НАБІР

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ЦМВ

Кат. №: ***LUA-PCR.CMV.50*** *Дата випуску інструкції:* ***11-07-2022***
Кількість тестів: ***50*** *Версія:* ***0***

Кількісне визначення ДНК CMV (QT) 2-го покоління
ПЛР у реальному часі для кількісного визначення геному CMV

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір для **Кількісного визначення ДНК CMV (QT) 2-го покоління** ПЛР у реальному часі з кодом **LUA-PCR.CMV.50** призначений для кількісного виявлення ДНК Цитомегаловірусу в зразку людини (кров, плазма, амніотична рідина) з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою **Внутрішнього контролю (IC)**.
Аналіз LUA-PCR.CMV.50 був стандартизований відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВОО3 для HCMV (код NIBSC 09/162) для вираження концентрації зразків також у міжнародних одиницях (МО/мл (IU/ml)).
Набір адаптований для використання на Термоциклерах в реальному часі ABI 7500 Sequence Detection System® (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems™*), MX3000P (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene™****), CFX96 (Програмне забезпечення CFX manager версії 1.7, Biorad™***) та приладі для ПЛР у реальному часі серії Rotor-Gene Q, Qiagen (версія програмного забезпечення 2.1.0 Qiagen™*****).

*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applera Corporation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.
**Biorad є зареєстрованою торговою маркою.
***Stratagene є зареєстрованою торговою маркою.
****Qiagen є зареєстрованою торговою маркою.
ТОВ «ЛАБЮЕЙ» не є власником даних зареєстрованих торгових марок.

B. ВСТУП

Цитомегаловірус людини (HCMV) є повсюдно поширеним представником сімейства вірусів герпесу людини.
Клінічні дані вказують на те, що HCMV інфікує різні типи тканин і клітин і, отже, є відповідальним за безліч клінічних ускладнень. Залежно від типу тканини та імунного стану носія, HCMV бере участь у трьох різних способах зараження: гострі інфекції з високопродуктивним зростанням, стійкі інфекції з низьким рівнем реплікації та приховані інфекції, коли вірусне потомство не утворюється. Механізм реактивації значною мірою невідомий, але, здається, тісно пов'язаний із порушенням імунного контролю вірусу. З цієї причини CMV є одним із найпоширеніших умовно-патогенних мікроорганізмів, що ускладнюють догляд за реципієнтами трансплантата; потенційно це є основною причиною захворюваності та смертності.
Маючи лінійний дволанцюговий геном ДНК >230 kb, HCMV є найбільшим представником сімейства вірусів герпесу людини.
У родині HCMV є прототипом підгрупи β-герпесвірусів, до якої входять герпесвіруси 6 і 7.
Лікування CMV-захворювання специфічними противірусними препаратами, такими як ганцикловір і фоскарнет, зменшує тяжкість захворювання та смертність у цих пацієнтів. Були розроблені профілактичні та превентивні противірусні стратегії, які спрямовані на уникнення агресивного лікування встановлених захворювань кінцевих органів.
Кількісна оцінка вірусного навантаження ДНК CMV конкретно визначає прогресування захворювання. Аналіз на основі ПЛР у реальному часі здатний точно кількісно визначити вірусну ДНК без обробки зразків після ПЛР, забезпечуючи швидкі результати та дійсно низький ризик перехресного забруднення досліджуваного зразка.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір LUA-PCR.CMV.50 заснований на аналізі в реальному часі, що використовує специфічні Праймери та Проби.
ДНК СМV, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, ампліфікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Ампліфікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності CMV.
Гетерологічний Внутрішній контроль (IC) служить контролем Екстракції/Ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.
Надається стандартна крива, що дозволяє визначити вірусне навантаження.

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат продукту з кодом LUA-PCR.CMV.50 містить реагенти для 50 тестів.

Компонент	Вміст	LUA-PCR.CMV.50 50 тестів
A **КОД: ALL/MM4** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ**	Майстер-мікс	x 1 флакон/0.825 мл (ml)
B **КОД: CMV/CB** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЖОВТИЙ**	Ліофілізовані Праймери/Проби	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
C **КОД: ALL/C** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ**	MG Вода	x 4 флакони/1.5 мл (ml)
NTC **КОД: ALL/NTC** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ**	Негативний контроль	X 1 флакон/1.5 мл (ml)
STD Кількісний стандарт ($6.0x10^4$ копій/мкл (µl)) **КОД: CMV/STD** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ**	Ліофілізований Кількісний стандарт	x 4 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
I.C. Внутрішній контроль **КОД: ALL/IC** **КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЗЕЛЕНИЙ**	Ліофілізований Внутрішній контроль	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладиш інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом Лабюей може надати реагенти для 25, 100, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент A	x1 флакон/0.4 мл (ml)	x2 флакони/0.825 мл (ml)	x3 флакони/0.825 мл (ml)
2. Компонент B	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
3. Компонент C	x2 флакони/1.5 мл (ml)	x5 флаконів/1.5 мл (ml)	x7 флаконів/1.5 мл (ml)
4. NTC	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)
5. IC	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
6. STD	x2 флакони	x4 флакони	x6 флаконів
7. Інструкція	1	1	1
Кількість тестів	**25**	**100**	**150**
Код	**LUA-PCR.CMV.25**	**LUA-PCR.CMV.100**	**LUA-PCR.CMV.150**

E. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір LUA-PCR.CMV.50 необхідно зберігати при +2…8 °C (°C). Після розчинення Компонент B (кодування CMV/CB) і Компонент IC (кодування ALL/IC) стабільні протягом 1 місяця при -20 °C (°C). Після розчинення Компонент STD (кодований CMV/STD) стабільний протягом 2 тижнів при -20 °C (°C). Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

F. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
2. Набір для екстракції ДНК.
3. MG EtOH.
4. Термоблок.
5. Мікроцентрифуга.

6. Штативи для пробірок.
7. Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
8. Безнуклеазні мікропробірки.
9. 0.2 мл (ml) мікропробірки або мікропланшети для ПЛР, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без тальку.
11. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
12. Абсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(*) Увага: Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі.
7. Компоненти A і B світлочутливі. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не міняли місцями.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками крові/плазми/амніотичної рідини людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти з правильною кількістю (зазначеною на етикетках) Компонента C (кодування: ALL/C), що постачається в наборі.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.
19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
20. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Забір амніотичних рідин необхідно проводити через 16 тижнів від початку вагітності під постійним ультразвуковим контролем. Дотримуючись встановлених і затверджених клінічних рекомендацій.
3. Не спостерігалося впливу внаслідок підготовки зразка з цитратом або EДТА.
   Увага: Гепарин (≥10 МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР.
   Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати зразки пацієнтів із гепарином.
4. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
5. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
6. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
7. Плазму та амніотичну рідину, якщо вони не використані негайно, після збору необхідно зберігати при -20 °.. -80 °C (°C). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -80 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
8. Зразки плазми для екстракції ДНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати при +2-8 °C (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
9. Зразки амніотичної рідини необхідно центрифугувати перед екстракцією ДНК і розчинити в PBS відповідно до загальноприйнятих лабораторних процедур. Зразки амніотичної рідини необхідно транспортувати та зберігати при температурі +2-8 °C (°C) не більше 4 годин. Зразки амніотичної рідини можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
10. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 300 мкл (µl)) і зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
11. Використовуючи заморожені зразки, розморожуйте зразки безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути розпаду нуклеїнової кислоти.
12. Зразки цільної периферичної крові для екстракції ДНК повинні бути зібрані в EDTA згідно з рекомендаціями лабораторії, транспортуватися та зберігатися при +2-8 °C (°C) протягом максимум 3 днів. Не заморожуйте зразки цільної периферичної крові, щоб уникнути лізису клітин і втрати вірусного титру.

I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-мікс:
Компонент A. Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі та коротко центрифугуйте, щоб зібрати весь об'єм.
ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Праймери/Проби:
Компонент B.
- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:
Компонент C. Готовий до використання.

Негативний Контроль:
NTC. Готовий до використання.

Стандартна крива:
STD.
- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований STD з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте безнуклеазні флакони для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення STD 1:10 у Компоненті С (код: ALL/C), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

	Підготовка Стандартної кривої	
STD	**Калібратор 60000 копій/мкл (µl)**	Додайте об'єм Компонента С (код: ALL/C), як написано на етикетці флакона
STD 1	**6000 копій/мкл (µl)**	10 мкл (µl) (STD) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 2	**600 копій/мкл (µl)**	10 мкл (µl) (STD 1) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 3	**60 копій/мкл (µl)**	10 мкл (µl) (STD 2) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 4	**6 копій/мкл (µl)**	10 мкл (µl) (STD 3) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: *Для кількісного визначення зразків в МО/мл (IU/ml) див. Розділ R.*

Внутрішній контроль:
I.C.
- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір LUA-PCR.CMV.50 призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp Viral DNA Mini з кодом: 51306 (QIAGEN), набором NucleoSpin Blood з кодом: 740951 (Macherey Nagel) і в поєднанні з автоматичним приладом для екстракції DIA.FASTEX, набором NA Body Fluid з кодом: D2021 (Chemagen, розповсюджується компанією Dia.Pro) і з автоматичним приладом для екстракції nucliSENS easyMAG. Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.
3. **Термоциклери в режимі реального часу та програмне забезпечення для приладів.** Набір LUA-PCR.CMV.50 призначений для використання тільки в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene), CFX96, програмним забезпеченням CFX manager версія 1.7 (Biorad) та приладом ПЛР у реальному часі серії Rotor-Gene Q, версія програмного забезпечення 2.1.0 (Qiagen).
4. Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не Сталося Поломок І Не Пролито Рідини Всередині Коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (код: ALL/C), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ
Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція ДНК
Крок екстракції геномної ДНК CMV має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Інструменти для ручної екстракції

Матеріал	**Опис**	**Код набору**	**Виробник**
Плазма/Кров/ Амніотична рідина	Nucleospin Blood	740951	MN™
Плазма/Кров/ Амніотична рідина	Набір QIAamp DNA mini®	51306	Qiagen™

Інструмент для автоматичної екстракції

Матеріал	**Опис**	**Код набору**	**Виробник**	**Інструмент**
Плазма/Кров/ Амніотична рідина	Набір NA Body Fluid	D-2021	Chemagen, дистрибується Dia.Pro	**DIA.FASTEX**

Примітка: *Перед виділенням ДНК центрифугувати зразки амніотичних рідин (10 000g, 5 хвилин), видалити супернатант і розчинити осад у 200 мкл (µl) стерильного PBS.*

Зразок	Встановлений протокол	Пропозиції наборів	Код	Виробник	Інструмент
Кров	Загальний протокол	NucliSENS Лізуючий Буфер	200292	Biomerieux	**NucliSENS easyMAG**
		NucliSENS easyMAG Лізуючий Буфер	280134		
		NucliSENS easyMAG Екстракційний Буфер 1	280130		
		NucliSENS easyMAG Екстракційний Буфер 2	280131		
		NucliSENS easyMAG Екстракційний Буфер 3	280132		
		NucliSENS easyMAG Magnetic Silica	280133		

Виділення ДНК повинно проводитися тільки згідно з інструкцією, наданою виробником (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro, Biomerieux).

Важлива примітка: У процедурах екстракції необхідно суворо використовувати наступні об'єми:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм елюювання мкл (µl)
Nucleospin Blood	200	100
Набір QIAamp DNA mini®	200	100
Набір NA Body Fluid	400	100
Система NucliSENS easyMAG (Загальний протокол)	100	55

ДНК, зібрану із зразків, не використану під час аналізу, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

Важлива примітка: *IC набору LUA-PCR.CMV.50 можна використовувати в процедурі ізоляції як контроль екстракції.*

Значення Внутрішнього Контролю Ct використовується для оцінки того, чи була процедура екстракції ДНК виконана правильно (див. розділ Q).

Для цього застосування

- Набір Nucleospin Blood та QIAamp DNA mini: ***Додайте 5 мкл (µl) I.C. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.***

- Набір NABody Fluid: ***Додайте 5 мкл (µl) I.C. до зразка (протокол крові) або до буфера для лізису та суміші зразків (протокол плазми) і продовжуйте, дотримуючись інструкцій, наданих виробником Набору для екстракції.***

- Система NucliSENS easyMAG: ***Додайте 5 мкл (µl) I.C. до зразка після етапу лізису і перед додаванням двоокису кремнію (загальний протокол) або додайте 55 мкл (µl) I.C. безпосередньо в пробірку з двоокисом кремнію (550 мкл (µl) двоокису кремнію + 550 мкл (µl) H_2O) і внесіть 100 мкл (µl) суміші в зразки. Дотримуйтесь інструкцій, наданих виробником Набору для екстракції.***

N.2 Постановка реакції

Набір **LUA-PCR.CMV.50** призначений для використання виключно в комбінації з ABI 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene), програмним забезпеченням CFX96 CFX manager версії 1.7 (Biorad) і приладом для ПЛР у реальному часі Rotor-Gene Q серії (Qiagen).

N.2.1 Підготовка RT-PCR

Важливо: *Приклад схеми розподілу наведено в Розділі O. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.*

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі I.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в розділі I).

Важлива примітка: *Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.*

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (I.C. як Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	15 мкл (µl)	180 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (µl)	24 мкл (µl)
I.C.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (µl)	6 мкл (µl)
C	Вода MG	2.5 мкл (µl)	30 мкл (µl)
Загальний об'єм		**20 мкл (µl)**	**240 мкл (µl)**

Важлива примітка: *Якщо Внутрішній контроль був доданий під час процедури виділення ДНК, приготуйте **Ампліфікаційну суміш** для **Зразків, NTC і стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:*

Приготування Ампліфікаційної суміші (I.C. як Екстракційний/Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	15 мкл (µl)	180 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (µl)	24 мкл (µl)
C	Вода MG	3 мкл (µl)	36 мкл (µl)
Загальний об'єм		**20 мкл (µl)**	**240 мкл (µl)**

N.2.2 Процедура ампліфікації

- Додайте 20 мкл (µl) Ампліфікаційної суміші в кожну реакційну пробірку або лунку для мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (µl) **Зразків, NTC та стандартної кривої** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Коротко центрифугуйте реакційні пробірки при 2000 об/хв (rpm).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операцій налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

Важлива примітка: Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті C (код: ALL/C) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C).
Наприкінці робочого дня належним чином викиньте залишки матеріалу Точок розведення STD.
Невикористаний об'єм Компонента B, STD та I.C. можна заморожувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі E.

N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

Важлива примітка: *Для Mx3000P встановіть «Налаштування підсилення фільтра»: ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (див. Інструкцію з експлуатації програмного забезпечення MxProTM QPCR, стор.41).*

N.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
2	1	95°C (°C)	10 хвилин
3	50	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.
ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

N.3.2 Вибір Детекторів
Дотримуючись інструкцій з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (ABI 7500 Applied Biosystems, BioRad CFX96, Mx3000P Stratagene), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення	Репортер	Гасник
CMV	FAM	Нефлуоресцентний
Внутрішній Контроль (IC)	JOE/VIC	Нефлуоресцентний
Пасивний Стандарт	ROX	Не присутній

Відповідно до Інструкції з експлуатації Термоциклера для визначення в режимі реального часу Rotor-Gene Q Qiagen, виберіть детектори, як зазначено в таблиці нижче:

Виявлення	**Канал**
CMV	ЗЕЛЕНИЙ
Внутрішній Контроль (IC)	ЖОВТИЙ

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

O. СХЕМА АНАЛІЗУ
Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

Мікропланшет або пробірки

	1	2	3
A	**STD 1**	Зразок 4	
B	**STD 2**	Зразок 5	
C	**STD 3**	Зразок 6	
D	**STD 4**	Зразок 7	
E	NTC	Зразок 8	
F	Зразок 1	Зразок 9	
G	Зразок 2	Зразок 10	
H	Зразок 3	Зразок 11	

Легенда: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК CMV, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що оцінюються.

P. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

P.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати інтерпретацію даних:

Для Термоциклерів для визначення в режимі реального часу **ABI 7500** Applied Biosystems, **CFX96** BioRad і **Mx3000P** Stratagene,

- Встановіть **«Baseline/Початкові умови»** (рівень фонової флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
STRATAGENE™ Mx3000P®	Адаптивні початкові умови Важлива примітка: *Не використовуйте алгоритм Mx4000 v1.00 - v3.00*
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови/базова лінія

Для Термоциклера для визначення в режимі реального часу **ROTOR-GENE Q СЕРІЇ** Qiagen:

- Виберіть **«Аналіз»** у рядку меню;
- У вікні Аналіз виберіть **«Кількісне визначення»**;
- Виберіть обидва Канали збору Зелений та Жовтий, а потім натисніть «показати»;
- Виберіть **«Динамічна пробірка/Dynamic Tube»** та **«Коригувати нахил/Slope Correct»** у кількісному аналізі.

На всіх перевірених приладах для визначення в режимі реального часу встановіть вручну **«Threshold/Поріг»** флуоресценції FAM/JOE/VIC/ЗЕЛЕНИЙ/ЖОВТИЙ.

FAM/ЗЕЛЕНИЙ «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	600
Rotor-Gene Q серій	0.04

JOE/VIC/ЖОВТИЙ «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	200
Rotor-Gene Q серій	0.03

P.2 Аналіз даних
Перевірка на калібраторах STD проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення Ct очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P® - QIAGEN™ ROTOR-GENE Q	
Перевірка FAM	**Вимоги**
STD 1	22.0 < Ct (Пороговий цикл) < 24.5
STD 2	25.5 ≤ Ct (Пороговий цикл) < 28.5
STD 3	29.0 ≤ Ct (Пороговий цикл) < 32.0
STD 4	32.0 < Ct (Пороговий цикл) ≤ 35.5

BIORAD™ CFX96®	
Перевірка FAM	**Вимоги**
STD 1	23.0 < Ct (Пороговий цикл) < 25.5
STD 2	26.5 ≤ Ct (Пороговий цикл) < 29.5
STD 3	30.0 ≤ Ct (Пороговий цикл) < 33.0
STD 4	33.0 < Ct (Пороговий цикл) ≤ 36.5

Крім того, значення Нахилу і R^2 перевіряються, щоб перевірити якість виконання. Повинні бути виконані наступні вимоги.

Перевірка FAM	**Вимоги**
Нахил	-3.1 < Нахил < -3.9

Перевірка FAM	**Вимоги**
Ефективність	$R^2 > 0.98$

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ
Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE/VIC підтверджують виявлення CMV, як описано в таблиці нижче:

CMV FAM	**Внутрішній Контроль JOE/VIC**	**Результат Аналізу**
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація ДНК CMV (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО флуоресцентного Сигналу внутрішнього контролю I.C. за рахунок конкуренції реагентів.

**Проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів або початковий зразок, що містить недостатню кількість клітин), що призводить до неправильного результату. Процедуру тестування необхідно повторити, починаючи з етапу Екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, код LUA-PCR.CMV.50, можна застосувати правильне кількісне визначення вірусного навантаження CMV, як зазначено в таблиці нижче:

АНАЛІТИЧНІ ДАНІ	ДІАГНОСТИЧНІ ДАНІ
Дані запуску CMV **(копії/мкл (µl))**	Вірусне навантаження CMV **(копії/мл (ml))**
Кількість > 2.0E+05	Вірусне навантаження CMV > 1.0E+08
1.0E+00 ≤ Кількість ≤ 2.0E+05	***КІЛЬКІСНА ОЦІНКА***
Кількість < 1.0E+00	Вірусне навантаження CMV < 5.0E+02

***ВАЖЛИВА ПРИМІТКА:** Для кількісного визначення зразків див. розділ R.*

Результати, отримані з набором, код LUA-PCR.CMV.50, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта.
Можливі наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE/VIC	Результат	Перевірити
ЗРАЗОК невідомий	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ *Позитивний*	***ВАЖЛИВО:*** Висока початкова концентрація ДНК CMV (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗАНИЖЕНОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю I.C. за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	+/-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилка в процедурі або неправильне функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення CMV і JOE/VIC для I.C. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ *Негативний*	
STD	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC правильний, лише якщо I.C. використовувався як контроль екстракції.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення CMV і JOE/VIC для I.C. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
STD	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення CMV і JOE/VIC для I.C. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався.
NTC	-	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC правильний, лише якщо I.C. використовувався як контроль екстракції.
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.

Важливі примітки:

1. *Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.*
2. *Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути помилкової передачі даних.*

Якщо результати тесту співпадають з *КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ АНАЛІЗУ*, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD розглядаються як зразки пацієнтів, і той самий об'єм, 10 мкл (µl), використовується під час етапу ампліфікації.
Концентрація калібраторів STD виражається в копіях/мкл (µl).
Концентрація вірусного геному на мл (ml) для кожного зразка пацієнта розраховується за такою формулою:

$$\textbf{Результати (копії/мл (ml))} = \frac{\textbf{копії/мкл (µl) (дані прогону) x Об'єм елюйованого зразка (мкл (µl))}}{\textbf{Об'єм екстрагованого зразка (мл (ml))}}$$

Приклад:
Результати (копії/мл (ml)) = 1500 x 100/0.2

Результати (копії/мл (ml)) = 7.5 E+05

Щоб перетворити результат вірусного навантаження зразків, виражений в копіях/мл (ml), в МО/мл (UI/ml), використовуйте відповідний коефіцієнт перетворення, як зазначено в таблиці нижче:

Прилад для визначення в реальному часі	Коефіцієнт перетворення	Результат МО/мл (UI/ml) (*)
ABI™PRISM® 7500 SDS	**1.00**	**копії/мл (ml) x 1.00**
STRATAGENE™ MX3000P®	**1.00**	**копії/мл (ml) x 1.00**
BIORAD™ CFX96®	**1.00**	**копії/мл (ml) x 1.00**
ROTOR-GENE Q	**0.92**	**копії/мл (ml) x 0.92**

*відкалібровано за 1-м міжнародним стандартом BOO3 (код NIBSC 09/162).

Приклад:
На ABI7500/Mx3000P/CFX96 Результати (копії/мл (ml)) = 7.5 E+05
Результати (МО/мл (IU/ml)) = 7.5 E+05

На Rotor-Gene Q Результати (копії/мл (ml)) = 7.5 E+05
Результати (МО/мл (IU/ml)) = 6.9 E+05

S. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ITS.
Оцінку ефективності проводили в лабораторіях на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

S.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа Виявлення** та як **Межа кількісного визначення**.
Межа виявлення (LOD): Це найменша кількість цільового значення, яку може виявити система із заданою ймовірністю.
Для тестів NAT це виражається як найменша концентрація **аналіту**, яка за багаторазової перевірки дає позитивний результат.
Межа виявлення (LOD) визначається шляхом тестування серійних розведень зразка, що містять відомі концентрації аналіту.
LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, у ≥ 95% зразків у звичайних лабораторних умовах).
Для набору LUA-PCR.CMV.50 **LOD** було визначено шляхом тестування серійних розведень 1:5 і 1:2 (8 повторів для трьох різних запусків) плазміди, що несла послідовність вірусної мішені.

Результати аналізували за допомогою аналізу **Probit**, щоб визначити межу виявлення на рівні 95%.

Результати аналізу PROBIT є наступними:

Межа виявлення LOD (p=0.05)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	**0.57 копії/мкл (µl)**
STRATAGENE™ MX3000P®	**0.62 копії/мкл (µl)**
BIORAD™ CFX96®	**0.85 копії/мкл (µl)**
ROTOR-GENE Q	**0.57 копії/мкл (µl)**

S.1.1 Межа кількісного визначення

Межа кількісного визначення була визначена шляхом вимірювання **лінійності, динамічного діапазону** та **відтворюваності**.
Лінійність - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

Динамічний діапазон - це діапазон концентрацій аналіту, для якого кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації аналіту з прийнятною правдивістю та точністю.
Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).
Для набору LUA-PCR.CMV.50 було підготовлено криву граничного розведення позитивного зразка CMV з визначеними копіями/мкл (µl). Точки розведення перевіряли в аналітичній системі та визначали їх Ct (пороговий цикл).
Для набору LUA-PCR.CMV.50, виконаного на ABI 7500, Mx3000P та BioRad CFX96, верхня межа **кількісного визначен**ня становить 5.30 $\log_{10}$ (2.0E+05 копій/мкл (µl)), а нижня межа кількісного визначення становить 0.00 $\log_{10}$ (1.0E+00 копій/мкл (µl)).
Динамічний діапазон також був визначений за допомогою серійного розведення 1-го міжнародного стандарту ВОО3 для HCMV (код NIBSC 09/162).
Для набору LUA-PCR.CMV.50, виконаного на ABI 7500, Mx3000P BioRad CFX96 і Qiagen Rotor-Gene Q, верхня межа **кількісного визначення** становить 6.70 $\log_{10}$ (5.0E+06 МО/мл (IU/ml)), а нижня межа кількісного визначення становить 2.70 $\log_{10}$ (5.0E+02 МО/мл (IU/ml)).

S.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ
Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти тільки послідовність цільових ДНК.
Аналітичну специфічність аналізу ДНК CMV вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (LionSoft v.1.0 від Biotools і Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з CMV, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів CMV.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Зразки, отримані від пацієнтів, які страждають від інфекцій, викликаних потенційно інтерферуючими мікроорганізмами, були отримані з Референсного клінічного центру та протестовані.

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Результат
VZV	негативний
EBV	негативний
HHV6	негативний
HHV8	негативний
HSV1	негативний
HSV2	негативний

S.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

S.3.1 Діагностична специфічність
Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.
Цей параметр досліджували шляхом дослідження 19 негативних ДНК CMV зразків плазми і 83 негативних ДНК CMV зразків цільної крові:

Негативні зразки ДНК CMV

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	102
ХИБНО ПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	102
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	**100**

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Специфічність системи становить 100%.

S.3.2 Діагностична чутливість
Діагностична чутливість - це ймовірність того, що прилад дає позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.
Для набору з кодом LUA-PCR.CMV.50 параметр досліджували шляхом аналізу 14 ДНК CMV позитивних зразків плазми та 28 ДНК CMV позитивних зразків крові:

Позитивні зразки ДНК CMV

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	42
ХИБНО НЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	42
ЧУТЛИВІСТЬ %	**100**

Крім того, були протестовані Панель Цитомегаловірусу QCMD 2005 і QCMD 2006. Панель QCMD 2005 містить 10 позитивних зразків плазми та 2 негативних зразка плазми, панель QCMD 2006 містить 8 позитивних зразків плазми та 2 негативних зразка плазми.

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Чутливість системи становить 100%.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	100%

S.4 ТОЧНІСТЬ
Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу.
У наборі LUA-PCR.CMV.50 **точність** виражалася як варіабельність в межах аналізу та мінливість між аналізами. 4 точки розведення у 8 повторах були перевірені в одному запуску (внутрішній аналіз) і в трьох різних запусках (між аналізами).
Потім на основі отриманих результатів розраховували варіабельність в межах і між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів ми визначили наступне значення прийнятності для набору LUA-PCR.CMV.50:

Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%) ≤ 10%.
Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) ≤ 10%.

T. ОБМЕЖЕННЯ
Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу. Зокрема, точне піпетування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення ДНК CMV.
Визначення ДНК CMV у зразку пацієнта має великі медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.
Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

5. СИМВОЛИ

REF	Код продукту		Температура зберігання
IVD	Прилад для діагностики in vitro		Дивіться інструкцію з використання
LOT	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
UA.TR.116	Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером призначеного органу з оцінки відповідності, який був залучений на етапі контролю виробництва		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.

ВИРОБНИК:
ТОВ «ЛАБЮЕЙ»
Україна, 76018
м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25
Моб.: +38 (067) 000-20-22
E-mail: info@labua.com.ua

UA.TR.116