

# Hướng dẫn sử dụng

## AltoStar<sup>®</sup> CMV PCR Kit 1.5

08/2021 VI



# AltoStar<sup>®</sup>

## CMV PCR Kit 1.5

Để sử dụng với

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



AS0021543



96



08 2021



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Mục lục

<b>1.</b>	<b>Về các hướng dẫn sử dụng này .....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>Mục đích sử dụng .....</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>Các thành phần của bộ kit .....</b>	<b>11</b>
<b>4.</b>	<b>Bảo quản và xử lý .....</b>	<b>12</b>
4.1	Bảo quản .....	12
4.2	Xử lý .....	13
4.2.1	Master A và Master B .....	13
4.2.2	Mẫu chuẩn định lượng (QS) và mẫu chứng âm (NTC).....	14
<b>5.</b>	<b>Mô tả sản phẩm .....</b>	<b>14</b>
5.1	Kiến thức khái quát.....	15
5.2	Mô tả thành phần.....	15
5.2.1	Master A và Master B .....	15
5.2.2	Mẫu chuẩn định lượng (QS).....	15
5.2.3	Mẫu chứng âm (NTC).....	16
5.3	Quy trình làm việc.....	16
5.3.1	Quy trình AltoStar® .....	16
5.3.2	Quy trình khác .....	17
5.3.2.1	Tách chiết nucleic acid .....	17
5.3.2.2	Hệ thống realtime PCR .....	18
5.4	Mẫu.....	18
5.4.1	Các loại mẫu.....	18
5.4.2	Thu nhận và xử lý mẫu.....	19
<b>6.</b>	<b>Cảnh báo, thận trọng và hạn chế .....</b>	<b>20</b>
<b>7.</b>	<b>Sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với quy trình AltoStar® .....</b>	<b>22</b>
7.1	Thẻ tích mẫu.....	22

7.2	Ổng mẫu.....	22
7.3	Mã vạch mẫu.....	22
7.4	Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp cho quy trình AltoStar®.....	23
7.5	Tổng quan tài liệu và thiết bị.....	24
7.6	Quy trình.....	25
7.6.1	Tổng quan quy trình làm việc của AltoStar®.....	25
7.6.2	Tạo chương trình cho một mẻ chạy trên AltoStar®.....	31
7.6.3	Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR.....	31
7.6.3.1	Chuẩn bị hóa chất cho một lần đặt phản ứng PCR.....	32
7.6.3.2	Nạp hệ thống AltoStar® AM16 cho một lần đặt phản ứng PCR.....	33
7.6.3.3	Trong quá trình đặt phản ứng PCR.....	36
7.6.4	Kết thúc quá trình đặt phản ứng PCR.....	36
7.6.4.1	Kết quả đặt phản ứng PCR.....	38
7.6.5	Niêm phong đĩa PCR.....	39
7.6.5.1	Độ ổn định hỗn hợp PCR.....	41
7.6.6	Bắt đầu lần chạy PCR.....	41
7.6.6.1	Trong khi chạy PCR.....	42
7.6.6.2	Chỉ định xét nghiệm cho các nhóm giếng.....	42
7.6.7	Phân tích dữ liệu PCR.....	45
7.6.7.1	Chuẩn hóa đường nền.....	46
7.6.7.2	Loại trừ các tín hiệu PCR bất thường.....	48
7.6.7.3	Thiết lập ngưỡng.....	52
7.6.8	Tính hợp lệ của kết quả PCR.....	56
7.6.8.1	Loại trừ các giếng có chứa dữ liệu không hợp lệ.....	56
7.6.8.2	Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định tính).....	59
7.6.8.3	Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định lượng).....	60
7.6.8.4	Tính hợp lệ kết quả của một mẫu.....	61

7.6.9	Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả tự động .....	62
7.6.10	Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả thủ công .....	62
7.6.10.1	Diễn giải kết quả thủ công .....	64
<b>8.</b>	<b>Sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các hệ thống realtime PCR khác ngoài hệ thống CFX96™ Deep Well Dx .....</b>	<b>66</b>
8.1	Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp .....	66
8.2	Quy trình .....	67
8.2.1	Chuẩn bị mẫu .....	67
8.2.2	Pha hóa chất phản ứng (Master Mix) .....	68
8.2.3	Đặt phản ứng .....	68
8.2.4	Lần chạy PCR .....	70
8.2.4.1	Lập trình hệ thống realtime PCR .....	70
8.2.4.2	Thiết lập lần chạy .....	70
8.2.5	Phân tích dữ liệu .....	71
<b>9.</b>	<b>Dữ liệu về hiệu suất .....</b>	<b>72</b>
9.1	Huyết tương .....	72
9.1.1	Độ nhạy phân tích .....	72
9.1.2	Độ đặc hiệu phân tích .....	74
9.1.2.1	Mẫu âm tính .....	74
9.1.2.2	Chất gây nhiễu .....	74
9.1.2.3	Phản ứng chéo .....	75
9.1.3	Phạm vi tuyến tính .....	76
9.1.4	Độ đúng (Precision) .....	77
9.1.5	Tổng tỷ lệ thất bại .....	79
9.1.6	Tồn đọng (Carry over) .....	79
9.1.7	Hiệu quả lâm sàng .....	79
9.2	Máu toàn phần .....	82
9.2.1	Độ nhạy phân tích .....	82

9.2.2	Độ đặc hiệu phân tích.....	83
9.2.2.1	Mẫu âm tính .....	84
9.2.2.2	Chất gây nhiễu .....	84
9.2.2.3	Phản ứng chéo.....	85
9.2.3	Phạm vi tuyến tính.....	85
9.2.4	Độ đúng (Precision).....	86
9.2.5	Tổng tỷ lệ thất bại.....	88
9.2.6	Tồn đọng (Carry over).....	88
9.2.7	Hiệu quả lâm sàng.....	88
9.3	Nước tiểu.....	90
9.3.1	Độ nhạy phân tích .....	90
9.3.2	Độ đặc hiệu phân tích.....	92
9.3.2.1	Mẫu âm tính .....	92
9.3.2.2	Chất gây nhiễu .....	92
9.3.2.3	Phản ứng chéo.....	93
9.3.3	Phạm vi tuyến tính.....	94
9.3.4	Độ đúng (Precision).....	95
9.3.5	Tổng tỷ lệ thất bại.....	97
9.3.6	Tồn đọng (Carry over).....	97
9.3.7	Hiệu quả lâm sàng.....	97
<b>10.</b>	<b>Thải bỏ .....</b>	<b>100</b>
<b>11.</b>	<b>Kiểm soát chất lượng.....</b>	<b>100</b>
<b>12.</b>	<b>Hỗ trợ kỹ thuật .....</b>	<b>101</b>
<b>13.</b>	<b>Tổng quan tài liệu .....</b>	<b>101</b>
<b>14.</b>	<b>Nhãn hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm.....</b>	<b>102</b>
<b>15.</b>	<b>Biểu tượng.....</b>	<b>103</b>

<b>16.</b>	<b>Giao thức xét nghiệm cho phần mềm AltoStar® Connect và thông tin để tích hợp LIMS.....</b>	<b>105</b>
<b>17.</b>	<b>Lịch sử chỉnh sửa .....</b>	<b>107</b>



## 1. Về các hướng dẫn sử dụng này

Các hướng dẫn sử dụng này hướng dẫn người dùng trong việc sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Các chương 1–6 và 9–14 chứa thông tin và hướng dẫn chung áp dụng cho từng quy trình làm việc được sử dụng với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Chương 7 hướng dẫn cách sử dụng sản phẩm với hệ thống tách chiết acid nucleic và chuẩn bị PCR tự động AltoStar® AM16 (Hamilton; sau đây gọi tắt là AltoStar® AM16) với phần mềm AltoStar® Connect (Phiên bản 1.7.4 trở lên, Hamilton) để đặt phản ứng PCR tự động và với hệ thống CFX96™ Deep Well Dx\* (Bio-Rad, sau đây gọi tắt là CFX96™ DW Dx) với phần mềm CFX Manager™ Dx (Phiên bản 3.1, Bio-Rad) cho realtime PCR. Chương 8 hướng dẫn cách sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 kết hợp với các phương pháp tách chiết axit nucleic khác và các hệ thống realtime PCR. Để biết thông tin chi tiết về cách sử dụng AltoStar® AM16, phần mềm AltoStar® Connect, AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 và CFX96™ DW Dx, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng tương ứng được liệt kê bên dưới:

- IVD hướng dẫn vận hành hệ thống AltoStar® AM16 (Hamilton)
- IVD hướng dẫn vận hành AltoStar® Connect Software (Hamilton)
- Hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5
- Hướng dẫn sử dụng AltoStar® Internal Control 1.5
- Cẩm nang vận hành hệ thống CFX96™ Dx và CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad)

\* “Hệ thống CFX96™ Deep Well Dx” là tên thương hiệu mới cho phiên bản IVD của CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Trong hướng dẫn này, các cụm từ **THẬN TRỌNG** và **LƯU Ý** có nghĩa như sau:

### THẬN TRỌNG



Nếu rõ các hướng dẫn hoặc quy trình vận hành, nếu không được tuân thủ một cách chính xác, có thể dẫn đến các vấn đề thương tích về người hoặc ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm. Liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ.

## LƯU Ý



Thông tin cung cấp cho người dùng là hữu ích nhưng không cần thiết cho nhiệm vụ hiện tại.

Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi sử dụng sản phẩm.

## 2. Mục đích sử dụng

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* (trong ống nghiệm), dựa trên công nghệ realtime PCR để phát hiện và định lượng DNA đặc hiệu cho cytomegalovirus (CMV) trong huyết tương người, máu toàn phần và nước tiểu. Xét nghiệm này dùng để hỗ trợ chẩn đoán tình trạng viêm nhiễm CMV và giám sát tải lượng CMV ở các cá nhân bị nhiễm trùng CMV.

Kết quả từ AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 phải được giải thích cùng với kết quả lâm sàng và các xét nghiệm khác.

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được thiết kế dành cho các chuyên viên đã qua đào tạo về kỹ thuật sinh học phân tử và quy trình chẩn đoán *in vitro*.

### 3. Các thành phần của bộ kit

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 bao gồm các thành phần sau:

**Bảng 1:** Thành phần bộ kit

Màu nắp	Thành phần	Số ống	Thể tích trên danh nghĩa [ $\mu$ l/ống]
Xanh lam	Master A <sup>1)</sup>	8	60 <sup>2)</sup>
Tím	Master B <sup>1)</sup>	8	180 <sup>3)</sup>
Đỏ	QS1 <sup>4)</sup>	2	250
Đỏ	QS2 <sup>4)</sup>	2	250
Đỏ	QS3 <sup>4)</sup>	2	250
Đỏ	QS4 <sup>4)</sup>	2	250
Trắng	NTC <sup>5)</sup>	2	250

1) Có chứa vật liệu sinh học có nguồn gốc từ động vật

2) Chứa thêm 25  $\mu$ l để trừ hao phần thể tích chết trong quá trình thao tác chất lỏng của hệ thống AltoStar® AM16

3) Chứa thêm 55  $\mu$ l để trừ hao phần thể tích chết trong quá trình thao tác chất lỏng của hệ thống AltoStar® AM16

4) Mẫu chuẩn định lượng (QS)

5) Mẫu chứng âm (NTC)

#### THẬN TRỌNG



Trước khi sử dụng lần đầu tiên, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần của sản phẩm về số lượng, loại và dung tích bên trong. Không sử dụng sản phẩm bị lỗi hoặc không đầy đủ, hiệu suất của sản phẩm có thể bị ảnh hưởng.

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 chứa đủ hóa chất để thực hiện 96 phản ứng trong tối đa 8 lần chạy.

Sản phẩm được vận chuyển với đá khô. Khi nhận và trước khi sử dụng lần đầu, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần nhằm đảm bảo:

- Sự nguyên vẹn
- Đủ số lượng, loại và dung tích
- Ghi nhãn chính xác
- Ngày hết hạn
- Tình trạng đông lạnh
- Độ trong suốt và không lẫn các hạt

Nếu có từ một thành phần sản phẩm trở lên không đông lạnh tại thời điểm nhận hoặc các ống bị hỏng trong quá trình vận chuyển hoặc bị thiếu, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

## 4. Bảo quản và xử lý

Tất cả các hóa chất trong AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đều là dung dịch sẵn sàng sử dụng.

### 4.1 Bảo quản

Tất cả các thành phần của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 phải được bảo quản ở nhiệt độ từ -25 °C đến -15 °C tại thời điểm giao đến.

#### THẬN TRỌNG



Điều kiện bảo quản không phù hợp có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

#### THẬN TRỌNG



Không sử dụng sản phẩm hết hạn sử dụng. Việc sử dụng các sản phẩm hết hạn có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 4.2 Xử lý

### THẬN TRỌNG



Không vượt quá số lần đông - rã đông và thời gian xử lý được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

### THẬN TRỌNG



Việc xử lý các thành phần của sản phẩm và mẫu không đúng cách có thể gây nhiễm và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm:

- Không hoán đổi nắp lọ hoặc nắp chai.
- Bảo quản vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng là dương tính tách biệt với các thành phần bộ kit.
- Sử dụng các khu vực làm việc riêng biệt cho chuẩn bị mẫu/đặt phản ứng và cho khuếch đại/phát hiện.
- Luôn bỏ găng tay sau khi xử lý vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng là vật liệu dương tính.
- Không mở các đĩa PCR và/hoặc các ống sau khi khuếch đại.

### THẬN TRỌNG



Không gộp thành phần của các lô kit khác nhau. Việc sử dụng nhiều lô kit khác nhau có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

### 4.2.1 Master A và Master B

Sau khi rã đông, các hóa chất phản ứng Master A và Master B sẽ ổn định trong vòng 5 giờ ở nhiệt độ tối đa là +30 °C.

### LƯU Ý



Trường hợp Master A và Master B được rã đông nhưng chưa dùng đến, có thể tái cấp đông và sẽ rã đông lần nữa trong lần chạy sau. Khi đã mở ra, cần bỏ nắp và thay bằng nắp mới để tránh nhiễm bẩn hoá chất.

## 4.2.2 Mẫu chuẩn định lượng (QS) và mẫu chứng âm (NTC)

1. Sau khi rã đông, mẫu chuẩn định lượng (QS) và mẫu chứng âm (NTC) sẽ ổn định trong vòng 5 giờ ở nhiệt độ tối đa là +30 °C.
2. Bỏ nắp các ống QS và NTC sau mỗi lần sử dụng rồi thay bằng nắp mới để tránh nhiễm hóa chất.
3. Sau khi sử dụng, đậy ống QS và NTC bằng nắp mới và cấp đông ngay.
4. Không vượt quá số lần đông - rã đông đối với mỗi ống QS và NTC: *Rã đông 1* → *Cấp đông 1* → *Rã đông 2* → *Cấp đông 2* → *Rã đông 3* → *Cấp đông 3* → *Rã đông 4*

## 5. Mô tả sản phẩm

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* (trong ống nghiệm) để phát hiện và định lượng DNA đặc hiệu với CMV trong huyết tương người, máu toàn phần và nước tiểu.

Quá trình này dựa trên công nghệ realtime PCR, sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các trình tự mục tiêu đặc hiệu cho CMV và các đầu dò (probe) đặc hiệu đã được đánh dấu huỳnh quang để phát hiện DNA mục tiêu đã được khuếch đại.

Bên cạnh việc khuếch đại và phát hiện DNA của CMV, xét nghiệm bao gồm cả các oligonucleotide để khuếch đại và phát hiện chứng nội/chất nội chuẩn (sau đây viết tắt là IC; AltoStar® Internal Control 1.5).

Các đầu dò đặc hiệu cho DNA của CMV được đánh dấu huỳnh quang FAM™. Các đầu dò đặc hiệu cho IC được đánh dấu huỳnh quang (JOE™) để có thể phát hiện bằng kênh VIC™.

Việc sử dụng các đầu dò mang thuốc nhuộm riêng biệt giúp phát hiện song song DNA đặc hiệu cho CMV và IC thông qua các kênh phát hiện tương ứng của hệ thống realtime PCR được sử dụng.

## 5.1 Kiến thức khái quát

Cytomegalovirus ở người (CMV, human herpesvirus 5) là một thành viên thuộc họ *Herpesviridae* và thuộc phân họ *Betaherpesvirinae*. Nó bao gồm một capsid có cấu trúc 20 mặt với bộ gen DNA mạch đôi dạng mạch thẳng khoảng 230 kbp, một lớp vỏ bao quanh và một lớp màng bọc bên ngoài. CMV phân bố trên toàn thế giới và lây nhiễm cho người ở mọi lứa tuổi, không có kiểu lây truyền theo mùa hoặc theo dịch bệnh. Tỷ lệ nhiễm CMV huyết thanh tăng theo độ tuổi ở tất cả các quần thể và nằm trong khoảng từ 40 đến 100 %. Tương tự như nhiễm các loại herpesvirus khác, nhiễm CMV nguyên phát dẫn đến tình trạng nhiễm trùng dai dẳng hoặc tiềm ẩn. Tình trạng tái kích hoạt virus có thể xảy ra khi đáp ứng với các kích thích khác nhau, đặc biệt là ức chế miễn dịch. Phần lớn các trường hợp nhiễm CMV đều không có triệu chứng hoặc ở mức cận lâm sàng nhưng trường hợp nhiễm trùng bẩm sinh và nhiễm trùng ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch có thể có triệu chứng và nghiêm trọng. Ở những vật chủ bị suy giảm khả năng miễn dịch, chẳng hạn như người được ghép tạng, bệnh nhân nhiễm HIV hoặc ung thư, nhiễm hoặc tái kích hoạt CMV có thể dẫn đến bệnh lan tỏa, đe dọa đến tính mạng [1,2,3].

## 5.2 Mô tả thành phần

### 5.2.1 Master A và Master B

Master A và Master B chứa tất cả các thành phần (đệm PCR, DNA polymerase, muối magiê, đoạn mồi và đầu dò) để cho phép khuếch đại qua trung gian PCR và phát hiện mục tiêu DNA đặc hiệu cho CMV và IC trong một lần đặt phản ứng.

### 5.2.2 Mẫu chuẩn định lượng (QS)

Mẫu chuẩn định lượng (QS) có chứa nồng độ đã chuẩn hóa của DNA đặc hiệu cho CMV (xem bảng 2). Các QS này được hiệu chuẩn theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO phiên bản 1 về các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đối với Cytomegalovirus ở người (Mã NIBSC: 09/162) [4]. Các QS này được sử dụng để xác minh chức năng của hệ thống khuếch đại và phát hiện đặc hiệu DNA đặc hiệu cho CMV cũng như để dựng đường chuẩn, cho phép định lượng DNA đặc hiệu cho CMV trong mẫu.

**Bảng 2:** Mẫu chuẩn định lượng (QS)

Mẫu chuẩn định lượng (QS)	Nồng độ [IU/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

### 5.2.3 Mẫu chứng âm (NTC)

Mẫu chứng âm (NTC) không chứa DNA đặc hiệu cho CMV, nhưng có chứa khuôn cho IC. NTC được sử dụng làm DNA chứng âm cho CMV trong realtime PCR và chỉ thị cho khả năng bị nhiễm của Master A và Master B.

## 5.3 Quy trình làm việc

### 5.3.1 Quy trình AltoStar®

Quy trình AltoStar® bao gồm các sản phẩm IVD sau:

- Hệ thống tách chiết acid nucleic và chuẩn bị PCR tự động AltoStar® AM16 (Hamilton)
- Phần mềm AltoStar® Connect phiên bản 1.7.4 trở lên (Hamilton)
- Hệ thống CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad) kèm phần mềm CFX Manager™ Dx phiên bản 3.1 (Bio-Rad)

Quy trình làm việc này bao gồm các bước tuần tự sau:

1. Lên chương trình cho một mẻ chạy AltoStar®.
2. Chạy tinh sạch trên AltoStar® AM16 sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5 và AltoStar® Internal Control 1.5.
3. Đặt phản ứng PCR trên AltoStar® AM16 sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.
4. Chạy realtime PCR trên hệ thống CFX96™ DW Dx.



Để biết thêm thông tin chi tiết về các bước 3 và 4 của quy trình làm việc, vui lòng tham khảo chương 7. Sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với quy trình AltoStar®. Hệ thống AltoStar® AM16 có thể xử lý đồng thời tất cả các loại mẫu và thể tích mẫu được chỉ định sử dụng với AltoStar® Purification Kit 1.5. Có thể phân tích song song nhiều xét nghiệm realtime PCR trên mỗi mẫu, miễn là có sẵn đủ lượng sản phẩm rửa giải.

#### LƯU Ý



Các xét nghiệm với các cấu hình nhiệt độ PCR khác nhau được tự động sắp xếp vào các đĩa PCR riêng biệt.

### 5.3.2 Quy trình khác

Có thể sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các quy trình tương thích (thủ công hoặc tự động). Hệ thống realtime PCR đã được kiểm định để sử dụng với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được liệt kê tại chương 5.3.2.2 Hệ thống realtime PCR. Việc sử dụng các quy trình tách chiết thay thế phải được người dùng kiểm định.

#### 5.3.2.1 Tách chiết nucleic acid

Có thể sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các hệ thống tách chiết nucleic acid khác, không phải AltoStar® AM16. Việc sử dụng các quy trình tách chiết nucleic acid thay thế phải được người dùng kiểm định. Tham khảo chương 8.2.1 Chuẩn bị mẫu cho các hướng dẫn liên quan đến cách sử dụng AltoStar® Internal Control 1.5 kết hợp với các phương pháp tách chiết khác thay vì AltoStar® Purification Kit 1.5.

### 5.3.2.2 Hệ thống realtime PCR

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đã được phát triển và kiểm định trên các hệ thống realtime PCR sau:

- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

Khi sử dụng các hệ thống realtime PCR kể trên (ngoại trừ hệ thống CFX96™ Deep Well Dx), việc đặt phản ứng PCR, lên chương trình cho hệ thống cũng như phân tích dữ liệu phải được thực hiện thủ công [để tìm hiểu thông tin chi tiết, xem chương 8.2.2 Pha hóa chất phản ứng (Master Mix) đến 8.2.5 Phân tích dữ liệu].

## 5.4 Mẫu

### 5.4.1 Các loại mẫu

Các loại mẫu sau được xác minh để sử dụng với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5:

- Huyết tương người trong EDTA
- Huyết tương người trong citrate
- Máu người toàn phần trong EDTA
- Máu người toàn phần trong citrate
- Nước tiểu người

#### THẬN TRỌNG



Không sử dụng các loại mẫu khác! Việc sử dụng các loại mẫu khác có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 5.4.2 Thu nhận và xử lý mẫu

Máu phải được lấy bằng các hệ thống lấy máu tiêu chuẩn có bán trên thị trường (ví dụ: Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner hoặc tương đương). Các thành phần trong ống phải được trộn trực tiếp sau khi lấy mẫu. Các mẫu máu phải được làm lạnh ở nhiệt độ từ +2 °C đến +8 °C. Quá trình vận chuyển phải được thực hiện theo các hướng dẫn của địa phương và quốc gia về việc vận chuyển vật liệu sinh học. Trước khi sử dụng, không được bảo quản máu quá 48 giờ ở nhiệt độ phòng (+20 °C đến +25 °C), 3 ngày ở +2 °C đến +8 °C hoặc 7 ngày ở -25 °C đến -15 °C.

Đối với quy trình tạo huyết tương EDTA, máu toàn phần phải được ly tâm theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống lấy máu trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy máu. Trước khi sử dụng, không được bảo quản huyết tương EDTA quá 48 giờ ở nhiệt độ phòng (+20 °C đến +25 °C), 5 ngày ở +2 °C đến +8 °C hoặc 2 tháng ở -25 °C đến -15 °C.

Mẫu nước tiểu phải được lấy vào vật chứa vô trùng. Các mẫu nước tiểu cần được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ +2 °C đến +8 °C trong vòng không quá 24 giờ.

### THẬN TRỌNG



Luôn coi mẫu là vật liệu lây nhiễm và nguy hiểm (về mặt sinh học) theo quy trình an toàn phòng thí nghiệm. Khi xảy ra sự cố tràn vật liệu mẫu, ngay lập tức sử dụng chất khử trùng thích hợp. Xử lý các vật liệu bị ô nhiễm như các vật liệu nguy hiểm sinh học.

### LƯU Ý



Việc bảo quản lạnh mẫu không ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm. Khi làm việc với các loại mẫu đông lạnh, cần đảm bảo mẫu được rã đông hoàn toàn hoặc trộn mẫu đúng cách trước khi sử dụng.

## 6. Cảnh báo, thận trọng và hạn chế

- Trước khi sử dụng lần đầu tiên, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần của sản phẩm về số lượng, loại và dung tích bên trong. Không sử dụng sản phẩm bị lỗi hoặc không đầy đủ, hiệu suất của sản phẩm có thể bị ảnh hưởng.
- Điều kiện bảo quản không phù hợp có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không sử dụng sản phẩm hết hạn sử dụng. Việc sử dụng các sản phẩm hết hạn có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không vượt quá số lần đông - rã đông và thời gian xử lý được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Việc xử lý các thành phần của sản phẩm và mẫu không đúng cách có thể gây nhiễm và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm:
  - Không hoán đổi nắp lọ hoặc nắp chai.
  - Bảo quản vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng là dương tính tách biệt với các thành phần bộ kit.
  - Sử dụng các khu vực làm việc riêng biệt cho chuẩn bị mẫu/đặt phản ứng và cho khuếch đại/phát hiện.
  - Luôn bỏ găng tay sau khi xử lý vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng là vật liệu dương tính.
  - Không mở các đĩa PCR và/hoặc các ống sau khi khuếch đại.
- Không gộp thành phần của các lô kit khác nhau. Việc sử dụng nhiều lô kit khác nhau có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không sử dụng các loại mẫu khác! Việc sử dụng các loại mẫu khác có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Luôn coi mẫu là vật liệu lây nhiễm và nguy hiểm (về mặt sinh học) theo quy trình an toàn phòng thí nghiệm. Khi xảy ra sự cố tràn vật liệu mẫu, ngay lập tức sử dụng chất khử trùng thích hợp. Xử lý các vật liệu bị ô nhiễm như các vật liệu nguy hiểm sinh học.
- Việc bảo quản sản phẩm rửa giải ở điều kiện không đúng có thể gây suy giảm trình tự mục tiêu CMV của mầm bệnh và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

- Không sử dụng giao thức (protocol) xét nghiệm khác với phiên bản được nêu trên mã vạch 2D trong các hướng dẫn sử dụng này. Việc sử dụng phiên bản giao thức xét nghiệm không chính xác có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Việc không ly tâm các thành phần của sản phẩm sau khi đã đông có thể gây nhiễm bởi hóa chất còn sót lại trong nắp và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không sử dụng lại nắp ống để tránh nhiễm bẩn hóa chất, gây ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả phải được diễn giải dựa trên tất cả các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm.
- Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.
- Đối với Master A và Master B, không sử dụng thể tích khác với thể tích quy định trong hướng dẫn này để thiết lập hóa chất phản ứng (Master Mix) vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không vượt quá thời gian bảo quản hỗn hợp PCR vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không trộn lẫn các mẫu hoặc ID mẫu trong quá trình đặt phản ứng PCR hoặc trong quá trình chuyển lên hệ thống PCR. Điều này có thể dẫn đến kết quả dương tính hoặc âm tính giả do việc gán mẫu không chính xác.
- Không sử dụng các điều kiện chu trình nhiệt khác với điều kiện được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.
- Không sử dụng các thiết lập kiểm soát khác với thiết lập được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này để phân tích dữ liệu, vì điều này có thể gây ra kết quả kiểm tra IVD không chính xác.
- Trường hợp mẫu có chứa các mầm bệnh khác ngoài CMV, có thể xảy ra cạnh tranh khuếch đại hoặc phản ứng chéo với mục tiêu, gây ra kết quả xét nghiệm IVD không chính xác.
- Việc xử lý chất thải nguy hại và chất thải sinh học phải tuân theo các quy định của địa phương và quốc gia để tránh ô nhiễm môi trường.
- Các đột biến tiềm ẩn trong vùng mục tiêu (vùng bắt mồi và đầu dò) của bộ gene CMV mà bộ kit sử dụng có thể dẫn đến việc không đủ tiêu chuẩn và/hoặc không phát hiện được sự hiện diện của mầm bệnh.

## 7. Sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với quy trình AltoStar®

Các nội dung hướng dẫn sử dụng sau đây mô tả cách sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 kết hợp với quy trình AltoStar®. Quy trình AltoStar® bao gồm nhiều sản phẩm IVD khác nhau (AltoStar® AM16, phần mềm AltoStar® Connect, AltoStar® Purification Kit 1.5, the AltoStar® Internal Control 1.5 và CFX96™ DW Dx). Cách sử dụng các sản phẩm này được mô tả chi tiết trong hướng dẫn sử dụng tương ứng.

- IVD hướng dẫn vận hành hệ thống AltoStar® AM16 (Hamilton)
- IVD hướng dẫn vận hành AltoStar® Connect Software (Hamilton)
- Hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5
- Hướng dẫn sử dụng AltoStar® Internal Control 1.5
- Cẩm nang vận hành hệ thống CFX96™ Dx và CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad)

### 7.1 Thẻ tích mẫu

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được kiểm định bằng nucleic acid tinh sạch từ 500 µl mẫu sử dụng hệ thống AltoStar® AM16. Lượng mẫu thêm vào cần được tính đến cả thể tích chết của ống mẫu sử dụng (xem chương 7.2 Ống mẫu).

### 7.2 Ống mẫu

Ống mẫu phù hợp để sử dụng với hệ thống AltoStar® AM16 được bán tại Altona Diagnostics (ống 7 ml có nắp, 82 x 13 mm, VK000010). Người dùng có thể kiểm tra các ống mẫu khác để đảm bảo khả năng ứng dụng. Để biết thông tin chi tiết, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5.

### 7.3 Mã vạch mẫu

Để thực hiện nhận dạng mẫu tự động bằng hệ thống AltoStar® AM16, tất cả các ống mẫu phải được dán nhãn bằng mã vạch phù hợp. Để biết thông tin chi tiết, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5.

## 7.4 Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp cho quy trình AltoStar®

Vật liệu và thiết bị được nêu trong bảng 3 phải được đặt hàng từ altona Diagnostics.

**Bảng 3:** Vật liệu và thiết bị cần thiết

Vật liệu	Mô tả	Mã đặt hàng
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Gói sản phẩm có chứa AltoStar® Automation System AM16, phần mềm AltoStar® Connect (Phiên bản 1.7.4 trở lên) và phần cứng công nghệ thông tin (IT)	AM16
AltoStar® Detection	Gói sản phẩm có chứa hệ thống CFX96™ Deep Well Dx cùng Phần mềm CFX Manager™ Dx (Phiên bản 3.1), một máy quét mã vạch và phần cứng công nghệ thông tin (IT)	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Hóa chất phân lập và tinh sạch nucleic acid để sử dụng với hệ thống AltoStar® Automation System AM16	PK15-16/ PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Chứng nội kiểm soát việc tách chiết nucleic acid, khuếch đại PCR và phát hiện	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	Đĩa 96-giếng (loại semi-skirted) mang mã vạch và có giếng màu trắng	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Giấy bạc niêm phong cho đĩa PCR	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Đầu tip có lọc 1.000 µl để sử dụng với AltoStar® Automation System AM16	VK000007
300 µl CO-RE Tips	Đầu tip có lọc 300 µl để sử dụng với AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Ống được đánh mã vạch để pha hoá chất PCR	VK000002
Waste Bag	Túi vô trùng có thể hấp diệt trùng để sử dụng với AltoStar® Automation System AM16	VK000009

Vật liệu	Mô tả	Mã đặt hàng
Screw Cap - red	Nắp vặn cho ống QS1–QS4 (đỏ)	VK000012
Screw Cap - blue	Nắp vặn cho ống Master A (xanh lam)	VK000013
Screw Cap - purple	Nắp vặn cho các ống Master B (tím)	VK000015
Screw Cap - white	Nắp vặn cho ống NTC (trắng)	VK000016

**Bảng 4:** Tài liệu và thiết bị phòng thí nghiệm bổ sung

Vật liệu	Mô tả	Mã đặt hàng
Máy niêm phong đĩa	VD: AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	VD: PX1 Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

## 7.5 Tổng quan tài liệu và thiết bị

- Máy vortex
- Găng tay không bột (dùng một lần)
- Máy ly tâm cho các thành phần của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- Máy ly tâm cho đĩa PCR



## 7.6 Quy trình

### 7.6.1 Tổng quan quy trình làm việc của AltoStar®

Các bước để hoàn tất quy trình AltoStar® được tóm tắt tại bảng 5. Thông tin về cách thiết lập cụ thể để sử dụng với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 có tại chương 7.6.2 Tạo chương trình cho một mẻ chạy trên AltoStar®. Để tham khảo hướng dẫn chi tiết các bước từ 1–5, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5, phần mềm AltoStar® Connect và AltoStar® AM16.

Các bước từ 6–11 được mô tả chi tiết hơn trong các chương 7.6.3 Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR đến chương 7.6.10 Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả thủ công.

**Bảng 5:** Tổng quan quy trình làm việc của AltoStar®

Bước	Hành động
1. Khởi động AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bật AltoStar® AM16.</li> <li>Bật máy tính và màn hình.</li> <li>Khởi động phần mềm AltoStar® Connect.</li> </ul>
2. Thực hiện bảo trì	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tại thanh trình đơn (menu), nhấp vào <b>Application</b> → <b>Instrument Maintenance</b> (Ứng dụng → Bảo trì thiết bị). <ul style="list-style-type: none"> <li>Nếu đến hạn bảo trì hàng tuần, nhấp vào <b>Start Weekly Maintenance</b> (Bắt đầu bảo trì hàng tuần).</li> <li>Nếu đến hạn bảo trì hàng ngày, nhấp vào <b>Start Daily Maintenance</b> (Bắt đầu bảo trì hàng ngày).</li> </ul> </li> <li>Làm theo hướng dẫn trên màn hình để tiến hành.</li> </ul>

Bước	Hành động
3. Lập trình một lần chạy AltoStar®	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tại thanh trình đơn (menu), nhấp vào <b>Program Run</b> → <b>Program Run (AltoStar® Purification)</b> [Chạy chương trình → Chạy chương trình (AltoStar® Purification)]. Cách khác là quay lại Start screen (Màn hình khởi động) và nhấp vào nút <b>Program Run</b> (Chạy chương trình).</li><li>• Nhập mẫu thủ công hoặc từ hệ thống quản lý thông tin phòng thí nghiệm (LIMS).</li><li>• Chọn xét nghiệm sau cho mẫu (nếu chưa nhập từ LIMS):<ul style="list-style-type: none"><li>◦ AltoStar® CMV PCR Kit 1.5</li></ul></li><li>• Nhấp vào nút <b>Create Run</b> (Tạo mẻ chạy) để tạo mẻ chạy trên AltoStar®.</li></ul>

Bước	Hành động
<p>4. Khởi động một lần chạy tinh sạch</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tại thanh trình đơn (menu), nhấn vào <b>Purification</b> → <b>Start Purification</b> (Tinh sạch → Bắt đầu tinh sạch). Cách khác là quay lại Start screen (Màn hình khởi động) và nhấn vào nút <b>Start Purification</b> (Bắt đầu tinh sạch).</li> <li>• Chọn lần chạy tinh sạch sắp bắt đầu để hiển thị các mẫu có trong lần chạy tinh sạch đã chọn.</li> <li>• Chuẩn bị hóa chất tinh sạch: <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Đảm bảo rằng các hóa chất tinh sạch có cùng số tải (LN) (ngoại trừ AltoStar® Internal Control 1.5) và không bị hết hạn.</li> <li>◦ Trường hợp nhìn thấy kết tủa trong Lysis Buffer (đệm ly giải), đun nóng (<math>\leq +50</math> °C) đến khi tan hoàn toàn.</li> <li>◦ Rã đông IC (AltoStar® Internal Control 1.5) và vortex trong 5 giây.</li> <li>◦ Vortex các hạt từ trong 5 giây và không để ướt nắp.</li> </ul> </li> <li>• Chuẩn bị mẫu cho lần chạy tinh sạch sắp bắt đầu theo mô tả trong hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5.</li> <li>• Nhấn vào nút <b>Start Run</b> (Bắt đầu chạy) tại thanh công cụ.</li> <li>• Làm theo hộp thoại Loading (Nạp) và nạp hệ thống cho phù hợp.</li> <li>• Xác nhận thông báo Loading complete (Nạp xong) bằng nút <b>OK</b> hoặc chờ 10 giây.</li> </ul> <p>Lúc này, hệ thống sẽ tự động thực hiện lần chạy tinh sạch.</p>

Bước	Hành động
5. Hoàn thành lần chạy tinh sạch	<ul style="list-style-type: none"><li>• Đảm bảo khay nạp trống và xác nhận hộp thoại Run finished (kết thúc lần chạy) bằng nút <b>OK</b>.</li><li>• Làm theo hướng dẫn trong hộp thoại Maintenance (bảo trì) và xác nhận bằng nút <b>OK</b>.</li><li>• Niêm phong và bảo quản các thành phần của AltoStar® Purification Kit 1.5 để có thể tái sử dụng.</li></ul> <p>Sản phẩm rửa giải (eluate) trong đĩa rửa giải chưa niêm phong sẽ hoạt động ổn định ở nhiệt độ phòng (tối đa +30 °C) trong vòng 4 giờ.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Trường hợp lần chạy đặt phản ứng PCR chưa bắt đầu ngay, cần niêm phong đĩa rửa giải bằng Eluate Plate Sealing Foil (giấy bạc niêm phong) và bảo quản ở nhiệt độ từ +2° C đến +8° C trong vòng tối đa 24 giờ.</li><li>• Xem kết quả chạy tinh sạch để xác nhận quá trình xử lý thành công từng mẫu.</li></ul>

Bước	Hành động
<b>6. Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tại thanh trình đơn, nhấp vào <b>PCR Setup</b> → <b>Start PCR Setup</b> (Đặt phản ứng PCR → Bắt đầu đặt phản ứng PCR). Cách khác là quay lại Start screen (Màn hình khởi động) và nhấp vào nút <b>Start PCR Setup</b> (Bắt đầu đặt phản ứng PCR).</li> <li>• Chọn lần đặt phản ứng PCR sắp bắt đầu để hiển thị đĩa rửa giải và các hoá chất có trong lần đặt phản ứng PCR đã chọn.</li> <li>• Chuẩn bị hóa chất phản ứng PCR: <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Đảm bảo rằng các hoá chất phản ứng và chất nội chuẩn được sử dụng đều từ cùng một lô kit và chưa bị hết hạn.</li> <li>◦ Rã đông một lượng ống hoá chất phản ứng và chất nội chuẩn cần thiết, vortex ngắn và spin-down bằng máy ly tâm.</li> </ul> </li> <li>• Nếu đĩa rửa giải đã niêm phong, ly tâm ngắn (spin-down) và cẩn thận gỡ niêm phong.</li> <li>• Nhấp vào nút <b>Start Run</b> (Bắt đầu chạy) tại thanh công cụ.</li> <li>• Làm theo hộp thoại Loading (Nạp) và nạp hệ thống cho phù hợp.</li> <li>• Xác nhận thông báo Loading complete (Nạp xong) bằng nút <b>OK</b> hoặc chờ 10 giây.</li> </ul> <p>Lúc này, hệ thống sẽ tự động đặt phản ứng PCR.</p>
<b>7. Hoàn thành việc đặt phản ứng PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Đảm bảo khay nạp trống và xác nhận hộp thoại Run finished (kết thúc lần chạy) bằng nút <b>OK</b>.</li> <li>• Làm theo hướng dẫn trong hộp thoại Maintenance (bảo trì) và xác nhận bằng nút <b>OK</b>.</li> <li>• Đậy lại và bảo quản các thành phần của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 để tái sử dụng.</li> <li>• Xem kết quả đặt phản ứng PCR để xác nhận quá trình xử lý thành công từng mẫu.</li> </ul>
<b>8. Niêm phong đĩa PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niêm phong đĩa PCR bằng PCR Plate Sealing Foil (giấy bạc niêm phong).</li> </ul>

Bước	Hành động
9. Bắt đầu lần chạy PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bật hệ thống CFX96™ DW Dx lên, cũng như máy tính và màn hình đi kèm.</li> <li>Khởi động phần mềm CFX Manager™ Dx.</li> <li>Mở hệ thống CFX96™ DW Dx.</li> <li>Ly tâm đĩa PCR và đưa vào hệ thống CFX96™ DW Dx.</li> <li>Chọn <b>File</b> → <b>Open</b> → <b>LIMS File...</b> (Tập → Mở → Tập LIMS) từ thanh trình đơn.</li> <li>Quét mã vạch của đĩa PCR bằng máy quét mã vạch cầm tay.</li> <li>Đóng hệ thống CFX96™ DW Dx.</li> <li>Nhấp vào nút <b>Start Run</b> (Bắt đầu chạy) để bắt đầu phản ứng PCR. Đặt tên và lưu tệp phản ứng PCR.</li> </ul> <p>Hệ thống CFX96™ DW Dx lúc này sẽ tự động chạy phản ứng PCR.</p>
10. Tách các xét nghiệm cho từng phân tích	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tách tất cả các xét nghiệm trong phản ứng PCR thành các nhóm giếng riêng biệt.</li> </ul>
11. Phân tích dữ liệu và diễn giải kết quả phản ứng PCR	<p>Đối với từng nhóm giếng riêng lẻ:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Thực hiện chuẩn hóa đường nền trong tất cả các giếng cho tất cả các kênh nhận diện được sử dụng.</li> <li>Loại trừ các giếng có tín hiệu PCR bất thường.</li> <li>Đặt ngưỡng cho tất cả các kênh nhận diện theo các chất nội chuẩn.</li> <li>Loại trừ các giếng chứa dữ liệu không hợp lệ.</li> <li>Tạo tệp kết quả LIMS để xuất kết quả sang LIMS.</li> <li>Tạo báo cáo kết quả để giải thích kết quả thủ công.</li> </ul>

### THẬN TRỌNG



Việc bảo quản sản phẩm rửa giải ở điều kiện không đúng có thể gây suy giảm trình tự mục tiêu CMV của mầm bệnh và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 7.6.2 Tạo chương trình cho một mẻ chạy trên AltoStar®

Để biết thông tin chi tiết về cách bắt đầu một mẻ chạy AltoStar®, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5, phần mềm AltoStar® Connect và AltoStar® AM16. Thông tin về cách thiết lập cụ thể để sử dụng với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 như bên dưới:

- Đối với ứng dụng xét nghiệm định lượng QS1–4 và NTC được chọn và đối với ứng dụng xét nghiệm định tính QS4 và NTC được chọn.
- Thể tích mẫu yêu cầu là 500 µl cộng với thể tích chết của ống mẫu tương ứng (xem chương 7.1 Thể tích mẫu và 7.2 Ống mẫu).
- Thể tích sản phẩm rửa giải cần thiết cho AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 là 10 µl.
- Lưu ý sử dụng đúng phiên bản giao thức xét nghiệm cho quá trình xét nghiệm. Để biết thông tin về phiên bản protocol hiện tại, tham khảo chương 16. Giao thức xét nghiệm cho phần mềm AltoStar® Connect và thông tin để tích hợp LIMS. Giao thức xét nghiệm tương ứng đã mã hóa bằng mã vạch 2D sẽ hiển thị ở đó. Để biết thông tin về cách nhập giao thức tinh sạch và giao thức xét nghiệm vào phần mềm AltoStar® Connect, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng tương ứng.

### THẬN TRỌNG



Không sử dụng giao thức (protocol) xét nghiệm khác với phiên bản được nêu trên mã vạch 2D trong các hướng dẫn sử dụng này. Việc sử dụng phiên bản giao thức xét nghiệm không chính xác có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 7.6.3 Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR

1. Chọn **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Đặt phản ứng PCR → Bắt đầu đặt phản ứng PCR) trên thanh trình đơn. Cách khác là quay lại Start screen (Màn hình khởi động) của phần mềm AltoStar® Connect và nhập vào nút **Start PCR Setup** (Bắt đầu đặt phản ứng PCR). Màn hình Start PCR Setup Run (Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR) hiển thị.

Các lần đặt phản ứng PCR đang chờ thực hiện được hiển thị tại bảng Programmed PCR Setup Runs (Lần đặt phản ứng PCR đã được lập trình) ở phía bên trái của màn hình.

2. Chọn lần đặt phản ứng PCR cần khởi động tại bảng Programmed PCR Setup Runs (Lần đặt phản ứng PCR đã được lập trình).
  - Các mẫu trong lần đặt phản ứng PCR được chọn được hiển thị tại bảng ở phía trên cùng bên phải của màn hình [Samples selected PCR Setup Run (Các mẫu trong lần đặt phản ứng PCR đã chọn)].
  - QS và chất kiểm chuẩn cần thiết cho lần đặt phản ứng PCR được chọn được hiển thị tại bảng ở phía giữa bên phải của màn hình [Controls in selected PCR Setup Run (Chất kiểm chuẩn trong lần đặt phản ứng PCR đã chọn)].
  - Số ống chính cần thiết cho lần đặt phản ứng PCR được chọn được hiển thị tại bảng ở phía dưới cùng bên phải của màn hình [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Ống chính cần thiết cho lần đặt phản ứng PCR đã chọn)].

#### LƯU Ý



Số lượng mẫu được ưu tiên trong một lần đặt phản ứng PCR được hiển thị tại cột **No. of prioritized Samples** (Số lượng mẫu ưu tiên). Tiến hành đặt phản ứng PCR với các mẫu được ưu tiên trước để tạo điều kiện xử lý nhanh nhất các mẫu được ưu tiên.

Trước khi nhấp vào nút **Start Run** (Bắt đầu đặt) trên thanh công cụ, chuẩn bị hoá chất cần thiết như được mô tả tại chương 7.6.3.1 Chuẩn bị hóa chất cho một lần đặt phản ứng PCR. Trường hợp đĩa rửa giải đã niêm phong để bảo quản, hãy chuẩn bị như được mô tả trong hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5.

#### 7.6.3.1 Chuẩn bị hóa chất cho một lần đặt phản ứng PCR

1. Rã đông hoàn toàn QS, các chất kiểm chuẩn và số lượng ống chứa hoá chất phản ứng cần thiết ở nhiệt độ phòng (tối đa. +30 °C).
2. Trộn các hoá chất bằng cách vortex nhẹ.
3. Ly tâm ngắn các ống để loại bỏ các giọt khỏi nắp.

#### THẬN TRỌNG



Việc không ly tâm các thành phần của sản phẩm sau khi rã đông có thể gây nhiễm bởi hóa chất còn sót lại trong nắp và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.



### 7.6.3.2 Nạp hệ thống AltoStar® AM16 cho một lần đặt phản ứng PCR

Để nắm được thông tin chi tiết về quá trình nạp, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống AltoStar® AM16 và phần mềm AltoStar® Connect.

1. Nhấp vào nút **Start Run** (Bắt đầu đặt phản ứng) trong thanh công cụ của màn hình Start PCR Setup Run (Bắt đầu đặt phản ứng PCR) để hiển thị hộp thoại Loading (Nạp).

Hộp thoại Loading (Nạp) bao gồm hình ảnh diễn giải trực quan sàn thao tác AltoStar® AM16 ở trên cùng và một bảng chỉ định khay chứa, các rãnh tương ứng đối với sàn thao tác AltoStar® AM16 cho từng khay chứa, vật liệu được nạp vào từng khay chứa và nhận xét về việc nạp khay chứa.

#### LƯU Ý

Để hình dung vị trí của một thành phần trên khay chứa và vị trí của khay chứa trên sàn AltoStar® AM16, chọn hàng tương ứng của bảng trong hộp thoại Loading (Nạp).



Vị trí của vật dụng và khay chứa tương ứng được thể hiện trực quan như sau:

- Màu đỏ là diễn giải trực quan của sàn thao tác hệ thống
- Trên AltoStar® AM16 bằng cách nhấp nháy đèn nạp phía trên rãnh, nơi cần đặt khay chứa đã chọn

2. Nạp vật liệu cần thiết, đĩa rửa giải và hoá chất đã chuẩn bị lên các khay chứa thích hợp.
  - Chỉ thay giá đựng đầu tip 1.000 µl **đã dùng hết (rỗng)** thành giá đựng đầu tip 1.000 µl **đã nạp đầy** trên khay chứa tip.
  - Chỉ thay giá đựng đầu tip 300 µl **đã dùng hết (rỗng)** thành giá đựng đầu tip 300 µl **đã nạp đầy** lên khay chứa đĩa và đầu tip.

#### LƯU Ý



Việc thay các giá đựng đầu tip khi chưa dùng hết cũng như xử lý các đầu tip riêng lẻ có thể ảnh hưởng đến việc quản lý tự động đầu tip và làm dừng máy.

- Đặt đĩa rửa giải cần sử dụng có giếng A1 vào bên trái vị trí đĩa đen.
- Đặt đĩa PCR có giếng A1 vào bên trái vị trí đĩa bạc phía trước.
- Nạp khay chứa 24-lỗ kèm một ống gộp mẫu chứa sử dụng cho mỗi xét nghiệm trong quá trình đặt phản ứng PCR.
- Đẩy nhẹ các ống xuống đáy của khay chứa và xoay các ống cho đến khi nhìn thấy mã vạch ống qua các cửa sổ của khay chứa.
- Nạp khay chứa ống hoá chất 32-lỗ và các thành phần xét nghiệm cần thiết cho quá trình đặt phản ứng PCR.
- Đẩy nhẹ các ống xuống đáy của khay chứa và xoay các ống cho đến khi nhìn thấy mã vạch ống qua các cửa sổ của khay chứa.

#### LƯU Ý



Vị trí của các ống riêng lẻ trên khay chứa là tùy ý.

#### LƯU Ý



Hệ thống không kiểm tra các thành phần được nạp trước khi xử lý. Thề tích thành phần không đủ sẽ ngăn việc đặt thành công phản ứng PCR đối với xét nghiệm bị ảnh hưởng.

#### LƯU Ý



Khởi động lần đặt phản ứng PCR khi ống vẫn đang đậy nắp có thể làm dừng máy trong khi chạy.

3. Cho các khay chứa có mã vạch khay chứa về hướng về mặt sau, phía bên phải.
4. Cho các khay chứa đã xếp đầy vào ray tương ứng giữa các khối lướt phía trước và phía sau của khay nạp cho đến khi chạm điểm móc dừng ở phía xa nhất so với khay nạp.

#### LƯU Ý



Việc đẩy các khay chứa qua điểm móc dừng có thể làm hỏng thiết bị và làm ảnh hưởng đến quá trình tải.

5. Kiểm tra để đảm bảo rằng tám thải đầu tip và thùng chứa tip thải được đặt ở đúng vị trí và đã đặt sẵn một túi đựng chất thải mới trong hộp đựng.
6. Nhấp vào **OK** trên hộp thoại Loading (Nạp) để tiếp tục chu trình nạp.

#### LƯU Ý



Khi nhấp vào **Cancel** (Huỷ), lần đặt phản ứng PCR sẽ được huỷ và có thể khởi động lại (xem chương 7.6.3 Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR).

Hệ thống AltoStar® AM16 kéo các khay chứa vào hệ thống và thực hiện xác nhận mã vạch.

#### LƯU Ý



Hệ thống AltoStar® AM16 tự động xác minh:

- Loại và vị trí đúng của các khay chứa đã nạp
- Thông tin định danh và vị trí chính xác của các thành phần được cho vào khay chứa
- Sự tương đồng về lô của các thành phần trong bộ kit xét nghiệm AltoStar®
- Tất cả các thành phần xét nghiệm AltoStar® đã nạp chưa bị hết hạn sử dụng
- Vị trí chính xác của tám thải đầu tip

Nếu bất kỳ phép kiểm tra nào trong số này cho kết quả không đạt thì sẽ có hộp thoại thông báo cho người dùng nêu rõ sự cố và hướng dẫn để khắc phục sự cố cho phù hợp. Để biết thêm thông tin về cách xử lý lỗi, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng phần mềm AltoStar® Connect.

#### LƯU Ý



Việc thay đổi vị trí của bất kỳ thành phần nào đã nạp sau khi khay chứa đã được kéo vào hệ thống có thể gây dừng chu trình đặt phản ứng PCR và/hoặc gây hư hỏng hệ thống.

Nếu tất cả phép kiểm tra đều cho kết quả đạt thì hộp thoại Loading Complete (Nạp xong) sẽ hiển thị.

7. Xác nhận hộp thoại Loading complete (Nạp xong) bằng cách nhấp vào **OK** hoặc chờ 10 giây để chu trình tự động khởi động.

#### LƯU Ý



Khi nhấp vào **Cancel** (Huỷ), lần đặt phản ứng PCR sẽ được huỷ và có thể khởi động lại (xem chương 7.6.3 Bắt đầu lần đặt phản ứng PCR).

Lần đặt phản ứng PCR sẽ được bắt đầu và sẽ được thực hiện mà không cần bất kỳ thao tác nào từ người sử dụng.

### 7.6.3.3 Trong quá trình đặt phản ứng PCR

Không cần bất kỳ thao tác nào từ người sử dụng cho đến khi đặt xong phản ứng. Màn hình Processing Status (Trạng thái xử lý) sẽ được hiển thị và thể hiện trạng thái của lần đặt phản ứng PCR và thời gian còn lại ước tính.

#### LƯU Ý



Việc đẩy hoặc kéo các khay chứa hoặc cửa sổ của AltoStar® AM16 trong khi đặt phản ứng PCR có thể gây dừng máy.

### 7.6.4 Kết thúc quá trình đặt phản ứng PCR

Khi kết thúc quy trình đặt phản ứng PCR, hộp thoại Run finished (Kết thúc lần chạy) sẽ được hiển thị.

1. Đảm bảo khay nạp trống.
2. Xác nhận hộp thoại Run finished (Kết thúc lần chạy) bằng cách nhấp vào **OK**.

AltoStar® AM16 sẽ dỡ các khay chứa. Đảm bảo không cản trở các khay chứa đang được dỡ.

Sau khi dỡ, hộp thoại Maintenance (Bảo trì) sẽ xuất hiện.

3. Làm theo hướng dẫn của hộp thoại Maintenance (Bảo trì).

Bảng của hộp thoại hiển thị số lượng phản ứng trong các ống hóa chất phản ứng chưa sử dụng trong lần đặt phản ứng PCR.

4. Nếu một lần đặt phản ứng PCR khác được bắt đầu ngay lập tức bằng cách sử dụng đĩa rửa giải đang được nạp hiện tại thì vẫn giữ đĩa rửa giải chưa niêm phong trên khay chứa. Nếu **không**, niêm phong và bảo quản đĩa rửa giải. Để biết thêm thông tin chi tiết, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng AltoStar® Purification Kit 1.5.

#### LƯU Ý



Sản phẩm rửa giải trong đĩa rửa giải sẽ hoạt động ổn định ở nhiệt độ phòng (tối đa. +30 °C) trong vòng 4 giờ kể từ khi lần chạy tinh sạch hoàn tất.

5. Đóng các ống đựng hoá chất bằng nắp ống tương ứng chưa qua sử dụng.

#### THẬN TRỌNG



Không sử dụng lại nắp ống để tránh nhiễm bẩn hóa chất, gây ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

6. Bảo quản hóa chất để tái sử dụng theo mô tả tại chương 4.2 Xử lý.
7. Thải bỏ vật liệu đã sử dụng (xem chương 10. Thải bỏ).
8. Xác nhận hộp thoại Maintenance (Bảo trì) bằng cách nhấp vào **OK**.

### 7.6.4.1 Kết quả đặt phản ứng PCR

Kết quả của lần đặt phản ứng PCR được lưu tại phần mềm AltoStar® Connect.

1. Nhấp vào **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Đặt phản ứng PCR → Kết quả đặt phản ứng PCR) trên thanh trình đơn để truy cập màn hình Results (Kết quả).

Màn hình Results (Kết quả) hiển thị một bảng gồm tất cả các mẫu được sử dụng trong lần đặt phản ứng PCR gần nhất và một cột **Status** (Trạng thái) ở bên phải cho biết quá trình đặt phản ứng PCR đối với một mẫu nhất định đã được tiến hành hoàn toàn hay chưa (xem bảng 6).

**Bảng 6:** Kết quả đặt phản ứng PCR

Tình trạng	Kết quả đặt phản ứng PCR
Processed (Đã xử lý)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sản phẩm rửa giải đã được xử lý thành công trong lần đặt phản ứng PCR.</li> <li>Hỗn hợp PCR thành phẩm đã sẵn sàng để chạy PCR.</li> </ul>
Error (Lỗi)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sản phẩm rửa giải chưa được xử lý thành công.</li> <li>Hỗn hợp PCR tương ứng sẽ được tự động bỏ qua trong phân tích PCR phía sau.</li> </ul>

2. Để xem kết quả của các lần đặt phản ứng PCR trước đó, nhấp vào nút **Load** (Nạp) trên thanh trình đơn, chọn lần đặt phản ứng PCR mong muốn từ danh sách trong hộp thoại Load Results (Kết quả nạp) đang mở và nhấp vào **OK**.

3 tệp kết quả cho lần đặt phản ứng PCR được tạo tự động bởi phần mềm AltoStar® Connect:

- Tệp LIMS (.xml) chuyển thông tin chi tiết về lần đặt phản ứng PCR, bao gồm cả kết quả trở lại LIMS
- Tệp báo cáo (.pdf) chứa thông tin chi tiết về lần đặt phản ứng PCR, bao gồm cả kết quả cho các mục đích lưu trữ
- Tệp máy luận nhiệt (.plm) để tự động lên chương trình cho hệ thống CFX96™ DW Dx

Các tệp này được lưu vào vị trí được chỉ định trong phần cài đặt hệ thống của phần mềm AltoStar® Connect.

**LƯU Ý**

Có thể tạo lại các tệp kết quả đặt phản ứng PCR bằng cách tải lần đặt phản ứng PCR tương ứng và nhấp vào nút **Create LIMS File** để tạo tệp LIMS, nút **Create Report** để tạo báo cáo hoặc nút **Create Bio-Rad Cyclser File** để tạo tệp máy luân nhiệt.

**7.6.5 Niêm phong đĩa PCR**

Sau khi hoàn thành lần đặt phản ứng PCR, đĩa PCR phải được niêm phong bằng tấm dán niêm phong đĩa PCR. Nên sử dụng AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] or the PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). Đối với các loại máy niêm phong đĩa khác không có trong khuyến cáo, người sử dụng phải đánh giá mức độ phù hợp.

Trường hợp sử dụng máy niêm phong đĩa theo đúng khuyến cáo, cần thực hiện theo các bước sau:

1. Bật máy niêm phong đĩa và đảm bảo bộ chuyển đổi đĩa (plate adapter) không còn ở trong ngăn.
2. Đảm bảo cài đặt máy niêm phong đĩa như sau:

**Bảng 7:** Cài đặt máy niêm phong đĩa

Máy niêm phong đĩa	Cài đặt	
	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [giây]
AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Chờ cho đến khi đạt đến nhiệt độ cài đặt. Quá trình này có thể mất vài phút.
4. Đặt đĩa PCR lên bộ chuyển đổi đĩa của máy niêm phong đĩa.

- Đặt một tấm dán niêm phong đĩa PCR lên đĩa PCR sao cho dòng chữ “THIS SIDE UP” (MẶT TRÊN) có thể nhìn rõ. Đảm bảo rằng tất cả các giếng của đĩa PCR được phủ tấm dán niêm phong và không có giếng nào bị chữ viết che khuất.

### LƯU Ý






Việc vận hành máy niêm phong đĩa khi không có bộ chuyển đổi đĩa trong ngăn có thể khiến máy niêm phong đĩa không hoạt động. Trong trường hợp này, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

### LƯU Ý



Nếu tấm dán niêm phong đĩa PCR hoặc khung bị đặt sai vị trí, tấm dán có thể dính vào tấm gia nhiệt của máy niêm phong đĩa trong khi niêm phong. Điều này sẽ làm cho máy niêm phong không hoạt động. Trong trường hợp này, hoặc trong trường hợp bước niêm phong đã được bắt đầu khi chưa có tấm dán niêm phong đĩa PCR, để máy niêm phong đĩa nguội dần xuống nhiệt độ phòng và liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

- Lắp khung niêm phong lên trên để ấn giữ giấy niêm phong.
- Mở ngăn bằng cách nhấn nút **Operate** (Vận hành)\*/ \*\*.
- Đặt cả cụm bao gồm bộ chuyển đổi đĩa, đĩa PCR, tấm dán niêm phong đĩa PCR và khung niêm phong vào máy niêm phong đĩa và nhấn **Operate** (Vận hành)\*/ \*\*.
- Ngăn kéo tự động đóng lại, niêm phong trong thời gian đã đặt và tự động mở lại.
- Lấy đĩa PCR đã được niêm phong và bộ chuyển đổi đĩa ra khỏi máy niêm phong đĩa và đóng máy niêm phong đĩa bằng cách nhấn nút **Close** (Đóng)\*/ \*\*.

\* AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]

\*\*PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)



### 7.6.5.1 Độ ổn định hỗn hợp PCR

Sau khi hoàn thành lần đặt phản ứng PCR, hỗn hợp PCR trong đĩa PCR đã niêm phong sẽ hoạt động ổn định ở nhiệt độ phòng (tối đa là +30 °C) trong vòng 30 phút.

#### THẬN TRỌNG



Không vượt quá thời gian bảo quản hỗn hợp PCR vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

### 7.6.6 Bắt đầu lần chạy PCR

Lần chạy PCR được thực hiện trên hệ thống CFX96™ DW Dx dưới sự kiểm soát của phần mềm CFX Manager™ Dx.

1. Bật hệ thống CFX96™ DW Dx lên, cũng như máy tính và màn hình đi kèm.
2. Khởi động phần mềm CFX Manager™ Dx.
3. Trên thanh trình đơn của phần mềm CFX Manager™ Dx, chọn **File** → **Open** → **LIMS File...** (Tập → Mở → Tập LIMS) để mở hộp thoại Open LIMS File (Mở tập LIMS).
4. Trong hộp thoại Open LIMS File (Mở tập LIMS) mở ra, đảm bảo rằng con trỏ nhấp nháy tại trường **File name** (Tên tập) ở dưới cùng. Nếu không, nhấp vào trường **File name** (Tên tập).
5. Quét mã vạch đĩa PCR bằng máy quét mã vạch cầm tay để tự động chọn và mở tập LIMS chính xác. Hộp thoại Run Setup (Cài đặt lần chạy) được hiển thị.

#### LƯU Ý



Tất cả các thông số cần thiết để bắt đầu phản ứng PCR được chuyển tự động từ phần mềm AltoStar® Connect sang hệ thống CFX96™ DW Dx bằng tập máy luận nhiệt.

6. Nhấp vào nút **Open Lid** (Mở nắp) trong hộp thoại Run Setup (Đặt phản ứng) để mở nắp hệ thống CFX96™ DW Dx.
7. Ly tâm ngắn đĩa PCR đã niêm phong để đảm bảo toàn bộ dung dịch ở dưới đáy giếng.

- Đưa đĩa PCR đã niêm phong vào khối gia nhiệt của hệ thống CFX96™ DW Dx với giếng A1 ở phía bên trái.
- Đóng hệ thống CFX96™ DW Dx bằng cách nhấp vào nút **Close Lid** (Đóng nắp) trong hộp thoại Run Setup (Đặt phản ứng).
- Bắt đầu lần chạy PCR bằng cách nhấp vào nút **Start Run** (Bắt đầu lần chạy) trong hộp thoại Run Setup (Cài đặt lần chạy).

### 7.6.6.1 Trong khi chạy PCR

Không cần bất kỳ tương tác nào từ người sử dụng cho đến khi lần chạy PCR hoàn tất. Hộp thoại Run Details (Chi tiết lần chạy) sẽ được hiển thị và thể hiện trạng thái của lần chạy PCR và thời gian còn lại ước tính.

#### LƯU Ý



Mở nắp hệ thống CFX96™ DW Dx trong khi chạy PCR bằng cách sử dụng nút ở phía trước nắp hoặc bằng cách nhấp vào **Open Lid** (Mở nắp) trong hộp thoại Run Details (Chi tiết lần chạy) sẽ hủy bỏ quá trình chạy và hủy bỏ tất cả các kết quả.

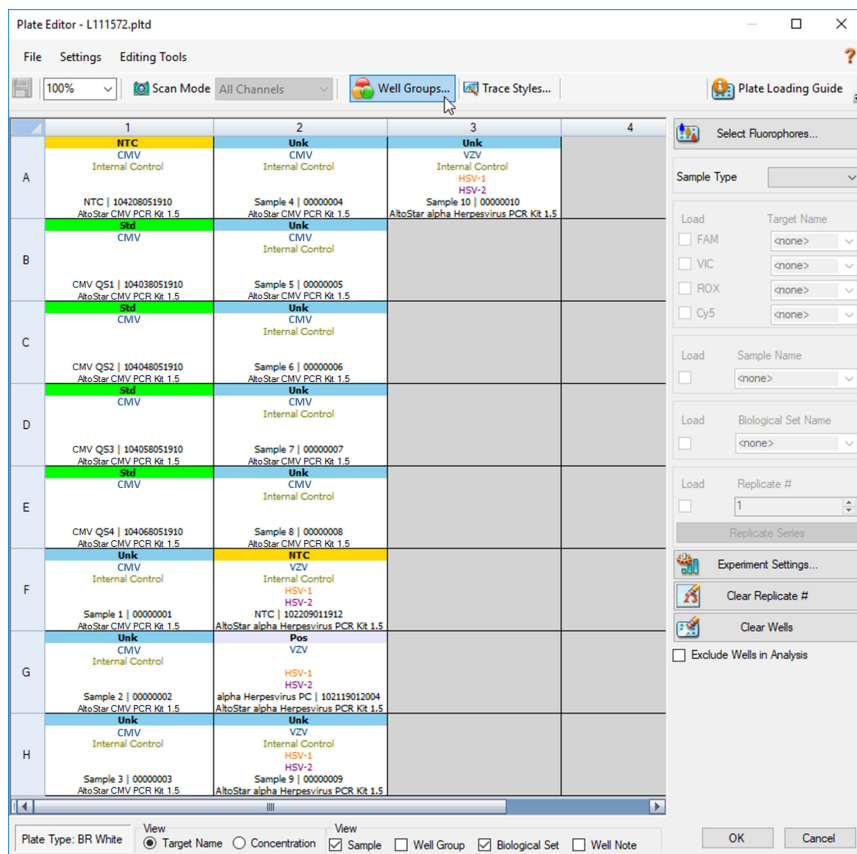
Ở cuối lần chạy PCR, cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu) được hiển thị và hiển thị các đường cong khuếch đại, cách bố trí đĩa và kết quả.

### 7.6.6.2 Chỉ định xét nghiệm cho các nhóm giếng

Quy trình AltoStar® xử lý một hoặc một số xét nghiệm PCR đồng thời trên một đĩa PCR. Tuy nhiên, mỗi xét nghiệm phải được người dùng phân tích riêng theo hướng dẫn sử dụng của xét nghiệm tương ứng.

Vì vậy, tất cả các xét nghiệm trên đĩa PCR phải được người dùng chỉ định cho từng nhóm giếng bằng phần mềm CFX Manager™ Dx.

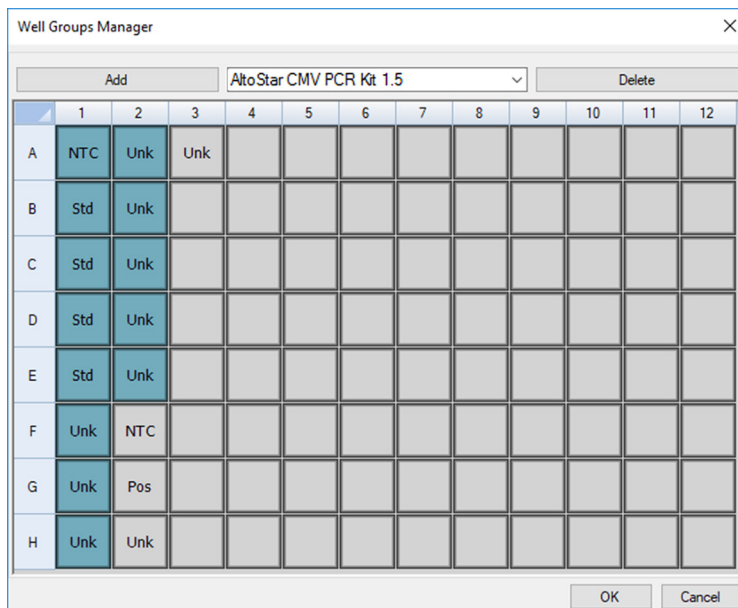
1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), nhấp vào nút **Plate Setup** (Thiết lập đĩa) trên thanh công cụ và chọn **View/Edit Plate** (Xem/chỉnh sửa đĩa). Xuất hiện hộp thoại Plate Editor (Trình chỉnh sửa đĩa) (xem hình 1).



Hình 1: Hộp thoại Plate Editor (Trình chỉnh sửa đĩa)

2. Trong hộp thoại Plate Editor (Trình chỉnh sửa đĩa), nhấp vào **Well Groups...** (Nhóm giếng) trên thanh công cụ. Xuất hiện hộp thoại Well Groups Manager (Trình quản lý nhóm giếng) (xem hình 2).
3. Nhấp vào nút **Add** (Thêm).
4. Nhập tên xét nghiệm đầu tiên vào hộp văn bản.

- Chọn tất cả các giếng trong khu vực đĩa PCR thuộc xét nghiệm đầu tiên (xem hình 2). Có thể xác định các giếng thuộc cùng một xét nghiệm trong hộp thoại Plate Editor (Trình chỉnh sửa đĩa) bằng mục nhập trong trường **Biological Set** (Thiết lập sinh học).

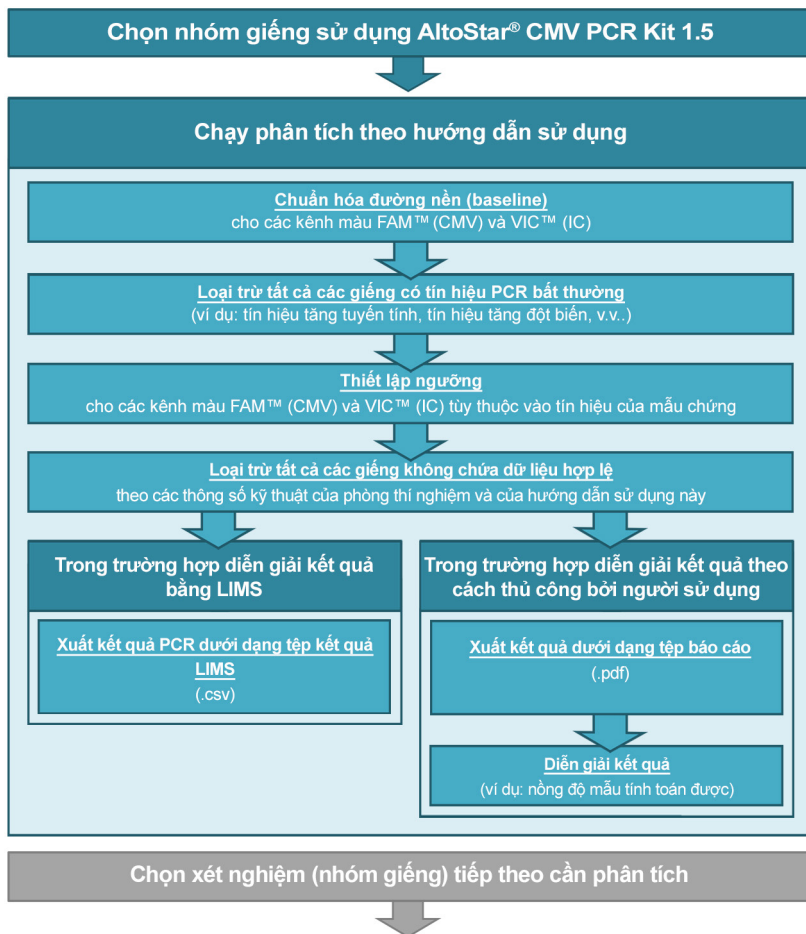


**Hình 2:** Hộp thoại Well Groups Manager (Trình quản lý nhóm giếng)

- Lặp lại các bước 3–5 cho tất cả các xét nghiệm trên đĩa PCR.
- Xác nhận chỉ định cho các nhóm giếng bằng cách nhấp vào **OK**. Hộp thoại Well Groups Manager (Trình quản lý nhóm giếng) sẽ đóng lại.
- Đóng hộp thoại Plate Editor (Trình chỉnh sửa đĩa) bằng cách nhấp vào nút **OK**.
- Xác nhận áp dụng các thay đổi bằng cách nhấp vào **Yes**.

### 7.6.7 Phân tích dữ liệu PCR

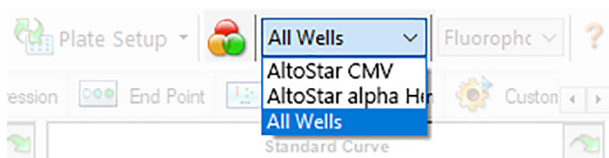
Kết quả của tất cả các xét nghiệm (nhóm giếng) trên đĩa PCR phải được phân tích theo trình tự được mô tả trong hình 3.



Hình 3: Quy trình phân tích dữ liệu PCR

Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ. Không sử dụng “All Wells” **Well Group**. Cách sử dụng ở hình 4 là góc nhìn ví dụ chung.

Trước khi phân tích kết quả, cần đảm bảo rằng nhóm giếng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 có chứa tất cả các giếng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 và không chứa giếng nào của các xét nghiệm khác.



**Hình 4:** Nút Well Group (Nhóm giếng) và trình đơn thả xuống Well Group (Nhóm giếng)

## LƯU Ý



Việc phân tích kết hợp trên một xét nghiệm có thể cho kết quả không chính xác.

## THẬN TRỌNG



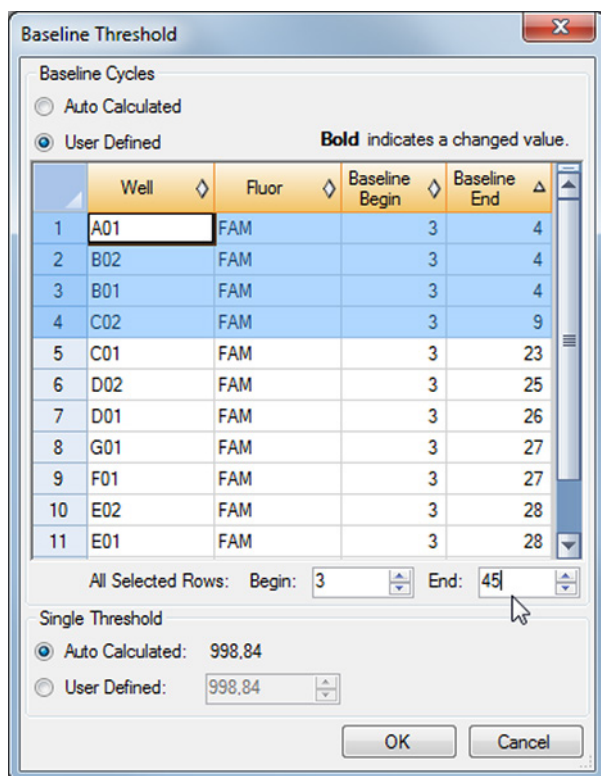
Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả phải được diễn giải dựa trên tất cả các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm.

### 7.6.7.1 Chuẩn hóa đường nền

Thiết lập đường nền mà phần mềm CFX Manager™ Dx sử dụng có thể cần được điều chỉnh cho từng giếng của xét nghiệm (**Well Group**) (Nhóm giếng) dựa theo phân tích.

1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.

- Ở phía bên trái của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), đánh dấu vào hộp kiểm **FAM** ứng với kênh nhận diện CMV.
- Trên thanh trình đơn của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), nhấp vào **Settings** → **Baseline Threshold...** (Cài đặt → Đường ngưỡng) để mở hộp thoại Baseline Threshold (Đường ngưỡng) (xem hình 5).
- Nhấp vào biểu tượng  $\diamond$  trong phần tiêu đề cột **Baseline End** (Kết thúc đường nền) để sắp xếp bảng theo các giá trị tăng dần **Baseline End** (Kết thúc đường nền).
- Chọn tất cả các đường thể hiện giá trị **Baseline End** (Kết thúc đường nền) từ 1–9 (xem hình 5).



Hình 5: Hộp thoại Baseline Threshold (Đường ngưỡng)

6. Đặt giá trị tại trường **End:** (Kết thúc) thành 45 đối với các dòng được chọn (xem hình 5).
7. Xác nhận cài đặt bằng cách nhấp vào **OK**.
8. Ở phía bên trái của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), bỏ đánh dấu hộp kiểm **FAM** và chỉ đánh dấu vào hộp kiểm **VIC** ứng với kênh nhận diện IC.
9. Lặp lại các bước 3–7 cho kênh nhận diện VIC™ (IC).

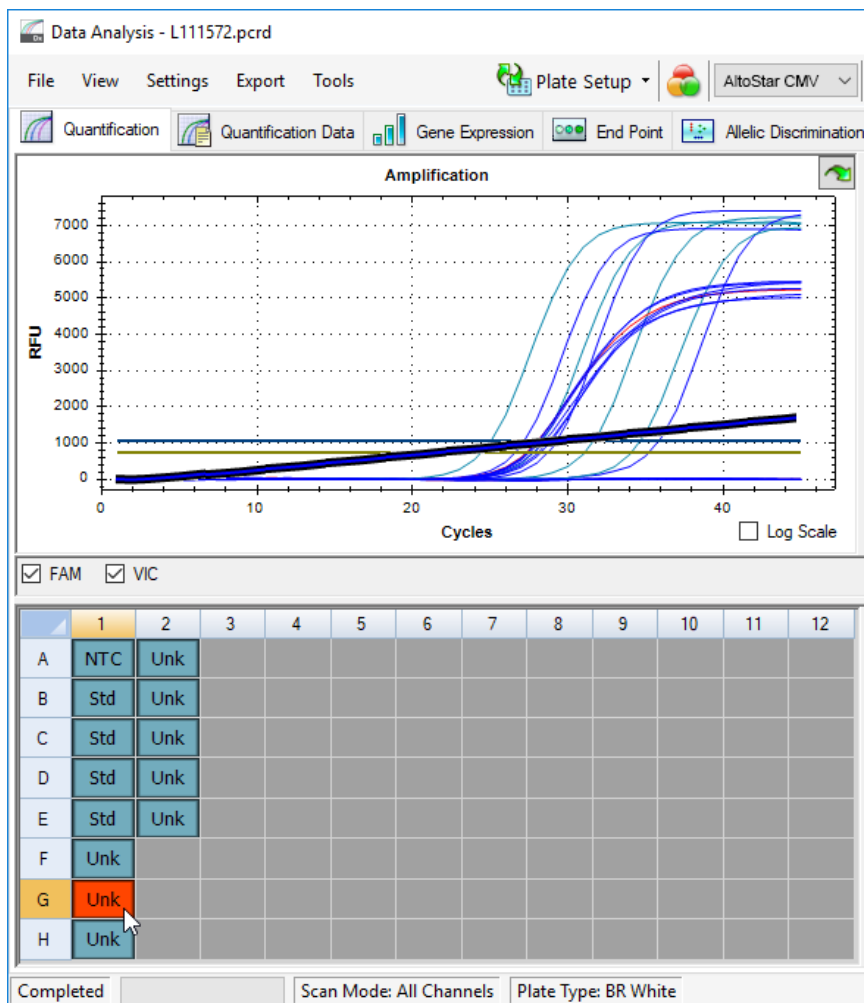
### 7.6.7.2 Loại trừ các tín hiệu PCR bất thường

Các kết quả hợp lệ chỉ có thể được lấy từ các tín hiệu PCR không có tín hiệu giả, các tín hiệu giả này có thể xuất phát từ các nguyên nhân như tạp chất hoặc bong bóng trong hỗn hợp. Người dùng phải loại trừ các tín hiệu PCR có chứa các tín hiệu giả.

1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.

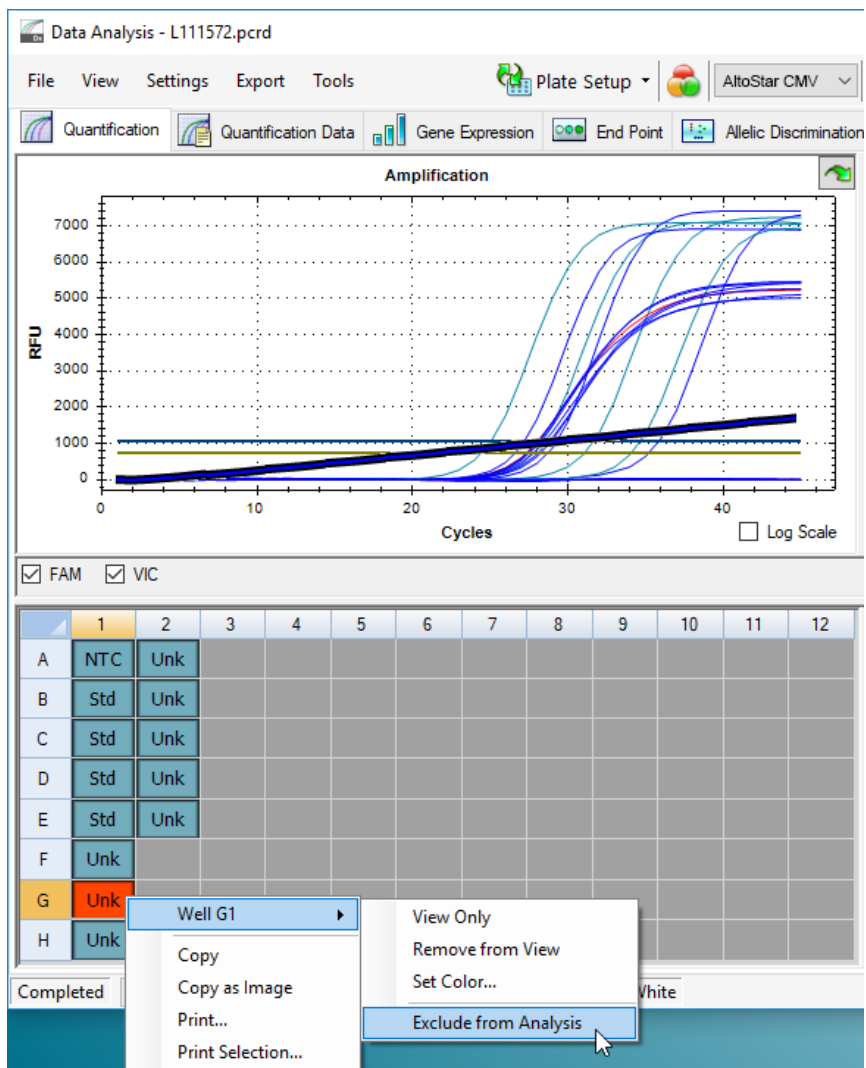


2. Xác định các giếng có tín hiệu PCR bất thường (tín hiệu tăng tuyến tính, tín hiệu tăng đột biến, v.v.) ở bất kỳ kênh màu nào, dù là FAM™ (CMV) và VIC™ (IC) (xem hình 6).



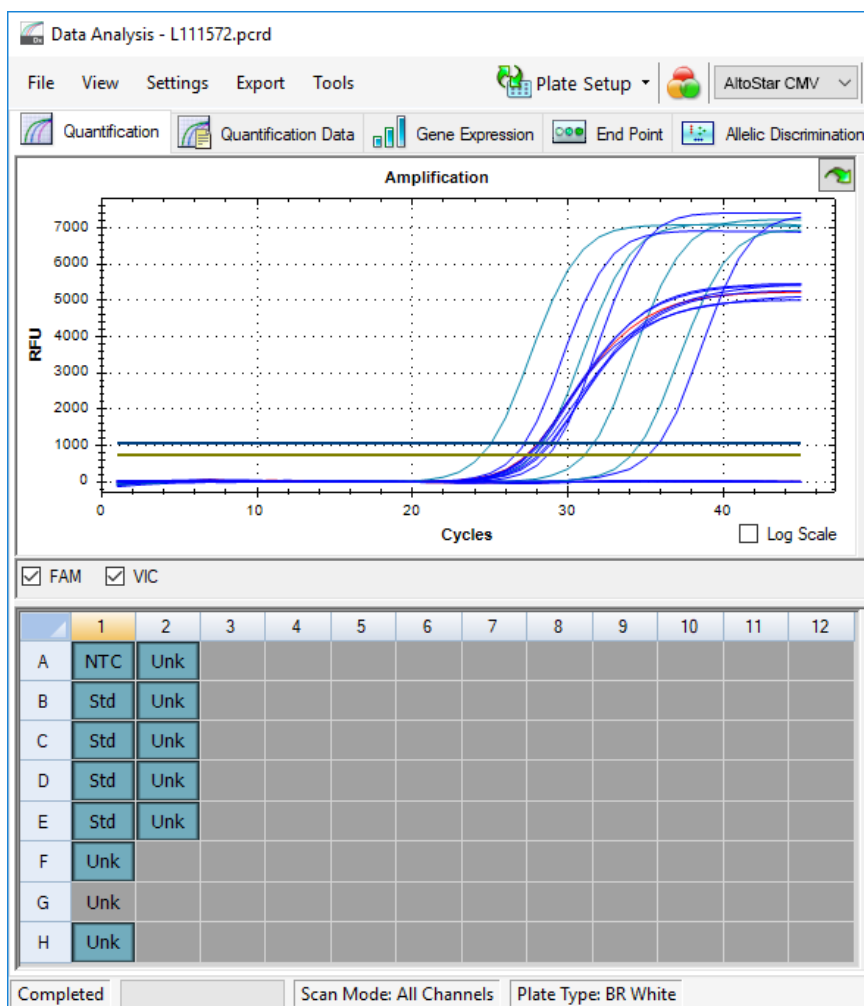
**Hình 6:** Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): tín hiệu PCR bất thường

3. Nhấp chuột phải vào từng giếng bị ảnh hưởng và chọn **Well...** → **Exclude from Analysis** (Giếng → Loại trừ khỏi phân tích) (xem hình 7).



Hình 7: Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): loại giếng khỏi phân tích

4. Giếng đã chọn sẽ được loại trừ khỏi phân tích này. Sẽ không có kết quả nào được tạo cho giếng này (xem hình 8).



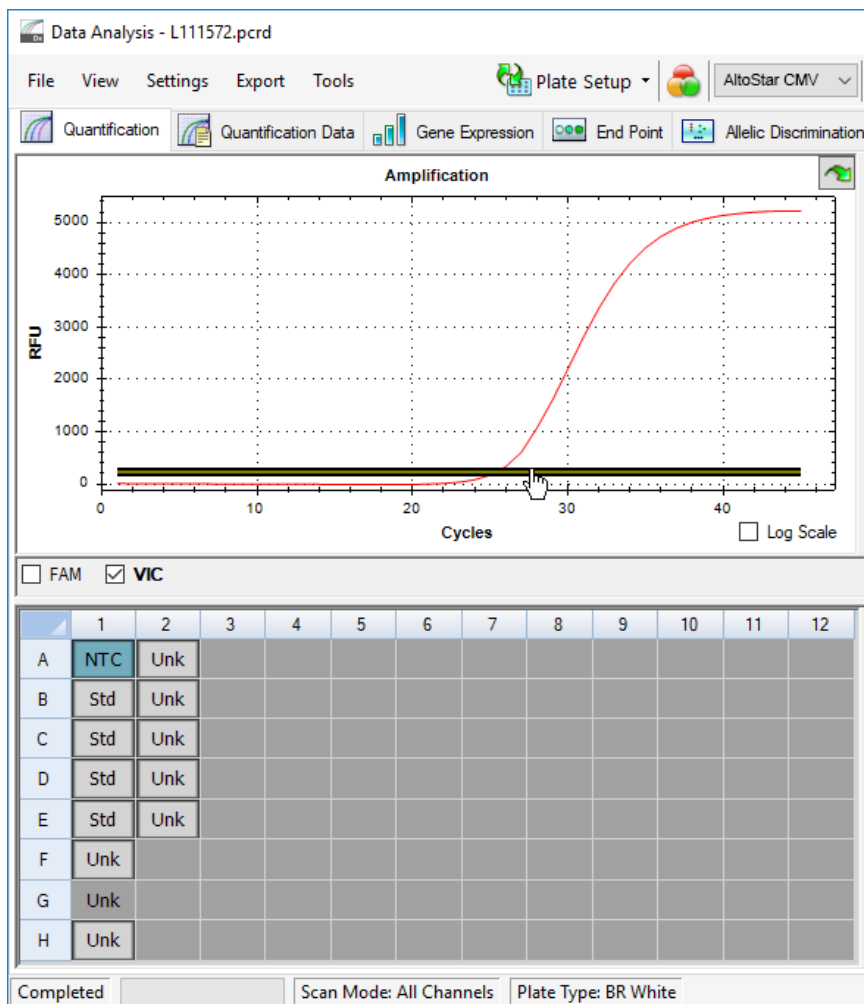
**Hình 8:** Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): giếng đã loại bỏ

### 7.6.7.3 Thiết lập ngưỡng

Người dùng phải đặt ngưỡng cho các kênh màu FAM™ (CMV) và VIC™ (IC) theo cách thủ công tùy thuộc vào tín hiệu của mẫu chứng.

1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.

2. Ở phía bên trái của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), đánh dấu vào hộp kiểm **VIC** ứng với kênh nhận diện IC (xem hình 9).



**Hình 9:** Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): thiết lập ngưỡng VIC™

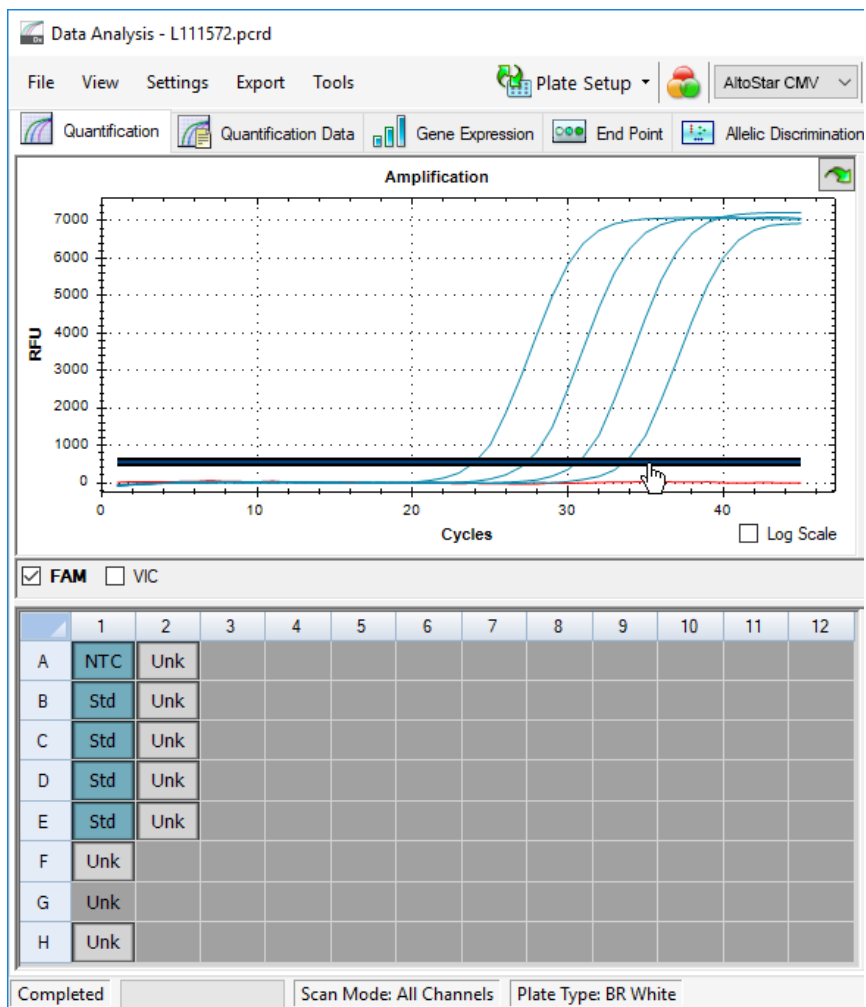
- Chỉ chọn giếng NTC ở chế độ xem đĩa của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu) (xem hình 9).
- Kéo ngưỡng vào vùng hàm mũ của tín hiệu NTC (xem hình 9).

#### LƯU Ý



NTC có chứa khuôn IC, vì vậy sẽ có tín hiệu IC trong một giếng NTC hợp lệ.

- Ở phía bên trái của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), bỏ đánh dấu hộp kiểm **VIC** và đánh dấu vào hộp kiểm **FAM** ứng với kênh nhận diện CMV (xem hình 10).



Hình 10: Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): thiết lập ngưỡng FAM™

- Chỉ chọn các giếng chứa NTC và QS ở chế độ xem đĩa của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu) (xem hình 10).
- Kéo đường ngưỡng cao hơn tín hiệu của NTC và đi vào vùng hàm mũ của tín hiệu QS (xem hình 10).

## 7.6.8 Tính hợp lệ của kết quả PCR

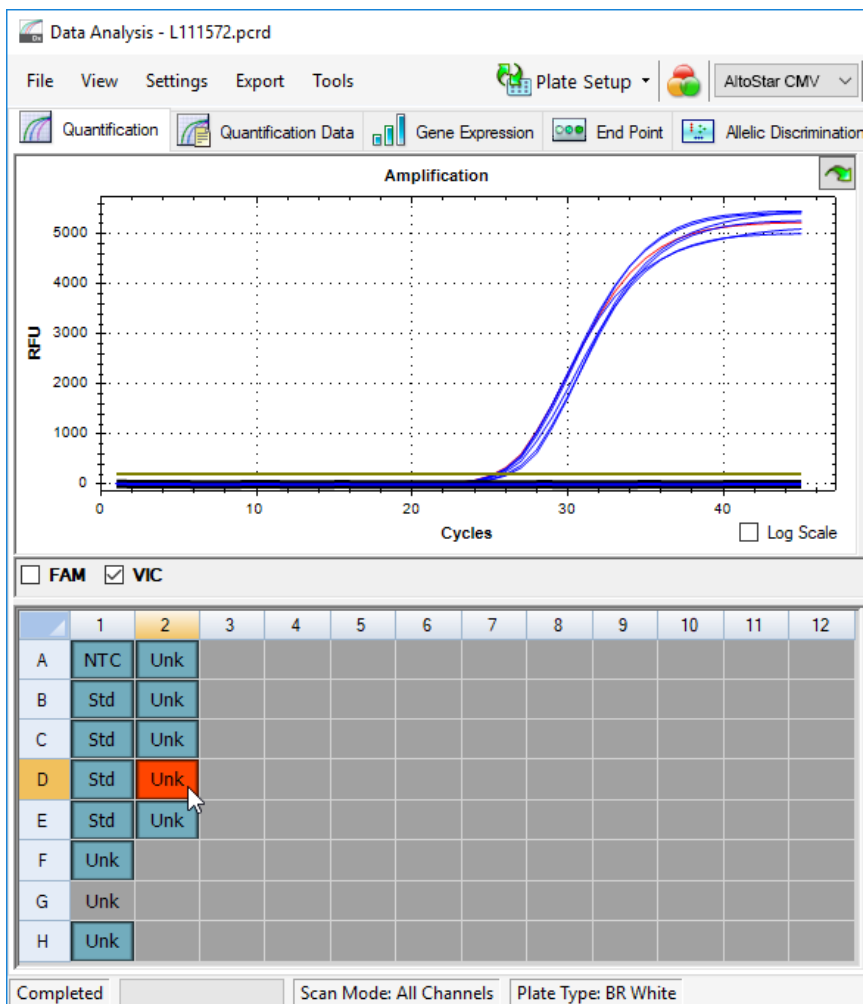
### 7.6.8.1 Loại trừ các giếng có chứa dữ liệu không hợp lệ

Các giếng không chứa dữ liệu hợp lệ phải được người dùng loại trừ khỏi việc tạo kết quả.

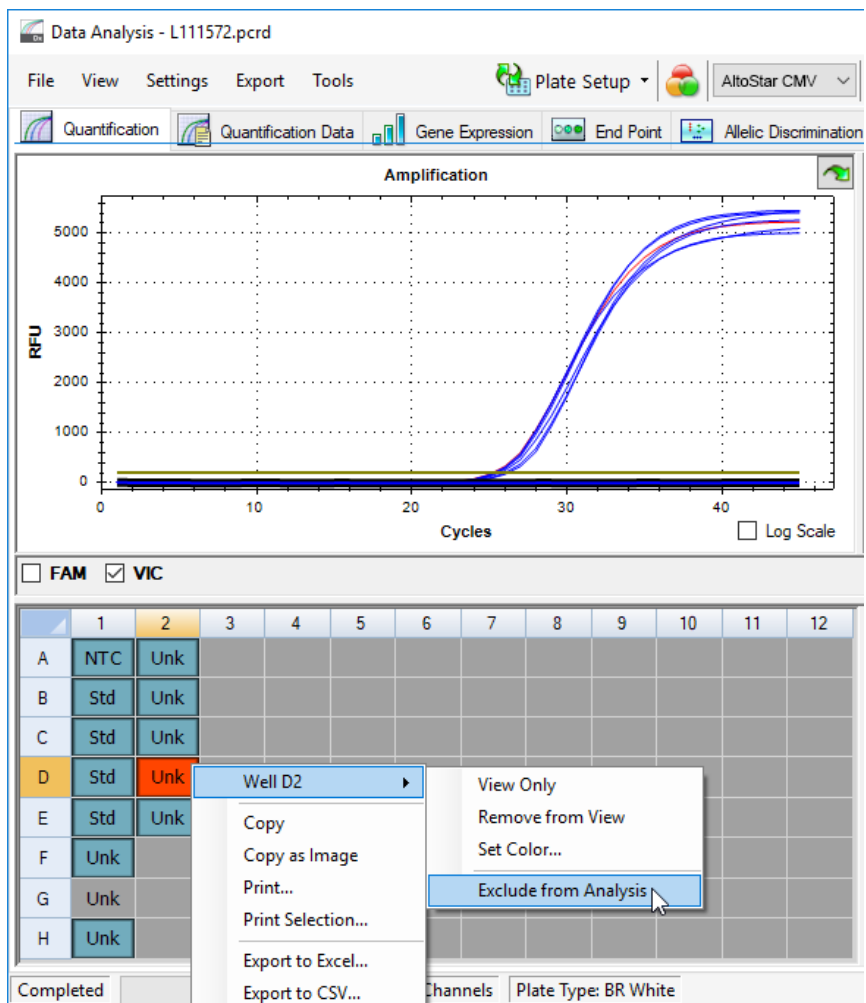
1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.
2. Xác định tất cả các giếng chứa dữ liệu không hợp lệ. Một giếng được coi là không hợp lệ nếu thuộc một trong số bất cứ trường hợp nào dưới đây:
  - a) Lần chạy hoàn tất không hợp lệ [xem các chương 7.6.8.2 Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định tính) và 7.6.8.3 Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định lượng)].
  - b) Dữ liệu giếng không đáp ứng các điều kiện kiểm soát để được tính là có kết quả hợp lệ (xem chương 7.6.8.4 Tính hợp lệ kết quả của một mẫu).



3. Nhấp vào các giếng chứa dữ liệu không hợp lệ theo chương 7.6.8.2 Tính hợp lệ của một lần chạy chuẩn đoán PCR (định tính) đến 7.6.8.4 Tính hợp lệ kết quả của một mẫu bằng nhấp chuột phải và chọn **Well... → Exclude from Analysis** (Giếng → Loại khỏi phân tích) (xem hình 11 và 12).



Hình 11: Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): giếng không hợp lệ



**Hình 12:** Cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu): loại giếng không hợp lệ khỏi phân tích

Giếng đã chọn sẽ được loại trừ khỏi phân tích này. Sẽ không có kết quả nào được tạo cho giếng này.

### 7.6.8.2 Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định tính)

Một lần chạy chẩn đoán PCR định tính được coi là **hợp lệ** khi thoả mãn các điều kiện sau:

**Bảng 8:** Các điều kiện kiểm chuẩn để đảm bảo một lần chạy PCR hợp lệ

Kiểm chuẩn	Kênh nhận diện	
	FAM™ (CMV)	VIC™ (IC)
QS	+	Không áp dụng
NTC	-	+

Một phản ứng PCR chẩn đoán định tính là **không hợp lệ** nếu:

- Lần chạy chưa hoàn tất.
- Bất kỳ điều kiện kiểm soát nào cho một lần chạy chẩn đoán PCR định tính không được thoả mãn.

Trong trường hợp lần chạy chẩn đoán PCR không hợp lệ, loại trừ tất cả các giếng khỏi phân tích và lặp lại lần chạy AltoStar® bắt đầu từ các mẫu ban đầu.

### 7.6.8.3 Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định lượng)

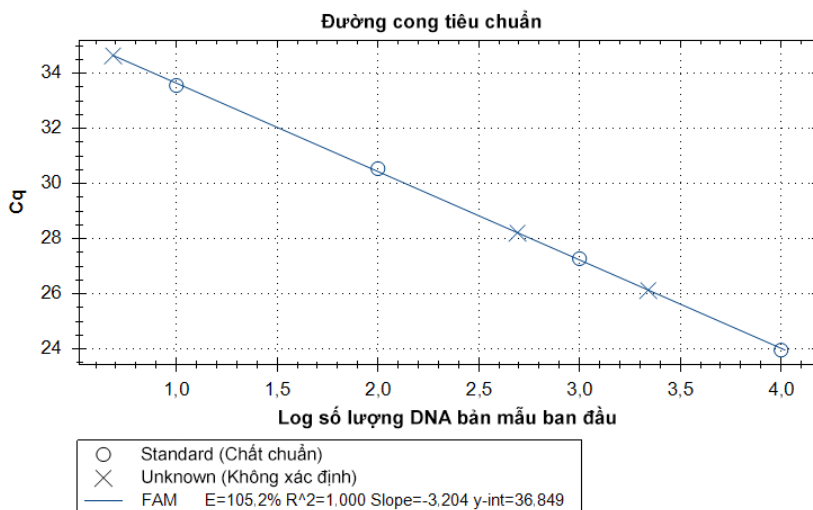
Một lần chạy chẩn đoán PCR định lượng được coi là **hợp lệ** nếu đáp ứng các điều kiện sau:

- Tất cả các điều kiện kiểm soát cho một lần chạy chẩn đoán PCR định tính hợp lệ đều thỏa mãn [xem chương 7.6.8.2 Tính hợp lệ của một lần chạy chẩn đoán PCR (định tính)].
- Đường chuẩn được tạo phải đạt giá trị thông số kiểm chuẩn sau:

**Bảng 9:** Thông số kiểm chuẩn đường chuẩn

Thông số kiểm chuẩn	Giá trị hợp lệ
R bình phương ( $R^2$ )	$\geq 0,98$

Thông số kiểm chuẩn của đường chuẩn được hiển thị bên dưới đồ thị đường chuẩn trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu) (xem hình 13).



**Hình 13:** Dữ liệu đường chuẩn

Một lần chạy chẩn đoán PCR định lượng được coi là **không hợp lệ** nếu:

- Lần chạy chưa hoàn tất.
- Bất kỳ điều kiện kiểm soát nào cho một lần chạy chẩn đoán PCR định lượng không được thỏa mãn.

Trong trường hợp lần chạy chẩn đoán PCR không hợp lệ, loại trừ tất cả các giếng khỏi phân tích và lặp lại lần chạy AltoStar® bắt đầu từ các mẫu ban đầu.

#### 7.6.8.4 Tính hợp lệ kết quả của một mẫu

Kết quả đối với một mẫu được coi là **không hợp lệ**, nếu các tín hiệu trong cả kênh nhận diện VIC™ (IC) và kênh nhận diện FAM™ (CMV) đều là âm tính (xem bảng 10). Trong trường hợp kết quả không hợp lệ cho một mẫu, loại trừ giếng ra khỏi phân tích và xét nghiệm lại từ mẫu ban đầu hoặc thu nhận mẫu mới rồi xét nghiệm.

**Bảng 10:** Tính hợp lệ của kết quả

Kênh nhận diện		Tính hợp lệ của kết quả
FAM™ (CMV)	VIC™ (IC)	
+	+	Kết quả hợp lệ
+	-	Kết quả hợp lệ*
-	+	Kết quả hợp lệ
-	-	<b>Kết quả không hợp lệ</b>

\* Phát hiện IC là không bắt buộc khi đã phát hiện được mục tiêu CMV. Tải lượng CMV DNA cao trong mẫu có thể làm giảm hoặc mất tín hiệu IC.

### 7.6.9 Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả tự động

Để cung cấp kết quả chạy PCR cho LIMS đã kết nối để diễn giải kết quả tự động, cần xuất dưới dạng tệp kết quả LIMS (.csv).

1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.
2. Đảm bảo rằng tất cả các bước trong quy trình phân tích (tham chương 7.6.7.1 Chuẩn hoá đường nền đến 7.6.8.1 Loại trừ các giếng có chứa dữ liệu không hợp lệ) đã được hoàn thành đối với nhóm giếng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.
3. Trên thanh trình đơn của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), nhấp vào **Export** → **Export All Data Sheets** (Xuất → Xuất tất cả các phiếu dữ liệu) để mở hộp thoại Browse For Folder (Tìm thư mục).
4. Trong hộp thoại Browse For Folder (Tìm thư mục), xác định vị trí tạo tệp kết quả LIMS và nhấp vào **OK**.

#### LƯU Ý



Việc tích hợp LIMS phải được thực hiện theo các thông số kỹ thuật của Altona Diagnostics. Để biết thông tin về việc tích hợp LIMS, xem chương 16. Giao thức xét nghiệm cho phần mềm AltoStar® Connect và thông tin để tích hợp LIMS và/hoặc liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

#### LƯU Ý

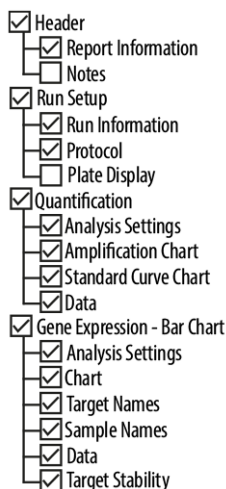


Việc lưu kết quả của nhiều xét nghiệm (nhóm giếng) từ một lần xét nghiệm PCR trong cùng một thư mục dẫn đến việc thay thế tệp kết quả LIMS của xét nghiệm (nhóm giếng) đầu tiên bằng tệp kết quả LIMS của xét nghiệm (nhóm giếng) thứ hai. Trong trường hợp này, các tệp kết quả LIMS của xét nghiệm (nhóm giếng) đầu tiên có thể được xuất lại.

### 7.6.10 Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả thủ công

Nếu kết quả không được chuyển đến LIMS để diễn giải kết quả tự động thì người dùng phải diễn giải kết quả theo cách thủ công. Khi đó, kết quả phân tích của mỗi xét nghiệm (nhóm giếng) cần được xuất dưới dạng tệp báo cáo.

1. Trong cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), lưu ý chọn **Well Group** (Nhóm giếng) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Nhấp vào trình đơn thả xuống **Well Group** (Nhóm giếng) ngay bên cạnh nút **Well Group** (Nhóm giếng) (xem hình 4) của thanh công cụ.
2. Ở phía bên trái của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), đánh dấu vào hộp kiểm **VIC** và **FAM**.
3. Đảm bảo rằng tất cả các bước trong quy trình phân tích (tham chương 7.6.7.1 Chuẩn hoá đường nền đến 7.6.8.1 Loại trừ các giếng có chứa dữ liệu không hợp lệ) đã được hoàn thành đối với nhóm giếng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.
4. Trên thanh trình đơn của cửa sổ Data Analysis (Phân tích dữ liệu), nhấp vào **Tools** → **Reports...** (Công cụ → Báo cáo) để mở hộp thoại Report (Báo cáo).
5. Đảm bảo chọn ít nhất các nội dung sau để tạo báo cáo ở phần trên bên trái của hộp thoại Report (Báo cáo) (xem hình 14):



**Hình 14:** Hộp thoại Report (Báo cáo)

6. Chọn hoặc bỏ chọn nội dung bổ sung của báo cáo bằng cách đánh dấu vào các hộp kiểm tương ứng theo yêu cầu.
7. Trên thanh trình đơn của cửa sổ hộp thoại Report (Báo cáo), đánh dấu vào **File** → **Save As...** (Tệp → Lưu) để mở hộp thoại Save Report (Lưu báo cáo).

- Trong hộp thoại Save Report (Lưu Báo cáo), chỉ định tên và vị trí cho tệp báo cáo sẽ được tạo và nhấp vào **Save** (Lưu).

### 7.6.10.1 Diễn giải kết quả thủ công

- Mở tệp báo cáo được tạo cho nhóm giếng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 (xem chương 7.6.10 Xuất kết quả PCR để diễn giải kết quả thủ công).
- Tham khảo bảng Quantification Data (Dữ liệu Định lượng) trong báo cáo (xem hình 15). Bảng gồm 2 hàng cho từng **Sample** (Mẫu) – một cho **Target CMV** và một cho **Target Internal Control**.

Quantification Data

Well	Floor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Well Note
A01	FAM	CMV	NTC	NTC   104208051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	
A02	FAM	CMV	Unkn	Sample 4   00000004	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B01	FAM	CMV	Std	CMV QS1   104038051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00	
B02	FAM	CMV	Unkn	Sample 5   00000005	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	4.855E+00	0.686	4.85E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C01	FAM	CMV	Std	CMV QS2   104048051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00	
C02	FAM	CMV	Unkn	Sample 6   00000006	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
D01	FAM	CMV	Std	CMV QS3   104058051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00	
E01	FAM	CMV	Std	CMV QS4   104068051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	1.000E+01	1.000	1.00E+01	0.00E+00	
E02	FAM	CMV	Unkn	Sample 8   00000008	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	4.924E+02	2.692	4.92E+02	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	FAM	CMV	Unkn	Sample 1   00000001	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	26.14	26.14	0.000	2.195E+03	3.341	2.20E+03	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	FAM	CMV	Unkn	Sample 3   00000003	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC   104208051910	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4   00000004	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5   00000005	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6   00000006	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
E02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8   00000008	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1   00000001	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3   00000003	AltoStar CMV PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 IU/ml

Hình 15: Báo cáo: Quantification Data (Dữ liệu định lượng)

Kết quả định tính sẽ được đánh dấu bằng thuật ngữ *qualitative* (định tính) tại cột **Well Note** (Ghi chú giếng) của bảng Quantification Data (Dữ liệu Định lượng).

- Xác định từng hàng có **Target** là **CMV** và có **Well Note** (Ghi chú giếng) là *qualitative* (định tính).
- Tại các hàng này, tham khảo cột **C<sub>q</sub>** để biết kết quả của **Sample** (Mẫu) tương ứng.



5. Tham khảo bảng 11 về cách diễn giải các kết quả định tính.

**Bảng 11:** Kết quả định tính: diễn giải kết quả

Chu kỳ ngưỡng (C <sub>q</sub> ) cho CMV	Diễn giải kết quả
1–45	Phát hiện DNA đặc hiệu cho CMV.
Không hiện diện	Không phát hiện DNA đặc hiệu cho CMV. Mẫu không chứa đủ lượng DNA đặc hiệu cho CMV để có thể phát hiện.

Kết quả định lượng được đánh dấu bằng *Concentration factor* (Hệ số nồng độ) trong cột **Well Note** (Ghi chú giếng) của bảng Quantitation Data (Dữ liệu Định lượng) (xem hình 15).

- Xác định từng hàng có **Target** là *CMV* và có **Well Note** (Ghi chú giếng) là *Concentration factor* (Hệ số nồng độ).
- Tại những dòng này, tham khảo cột **Starting Quantity (SQ)** (Lượng khởi đầu) để biết nồng độ đích *CMV* đo được trong sản phẩm rửa giải của **Sample** (Mẫu) tương ứng. Để tính toán kết quả của mẫu ban đầu của bệnh nhân, giá trị **Starting Quantity (SQ)** (Lượng khởi đầu) phải được người dùng nhân với *Concentration factor* (Hệ số nồng độ) (bao gồm cả đơn vị) tương ứng.
- Tham khảo bảng 12 về cách diễn giải các kết quả định lượng.

**Bảng 12:** Kết quả định lượng: diễn giải kết quả

Starting Quantity (SQ) [Lượng khởi đầu (SQ)] của mục tiêu CMV	Diễn giải kết quả
> 0	Phát hiện DNA đặc hiệu cho CMV. Nhân giá trị <b>Starting Quantity (SQ)</b> (Lượng khởi đầu) với <i>Concentration factor</i> (Hệ số nồng độ) trong cột <b>Well Note</b> (Ghi chú giếng) (bao gồm cả đơn vị) để tính toán nồng độ mẫu ban đầu của bệnh nhân.
Không hiện diện	Không phát hiện DNA đặc hiệu cho CMV. Mẫu không chứa đủ lượng DNA đặc hiệu cho CMV để có thể phát hiện.

## 8. Sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các hệ thống realtime PCR khác ngoài hệ thống CFX96™ Deep Well Dx

Ngoài hệ thống CFX96™ DW Dx, AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đã được kiểm định với các hệ thống realtime PCR khác (xem chương 5.3.2.2 Hệ thống realtime PCR). Các chương sau 8.1 Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp và 8.2 Quy trình mô tả cách sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các hệ thống này.

### 8.1 Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp

Cần có các hệ thống realtime PCR và vật liệu sau:

- Vật liệu và thiết bị chung (xem chương 7.5 Tổng quan tài liệu và thiết bị)
- Hệ thống CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad)
  - Đĩa PCR 96 giếng và giấy bạc niêm phong (chi tiết xem bảng 3)
- Hệ thống CFX96™ Dx (Bio-Rad)
  - Đĩa PCR 96 giếng và giấy bạc niêm phong (chi tiết xem bảng 3)
- Hệ thống Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
  - Strip ống 0,1 ml có nắp đậy [Ống STRIP 0,1 ml dành cho máy luân nhiệt Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) hoặc tương đương]
- Hệ thống QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System và ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
  - Đĩa PCR 96 giếng và giấy bạc niêm phong [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate và MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) hoặc tương đương]
- Hệ thống LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
  - Đĩa PCR 96 giếng và giấy bạc niêm phong [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white và LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) hoặc tương đương]

**LƯU Ý**

Không nên sử dụng các vật liệu hoặc thiết bị khác ngoài quy định trong các hướng dẫn sử dụng này.

## 8.2 Quy trình

### 8.2.1 Chuẩn bị mẫu

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được kiểm định bằng AltoStar® AM16 kết hợp với AltoStar® Purification Kit 1.5.

Các hệ thống và bộ kit tách chiết nucleic acid thay thế cũng có thể thích hợp. Người dùng cần kiểm định tính phù hợp của quy trình tách chiết nucleic acid để sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 phải được sử dụng với một IC khác loại (AltoStar® Internal Control 1.5), cho phép kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu (tách chiết nucleic acid) và quy trình PCR phía sau.

- Khi sử dụng các phương pháp tách chiết nucleic acid khác ngoài AltoStar® AM16 kết hợp với AltoStar® Purification Kit 1.5, IC phải được thêm vào bước ly giải của quy trình tách chiết nucleic acid.
- IC phải luôn được thêm vào hỗn hợp mẫu/đệm ly giải.
- Thể tích IC cần thêm luôn luôn và chỉ phụ thuộc vào thể tích sản phẩm rửa giải. Thể tích này chiếm 50 % thể tích sản phẩm rửa giải. Chẳng hạn, nếu nucleic acid sẽ được rửa giải trong 60 µl dung dịch đệm rửa giải hoặc nước thì cần thêm 30 µl IC mỗi mẫu vào hỗn hợp dung dịch mẫu/đệm ly giải.

**THẬN TRỌNG**

Việc bảo quản sản phẩm rửa giải ở điều kiện không đúng có thể gây suy giảm trình tự mục tiêu CMV của mầm bệnh và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 8.2.2 Pha hóa chất phản ứng (Master Mix)

Tất cả các thành phần của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 và mẫu phải được rã đông hoàn toàn, trộn (bằng pipet hoặc vortex nhẹ) và ly tâm ngắn (spin-down) trước khi sử dụng. Pha hoá chất phản ứng (Master Mix) theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

**Bảng 13:** Sơ đồ hút nhả pipet (pha Master Mix)

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Thể tích Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

### THẬN TRỌNG



Đối với Master A và Master B, không sử dụng thể tích khác với thể tích quy định trong hướng dẫn này để thiết lập hóa chất phản ứng (Master Mix) vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

### THẬN TRỌNG



Việc không ly tâm các thành phần của sản phẩm sau khi rã đông có thể gây nhiễm bởi hóa chất còn sót lại trong nắp và có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 8.2.3 Đặt phản ứng

- Hút 20 µl Master Mix cho vào các giếng cần sử dụng của đĩa PCR 96 giếng hoặc ống phản ứng có độ quang học phù hợp.
- Thêm 10 µl mẫu (sản phẩm rửa giải từ quá trình tách chiết nucleic acid) hoặc 10 µl chất kiểm chuẩn (QS1–4 hoặc NTC).

**Bảng 14:** Sơ đồ hút nhả pipet (đặt phản ứng)

Đặt phản ứng	
Master Mix	20 µl
Mẫu hoặc chất kiểm chuẩn	10 µl
<b>Tổng thể tích</b>	<b>30 µl</b>

- Đảm bảo rằng đối với phân tích định lượng, QS1–4 và NTC được sử dụng. Đảm bảo rằng đối với phân tích định tính, ít nhất QS4 và NTC được sử dụng.
- Trộn kỹ các mẫu và chất kiểm chuẩn với Master Mix bằng cách hút nhả pipet.
- Đậy đĩa PCR 96 giếng bằng giấy bạc niêm phong đĩa PCR và các ống phản ứng bằng nắp đậy thích hợp (xem chương 8.1 Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp).
- Lý tâm đĩa PCR 96 giếng trong máy ly tâm có rotor dành cho đĩa microtiter trong 30 giây với tốc độ khoảng 1.000 x g (~ 3.000 vòng/phút).

Sau khi hoàn thành lần đặt phản ứng PCR, hỗn hợp PCR sẽ ổn định ở nhiệt độ phòng (tối đa +30 °C) trong vòng 30 phút.

#### THẬN TRỌNG



Không vượt quá thời gian bảo quản hỗn hợp PCR vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

#### THẬN TRỌNG



Không trộn lẫn các mẫu hoặc ID mẫu trong quá trình đặt phản ứng PCR hoặc trong quá trình chuyển lên hệ thống PCR. Điều này có thể dẫn đến kết quả dương tính hoặc âm tính giả do việc gán mẫu không chính xác.

## 8.2.4 Làn chạy PCR

### 8.2.4.1 Lập trình hệ thống realtime PCR

Để biết thông tin cơ bản về việc thiết lập và lập trình các hệ thống realtime PCR khác nhau, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn lập trình chi tiết liên quan đến việc sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

### 8.2.4.2 Thiết lập lần chạy

Xác định các thông số cài đặt cơ bản sau:

**Bảng 15:** Thiết lập lần chạy

Cài đặt	
Thể tích phản ứng	30 µl
Tốc độ gia nhiệt (ramp rate)	Mặc định
Tham chiếu thụ động (passive reference)*	ROX™

\* Nếu hệ thống có sử dụng

Xác định các bộ phát hiện huỳnh quang sau (thuốc nhuộm):

**Bảng 16:** Bộ phận phát hiện huỳnh quang

Mục tiêu	Bộ phận phát hiện	Chất phát huỳnh quang (reporter)	Chất dập huỳnh quang (quencher)
CMV	CMV	FAM™	(Không)
IC	Internal Control	JOE™	(Không)

Xác định chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm sau đây:

**Bảng 17:** Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm

	Bước	Số chu kỳ lặp lại	Ghi nhận tín hiệu	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [phút:giây]
Biến tính	Giữ	1	-	95	02:00
Khuếch đại	Chu kỳ	45	-	95	00:15
			Có	58	00:45
			-	72	00:15

### THẬN TRỌNG



Không sử dụng các điều kiện chu trình nhiệt khác với điều kiện được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm.

## 8.2.5 Phân tích dữ liệu

Để biết thông tin cơ bản về phân tích dữ liệu trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn chi tiết về phân tích dữ liệu được tạo bằng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 trên nhiều hệ thống realtime PCR khác nhau, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của altona Diagnostics (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

Tiêu chí xác định tính hợp lệ của các lần chạy chẩn đoán PCR và việc diễn giải kết quả không phụ thuộc vào hệ thống realtime PCR được mô tả tại chương 7.6.8.2 Tính hợp lệ của lần chạy chẩn đoán PCR (định tính) đến 7.6.8.4 Tính hợp lệ kết quả của một mẫu, chương 7.6.10.1 Diễn giải kết quả thủ công và bảng 11 và 12.

### LƯU Ý



Nồng độ của "sample" (mẫu) được hiển thị ở IU/μl và được hiểu là nồng độ trong sản phẩm rửa giải.

Để xác định **tải lượng vi rút của mẫu ban đầu**, phải áp dụng công thức sau:

$$\text{Tải lượng virus (Mẫu)} \text{ [IU/ml]} = \frac{\text{Thể tích (Sản phẩm rửa giải) } [\mu\text{l}] \cdot \text{Tải lượng vi rút (Sản phẩm rửa giải) } \text{ [IU}/\mu\text{l}]}{\text{Thể tích mẫu đầu vào [ml]}}$$

### THẬN TRỌNG



Không sử dụng các thiết lập kiểm soát khác với thiết lập được chỉ định trong các hướng dẫn sử dụng này để phân tích dữ liệu, vì điều này có thể gây ra kết quả kiểm tra IVD không chính xác.

### THẬN TRỌNG



Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả phải được diễn giải dựa trên tất cả các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm.

## 9. Dữ liệu về hiệu suất

Hiệu suất của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO phiên bản 1 về các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid cho Cytomegalovirus ở người (Mã NIBSC: 09/162) và vật liệu chuẩn CMV được hiệu chỉnh theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO.

### 9.1 Huyết tương

#### 9.1.1 Độ nhạy phân tích

Để xác định giới hạn phát hiện (LoD) pha loãng bậc liên tiếp theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO phiên bản 1 về các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid cho Cytomegalovirus ở người (Mã NIBSC: 09/162) trong huyết tương để tạo ra các nồng độ từ 1,00E+03 đến 1,00E+01 IU/ml.



Mỗi mức pha loãng (dilution) được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate), trong 3 lần chạy khác nhau (tổng n = 24 cho mỗi mức pha loãng) được sử dụng kết hợp với:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Dữ liệu từ tất cả các lần chạy được tổng hợp và thực hiện phân tích xác suất để xác định giá trị LoD 95 %.

**Bảng 18:** Kết quả xét nghiệm PCR sử dụng cho việc tính toán độ nhạy phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Nồng độ [IU/ml]	N [tổng số]	N [dương tính]	Tỉ lệ biểu hiện [%]
1,00E+03	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	23	96
2,00E+02	24	23	96
1,50E+02	24	23	96
1,00E+02	24	16	67
5,00E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17

LoD của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 để phát hiện CMV trong huyết tương là 215 IU/ml (khoảng tin cậy 95 %: 163–330 IU/ml).

### 9.1.2 Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đảm bảo thông qua sự lựa chọn kỹ lưỡng các oligonucleotide (đoạn mồi và đầu dò). Các oligonucleotide được kiểm tra bằng cách phân tích so sánh trình tự với các trình tự công khai có sẵn để đảm bảo rằng sẽ phát hiện được tất cả các kiểu gen liên quan đến CMV.

Để xác nhận độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 các thí nghiệm sau được thực hiện (xem các chương 9.1.2.1 Mẫu âm tính đến 9.1.2.3 Phản ứng chéo).

#### 9.1.2.1 Mẫu âm tính

35 mẫu huyết tương âm tính với CMV từ các cá nhân hiến tặng được xét nghiệm với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Tất cả (35/35) mẫu được xét nghiệm âm tính với DNA đặc hiệu cho CMV và dương tính với IC. Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với các mẫu huyết tương là  $\geq 95\%$ .

#### 9.1.2.2 Chất gây nhiễu

Để đánh giá ảnh hưởng của các chất nội sinh và ngoại sinh có khả năng gây nhiễu đối với hiệu suất của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5, làm tăng mạnh chất đã chọn trong các mẫu huyết tương. Các mẫu huyết tương này có chứa CMV ở nồng độ  $3 \times \text{LoD}$  ( $6,45\text{E}+02$  IU/ml),  $1,00\text{E}+04$  IU/ml và không CMV tương ứng.

Kết quả thu được đối với các mẫu có chứa chất có khả năng gây nhiễu được so sánh với kết quả được tạo ra đối với các mẫu huyết tương không chứa chất gây nhiễu. Mỗi mẫu được xử lý trên 3 bản sao (replicate).

Chưa quan sát thấy tình trạng nhiễu đối với các mẫu chứa hàm lượng cao:

- Chất nội sinh
  - Bilirubin
  - Hemoglobin
  - DNA bộ gen người
  - Albumin huyết thanh người
  - Chất béo trung tính
- Chất ngoại sinh
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

#### THẬN TRỌNG



Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.

### 9.1.2.3 Phản ứng chéo

Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 liên quan đến phản ứng chéo với các mầm bệnh khác không phải CMV được đánh giá thông qua xét nghiệm:

- Virus họ hàng của CMV
- Virus gây triệu chứng tương tự như nhiễm CMV
- Virus có khả năng hiện diện ở bệnh nhân nhiễm CMV

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 không phản ứng chéo với bất kỳ mầm bệnh nào trong số các mầm bệnh sau:

- Adenovirus (ADV)
- Virus BK (BKV)
- Virus Epstein-Barr (EBV)
- Virus viêm gan A (HAV)
- Virus viêm gan B (HBV)
- Virus viêm gan C (HCV)
- Virus Herpes simplex 1 (HSV-1)
- Virus Herpes simplex 2 (HSV-2)
- Virus herpes ở người 6A (HHV-6A)
- Virus herpes ở người 6B (HHV-6B)
- Virus suy giảm miễn dịch ở người 1 (HIV-1)
- Virus JC (JCV)
- Parvovirus B19
- Virus Varicella-Zoster (VZV)

#### THẬN TRỌNG



Trường hợp mẫu có chứa các mầm bệnh khác ngoài CMV, có thể xảy ra cạnh tranh khuếch đại hoặc phản ứng chéo với mục tiêu, gây ra kết quả xét nghiệm IVD không chính xác.

### 9.1.3 Phạm vi tuyến tính

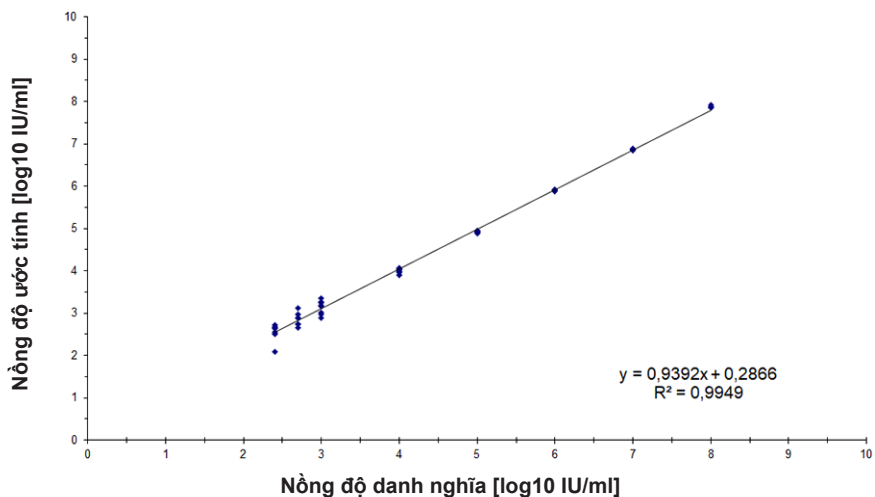
Để xác định phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 pha loãng bậc liên tiếp CMV trong huyết tương để tạo ra các nồng độ từ 1,00E+08 đến 2,00E+02 IU/ml đã được xét nghiệm:

- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ 1,00E+08 đến 1,00E+06 IU/ml đã được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate).
- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ 1,00E+05 đến 2,00E+02 IU/ml đã được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate).

Phân tích được thực hiện dựa trên phương thức hồi quy đa thức.

Phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với việc định lượng CMV trong huyết tương là 2,50E+02–1,00E+08 IU/ml. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng sơ đồ trong hình 16.

### Nồng độ ước tính log10 so với nồng độ danh nghĩa log10 AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



**Hình 16:** Phân tích hồi quy tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các mẫu huyết tương

#### 9.1.4 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (Precision) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá thông qua một danh sách gồm:

- 1 mẫu huyết tương có CMV dương tính cao (1,00E+04 IU/ml)
- 1 mẫu huyết tương có CMV dương tính thấp [1,25E+03 IU/ml (5 x giới hạn định lượng dưới (LLoQ))]
- 1 mẫu huyết tương có CMV âm tính

Mỗi loại mẫu trong danh sách được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate) cho mỗi lần chạy.

5 lần chạy được thực hiện vào 5 ngày khác nhau bằng cách sử dụng kết hợp:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Độ lặp lại (biến động trong lần chạy), biến động giữa các lô và độ tái lập (reproducibility hay biến động tổng số) được xác định dựa trên:

- Giá trị định lượng cho các mẫu có CMV dương tính cao và thấp (xem bảng 19)
- Giá trị chu trình ngưỡng ( $C_q^*$ ) đối với IC trong các mẫu CMV âm tính (xem bảng 20)

\* Lưu rằng cụm từ  $C_q$  được chọn tương đương với cụm từ  $C_t$  ở các máy luân nhiệt khác không phải hệ thống CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad).

**Bảng 19:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của log10 dữ liệu định lượng) đối với các mẫu huyết tương có CMV dương tính cao và thấp

	Mẫu CMV dương tính cao (1,00E+04 IU/ml)	Mẫu CMV dương tính thấp (1,25E+03 IU/ml)
Biến động trong lần chạy	0,84–2,29	2,57–4,57
Biến động giữa các lô	2,65	4,64
Biến động tổng số	2,41	4,19

**Bảng 20:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của giá trị  $C_q$ ) đối với IC trong các mẫu huyết tương có CMV âm tính

	IC
Biến động trong lần chạy	0,12–0,37
Biến động giữa các lô	0,22
Biến động tổng số	0,42

### 9.1.5 Tổng tỷ lệ thất bại

Độ mạnh (robustness) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá thông qua xét nghiệm 30 mẫu huyết tương có CMV âm tính từ các cá nhân hiến tặng được bổ sung CMV tạo ra nồng độ cuối cùng 3 x LoD (6,45E+02 IU/ml). Tất cả (30/30) mẫu xét nghiệm dương tính trong kênh nhận diện huỳnh quang đặc hiệu cho CMV (FAM™).

### 9.1.6 Tồn đọng (Carry over)

Tồn đọng (Carry over) chủ yếu là một rủi ro phụ thuộc vào quy trình và không phụ thuộc vào xét nghiệm PCR sử dụng. Đối với quy trình AltoStar®, AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 được sử dụng làm model mẫu. Khả năng nhiễm chéo do tồn đọng từ các mẫu dương tính cao được đánh giá bằng cách xét nghiệm xen kẽ parvovirus B19 dương tính cao (1,00E+07 IU/ml) và các mẫu âm tính (n = 44 trên mỗi lần chạy; 2 lần chạy) sử dụng AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Không quan sát thấy sự tồn đọng, tức là tất cả các mẫu âm tính với parvovirus B19 đều cho kết quả âm tính.

### 9.1.7 Hiệu quả lâm sàng

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đã được đánh giá trong một nghiên cứu so sánh với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay đã có CE. Khi đó, 142 mẫu huyết tương từ quá trình theo dõi định kỳ CMV đã được xét nghiệm song song bằng kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.

kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay đã được sử dụng kết hợp với hệ thống VERSANT® kPCR Molecular System (Siemens).

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được sử dụng kết hợp với AltoStar® Purification Kit 1.5 và AltoStar® Internal Control 1.5 trên AltoStar® AM16 và hệ thống CFX96™ DW Dx.

Đối với phân tích định tính, tất cả các mẫu có kết quả không hợp lệ cho một hoặc cả hai xét nghiệm cũng như các mẫu có kết quả định lượng dưới LoD của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.

Kết quả cho 125 mẫu còn lại được hiển thị tại bảng 21.

**Bảng 21:** Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán đối với CMV trong các mẫu huyết tương

		kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay	
		DƯƠNG TÍNH	ÂM TÍNH
AltoStar® CMV PCR Kit 1.5	DƯƠNG TÍNH	81	0
	ÂM TÍNH	0	44

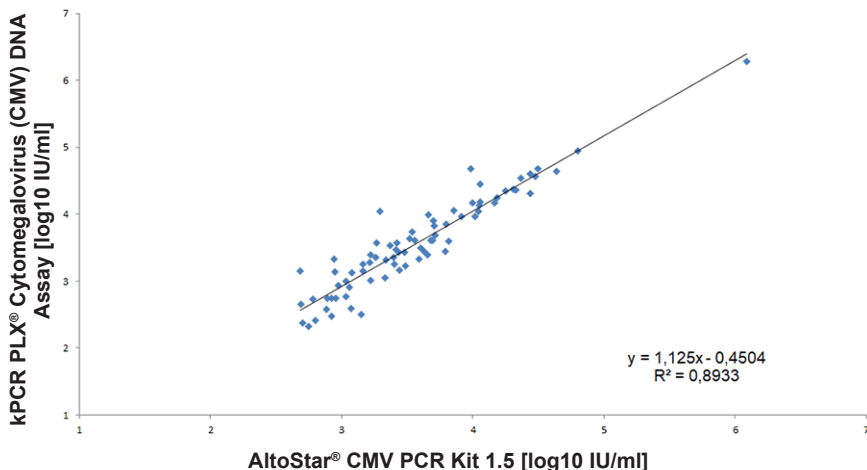
Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 so với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay là 100 %.

Đối với tương quan định lượng, các mẫu có kết quả xét nghiệm âm tính với một hoặc cả hai xét nghiệm và mẫu có kết quả định lượng thấp hơn giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.



Kết quả của 77 mẫu còn lại được sử dụng cho mối tương quan định lượng bằng phân tích hồi quy tuyến tính (xem hình 17).

### kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



Hình 17: Phân tích hồi quy tuyến tính các kết quả thu được với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay (tham khảo) và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Có mối tương quan rất tốt giữa các kết quả định lượng thu được bằng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 và kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay [hệ số tương quan  $R = 0,95$  ( $R^2 = 0,89$ )].

## 9.2 Máu toàn phần

### 9.2.1 Độ nhạy phân tích

Để xác định LoD pha loãng bậc liên tiếp theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO phiên bản 1 về các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid cho Cytomegalovirus ở người (Mã NIBSC: 09/162) trong máu toàn phần để tạo ra các nồng độ từ 1,00E+04 đến 1,00E+01 IU/ml.

Mỗi mức pha loãng (dilution) được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate), trong 3 lần chạy khác nhau (tổng n = 24 cho mỗi mức pha loãng) được sử dụng kết hợp với:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Dữ liệu từ tất cả các lần chạy được tổng hợp và thực hiện phân tích xác suất để xác định giá trị LoD 95 %.

**Bảng 22:** Kết quả xét nghiệm PCR sử dụng cho việc tính toán độ nhạy phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Nồng độ [IU/ml]	N [tổng số]	N [dương tính]	Tỉ lệ biểu hiện [%]
1,00E+04	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
3,50E+02	24	24	100
2,00E+02	24	21	88
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	5	21
2,00E+01	24	2	8
1,00E+01	24	3	13

LoD của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 để phát hiện CMV trong máu toàn phần là 305 IU/ml (khoảng tin cậy 95 %: 128–495 IU/ml).

### 9.2.2 Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đảm bảo thông qua sự lựa chọn kỹ lưỡng các oligonucleotide (đoạn mồi và đầu dò). Các oligonucleotide được kiểm tra bằng cách phân tích so sánh trình tự với các trình tự công khai có sẵn để đảm bảo rằng sẽ phát hiện được tất cả các kiểu gen liên quan đến CMV.

Để xác nhận độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 các thí nghiệm sau được thực hiện (xem các chương 9.2.2.1 Mẫu âm tính đến 9.2.2.3 Phản ứng chéo).

### 9.2.2.1 Mẫu âm tính

31 mẫu máu toàn phần âm tính với CMV từ các cá nhân hiến tặng được xét nghiệm với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Tất cả (31/31) mẫu được xét nghiệm đều âm tính với DNA đặc hiệu cho CMV và dương tính với IC. Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với các mẫu máu toàn phần là  $\geq 95\%$ .

### 9.2.2.2 Chất gây nhiễu

Để đánh giá ảnh hưởng của các chất nội sinh và ngoại sinh có khả năng gây nhiễu đối với hoạt động của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5, làm tăng mạnh chất đã chọn trong các mẫu máu toàn phần. Các mẫu máu toàn phần này có chứa CMV ở nồng độ  $3 \times \text{LoD}$  ( $9,15\text{E}+02$  IU/ml),  $1,00\text{E}+04$  IU/ml và không CMV tương ứng.

Kết quả thu được đối với các mẫu có chứa chất có khả năng gây nhiễu được so sánh với kết quả được tạo ra đối với các mẫu máu toàn phần không chứa chất gây nhiễu. Mỗi mẫu được xử lý trên 3 bản sao (replicate).

Chưa quan sát thấy tình trạng nhiễu đối với các mẫu chứa hàm lượng cao:

- Chất nội sinh
  - Bilirubin
  - Hemoglobin
  - DNA bộ gen người
  - Albumin huyết thanh người
  - Chất béo trung tính
  
- Chất ngoại sinh
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

**THẬN TRỌNG**

Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.

**9.2.2.3 Phản ứng chéo**

Vì các mầm bệnh được tìm thấy trong huyết tương và trong máu toàn phần là tương tự nhau nên không có thêm mầm bệnh nào được xét nghiệm đối với máu toàn phần. Để tìm hiểu về cách đánh giá phản ứng chéo, xem chương 9.1.2.3 Phản ứng chéo.

**THẬN TRỌNG**

Trường hợp mẫu có chứa các mầm bệnh khác ngoài CMV, có thể xảy ra cạnh tranh khuếch đại hoặc phản ứng chéo với mục tiêu, gây ra kết quả xét nghiệm IVD không chính xác.

**9.2.3 Phạm vi tuyến tính**

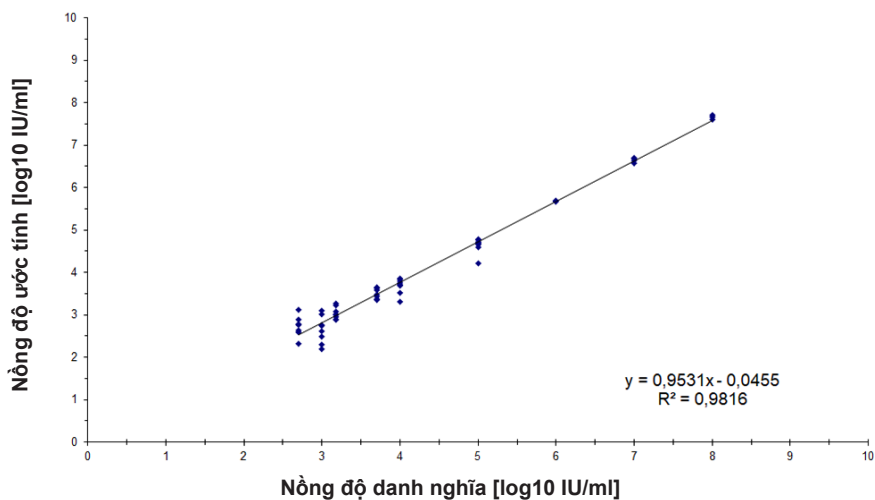
Để xác định phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 pha loãng bậc liên tiếp CMV trong máu toàn phần để tạo ra các nồng độ từ  $1,00E+08$  đến  $5,00E+02$  IU/ml đã được xét nghiệm:

- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ  $1,00E+08$  đến  $1,00E+06$  IU/ml đã được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate).
- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ  $1,00E+05$  đến  $5,00E+02$  IU/ml đã được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate).

Phân tích được thực hiện dựa trên phương thức hồi quy đa thức.

Phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với việc định lượng CMV trong máu toàn phần là từ  $5,00E+02$ – $1,00E+08$  IU/ml. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng sơ đồ trong hình 18.

### Nồng độ ước tính log10 so với nồng độ danh nghĩa log10 AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



**Hình 18:** Phân tích hồi quy tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các mẫu máu toàn phần

#### 9.2.4 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (Precision) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá thông qua một danh sách gồm:

- 1 mẫu máu toàn phần có CMV dương tính cao ( $1,00E+04$  IU/ml)
- 1 mẫu máu toàn phần có CMV dương tính thấp [ $2,50E+03$  IU/ml ( $5 \times$  LLoQ)]
- 1 mẫu máu toàn phần có CMV âm tính

Mỗi loại mẫu trong danh sách được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate) cho mỗi lần chạy.

5 lần chạy được thực hiện vào 5 ngày khác nhau bằng cách sử dụng kết hợp:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Độ lặp lại (biến động trong lần chạy), biến động giữa các lô và độ tái lập (reproducibility hay biến động tổng số) được xác định dựa trên:

- Giá trị định lượng cho các mẫu có CMV dương tính cao và thấp (xem bảng 23)
- Giá trị chu trình ngưỡng ( $C_q^*$ ) đối với IC trong các mẫu CMV âm tính (xem bảng 24)

\* Lưu rằng cụm từ  $C_q$  được chọn tương đương với cụm từ  $C_t$  ở các máy luân nhiệt khác không phải hệ thống CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad).

**Bảng 23:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của log10 dữ liệu định lượng) đối với các mẫu máu toàn phần có CMV dương tính cao và thấp

	Mẫu CMV dương tính cao (1,00E+04 IU/ml)	Mẫu CMV dương tính thấp (2,50E+03 IU/ml)
Biến động trong lần chạy	1,17–2,66	1,65–4,11
Biến động giữa các lô	3,22	4,33
Biến động tổng số	4,55	6,13

**Bảng 24:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của giá trị  $C_q$ ) đối với IC trong các mẫu máu toàn phần có CMV âm tính

	IC
Biến động trong lần chạy	0,09–0,67
Biến động giữa các lô	1,06
Biến động tổng số	1,08

### 9.2.5 Tổng tỷ lệ thất bại

Độ mạnh (robustness) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá bằng cách xét nghiệm 30 mẫu máu toàn phần có CMV âm tính từ các cá nhân hiến tặng được bổ sung CMV tạo ra nồng độ cuối cùng 3 x LoD (9,15E+02 IU/ml). Tất cả (30/30) mẫu xét nghiệm dương tính trong kênh nhận diện huỳnh quang đặc hiệu cho CMV (FAM™).

### 9.2.6 Tồn đọng (Carry over)

Tham khảo chương 9.1.6 Tồn đọng (Carry over).

### 9.2.7 Hiệu quả lâm sàng

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đã được đánh giá trong một nghiên cứu so sánh với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay đã có CE. Khi đó, 79 mẫu máu toàn phần từ quá trình theo dõi định kỳ CMV đã được xét nghiệm song song với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5.

Xét nghiệm kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay được sử dụng kết hợp với VERSANT® kPCR Molecular System (Siemens).

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được sử dụng kết hợp với AltoStar® Purification Kit 1.5 và AltoStar® Internal Control 1.5 trên AltoStar® AM16 và hệ thống CFX96™ DW Dx.

Đối với phân tích định tính, tất cả các mẫu có kết quả không hợp lệ cho một hoặc cả hai xét nghiệm cũng như các mẫu có kết quả định lượng dưới LoD của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.

Kết quả cho 74 mẫu còn lại được hiển thị tại bảng 25.



**Bảng 25:** Kết quả đánh giá đặc nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán đối với CMV trong các mẫu máu toàn phần

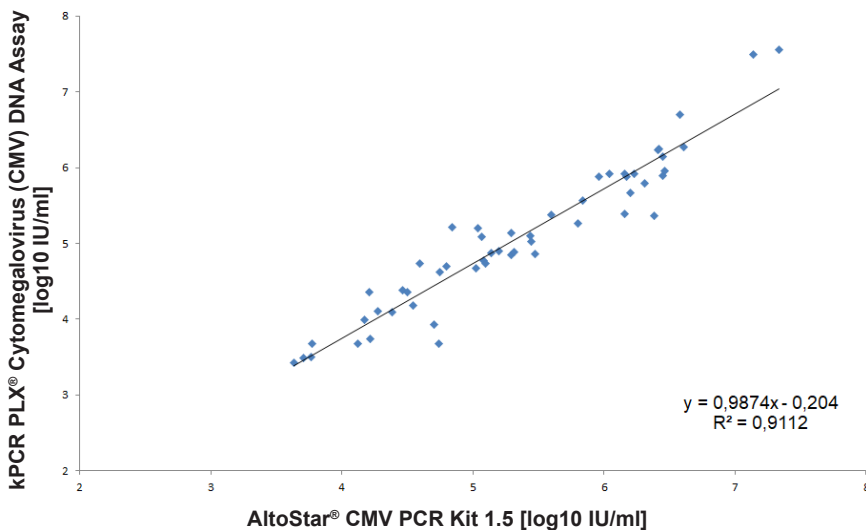
		kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay	
		DƯƠNG TÍNH	ÂM TÍNH
AltoStar® CMV PCR Kit 1.5	DƯƠNG TÍNH	54	0
	ÂM TÍNH	0	20

Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 so với kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay là 100 %.

Đối với tương quan định lượng, các mẫu có kết quả xét nghiệm âm tính với một hoặc cả hai xét nghiệm và mẫu có kết quả định lượng thấp hơn giới hạn định lượng dưới (LLoQ) của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.

Kết quả của 53 mẫu còn lại được sử dụng cho mỗi tương quan định lượng bằng phân tích hồi quy tuyến tính (xem hình 19).

### kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



**Hình 19:** Phân tích hồi quy tuyến tính các kết quả thu được bằng kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay (tham khảo) và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Có mối tương quan rất tốt giữa các kết quả định lượng thu được bằng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 và kPCR PLX® Cytomegalovirus (CMV) DNA Assay [hệ số tương quan  $R = 0,95$  ( $R^2 = 0,91$ )].

## 9.3 Nước tiểu

### 9.3.1 Độ nhạy phân tích

Để xác định LoD pha loãng bậc liên tiếp theo Tiêu chuẩn Quốc tế của WHO phiên bản 1 về các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đối với Cytomegalovirus ở người (Mã NIBSC: 09/162) trong nước tiểu để tạo ra các nồng độ từ  $5,00E+03$  đến  $1,00E+01$  IU/ml.

Mỗi mức pha loãng (dilution) được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate), trong 3 lần chạy khác nhau (tổng n = 24 cho mỗi mức pha loãng) được sử dụng kết hợp với:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Dữ liệu từ tất cả các lần chạy được tổng hợp và thực hiện phân tích xác suất để xác định giá trị LoD 95 %.

**Bảng 26:** Kết quả xét nghiệm PCR sử dụng cho việc tính toán độ nhạy phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Nồng độ [IU/ml]	N [tổng số]	N [dương tính]	Tỉ lệ biểu hiện [%]
5,00E+03	24	24	100
2,50E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
5,00E+02	24	22	92
2,50E+02	24	21	88
2,00E+02	24	19	79
1,00E+02	24	13	54
5,00E+01	24	13	54
1,00E+01	24	6	25

LoD của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 để phát hiện CMV trong nước tiểu là 711 IU/ml (khoảng tin cậy 95 %: 420–1.625 IU/ml).

### 9.3.2 Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đảm bảo thông qua sự lựa chọn kỹ lưỡng các oligonucleotide (đoạn mồi và đầu dò). Các oligonucleotide được kiểm tra bằng cách phân tích so sánh trình tự với các trình tự công khai có sẵn để đảm bảo rằng sẽ phát hiện được tất cả các kiểu gen liên quan đến CMV.

Để xác nhận độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 các thí nghiệm sau được thực hiện (xem các chương 9.3.2.1 Mẫu âm tính đến 9.3.2.3 Phản ứng chéo).

#### 9.3.2.1 Mẫu âm tính

35 mẫu nước tiểu âm tính với CMV từ các cá nhân hiến tặng được xét nghiệm với AltoStar® CMV PCR Kit 1.5. Tất cả (35/35) mẫu được xét nghiệm đều âm tính với DNA đặc hiệu cho CMV và dương tính với IC. Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với các mẫu nước tiểu là  $\geq 95\%$ .

#### 9.3.2.2 Chất gây nhiễu

Để đánh giá ảnh hưởng của các chất nội sinh và ngoại sinh có khả năng gây nhiễu đối với hiệu suất của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 làm tăng mạnh chất đã chọn trong các mẫu nước tiểu. Các mẫu nước tiểu này có chứa CMV ở nồng độ lần lượt là  $3 \times \text{LoD}$  ( $2,13\text{E}+03$  IU/ml),  $5,00\text{E}+04$  IU/ml và không CMV tương ứng.

Kết quả thu được đối với các mẫu có chứa chất có khả năng gây nhiễu được so sánh với kết quả được tạo ra đối với mẫu nước tiểu không chứa chất gây nhiễu. Mỗi mẫu được xử lý trên 3 bản sao (replicate).

Chưa quan sát thấy tình trạng nhiễu đối với các mẫu chứa hàm lượng cao:

- Chất nội sinh
  - Bilirubin
  - Đường Glucose
  - Albumin huyết thanh người
  - Máu toàn phần người

- Chất ngoại sinh
  - Azathioprine
  - Cyclosporine
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

#### THẬN TRỌNG



Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.

### 9.3.2.3 Phản ứng chéo

Độ đặc hiệu phân tích của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 liên quan đến phản ứng chéo với các tác nhân gây bệnh khác thay vì liên quan đến phản ứng chéo với các tác nhân gây bệnh khác CMV được đánh giá. Ngoài các mầm bệnh được xét nghiệm đối với các mẫu huyết tương và máu toàn phần (xem chương 9.1.2.3 Phản ứng chéo và 9.2.2.3 Phản ứng chéo), các mầm bệnh có khả năng được tìm thấy trong nước tiểu nền mẫu (ví dụ: mầm bệnh liên quan đến nhiễm trùng đường tiết niệu và các bệnh lây truyền qua đường tình dục) đã được xét nghiệm.

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 không phản ứng chéo với bất kỳ mầm bệnh nào sau đây:

- *Chlamydia trachomatis*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Mycoplasma hominis*
- *Proteus mirabilis*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Ureaplasma parvum*

### THẬN TRỌNG



Trường hợp mẫu có chứa các mầm bệnh khác ngoài CMV, có thể xảy ra cạnh tranh khuếch đại hoặc phản ứng chéo với mục tiêu, gây ra kết quả xét nghiệm IVD không chính xác.

### 9.3.3 Phạm vi tuyến tính

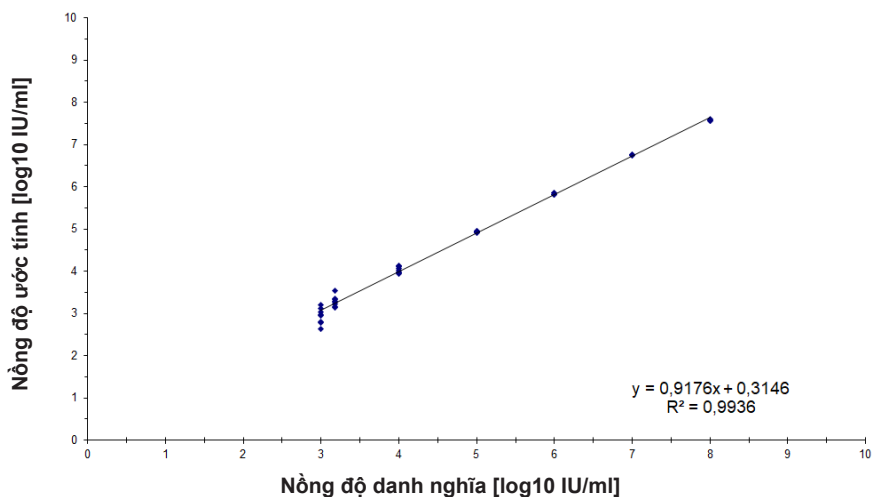
Để xác định phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 pha loãng bậc liên tiếp CMV trong nước tiểu trong khoảng từ  $1,00E+08$  đến  $2,00E+02$  IU/ml đã được xét nghiệm:

- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ  $1,00E+08$  đến  $1,00E+06$  IU/ml đã được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate).
- Các mức pha loãng (dilution) có nồng độ từ  $1,00E+05$  đến  $2,00E+02$  IU/ml đã được xét nghiệm trên 8 bản sao (replicate).

Phân tích được thực hiện dựa trên phương thức hồi quy đa thức.

Phạm vi tuyến tính của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đối với việc định lượng CMV trong nước tiểu là  $1,00E+03$ – $1,00E+08$  IU/ml. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng sơ đồ trong hình 20.

### Nồng độ ước tính log<sub>10</sub> so với nồng độ danh nghĩa log<sub>10</sub> AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



Hình 20: Phân tích hồi quy tuyến tính AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 với các mẫu nước tiểu

#### 9.3.4 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (Precision) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá thông qua một danh sách gồm:

- 1 mẫu nước tiểu có CMV dương tính cao (5,00E+04 IU/ml)
- 1 mẫu nước tiểu có CMV dương tính thấp [5,00E+03 IU/ml (5 x LLoQ)]
- 1 mẫu nước tiểu có CMV âm tính

Mỗi loại mẫu trong danh sách được xét nghiệm trên 4 bản sao (replicate) cho mỗi lần chạy.

5 lần chạy được thực hiện vào 5 ngày khác nhau bằng cách sử dụng kết hợp:

- 3 lô AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lô AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 hệ thống AltoStar® AM16
- 3 hệ thống CFX96™ DW Dx

Độ lặp lại (biến động trong lần chạy), biến động giữa các lô và độ tái lập (reproducibility hay biến động tổng số) được xác định dựa trên:

- Giá trị định lượng cho các mẫu có CMV dương tính cao và thấp (xem bảng 27)
- Giá trị chu trình ngưỡng ( $C_q^*$ ) đối với IC trong các mẫu CMV âm tính (xem bảng 28)

\* Lưu rằng cụm từ  $C_q$  được chọn tương đương với cụm từ  $C_t$  ở các máy luân nhiệt khác không phải hệ thống CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad).

**Bảng 27:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của log10 dữ liệu định lượng) đối với các mẫu nước tiểu có CMV dương tính cao và thấp

	Mẫu CMV có dương tính cao (5,00E+04 IU/ml)	Mẫu CMV dương tính thấp với (5,00E+03 IU/ml)
Biến động trong lần chạy	0,09–0,67	0,47–0,85
Biến động giữa các lô	2,89	3,69
Biến động tổng số	2,29	2,90

**Bảng 28:** Dữ liệu về độ đúng (CV % của giá trị  $C_q$ ) đối với IC trong các mẫu nước tiểu có CMV âm tính

	IC
Biến động trong lần chạy	0,20–0,36
Biến động giữa các lô	0,40
Biến động tổng số	1,00



### 9.3.5 Tổng tỷ lệ thất bại

Độ mạnh (robustness) của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được đánh giá thông qua xét nghiệm 30 mẫu nước tiểu có CMV âm tính từ các cá nhân hiến tặng được bổ sung CMV tạo ra nồng độ cuối cùng 3 x LoD (2,13E+03 IU/ml). Tất cả (30/30) mẫu xét nghiệm dương tính trong kênh nhận diện huỳnh quang đặc hiệu cho CMV (FAM™).

### 9.3.6 Tồn đọng (Carry over)

Tham khảo chương 9.1.6 Tồn đọng (Carry over).

### 9.3.7 Hiệu quả lâm sàng

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đã được đánh giá trong một nghiên cứu so sánh với CMV R-gene® kit (bioMérieux) đã có CE. Khi đó, 87 mẫu nước tiểu từ quá trình theo dõi định kỳ CMV đã được xét nghiệm song song với CMV R-gene® kit (bioMérieux) và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5:

CMV R-gene® kit (bioMérieux) đã được sử dụng kết hợp với MagNA Pure® 96 DNA and Viral Nucleic Acid Small Volume Kit (Roche) trên hệ thống MagNa Pure® 96 (Roche).

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 được sử dụng kết hợp với AltoStar® Purification Kit 1.5 và AltoStar® Internal Control 1.5 trên AltoStar® AM16 và hệ thống CFX96™ DW Dx.

Đối với phân tích định tính, tất cả các mẫu có kết quả không hợp lệ cho một hoặc cả hai xét nghiệm cũng như các mẫu có kết quả định lượng dưới LoD của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.

Kết quả cho 80 mẫu còn lại được hiển thị tại bảng 29.

**Bảng 29:** Kết quả đánh giá đặc nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán đối với CMV trong các mẫu nước tiểu

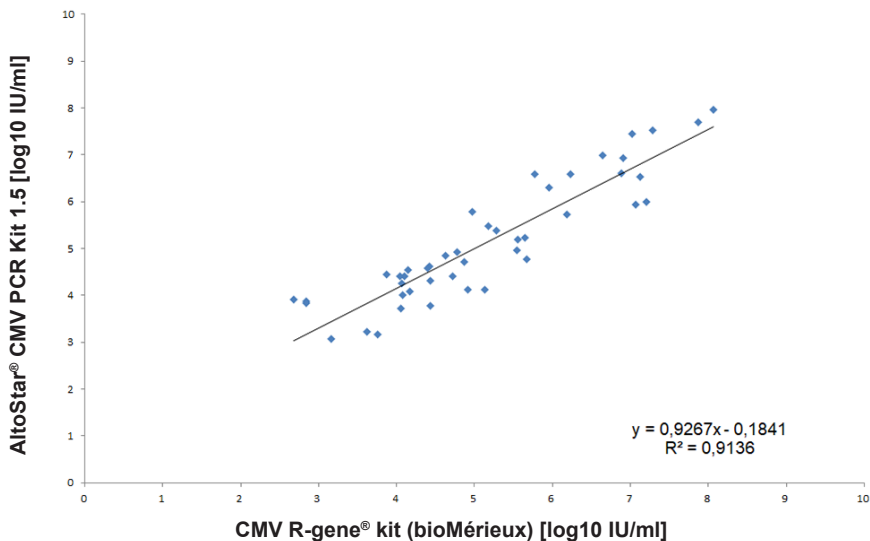
		CMV R-gene® kit (bioMérieux)	
		DƯƠNG TÍNH	ÂM TÍNH
AltoStar® CMV PCR Kit 1.5	DƯƠNG TÍNH	54	0
	ÂM TÍNH	1	25

Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 so với CMV R-gene® kit (bioMérieux) lần lượt là 98% và 100%.

Đối với tương quan định lượng, các mẫu có kết quả xét nghiệm âm tính với một hoặc cả hai xét nghiệm và mẫu có kết quả định lượng thấp hơn giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của một hoặc cả hai xét nghiệm đều bị loại trừ.

Kết quả của 45 mẫu còn lại được sử dụng cho tương quan định lượng bằng phân tích hồi quy tuyến tính (xem hình 21).

### CMV R-gene® kit (bioMérieux) và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



**Hình 21:** Phân tích hồi quy tuyến tính các kết quả thu được với CMV R-gene® kit (bioMérieux) (tham khảo) và AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

Có mối tương quan rất tốt giữa các kết quả định lượng thu được bằng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 và CMV R-gene® kit (bioMérieux) [hệ số tương quan  $R = 0,96$  ( $R^2 = 0,91$ )].

## 10. Thải bỏ

Xử lý chất thải nguy hại và chất thải sinh học tuân thủ các quy định của địa phương và quốc gia. Không được để các thành phần sản phẩm còn sót lại và chất thải xâm nhập vào cống rãnh, các dòng nước hoặc đất.

### THẬN TRỌNG



Luôn coi mẫu là vật liệu lây nhiễm và nguy hiểm (về mặt sinh học) theo quy trình an toàn phòng thí nghiệm. Khi xảy ra sự cố tràn vật liệu mẫu, ngay lập tức sử dụng chất khử trùng thích hợp. Xử lý các vật liệu bị ô nhiễm như các vật liệu nguy hiểm sinh học.

### THẬN TRỌNG



Việc xử lý chất thải nguy hại và chất thải sinh học phải tuân theo các quy định của địa phương và quốc gia để tránh ô nhiễm môi trường.

### LƯU Ý



Đĩa PCR phải được thải bỏ ở trạng thái đã được niêm phong vì không được phép tháo tấm dán niêm phong đĩa PCR.

## 11. Kiểm soát chất lượng

Theo Hệ thống Quản lý Chất lượng được chứng nhận EN ISO 13485 của Altona Diagnostics GmbH, mỗi lô hàng của AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 đều được kiểm tra dựa trên các thông số kỹ thuật đã ấn định trước để đảm bảo chất lượng sản phẩm nhất quán.

## 12. Hỗ trợ kỹ thuật

Để được hỗ trợ, khách hàng vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics:

**Email:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

**Số điện thoại:** +49-(0)40-5480676-0

### LƯU Ý



Mọi sự cố nghiêm trọng xảy ra liên quan đến sản phẩm này sẽ được báo cáo cho Altona Diagnostics và cơ quan có thẩm quyền tại quốc gia của bạn.

## 13. Tổng quan tài liệu

- [1] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.
- [2] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.
- [3] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.
- [4] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1<sup>st</sup> WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.

## 14. Nhãn hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm

4s3™ (4titude); AltoStar®, kPCR PLX® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); R-gene® (bioMérieux); CFX96™, CFX Manager™, Hard-Shell® (Bio-Rad); Rotor-Gene® (QIAGEN); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler®, MagNA Pure® (Roche); FAM™, JOE™, MicroAmp™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Tên, nhãn hiệu đã đăng ký v.v. được sử dụng trong tài liệu này, ngay cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy, không được coi là không được pháp luật bảo vệ.
















AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 là bộ dụng cụ chẩn đoán đã có CE theo chỉ thị chẩn đoán *in vitro* 98/79/EC của Châu Âu.




Sản phẩm chưa được Bộ Y tế Canada cấp phép và chưa được FDA cho phép hoặc phê duyệt.

Không hiện diện ở tất cả các quốc gia.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; bảo lưu mọi quyền.

## 15. Biểu tượng

Biểu tượng	Giải thích
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>in vitro</i>
	Mã số thương phẩm toàn cầu
	Mã lô
	Nội dung
	Màu nắp
	Số catalogue
	Mã số
	Thành phần
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng
	Chứa đủ cho "n" xét nghiệm/phản ứng (rxns)
	Giới hạn nhiệt độ
	Hạn sử dụng
	Nhà sản xuất
	Thận trọng
	Số vật liệu

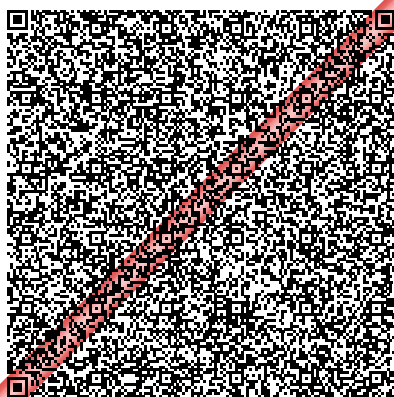
Biểu tượng	Giải thích
	Phiên bản
	Lưu ý
	Có chứa vật liệu sinh học có nguồn gốc từ động vật



## 16. Giao thức xét nghiệm cho phần mềm AltoStar® Connect và thông tin để tích hợp LIMS

Mã vạch 2D trong hình 22 được sử dụng để cài đặt giao thức xét nghiệm mới nhất để sử dụng AltoStar® CMV PCR Kit 1.5 trên AltoStar® AM16. Mã vạch chỉ có thể được quét dưới dạng in. Có thể quét mã vạch trực tiếp từ sách hướng dẫn hoặc in ra một tờ giấy riêng. Lưu ý rằng kích thước của bản in ảnh hưởng đến khả năng quét của mã vạch. Đảm bảo tỷ lệ kích thước là 100 %. Khi quét, hướng máy quét đến vạch đỏ trên mã vạch. Để biết thông tin chi tiết về việc quản lý các giao thức xét nghiệm, vui lòng tham khảo chương tương ứng trong hướng dẫn sử dụng phần mềm AltoStar® Connect. Để biết thông tin về tích hợp LIMS, xem bảng 31.

AltoStar® CMV PCR Kit 1.5



**Protocol Version:**

**1**

Checksum: 0B711EB83E2AD6C9D564A61B4318725D910F9622

**Hình 22:** Mã vạch giao thức thử nghiệm cho AltoStar® CMV PCR Kit 1.5

**Bảng 30:** Nhật ký thay đổi đối với giao thức xét nghiệm

Phiên bản giao thức	Phát hành bản cập nhật
1	Phiên bản đầu tiên

**Bảng 31:** Thông tin tích hợp LIMS (Hệ thống quản lý thông tin trong phòng thí nghiệm)

Cách sử dụng	Dữ liệu
Yêu cầu xét nghiệm (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar® CMV PCR Kit 1.5
Kết quả xét nghiệm (CFX96™ DW Dx → LIMS)	IU/ml
Kết quả xét nghiệm của kênh màu 1 (CFX96™ DW Dx → LIMS)	CMV
Kết quả xét nghiệm của kênh màu 2 (CFX96™ DW Dx → LIMS)	Internal Control

Đối với LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes - Tên và Mã số định danh quan sát logic), vui lòng tham khảo trang web của altona Diagnostics GmbH ([www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)) hoặc liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của altona Diagnostics (xem chương 12. Hỗ trợ kỹ thuật).

## 17. Lịch sử chỉnh sửa

**Bảng 32:** Lịch sử chỉnh sửa

Mã định danh	Ngày cấp [tháng / năm]	Các chỉnh sửa
MAN-AS0021540- VI-S01	08/2021	Phát hành lần đầu

**trang để trống có chủ ý**

**trang để trống có chủ ý**

**trang để trống có chú ý**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

**[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)**

