

Instrukcja użytkowania

RealStar[®] **CMV PCR Kit 1.0**

09/2023 PL

RealStar®

CMV PCR Kit 1.0

Do stosowania z

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

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

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



021013



96



09 2023



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

Spis treści

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | Przeznaczenie zestawu..... | 6 |
| 2. | Składniki zestawu | 6 |
| 3. | Przechowywanie | 6 |
| 4. | Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone..... | 7 |
| 5. | Podstawowe informacje | 8 |
| 6. | Opis wyrobu | 9 |
| 6.1 | Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym | 11 |
| 7. | Ostrzeżenia i środki ostrożności | 12 |
| 8. | Procedura | 13 |
| 8.1 | Pobieranie, transport i przechowywanie próbek | 13 |
| 8.2 | Przygotowanie próbki..... | 14 |
| 8.3 | Przygotowanie mieszaniny master mix | 15 |
| 8.4 | Konfiguracja reakcji..... | 17 |
| 9. | Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym | 18 |
| 9.1 | Ustawienia..... | 18 |
| 9.2 | Detektory fluorescencji (barwniki) | 18 |
| 9.3 | Profil temperatury i pomiar barwnika..... | 19 |
| 10. | Analiza danych | 19 |
| 10.1 | Prawidłowość badań diagnostycznych..... | 20 |
| 10.1.1 | Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)..... | 20 |
| 10.1.2 | Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)..... | 20 |
| 10.1.3 | Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe) | 21 |
| 10.1.4 | Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)..... | 21 |
| 10.2 | Manualna analiza | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 10.2.1 Analiza jakościowa | 22 |
| 10.2.2 Analiza ilościowa | 22 |
| 11. Charakterystyka działania testu | 24 |
| 11.1 Czułość analityczna | 24 |
| 11.1.1 Czułość analityczna bez uwzględnienia izolacji kwasu nukleinowego | 24 |
| 11.1.2 Czułość analityczna dla próbek osocza z EDTA | 26 |
| 11.1.3 Czułość analityczna dla próbek krwi pełnej z EDTA | 28 |
| 11.2 Swistość analityczna | 29 |
| 11.3 Zakres liniowości | 30 |
| 11.4 Precyzja | 33 |
| 11.5 Ocena diagnostyczna | 34 |
| 11.5.1 Typ próbki: Osocze ludzkie z EDTA | 34 |
| 11.5.2 Typ próbki: Krew pełna z EDTA | 36 |
| 12. Ograniczenia | 37 |
| 13. Kontrola jakości | 38 |
| 14. Pomoc techniczna | 38 |
| 15. Literatura | 38 |
| 16. Znaki towarowe i zastrzeżenia | 39 |
| 17. Wyjaśnienie symboli | 40 |

1. Przeznaczenie zestawu

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla wirusa cytomegalii (CMV) w osoczu ludzkim z EDTA i krwi pełnej z EDTA.

2. Składniki zestawu

| Kolor zakrętki | Składnik | Liczba fiolek | Objętość [µl/fiolkę] |
|----------------|-------------------|---------------|----------------------|
| Niebieski | Master A | 8 | 60 |
| Fioletowy | Master B | 8 | 180 |
| Zielony | Internal Control | 1 | 1000 |
| Czerwony | QS1-4* | 4 | 250 |
| Biały | Water (PCR grade) | 1 | 500 |

* Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 zawiera standardy ilościowe (QS) dla czterech różnych stężeń (patrz rozdział 6. Opis wyrobu)

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

3. Przechowywanie

- Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 jest wysyłany w suchym lodzie. Składniki zestawu powinny być dostarczone w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub próbówki zostały uszkodzone podczas transportu należy skontaktować się z altona Diagnostics GmbH w celu uzyskania pomocy.
- Po odbiorze wszystkie składniki należy przechowywać w temperaturze od -25 °C do -15 °C.

- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania odczynników Master (więcej niż dwukrotnie), ponieważ może to negatywnie wpływać to na właściwości użytkowe testu. Odczynniki powinny być zamrażane w porcjach, jeśli nie zostaną użyte na raz.
- Przechowywanie w temperaturze +2 °C do +8 °C nie powinno przekroczyć 2 godzin.
- Mieszaniny reakcyjne Master A i Master B należy chronić przed światłem.

4. Materiały i urządzenia wymagane, ale niedołączone

- Odpowiednie urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym (patrz rozdział 6.1 Urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym)
- Odpowiedni system lub zestaw do izolacji kwasu nukleinowego (patrz rozdział 8.2 Przygotowanie próbki)
- Wirówka z rotorem na próbki reakcyjne o objętości 2 ml
- Wirówka z rotorem na mikropłytki, w przypadku używania płytek reakcyjnych z 96 studzienkami
- Wyrząsarka
- Odpowiednie płytki reakcyjne z 96 studzienkami lub próbki reakcyjne z odpowiednim zamknięciem (optycznym)
- Pipety (regulowane)
- Końcówki do pipet z filtrami do jednorazowego użytku
- Rękawiczki bezpudrowe do jednorazowego użytku

UWAGA



Należy upewnić się, że wszystkie użyte urządzenia zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i są konserwowane zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producenta.

UWAGA

Zalecane jest użycie rotora z 72 studzienkami z odpowiednimi probówkami reakcyjnymi o objętości 0,1 ml w przypadku użycia Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) lub Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Podstawowe informacje

Ludzki wirus cytomegalii (CMV) należy do rodziny *Herpesviridae* podrodziny *Betaherpesvirinae*. Wirus składa się z kapsydu o symetrii ikosaedralnej, liniowego, dwuniciowego genomu o długości ok 230 tysięcy par zasad, otaczającej kapsyd osłonki oraz zewnętrznej otoczki.

Wirus CMV występuje na całym świecie i powoduje zakażenia u ludzi w każdym wieku, bez sezonowych lub epidemicznych modeli przenoszenia. Seroprewalencja wirusa CMV wzrasta wraz z wiekiem we wszystkich populacjach i wynosi od 40 do 100%. Podobnie jak w przypadku zakażeń innymi wirusami herpes, zakażenie pierwotne wirusem CMV powoduje trwałe lub utajone zakażenie. Reaktywacja wirusa może wystąpić w odpowiedzi na różne czynniki, w szczególności immunosupresję. Większość zakażeń wirusem CMV ma charakter bezobjawowy lub brak jest objawów klinicznych, jednak czym zakażenia wrodzone lub u pacjentów z obniżoną odpornością mogą przebiegać objawowo i mieć poważny charakter. U pacjentów o obniżonej odporności, na przykład po przeszczepach, zakażonych wirusem HIV lub z nowotworami, zakażenie lub reaktywacja wirusa CMV może stać się zagrażającą życiu chorobą rozsianą.

6. Opis wyrobu

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do wykrywania i oznaczania ilościowego DNA właściwego dla wirusa cytomegalii (CMV) w osoczu ludzkim z EDTA i krwi pełnej z EDTA.

Test zawiera heterologiczny system amplifikacji (kontrola wewnętrzna) umożliwiający identyfikację ewentualnej inhibicji PCR oraz weryfikację integralności odczynników wchodzących w skład zestawu.

Technologia PCR w czasie rzeczywistym wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w celu amplifikacji sekwencji docelowych oraz sondy właściwe dla tych sekwencji docelowych w celu wykrycia amplifikowanego DNA. Sondy są oznakowane fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym i barwnikiem tłumiącym.

Sondy właściwe dla DNA CMV są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla kontroli wewnętrznej (IC) jest oznakowana fluoroforem JOE™.

Użycie sond związanych z różnymi barwnikami umożliwia równoległe wykrywanie DNA właściwego dla CMV oraz IC w odpowiadającym im kanałach detekcji urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym.

Badanie obejmuje dwa procesy w pojedynczym oznaczeniu:

- Amplifikacja PCR sekwencji docelowej DNA i kontroli wewnętrznej
- Równoczesna detekcja amplikonów PCR przez sondy oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 obejmuje:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4*
- Water (PCR grade)

* Standardy ilościowe (QS) o czterech różnych stężeniach

Internal Control = kontrola wewnętrzna

Water (PCR grade) = woda (klasa PCR)

Mieszaniny reakcyjne Master A i Master B zawierają wszystkie składniki (roztwór buforowy PCR, polimerazę DNA, sól magnezu, startery i sondy) umożliwiające jak również związaną z PCR amplifikację i detekcję DNA właściwego dla CMV oraz IC w konfiguracji pojedynczej reakcji.

Standardy ilościowe zawierają znormalizowane stężenia DNA właściwego dla CMV. Zostały one skalibrowane w stosunku do pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla technik amplifikacji kwasu nukleinowego ludzkiego wirusa cytomegalii (1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques) (NIBSC code: 09/162). Standardy ilościowe mogą być stosowane indywidualnie jako kontrole pozytywne lub łącznie w celu utworzenia **krzywej wzorcowej**, która z kolei może być użyta do wyznaczenia stężenia DNA właściwego dla CMV w próbce.

Standardy ilościowe mają następujące stężenia:

| Standard ilościowy | Stężenie [IU/μl] |
|--------------------|---------------------|
| QS1 | 1,00E+04 |
| QS2 | 1,00E+03 |
| QS3 | 1,00E+02 |
| QS4 | 1,00E+01 |

6.1 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 został poddany walidacji dla osocza ludzkiego z EDTA w połączeniu z zestawem QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) dla następujących urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 został poddany walidacji dla osocza ludzkiego z EDTA i krwi pełnej z EDTA w połączeniu z systemem VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare) dla następujących urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym:

- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

Należy uważnie zapoznać się z treścią instrukcji użytkowania przed użyciem wyrobu.

- Przed pierwszym użyciem sprawdzić wyrób i jego składniki pod kątem:
 - Integralności
 - Kompletności pod względem liczby, typu i stopnia napełnienia (patrz rozdział 2. Składniki zestawu)
 - Prawidłowych etykiet
 - Zamarznięcia w momencie dostawy
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Próbkę należy zawsze traktować jako zakaźne i/lub zagrożenie biologiczne zgodnie z procedurami bezpieczeństwa laboratorium.
- Podczas pracy z próbkami należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku, fartuch laboratoryjny i ochronę oczu.
- Unikać skażenia próbek oraz składników zestawu mikroorganizmami i nukleazami (DNaza/RNaza).
- Zawsze używać końcówek pipet jednorazowego użytku, nieskażonych DNazą/RNazą, z barierą chroniącą przed aerozolami.
- Podczas pracy ze składnikami zestawu należy zawsze nosić ochronne rękawiczki bezpudrowe jednorazowego użytku.
- Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do (i) przygotowania próbek, (ii) konfiguracji reakcji oraz (iii) amplifikacji/detekcji. Praca w laboratorium powinna przebiegać jednokierunkowo. Zawsze nosić rękawiczki jednorazowe w każdym obszarze i zmieniać je przed przejściem do innego obszaru.
- Materiały eksploatacyjne i wyposażenie należy przypisać do danego obszaru roboczego i nie przenosić ich pomiędzy poszczególnymi obszarami.

- Materiał pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od wszystkich innych składników zestawu.
- Nie otwierać płytek/probówek reakcyjnych po amplifikacji, aby uniknąć zanieczyszczenia amplikonami.
- Dodatkowe kontrole mogą wymagać oznaczenia zgodnie z wytycznymi lub wymaganiami przepisów lokalnych, stanowych i/lub federalnych lub organizacji akredytujących.
- Nie należy sterylizować probówek reakcyjnych po badaniu PCR w autoklawie, ponieważ nie zapewnia to degradacji amplifikowanego kwasu nukleinowego i wiąże się z ryzykiem skażenia obszaru laboratorium.
- Nie stosować składników zestawu po upływie ich terminu ważności.
- Utylizować odpady (próbki i testy) zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

8. Procedura

8.1 Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Krew należy pobrać z użyciem dostępnych w sprzedaży standardowych systemów pobierania krwi z EDTA (np. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner lub równoważne). Zawartość probówek należy wymieszać bezpośrednio po pobraniu próbki. Próbkę krwi należy transportować w stanie schłodzonym (2–8 °C). Materiał należy transportować zgodnie z przepisami lokalnymi i krajowymi dotyczącymi transportu materiału biologicznego.

Podczas uzyskiwania osocza z EDTA, krew pełną z EDTA należy odwirować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta systemu pobierania próbek w ciągu 24 godzin od pobrania. Osocze ludzkie z EDTA i krew pełną z EDTA należy przechowywać w temperaturze od 2 do 8 °C nie dłużej niż przez 14 dni (Abdul-Ali i inni 2011).

8.2 Przygotowanie próbki

DNA wyizolowane z ludzkiego osocza z EDTA lub krwi pełnej z EDTA stanowi materiał wyjściowy dla zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0.

Jakość wyizolowanego DNA ma istotny wpływ na działanie całego systemu testowego. Należy upewnić się, że stosowany system izolacji kwasu nukleinowego jest kompatybilny z technologią PCR w czasie rzeczywistym.

Następujące metody izolacji kwasu nukleinowego zostały podane walidacji do użycia z zestawem RealStar® CMV PCR Kit 1.0 dla **osocza ludzkiego z EDTA**:

- Zestaw QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)
- System VERSANT® kPCR Molecular System SP w połączeniu z zestawem VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

W celu zwiększenia czułości system, protokół badania dla zestawu QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) można zmodyfikować zgodnie ze specyfikacjami podanymi w tabeli 3: Modyfikacje protokołu badania dla zestawu QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) (patrz rozdział 11.1.2 Czułość analityczna dla próbek osocza z EDTA).

W przypadku korzystania z procedury przygotowania próbki opartej na metodzie kolumnkowej oraz buforach płuczących zawierających alkohol etylowy, przed etapem elucji kwasu nukleinowego zalecane jest wykonanie dodatkowego etapu odwirowania przez 10 minut przy prędkości 17000 x g (~ 13000 obr./min.) z użyciem nowej próbówki zbiorczej.

Następujące metody izolacji kwasu nukleinowego zostały podane walidacji do użycia z zestawem RealStar® CMV PCR Kit 1.0 dla **krwi pełnej z EDTA**:

- System VERSANT® kPCR Molecular System SP w połączeniu z zestawem VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

Dla próbek krwi pełnej z EDTA, protokół przygotowania próbki dla odczynników VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents (SMN 10629800 i 10629801) wymaga następujących modyfikacji: Próbkę krwi pełnej z EDTA należy wymieszać z buforem PRE w stosunku 1:1 (350 µl + 350 µl), zamiast stosunku podanego w instrukcji użytkowania.

OSTROŻNIE



Jeśli w systemie przygotowania próbki wykorzystywane są bufony płuczące zawierające alkohol etylowy, należy upewnić się, że przed etapem elucji kwasu nukleinowego usunięte zostały wszelkie pozostałości alkoholu etylowego. Alkohol etylowy jest silnym inhibitorem badania PCR w czasie rzeczywistym.

OSTROŻNIE



Użycie nośnikowego RNA jest krytyczne dla wydajności izolacji i stabilności izolowanego kwasu nukleinowego.

Dodatkowe informacje i pomoc techniczną w zakresie obróbki wstępnej i przygotowania próbki można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

8.3 Przygotowanie mieszaniny master mix

Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki powinny być całkowicie rozmrożone, wymieszane (poprzez użycie pipety lub wytrząsanie) i krótko odwirowane.

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 zawiera heterologiczną IC, która może być stosowana jako kontrola inhibicji PCR lub jako kontrola dla procedury przygotowania próbki (izolacja kwasu nukleinowego) i jako kontrola inhibicji PCR.

- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna jest używana jako kontrola inhibicji PCR, a nie jako kontrola procedury przygotowania próbki, mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującym schematem pipetowania:

| Liczba reakcji (rxns) | 1 | 12 |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 15 µl | 180 µl |
| Kontrola wewnętrzna | 1 µl | 12 µl |
| Objętość mieszaniny master mix | 21 µl | 252 µl |

- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna jest używana jako kontrola procedury przygotowania próbki i jako kontrola inhibicji PCR, dodaj IC podczas procedury izolacji kwasu nukleinowego.
- ▶ Niezależnie od metody/systemu stosowanego do izolacji kwasu nukleinowego, **nie należy** dodawać IC bezpośrednio do próbki. IC należy zawsze dodawać do mieszaniny próbki i buforu lizującego. Objętość dodawanego IC zawsze zależy wyłącznie od objętości eluatu. Stanowi ona 10% objętości eluatu. Na przykład, jeśli kwas nukleinowy ma być eluowany w 60 µl buforu elucyjnego lub wody, do mieszaniny próbki i buforu lizującego należy dodać 6 µl IC na próbkę.
- ▶ Jeśli kontrola wewnętrzna została dodana podczas procedury przygotowania próbki, mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującą procedurą schematu pipetowania:

| Liczba reakcji (rxns) | 1 | 12 |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| Master A | 5 µl | 60 µl |
| Master B | 15 µl | 180 µl |
| Objętość mieszaniny master mix | 20 µl | 240 µl |

OSTROŻNIE

Jeśli kontrola wewnętrzna (IC) została dodana podczas procedury przygotowania próbki, co najmniej kontrola negatywna powinna zawierać IC.

OSTROŻNIE

Niezależnie od metody/systemu stosowanego do izolowania kwasu nukleinowego, nie należy dodawać IC bezpośrednio do próbki.

8.4 Konfiguracja reakcji

- ▶ Przenieś pipetą 20 µl mieszaniny master mix do odpowiednich studzienek w 96-studzienkowej płytce optycznej lub do odpowiedniej optycznej probówki reakcyjnej.
- ▶ Dodaj 10 µl próbki (eluat z izolacji kwasu nukleinowego) lub 10 µl roztworu kontrolnego (standard ilościowy, kontrola pozytywna lub negatywna).

| Konfiguracja reakcji | |
|---------------------------|--------------|
| Mieszanina master mix | 20 µl |
| Próbka lub kontrola | 10 µl |
| Objętość całkowita | 30 µl |

- ▶ Należy upewnić się, że dla każdego badania używana jest co najmniej jedna kontrola pozytywna (QS) oraz jedna kontrola negatywna.
- ▶ Do celów oznaczenia ilościowego, należy użyć wszystkie (QS1 do QS4).
- ▶ Dokładnie wymieszaj próbki i kontrole z mieszaniną master mix poprzez pipetowanie w górę i w dół.
- ▶ Zamknij 96-studzienkową płytkę, używając odpowiednich pokrywek lub optycznej folii do zamykania płytek oraz zamknij probówki reakcyjne, używając odpowiednich pokrywek.

- ▶ Odwiruj 96-studzienkową płytkę w wirówce kompatybilnej z mikroplatką przez 30 sekund z prędkością około 1000 x g (~ 3000 obr./min).

9. Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym

Szczegółowe informacje dotyczące konfiguracji i programowania różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkowania danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące programowania i używania zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

9.1 Ustawienia

- ▶ Wybierz następujące ustawienia:

| Ustawienia | |
|------------------|----------|
| Objętość reakcji | 30 µl |
| Szybkość zmiany | Domyślna |
| Wzorzec pasywny | ROX™ |

9.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- ▶ Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

| Sekwencja docelowa | Nazwa detektora | Barwnik reporterowy | Barwnik tłumiący |
|--------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| DNA właściwe dla CMV | CMV | FAM™ | (Brak) |
| Kontrola wewnętrzna (IC) | IC | JOE™ | (Brak) |

9.3 Profil temperatury i pomiar barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiar barwnika:

| | Etap | Liczba cykli | Pomiar | Temperatura [°C] | Czas [min:s] |
|--------------|--------------------------|--------------|--------|------------------|--------------|
| Denaturacja | Utrzymywanie temperatury | 1 | - | 95 | 10:00 |
| Amplifikacja | Zmiany cykliczne | 45 | - | 95 | 00:15 |
| | | | tak | 58 | 01:00 |

10. Analiza danych

Szczegółowe informacje dotyczące analizy danych dla określonych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkowania danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące analizy danych generowanych przez zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 dla różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej (patrz rozdział 14. Pomoc techniczna).

10.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

Jakościowe badanie diagnostyczne jest **prawidłowe**, jeśli zostały spełnione następujące warunki kontrolne:

| ID kontroli | Kanał detekcji | |
|-------------------------|----------------|------|
| | FAM™ | JOE™ |
| Kontrola pozytywna (QS) | + | +/-* |
| Kontrola negatywna | - | + |

* Obecność lub brak sygnału w kanale JOE™ nie jest istotna dla prawidłowości badania.

10.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)

Jakościowe badanie diagnostyczne jest **nieprawidłowe**, jeśli (i) nie zostało ukończone, lub (ii) jakiegokolwiek warunki kontrolne dla **prawidłowego** badania diagnostycznego nie zostały spełnione.

W przypadku **nieprawidłowego** badania diagnostycznego, badanie należy powtórzyć z użyciem pozostałego oczyszczonego kwasu nukleinowego lub rozpocząć ponownie z użyciem pierwotnych próbek.

10.1.3 Prawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

Ilościowe badanie diagnostyczne jest **prawidłowe**, jeśli zostały spełnione wszystkie warunki kontrolne dla **prawidłowego jakościowego** badania diagnostycznego [patrz rozdział 10.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne (jakościowe)]. Wyniki **oznaczenia ilościowego** są **prawidłowe**, jeśli utworzona **krzywa wzorcowa** osiąga następującą wartość parametru kontrolnego:

| Parametr kontrolny | Prawidłowa wartość |
|--------------------|--------------------|
| R^2 | > 0,98 |

UWAGA



Nie wszystkie urządzenia do PCR w czasie rzeczywistym wskazują wartość R^2 . Szczegółowe informacje można znaleźć w instrukcji użytkowania danego urządzenia.

10.1.4 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne (ilościowe)

Ilościowe badanie diagnostyczne jest **nieprawidłowe**, jeśli (i) nie zostało ukończone, lub (ii) jakiegokolwiek warunki kontrolne dla **prawidłowego ilościowego** badania diagnostycznego nie zostały spełnione.

W przypadku **nieprawidłowego** badania diagnostycznego, badanie należy powtórzyć z użyciem pozostałego oczyszczonego kwasu nukleinowego lub rozpocząć ponownie z użyciem pierwotnych próbek.

10.2 Manualna analiza

10.2.1 Analiza jakościowa

| Kanał detekcji | | Analiza |
|----------------|------|---|
| FAM™ | JOE™ | |
| + | + | Wykryto DNA właściwe dla CMV. |
| - | + | Nie wykryto DNA właściwego dla CMV. Próbkę nie zawiera wykrywalnych ilości DNA właściwego dla CMV. |
| - | - | Inhibicja PCR lub nieprawidłowe działanie odczynnika. Powtórzyć oznaczenie z użyciem pierwotnej próbki lub pobrać i wykonać oznaczenie na nowej próbce. |

* Detekcja kontroli wewnętrznej w kanale detekcji JOE™ nie jest wymagana dla wyników pozytywnych w kanale detekcji FAM™. Wysokie stężenie DNA CMV w próbce może powodować osłabienie lub brak sygnału kontroli wewnętrznej.

Oczekiwanym wynikiem pozytywnym dla CMV jest wskaźnik pozytywnych wyników wynoszący 95%, jeśli analizowana próbka zawiera co najmniej 265 IU CMV na ml osocza z EDTA [przedział ufności 95%: 50–2278 IU/ml] oraz 835 IU CMV na ml krwi pełnej z EDTA [przedział ufności 90%: 614 do 1274 IU/ml].

Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

10.2.2 Analiza ilościowa

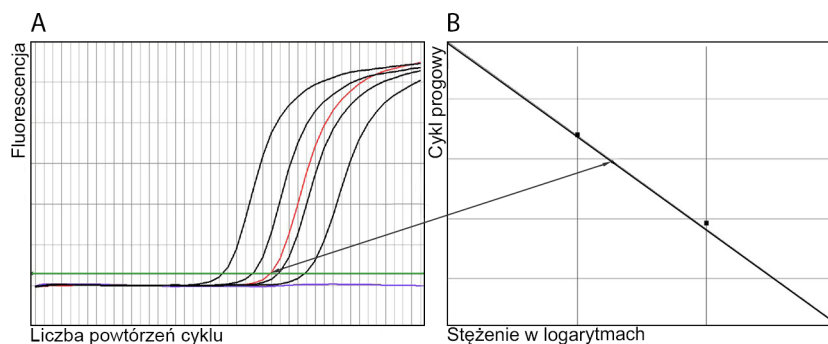
Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 obejmuje cztery standardy ilościowe (QS). W celu utworzenia **krzywej wzorcowej** dla analizy ilościowej, muszą zostać zdefiniowane jako **standardy** o odpowiednich stężeniach (patrz rozdział 6. Opis wyrobu). Użycie **standardów** o odpowiednich stężeniach pozwala na uzyskanie krzywej wzorcowej do analizy ilościowej.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

- C_t = Cykl progowy
 m = Nachylenie
 N_0 = Stężenie początkowe
 b = Punkt przecięcia

Na podstawie krzywej wzorcowej można oznaczyć ilościowo próbki pozytywne o nieznanym stężeniu.

$$N_0 = 10^{(C_t - b) / m}$$



Rysunek 1: Standardy ilościowe (czarne), próbka pozytywna (czerwona) oraz negatywna (niebieska) widoczne na wykresie amplifikacji [A] oraz analiza krzywej wzorcowej [B]

UWAGA



Stężenie „Próbki” jest wskazywane w IU/μl i dotyczy stężenia w eluacie.

W celu wyznaczenia **ładunku wirusa pierwotnej próbki**, należy użyć następującego wzoru:

$$\text{Ładunek wirusa (Próbka) [IU/ml]} = \frac{\text{Objętość (Eluat) [μl]} \cdot \text{ładunek wirusa (Eluat) [IU/μl]}}{\text{Objętość próbki [ml]}}$$

11. Charakterystyka działania testu

Ocena charakterystyki działania bez uwzględnienia wybranej metody izolacji kwasu nukleinowego, została wykonana z użyciem znanej ilości DNA właściwego dla CMV. Ocena charakterystyki działania z uwzględnieniem wybranych metod izolacji kwasu nukleinowego, została wykonana z użyciem pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla technik amplifikacji kwasu nukleinowego dla ludzkiego wirusa cytomegalii (1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques) (NIBSC code: 09/162).

11.1 Czułość analityczna

Czułość analityczna (granica wykrywalności - LoD) zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 została zdefiniowana jako stężenie cząstek DNA właściwego dla CMV, które mogą być wykryte przy 95% odsetek wyników pozytywnych. Czułość analityczna została wyznaczona z uwzględnieniem i bez uwzględnienia wybranej metody izolacji kwasu nukleinowego.

11.1.1 Czułość analityczna bez uwzględnienia izolacji kwasu nukleinowego

Seria rozcieńczeń DNA właściwego dla CMV została przygotowana w zakresie stężeń od 1,21 IU/μl do nominalnego stężenia 0,0004 IU/μl oraz analizowana z użyciem zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 w połączeniu z następującymi urządzeniami do PCR w czasie rzeczywistym:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Badanie zostało wykonane w okresie dwóch dni przy co najmniej ośmiu powtórzeniach na stężenie. Wyniki zostały opracowane na podstawie analizy probit.

Tabela 1: Wyniki badania PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej [Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)]

| Stężenie początkowe [IU/μl] | Liczba powtórzeń | Liczba wyników pozytywnych | Odsetek pozytywnych wyników [%] |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1,2100 | 16 | 16 | 100 |
| 0,3826 | 16 | 16 | 100 |
| 0,1210 | 16 | 13 | 81 |
| 0,0383 | 16 | 4 | 25 |
| 0,0121 | 16 | 2 | 13 |
| 0,0038 | 16 | 0 | 0 |
| 0,0012 | 16 | 0 | 0 |
| 0,0004 | 16 | 0 | 0 |

Tabela 2: Czułość analityczna wyznaczona z użyciem analizy probit dla różnych urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym

| Urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym | Granica wykrywalności [95%] | Przedział ufności [95%] |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| ABI Prism® 7500 Fast SDS | 0,668 IU/μl | 0,323–2,258 IU/μl |
| Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex | 0,249 IU/μl | 0,160–0,644 IU/μl |
| LightCycler® 480 Instrument II | 0,238 IU/μl | 0,149–0,624 IU/μl |
| Mx 3005P™ QPCR System | 0,257 IU/μl | 0,150–0,704 IU/μl |
| CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System | 0,943 IU/μl | 0,083–16,884 IU/μl |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | 0,702 IU/μl | 0,396–1,985 IU/μl |

11.1.2 Czułość analityczna dla próbek osocza z EDTA

Czułość analityczna, z uwzględnieniem wybranej metody izolacji kwasu nukleinowego dla próbek osocza z EDTA, została wyznaczona z użyciem serii rozcieńczeń pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla technik amplifikacji kwasu nukleinowego dla ludzkiego wirusa cytomegalii (1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques) (NIBSC code: 09/162) w zakresie stężeń od 316 IU/ml do nominalnego stężenia 0,03 IU/ml w próbkach negatywnych CMV w osoczu z EDTA.

W okresie dwóch dni, izolacji kwasu nukleinowego z użyciem zestawu QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) poddano osiem podwielokrotności każdego stężenia. Protokół badania dla zestawu QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) został zmodyfikowany zgodnie z następującą tabelą.

Tabela 3: Modyfikacje protokołu badania dla zestawu QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

| | Protokół QIAGEN [μl] | Modyfikacja [μl] |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Próbka | 200 | 400 |
| Proteaza | 25 | 50 |
| Bufor lizujący (AL) | 200 | 400 |
| Etanol ¹ (bezwzgl.) | 250 | 500 |
| Bufor płuczący (AW1) | 500 | 700 |
| Bufor płuczący (AW2) | 500 | 700 |
| Etanol ² (bezwzgl.) | 500 | 700 |

¹ dodane do mieszaniny próbki/buforu lizującego

² Etap przemywania 3

Każdy eluat poddano analizie z użyciem zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 w połączeniu z następującymi urządzeniami do PCR w czasie rzeczywistym:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Wyniki zostały opracowane na podstawie analizy probit.

Tabela 4: Wyniki badania PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej próbek osocza ludzkiego z EDTA [LightCycler® 480 Instrument II (Roche)]

| Stężenie początkowe [IU/ml] | Liczba powtórzeń | Liczba wyników pozytywnych | Odsetek pozytywnych wyników [%] |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 316,23 | 16 | 16 | 100 |
| 100,00 | 16 | 15 | 94 |
| 31,62 | 16 | 13 | 81 |
| 10,00 | 16 | 6 | 38 |
| 3,16 | 16 | 3 | 19 |
| 1,00 | 16 | 0 | 0 |
| 0,32 | 16 | 0 | 0 |
| 0,10 | 16 | 0 | 0 |
| 0,03 | 16 | 0 | 0 |

Tabela 5: Czulość analityczna wyznaczona z użyciem analizy probit dla różnych urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym

| Urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym | Granica wykrywalności [95%] | Przedział ufności [95%] |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| ABI Prism® 7500 Fast SDS | 92,10 IU/ml | 46,94–288,29 IU/ml |
| Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex | 106,29 IU/ml | 51,05–356,08 IU/ml |
| LightCycler® 480 Instrument II | 91,38 IU/ml | 49,16–271,13 IU/ml |
| Mx 3005P™ QPCR System | 85,14 IU/ml | 45,09–256,13 IU/ml |
| CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System | 116,32 IU/ml | 59,67–357,43 IU/ml |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | 264,98 IU/ml | 49,54–2278,24 IU/ml |

11.1.3 Czulość analityczna dla próbek krwi pełnej z EDTA

Czulość analityczna, z uwzględnieniem wybranej metody izolacji kwasu nukleinowego dla próbek krwi pełnej z EDTA, została wyznaczona z użyciem serii rozcieńczeń pierwszego międzynarodowego wzorca Światowej Organizacji Zdrowia dla technik amplifikacji kwasu nukleinowego dla ludzkiego wirusa cytomegalii (1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques) (NIBSC code: 09/162) w zakresie stężeń od 10000 IU/ml do nominalnego stężenia 20 IU/ml w próbkach negatywnych CMV w krwi pełnej z EDTA.

Podczas trzech niezależnych badań, osiem podwielokrotności każdego stężenia zostało poddane izolacji kwasu nukleinowego z użyciem systemu VERSANT® kPCR Molecular System SP w połączeniu z zestawem VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare).

Wyniki zostały opracowane na podstawie analizy probit.

Tabela 6: Wyniki badania PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej dla próbek krwi pełnej z EDTA [VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)]

| Stężenie początkowe [IU/ml] | Liczba powtórzeń | Liczba wyników pozytywnych | Odsetek pozytywnych wyników [%] |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 10000 | 24 | 24 | 100 |
| 3162 | 24 | 24 | 100 |
| 1500 | 24 | 24 | 100 |
| 1000 | 24 | 24 | 100 |
| 750 | 24 | 22 | 92 |
| 500 | 24 | 20 | 83 |
| 250 | 24 | 16 | 67 |
| 100 | 24 | 10 | 42 |
| 20 | 22 | 1 | 5 |

Tabela 7: Czułość analityczna dla próbek krwi pełnej z EDTA wyznaczona metodą analizy probit z użyciem systemu VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)

| Urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym | Granica wykrywalności [95%] | Przedział ufności [90%] |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| VERSANT® kPCR Molecular System AD | 835 IU/ml | 614–1274 IU/ml |

11.2 Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 jest zapewniona poprzez precyzyjny wybór oligonukleotydów (starterów i sond). Oligonukleotydy zostały sprawdzone metodą analizy porównania sekwencji wobec sekwencji dostępnych publicznie w celu zapewnienia wykrywania wszystkich istotnych genotypów CMV.

Analizie z użyciem zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 poddano ponad sto różnych próbek osocza ludzkiego z EDTA z wynikiem negatywnym dla CMV oraz ponad trzydzieści różnych próbek krwi pełnej z EDTA z wynikiem negatywnym dla CMV. Żadna z próbek nie wykazała sygnału pozytywnego dla CMV, wszystkie zaś wykazały prawidłowy sygnał IC. Ponadto, swoistość zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 została oceniona na podstawie badania panelu genomowego DNA/RNA wyizolowanego z innych wirusów opryszczki i innych patogenów występujących u pacjentów o obniżonej odporności.

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Wirus opryszczki pospolitej typu 1
- Wirus opryszczki pospolitej typu 2
- Wirus ospy wietrznej i półpaśca
- Wirus Epsteina-Barr
- Ludzki wirus opryszczki typu 6A
- Ludzki wirus opryszczki typu 6B
- Ludzki wirus opryszczki typu 7
- Ludzki wirus opryszczki typu 8
- Ludzki parwovirus typu B19
- Wirus BK
- Wirus JC
- Wirus SV40
- Wirus zapalenia wątroby typu A
- Wirus zapalenia wątroby typu B
- Wirus zapalenia wątroby typu C
- Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1

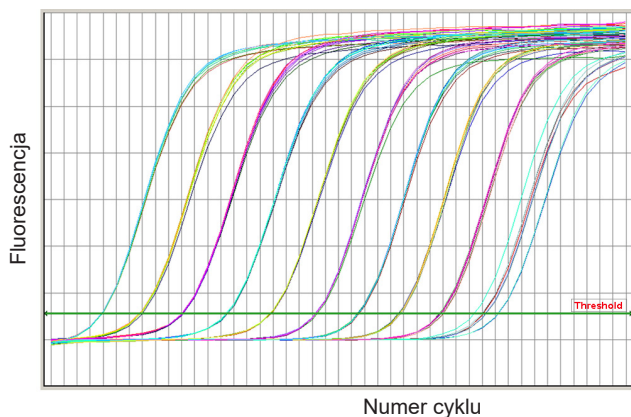
11.3 Zakres liniowości

Zakres liniowości zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 został oceniony poprzez analizę logarytmicznej serii rozcieńczeń DNA właściwego dla CMV (zakres stężeń od 1,21E+09 do 1,21E+00 IU/μl) z użyciem następujących urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

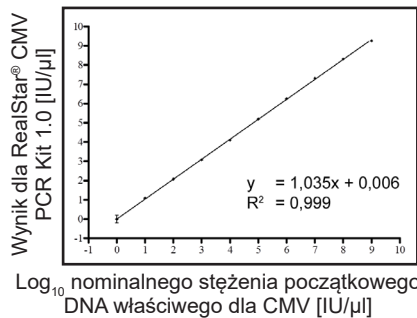
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Wszystkie stężenia zostały poddane analizie w postaci ośmiu powtórzeń na urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym. Zakres liniowości zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 obejmuje co najmniej dziewięć rzędów wielkości dla wszystkich urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym.



Rysunek 2: Krzywe amplifikacji dla ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

A



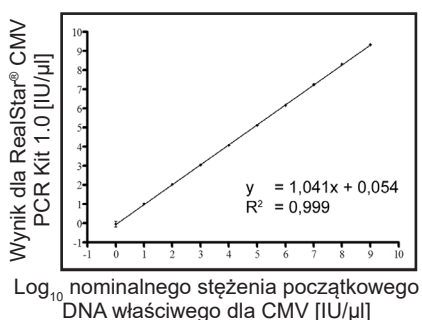
B

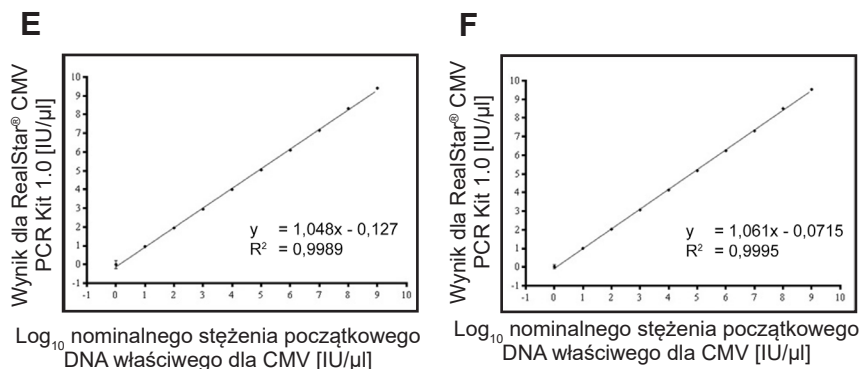


C



D





Rysunek 3: Regresja liniowa analizowanej serii rozcieńczeń dla urządzenia ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) [A], Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene) [B], LightCycler® Instrument 480 II (Roche) [C], Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene™ Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) [D], CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [E] oraz CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [F]

11.4 Precyzja

Precyzja zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 została wyznaczona jako zmienność wewnątrztestowa (zmienność w ramach pojedynczego eksperymentu), zmienność międzytestowa (zmienność pomiędzy różnymi eksperymentami) oraz zmienność międzyseryjna (zmienność pomiędzy różnymi seriami produkcyjnymi). Zmienność całkowita została obliczona przez połączenie wyników 3 analiz.

Dane zmienności są wyrażone w postaci współczynnika zmienności całkowitej. Dane są oparte na analizie ilościowej kontroli pozytywnej o wysokiej wartości (HPC: 121 IU/ μ l) i wartości cyklu progowego (C_t) w postaci kontroli pozytywnej o niskiej wartości (LPC: 1,8 IU/ μ l) oraz kontroli wewnętrznej (IC). Analizie poddano co najmniej osiem powtórzeń na próbkę.

Tabela 8: Precyzja w postaci współczynnika zmienności całkowitej z użyciem różnych urządzeń do PCR w czasie rzeczywistym

| Urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym | Zmienność całkowita / współczynnik zmienności [%] | | |
|---|---|---------------------------------------|---------------------|
| | Kontrola pozytywna o wysokiej wartości | Kontrola pozytywna o niskiej wartości | Kontrola wewnętrzna |
| ABI Prism® 7500 Fast SDS | 4,89 | 1,49 | 0,91 |
| LightCycler® 480 Instrument II | 6,62 | 1,13 | 0,12 |
| Rotor-Gene® 6000 / Q 5/6 plex | 10,79 | 4,20 | 0,65 |
| Mx 3005P™ QPCR System | 19,77 | 1,22 | 0,60 |
| CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System | 5,33 | 1,85 | 1,74 |
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System | 7,28 | 1,59 | 3,36 |

11.5 Ocena diagnostyczna

11.5.1 Typ próbki: Osocze ludzkie z EDTA

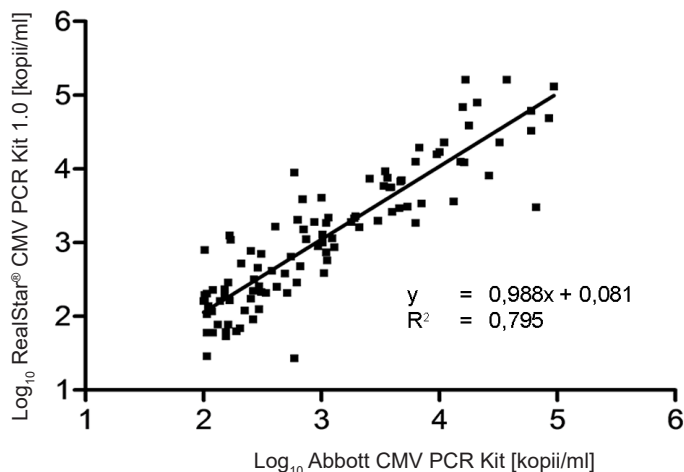
Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 został oceniony w badaniu porównawczym z zestawem Abbott RealTime CMV firmy Abbott Diagnostics z oznaczeniem CE.

124 próbki osocza z EDTA przekazane do rutynowego badania CMV zostały przetworzone w systemie izolacji kwasu nukleinowego m2000sp (Abbott Diagnostics) i poddane analizie z użyciem zestawu Abbott RealTime CMV na urządzeniu m2000rt instrument (Abbott Diagnostics) z oznaczeniem CE. Eluaty DNA były przechowywane w temperaturze -20 °C i poddane ponownej analizie z użyciem zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 z urządzeniem m2000rt Instrument.

Tabela 9: Wyniki oceny czułości i swoistości diagnostycznej

| | | RealStar® CMV PCR Kit 1.0 | |
|---------------------|---|---------------------------|----|
| | | + | - |
| Abbott RealTime CMV | + | 103 | 1 |
| | - | 0 | 20 |

Czułość i swoistość diagnostyczna zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 w porównaniu do testu Abbott RealTime CMV wynosiły odpowiednio 99,04% i 100%.



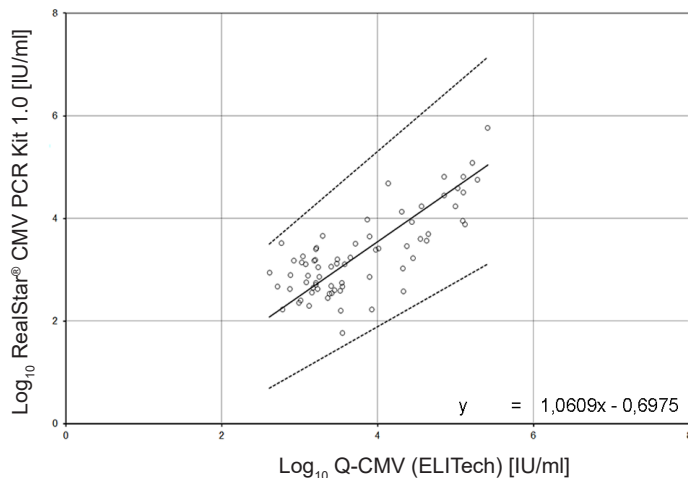
Rysunek 4: Korelacja wyników oznaczenia ilościowego pomiędzy zestawami RealStar® CMV PCR Kit 1.0 i Abbott RealTime CMV (n=102).

Wykazano dobrą korelację pomiędzy wynikami oznaczenia ilościowego zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 i zestawu Abbott RealTime CMV. Nie występują systematyczne lub proporcjonalne różnice pomiędzy dwoma metodami.

11.5.2 Typ próbki: Krew pełna z EDTA

Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 został oceniony w badaniu porównawczym z zestawem Q - CMV Real Time Complete Kit firmy ELITech Molecular Diagnostics z oznaczeniem CE.

90 próbek pełnej krwi z EDTA, dających wynik pozytywny dla CMV z rutynowego monitorowania CMV, zostało poddanych równoległym badaniom z użyciem systemu izolacji kwasu nukleinowego NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux) z zestawem Q - CMV Real Time Complete Kit na urządzeniu ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), z oznaczeniem CE i użyciem systemu kPCR Molecular System (Siemens) z zestawem RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Do celów korelacji ilościowej, wszystkie próbki dające wynik negatywny dla jednego lub obu testów, jak również wyniki odstające, zostały wykluczone z analizy. Wyniki dla pozostałych 71 próbek zostały użyte w dalszej analizie. Korelacja ilościowa wyników została wyznaczona metodą analizy regresji Passinga-Babloka.



Rysunek 5: Korelacja wyników ilościowych pomiędzy zestawem RealStar® CMV PCR Kit 1.0 i zestawem Q-CMV Real Time Complete Kit firmy ELITech Molecular Diagnostics

Wykazano dobrą korelację pomiędzy wynikami oznaczenia ilościowego zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 oraz zestawu Q - CMV Real Time Complete Kit. Nie występują systematyczne lub proporcjonalne różnice pomiędzy dwoma metodami.

12. Ograniczenia

- Optymalne rezultaty mogą być zapewnione wyłącznie w przypadku ścisłego przestrzegania zaleceń instrukcji użytkowania.
- Użycie tego wyrobu jest ograniczone wyłącznie do personelu poinstruowanego i przeszkolonego w technikach PCR w czasie rzeczywistym oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.
- Dobra praktyka laboratoryjna jest kluczowa dla prawidłowego działania testu. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie doprowadzić do zanieczyszczenia składników zestawu i konfiguracji reakcji. Wszystkie odczynniki należy monitorować pod kątem zanieczyszczenia i skażenia. Wszelkie podejrzone odczynniki należy utylizować.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnego działania testu.
- Test nie może być stosowany bezpośrednio na próbce. Przed użyciem tego testu należy zastosować odpowiednie metody izolacji kwasu nukleinowego.
- Obecność inhibitorów PCR (np. heparyny) może powodować nieprawidłowe obniżone oznaczenie ilościowe, lub fałszywie negatywne wyniki.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej genomu CMV objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie mogą spowodować nieprawidłowe oznaczenie ilościowe i/lub niewykrycie obecności patogenów.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki dla zestawu RealStar® CMV PCR Kit 1.0 należy interpretować z uwzględnieniem danych klinicznych i laboratoryjnych.

13. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością według wytycznych Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485, każda partia zestawów RealStar® CMV PCR Kit 1.0 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

14. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
telefon: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Literatura

- [1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.
- [2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.
- [3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.
- [4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.
- [5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Znaki towarowe i zastrzeżenia

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Mx 3005P™ (Stratagene); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. stosowane w niniejszym dokumencie, nawet jeśli nie zostało to wyraźnie oznaczone, są traktowane jako chronione prawnie.

















Zestaw RealStar® CMV PCR Kit 1.0 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.

Wyrób nie posiada licencji Health Canada oraz nie został dopuszczony ani zatwierdzony przez FDA.

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.

17. Wyjaśnienie symboli

| Symbol | Wyjaśnienie |
|---|--|
|  | Wyrób medyczny używany do diagnostyki <i>in vitro</i> |
|  | Numer partii |
|  | Kolor zakrętki |
|  | Numer katalogowy |
|  | Zawartość |
|  | Numer |
|  | Składnik |
|  | Global Trade Item Number |
|  | Zapoznaj się z instrukcją użytkownika |
|  | Zawiera ilość wystarczającą na „n” testów/reakcji (rxns) |
|  | Limit temperatury |
|  | Termin ważności |
|  | Producent |
|  | Ostrożnie: Wyróżnia instrukcje lub procedury operacyjne, których nieprzestrzeganie może stać się przyczyną obrażeń ciała lub może negatywnie wpływać na działanie wyrobu. Skontaktuj się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc. |
|  | Uwaga: Przydatne informacje dla użytkownika, które nie są kluczowe dla wykonywanego zadania. |
|  | Wersja |

Uwagi:

Uwagi:

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

www.altona-diagnostics.com

