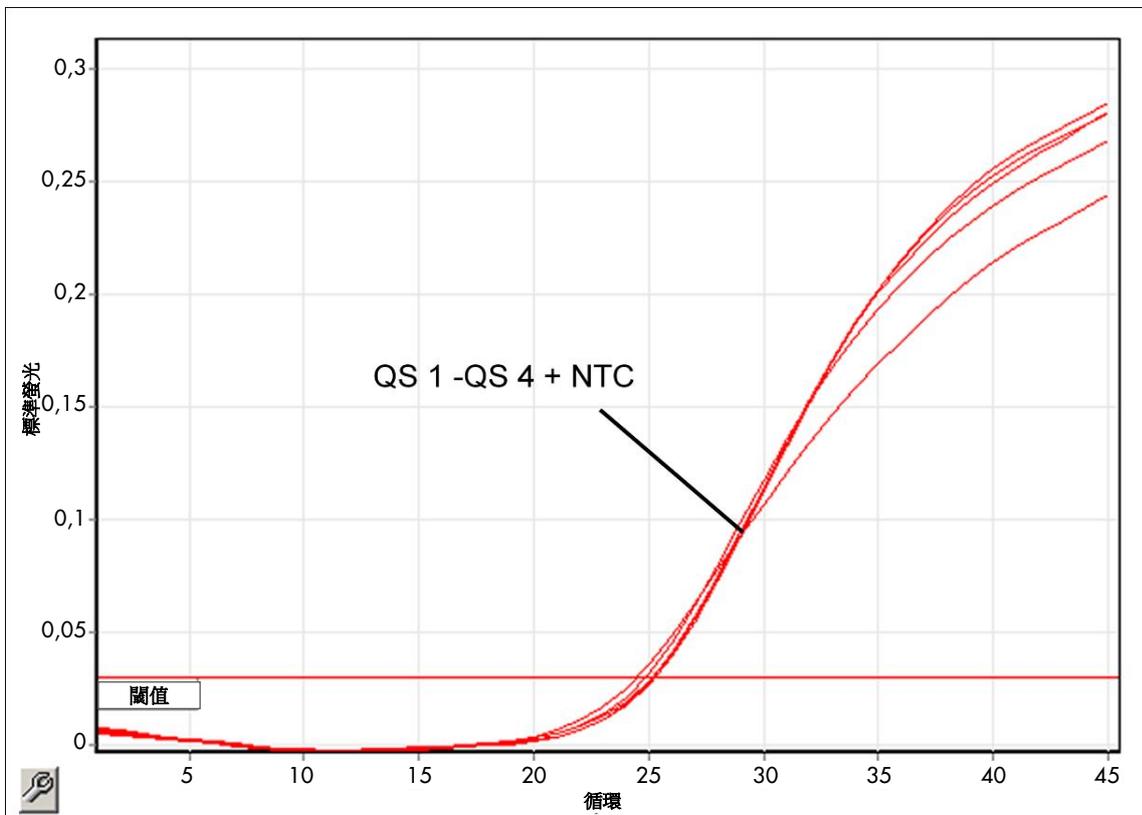


圖 9：檢測螢光通道 **Cycling Yellow** 中的內部對照劑 (IC)，同時擴增量標準品 (CMV QS 1 - 4)。NTC：無模板對照組 (陰性對照組)。

在熒光通道 **Cycling Green** 中檢測到訊號。

分析的結果為陽性：樣本包含 **CMV DNA**。

在此情況下，並非必須在 **Cycling Yellow** 通道中檢測到訊號，因為初始濃度較高的 **CMV DNA**（**Cycling Green** 通道中陽性訊號）可能導致「循環黃色」通道中內部對照劑的螢光訊號減少或缺少（競爭）。

備註：在 Rotor-Gene 3000 上，相關通道為陽性訊號的 **Cycling A.FAM** 和內部對照劑的 **Cycling A.JOE**。

在熒光通道 **Cycling Green** 中，未檢測到訊號。同時，來自內部對照劑的訊號出現在 **Cycling Yellow** 通道中。

在樣本中未檢測到 **CMV DNA**，可將其視為陰性。

如果是陰性 **CMV PCR**，檢測到內部對照劑訊號可以排除發生 **PCR** 抑制的可能性。

備註：在 Rotor-Gene 3000 上，相關通道為內部對照劑的 **Cycling A.JOE** 和缺少訊號的 **Cycling A.FAM**。

在 **Cycling Green** 或 **Cycling Yellow** 通道中未檢測到訊號。

無法就結果得出結論。

有關錯誤來源及其解決方案的資訊，請參閱下方的「疑難排解指南」。

備註：在 Rotor-Gene 3000 上，相關通道為 **Cycling A.FAM** 和 **Cycling A.JOE**。

疑難排解指南

本疑難排解指南對解決發生的任何問題都可能有用。如需了解更多資訊，請參閱我們技術支援中心的常見問題頁面：www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx。如果您對本使用手冊中的資訊和操作程序，或對樣本和檢測技術有任何問題，**QIAGEN** 技術服務部的科學家將樂意為您解答（聯絡資訊請參見封底或瀏覽網站 www.qiagen.com）。

意見和建議

螢光通道 **Cycling Green** 或 **Cycling A.FAM** 中沒有陽性對照 (**CMV QS 1 - 4**) 訊號

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) 選擇用於 PCR 資料分析的螢光通道不符合操作程序 | 對於資料分析，選擇螢光通道 Cycling Green 或 Cycling A.FAM 進行 CMV PCR 分析，選擇螢光通道 Cycling Yellow 或 Cycling A.JOE 進行內部對照劑 PCR 分析。 |
| b) Rotor-Gene 儀器溫度曲線的設定不正確 | 將溫度曲線與方案進行比較。請參閱第 12 頁的「操作程序：PCR 和資料分析」。 |

意見和建議

-
- c) PCR 設定錯誤 透過移液方案檢查您的工作步驟，如有必要，重複 PCR。請參閱第 12 頁的「操作程序：PCR 和資料分析」。
 - d) 單個或多個試劑組組分的儲存條件與「試劑儲存與處理」（第 8 頁）部分的說明不一致 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。
 - e) *artus* CMV RG PCR Kit 已過期 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。

使用 **QIAamp DSP Virus Kit ($C_T = 27 \pm 3$ ；閾值：0.03)** 純化的陰性血漿樣本，**Cycling Yellow** 螢光通道或 **Cycling A.JOE** 中的內部對照劑訊號微弱或無訊號，同時 **Cycling Green** 通道或 **Cycling A.FAM** 無訊號。

- a) PCR 條件不符合操作程序 檢查 PCR 條件（見上文），並在必要時使用更正後的設定重複 PCR 分析。
- b) PCR 受到抑制 確保您採用建議的隔離方法，並嚴格遵循生產商的說明。
- c) DNA 在萃取期間損失 如果向提取添加了內部對照劑，沒有內部對照訊號可能表示 DNA 在提取期間損失。確保您採用建議的隔離方法（參閱第 10 頁的「DNA 分離」），並嚴格遵循生產商的說明。
- d) 單個或多個試劑組組分的儲存條件與「試劑儲存與處理」（第 8 頁）部分的說明不一致 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。
- e) *artus* CMV RG PCR Kit 已過期 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。

PCR 分析螢光通道 **Cycling Green** 或 **Cycling A.FAM** 中的陰性對照訊號

- a) PCR 準備期間發生汙染 使用新的試劑對複製品重複 PCR。
如果可能，在加入待檢測樣本後直接蓋上 PCR 管。
確保最後對陽性對照移液。
定期確保工作區和儀器無汙染。
- b) 提取期間發生了汙染 使用新試劑重複待測樣本的提取和 PCR 分析。
定期確保工作區和儀器無汙染。

品質控制

依照 QIAGEN 的 ISO 認證品質管制系統，每批 *artus* CMV RG PCR Kit 已針對預定品質標準進行了檢測，以確保產品品質一致。

限制

所有試劑只能用於體外診斷。

本產品只能由在體外診斷程序方面經過專門指導和訓練的人員使用。

必須嚴格遵守使用者手冊要求，才能獲得最佳 PCR 結果。

應注意所有組分盒和標籤上列印的有效期限。請勿使用過期成分。

病毒基因組被試劑組引物和/或探針覆蓋的高度保留區段內的突變儘管罕見，但確有可能導致定量不足，或在這些情況下未能檢測到病毒的存在。檢測設計的有效性和效能將定期修訂。

效能特性

分析靈敏度

針對 *artus* CMV RG PCR Kit 評估分析檢測極限，以及考量純化過程的分析檢測極限（靈敏度限值）。使用 CMV 臨床陽性檢體以特定萃取方法純化，判斷考量純化過程的分析檢測極限。相對的，使用已知濃度的 CMV DNA 時，判斷分析檢測極限與選用的萃取方法無關。

為確認 *artus* CMV RG PCR Kit 的分析靈敏度，將 CMV 基因體 DNA 序列稀釋，由 10 至標稱 0.00316 副本/ μ l，以 *artus* CMV RG PCR Kit 在 Rotor-Gene 儀器上進行分析。2. 在 3 個不同日期對 8 個重複樣品進行測試，透過概率單位分析確定結果。圖 10 圖示以 Rotor-Gene 6000 執行的概率單位分析。*artus* CMV RG PCR Kit 在 Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 和 Rotor-Gene 3000 上使用時，分析檢測限值分別為 0.36 副本/ μ l ($p = 0.05$) 和 0.24 副本/ μ l ($p = 0.05$)。這個結果表示檢測到 0.36 副本/ μ l 或 0.24 副本/ μ l 的概率為 95%。

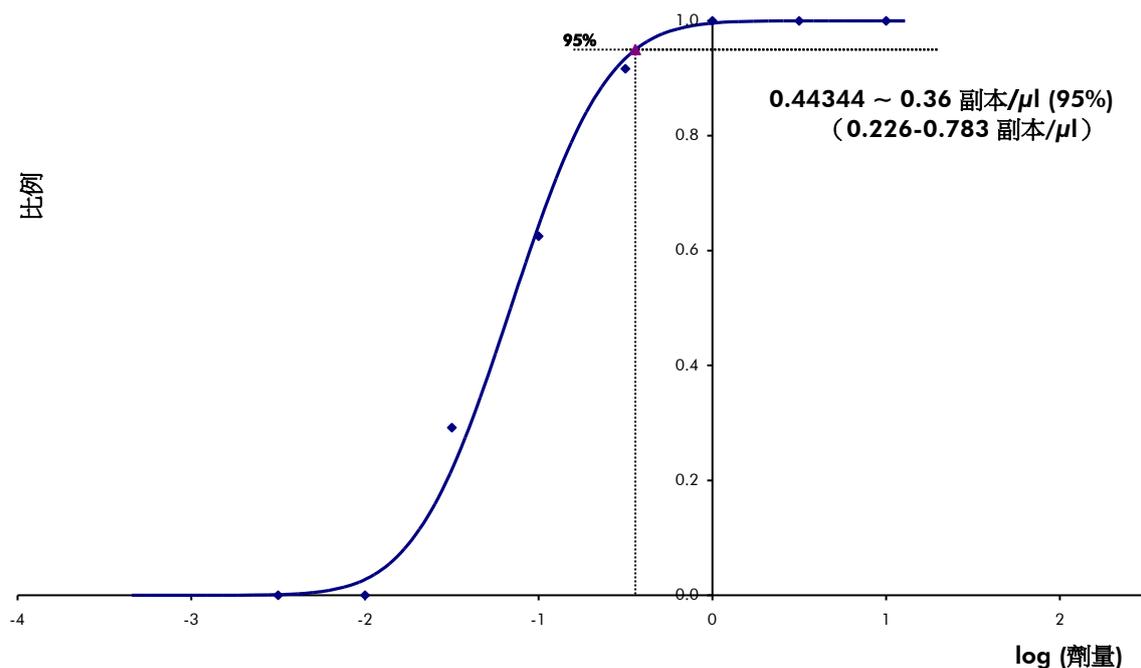


圖 10：概率單位分析：CMV (Rotor-Gene 6000)。 *artus* CMV RG PCR Kit 在 Rotor-Gene 6000 上的分析靈敏度。

考量 *artus* CMV RG PCR Kit 的純化過程 (QIAamp DSP Virus Kit)，在 Rotor-Gene 儀器上的分析靈敏度，使用添加由 1000 至標稱 0.316 CMV 副本/ml 序列稀釋之 CMV 病毒材料的臨床血漿檢體，使用 QIAamp DSP Virus Kit 萃取 DNA (萃取體積：0.5 ml；溶析體積：60 μ l)。在 3 個不同日期，對 8 個重複樣本以 *artus* CMV RG PCR Kit 分析所有 8 種稀釋濃度，透過概率單位分析確定結果。圖 11 圖示概率單位分析。考量 *artus* CMV RG PCR Kit 的純化過程，

在 Rotor-Gene 3000 上的分析檢測限值為 57.1 副本/ml ($p = 0.05$)。這個結果表示檢測到 57.1 副本/ml 的概率為 95%。

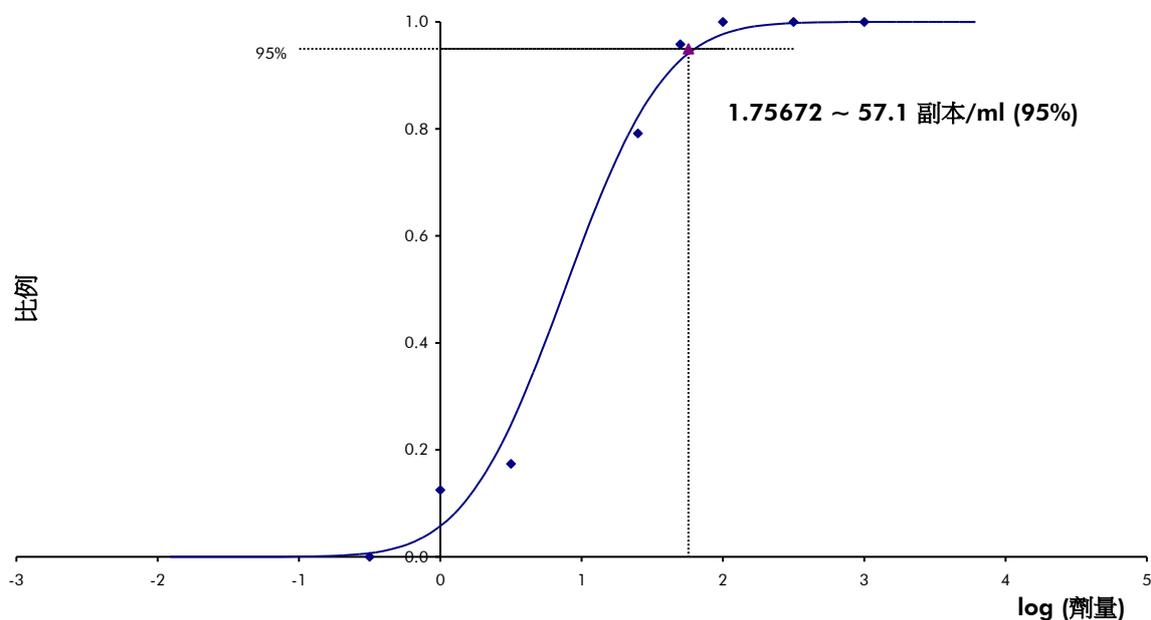


圖 11：概率單位分析：CMV (Rotor-Gene 3000)。考量 *artus* CMV RG PCR Kit 的純化過程 (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) 在 Rotor-Gene 3000 上的分析靈敏度。

使用 EZ1 DSP Virus Kit (萃取體積：0.4 ml；溶析體積：60 μ l) 的 EZ1 Advanced XL 儀器進行純化，考量 *artus* CMV RG PCR Kit 的純化過程，在 Rotor-Gene 6000 上的分析靈敏度為 68.75 副本/ml ($p = 0.05$)。這個結果表示檢測到 68.75 副本/ml 概率為 95%。

特定

artus CMV RG PCR Kit 的特異性主要透過選擇引子和探針，以及選擇嚴格的反應條件來確保。透過序列比較分析，檢查引子和探針是否存在與基因庫中所有已公佈序列同源的可能性，因此可以確保所有相關病毒株的可檢測性。

此外，還透過 100 種不同的 CMV 陰性血漿樣本驗證特異性。這些樣本未與 CMV RG Master 內的 CMV 特定引子和探針產生任何訊號。

使用表 5 (第 25 頁) 所列對照組測試 *artus* CMV RG PCR Kit 的潛在交叉反應性。受測所有病原體均未產生反應。混合感染未出現交叉反應。

表 5：檢測試劑組對潛在交叉反應病原體的特異性

對照組	CMV (Cycling Green 或 Cycling A.FAM)	內部對照劑 (Cycling Yellow 或 Cycling A.JOE)
人類皰疹病毒 1 (單純性皰疹病毒 1)	-	+
人類皰疹病毒 2 (單純性皰疹病毒 2)	-	+
人類皰疹病毒 3 (水痘-帶狀皰疹病毒)	-	+
人類皰疹病毒 4 (艾巴病毒)	-	+
人類皰疹病毒 6A	-	+
人類皰疹病毒 6B	-	+
人類皰疹病毒 7	-	+
人類皰疹病毒 8 (卡波西氏肉瘤相關皰疹病毒)	-	+
A 型肝炎病毒	-	+
B 型肝炎病毒	-	+
C 型肝炎病毒	-	+
人類免疫不全病毒 1	-	+
人類 T 細胞白血病毒 1	-	+
人類 T 細胞白血病毒 2	-	+
西尼羅病毒	-	+
腸病毒	-	+
微小病毒 B19 型	-	+

精確度

使用 Rotor-Gene 儀器取得 *artus* CMV RG PCR Kit 的精確度資料，並確認檢測的總變異。總變異包括檢測內變異（單次實驗中，相同濃度樣本多個結果間的變異）、檢測間變異（單一實驗室中，不同操作員操作同類型的不同儀器，取得多個檢測結果間的變異），以及批次間變異（使用不同批次取得多個結果檢測間的變異）。使用所得的資料確認特定病原體和內部對照劑 PCR 的標準差、變異和變異係數。

經由檢測最低濃度的定量標準品（QS 4；10 副本/ μ l），收集 *artus* CMV RG PCR 的精確度資料。對 8 個重複樣品進行測試。依據擴增曲線（ C_T ：閾值循環，參閱第 27 頁表 6）的 C_T 值，計算出精確度資料。此外，使用對應的 C_T 值確認定量結果的精確度資料(單位：副本/ μ l)（參閱第 27 頁表 7）。依據這些結果，任何具有上述濃度樣本的內部對照劑檢測，其整體統計分布為 1.21% (C_T) 或 14.38% (濃度) 和 1.93% (C_T)，這些數值是由已測得變異的所有單一數值加總取得。

穩健性

穩健性驗證可確認 *artus* CMV RG PCR Kit 的總失敗率。在 100 份 CMV 陰性血漿樣本中加入 CMV DNA，DNA 最終濃度為 170 副本/ml（約分析靈敏度限值的 3 倍濃度）。使用 QIAamp DSP Virus Kit 萃取後，以 *artus* CMV RG PCR Kit 分析這些樣本。所有 CMV 樣本的失敗率為 0%。此外，經由萃取並分析 100 份 CMV 陰性血漿樣本，評估內部對照劑的穩健性。因此，*artus* CMV RG PCR Kit 的穩健性是 $\geq 99\%$ 。

再現性

再現性資料可定期評估 *artus* CMV RG PCR Kit 效能，以及與其他產品進行效率比較。這些資料是透過參加既有的技術能力計畫取得。

表 6：基於 C_T 值的精確度資料

	標準差	變異	變異係數 (%)
檢測內變異： CMV QS 4	0.17	0.03	0.57
檢測內變異： 內部對照劑	0.31	0.10	1.16
檢測間變異： CMV QS 4	0.38	0.14	1.27
檢測間變異： 內部對照劑	0.47	0.22	1.77
批次間變異： CMV QS 4	0.33	0.11	1.10
批次間變異： 內部對照劑	0.53	0.28	2.02
總變異： CMV QS 4	0.36	0.13	1.21
總變異： 內部對照劑	0.51	0.26	1.93

表 7：基於定量結果的精確度資料 (單位：副本/ μ l)

	標準差	變異	變異係數 (%)
檢測內變異： CMV QS 4	1.34	1.80	13.30
檢測間變異： CMV QS 4	1.54	2.38	15.25
批次間變異： CMV QS 4	1.46	2.12	14.41
總變異： CMV QS 4	1.45	2.11	14.38

診斷評估

有一項試驗曾評估 *artus* CMV RG PCR Kit。收集 156 份臨床 EDTA 血漿檢體進行回溯性及前瞻性分析，比較 *artus* CMV RG PCR Kit 與 COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test。所有檢體先前已使用 COBAS AMPLICOR CMV MONITOR 作為常規診斷工具，分析其為陰性或陽性。

使用 QIAamp DSP Virus Kit 分離 *artus* CMV RG PCR Kit 檢測所需的 CMV DNA，並在分離時加入 *artus* CMV RG PCR Kit 的內部對照劑，並以 Rotor-Gene 3000 進行分析。依據仿單內的製造商說明，處理並分析 COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test 的檢體。

COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test 檢測結果為陽性的 11 件樣本，在 *artus* CMV RG PCR Kit 檢測中也呈陽性。COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test 檢測結果為陰性的 145 件樣本中，有 123 件經 *artus* CMV RG PCR Kit 檢測也呈陰性，其中 22 件檢測結果不一致 (表 8)。

表 8：比較驗證研究結果

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

如果將 COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test 的結果作為基準，*artus* CMV RG PCR Kit 的所有樣本診斷靈敏度為 100%，診斷特異性為 84.8%。

22 件檢測結果不一致的樣本，經進一步檢測證實了 *artus* PCR Kits 的結果。因此，可推測結果不一致的原因是 *artus* CMV RG PCR Kit 的靈敏度較高。

參考資料

QIAGEN 擁有一個大型、最新的網上資料庫，內容為與 QIAGEN 產品相關的科技出版物。全面查詢搜尋幫您找到所需文件，您既可以輸入關鍵字，也可輸入應用、研究領域、標題等進行查找。

如果您想獲得完整的參考清單，請瀏覽 QIAGEN 網上資料庫 www.qiagen.com/RefDB/search.asp 或與 QIAGEN 技術服務部或當地經銷商聯絡。

符號

	含有足夠進行 <N> 次測試的試劑
	使用期限
	體外診斷醫療器材
	目錄編號
	批號
	材料編號
	組分
	內含物
	數量
	全球交易品項識別代碼
	溫度限制
	製造商
	參考使用說明

聯絡資訊

關於技術支援和更多資訊，請參見 www.qiagen.com/Support 網頁上的技術支援中心，或致電 QIAGEN 技術服務部門或當地經銷商（請參見本手冊背面或瀏覽 www.qiagen.com）。

訂購資訊

產品	目錄	目錄編號
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	24 次反應：主要混合物、鎂溶液、4 份定量標準品、內部對照劑、水 (PCR 等級)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	96 次反應：主要混合物、鎂溶液、4 份定量標準品、內部對照劑、水 (PCR 等級)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit — 用於自動化同時純化 1 - 14 個血清、血漿或腦脊髓液樣本中的病毒 DNA 和 RNA		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	48 次病毒核酸製備：預充式試劑盒、一次性吸頭支架、一次性過濾吸頭、樣本試管、洗脫試管、緩衝液、載體 RNA	62724
QIAamp DSP Virus Kit — 用於純化人類血漿中的病毒核酸，供體外診斷使用		
QIAamp DSP Virus Kit	50 次製備：QIAamp MinElute® 離心管柱、緩衝液、試劑、試管、離心管柱延長器及 VacConnectors	60704
EASY<i>artus</i> CMV RG PCR Kits — 使用 EZ1 DSP Virus Kit 進行全自動病毒核酸純化，搭配 <i>artus</i> CMV RG PCR Kits 檢測病原體		
EASY <i>artus</i> CMV RG PCR Kit 1	1 個 EZ1 DSP Virus Kit、1 個 <i>artus</i> CMV RG PCR Kit	EA10323
EASY <i>artus</i> CMV RG PCR Kit 2	1 個 EZ1 DSP Virus Kit、2 個 <i>artus</i> CMV RG PCR Kit	EA10324
Rotor-Gene Q MDx 和配件		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR 循環儀，帶 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），膝上型電腦，軟體，配件：含 1 年期部件保固和人力服務，不含安裝和訓練	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR 循環儀，帶 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），膝上型電腦，軟體，配件：含 1 年期部件保固和人力服務、安裝以及訓練	9002023

產品	目錄	目錄編號
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色和深紅色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：包含為期 1 年的零件維修保固和人力服務，不包括安裝和訓練	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色和深紅色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：含為期 1 年的零件維修保固以及人工、安裝和訓練	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR 儀器，帶 6 個通道（藍色、綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），包括膝上型電腦、軟體、配件：含 1 年期部件保固和人力服務，不含安裝和訓練	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR 儀器，帶 6 個通道（藍色、綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），包括膝上型電腦、軟體、配件：含 1 年期部件保固和人力服務、安裝以及訓練	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR 循環儀，帶 2 個通道（綠色、黃色），膝上型電腦，軟體，配件：含 1 年期部件保固和人力服務，不含安裝和訓練	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR 循環儀，帶 2 個通道（綠色、黃色），膝上型電腦，軟體，配件：含 1 年期部件保固和人力服務、安裝以及訓練	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 2 個通道（綠色、黃色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：包含為期 1 年的零件維修保固和人力服務，不包括安裝和訓練	9002012

產品	目錄	目錄編號
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 2 個通道（綠色、黃色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：含為期 1 年的零件維修保固以及人工、安裝和訓練	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	帶有 72 x 0.1 ml 試管的鋁製區塊，使用單通道移液管進行人工反應設定	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	用於在標準 8 x 12 陣列（使用 96 個 0.2 ml 試管）中進行手動反應設定的鋁制塊	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 個 4 連排管，以及用於 1000 次反應的蓋	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 個 4 連排管，以及用於 10,000 次反應的蓋	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 個用於 1000 次反應的薄壁試管	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 個用於 10,000 次反應的薄壁試管	981008

如需了解最新的許可資訊和產品特定的免責聲明，請參閱各 QIAGEN 試劑組手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組手冊和使用者手冊可從 www.qiagen.com 上下載，或者從 QIAGEN 公司技術服務或您當地經銷商處取得。

本頁為刻意留白

本產品允許購買者將其用於執行人類體外診斷的診斷服務。除此特定的購買使用權之外，未授予任何非具體的專利或其他許可。

商標：QIAGEN®、QIAamp®、artus®、EASYartus®、EZ1®、MinElute®、Rotor-Gene® (QIAGEN Group)；AMPLICOR®、COBAS®、MONITOR® (Roche Group)；FAM™、JOE™ (Life Technologies)；SYBR® (Molecular Probes, Inc.)。

有限授權合約

使用本產品表示 *artus CMV RG PCR Kit* 的購買者或使用者同意以下條款：

1. *artus CMV RG PCR Kit* 只能按照 *artus CMV RG PCR Kit 使用手冊*與試劑組內包含的成分搭配使用。不得將本試劑組隨附的成分與任何未包含在本試劑組中的成分搭配或整合使用，QIAGEN 未在其智慧財產權下授予任何此等許可，除非在 *artus CMV RG PCR Kit 使用手冊*或 www.qiagen.com 上提供的其他操作程序中另有說明。
2. 除了特別聲明的許可外，QIAGEN 不保證本試劑組和/或其使用不會侵犯第三方的權利。
3. 本試劑組及其成分僅供一次使用，不得重複使用、翻新或再銷售。
4. 除了特別聲明的授權外，QIAGEN 明確否認全部明示或暗示的任何其他授權。
5. 本試劑組的購買者和使用者同意不會採取或允許他人採取可導致或促成以上所禁止行為的任何措施。QIAGEN 可在任何法院申請強制執行此有限授權協定的禁止事項，並應取得在強制執行此有限授權協定，或本試劑組和/或其成分相關的任何智慧財產權的任何行動過程中，所產生的所有調查和訴訟費用，包括律師費。

有關最新的許可條款，請瀏覽 www.qiagen.com。

© 2009 – 2014 QIAGEN, 保留所有權利。

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

