

Příručka pro sadu *artus*[®] VZV RG PCR



24 (katalogové č. 4502263)



96 (katalogové č. 4502265)

Verze 1



In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q



4502263, 4502265



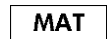
1056824CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

NĚMECKO

R4



1056824CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Zamýšlené použití	6
Souhrn a vysvětlení	6
Informace o patogenu	6
Princip metody	6
Dodávané materiály	7
Obsah sady	7
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	8
Varování a bezpečnostní opatření	8
Všeobecná bezpečnostní opatření	9
Uchovávání a nakládání s reagensy	9
Postup	10
Izolace DNA	10
Interní kontrola	10
Protokol: PCR a analýza dat	11
Interpretace výsledků	17
Kvantifikace	17
Výsledky	17
Řešení problémů	19
Řízení jakosti	20
Omezení	21
Charakteristiky chování	21
Analytická senzitivita	21
Specifická	22
Přesnost	23
Literatura	26
Symboly	26
Kontaktní informace	27
Informace o způsobu objednávání	28

Zamýšlené použití

Sada *artus* VZV RG PCR je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci DNA VZV v lidském mozkomíšním moku (likvoru). Tato diagnostická sada využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji Rotor-Gene Q.

Poznámka: Sada *artus* VZV RG PCR se nesmí používat s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

Souhrn a vysvětlení

Sada *artus* VZV RG PCR je systém k přímému použití pro průkaz DNA viru VZV pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístrojích Rotor-Gene Q. Směs VZV RG Master obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci úseku 82 bp genomu viru VZV a také pro bezprostřední detekci specifického amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000 (zdroj 470 nm, detektor 510 nm).

Kromě toho sada *artus* VZV RG PCR obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange přístroje Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000 (zdroj 585 nm, detektor 610 nm). Limit detekce analytické VZV PCR (viz „Analytická senzitivita“, strana 21) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (VZV RG QS 1–4), pomocí nichž lze určit množství virové DNA. Další informace viz “Kvantifikace”, strana 17.

Informace o patogenu

Varicella zoster virus (VZV) je virus DNA, který se přenáší z osoby na osobu kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem. Infekce VZV způsobuje slabě zvýšené teploty a ovlivňuje celkový zdravotní stav v mírném rozsahu. Pro onemocnění je charakteristický polyformní ekzém s jizvami, puchýři a strupy společně se silným svěděním (varicela). Závažné infekce VZV se často projevují u pacientů s potlačenou imunitou a mohou vést k nebezpečným komplikacím, jako je pneumonie a encefalitida. Po akutní infekci patogen přetrvává v sensorických spinálních gangliích a v gangliích kraniálních nervů. Pokud se imunita oslabí, může dojít k exacerbacím (např. pásový opar).


Princip metody

Průkaz původce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je založen na amplifikaci specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se vážou specificky na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje

průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat reakční zkumavky.*

Dodávané materiály

Obsah sady

artus VZV RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalogové č.		4502263	4502265
Počet reakcí		24	96
Modrá	VZV RG Master	2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Žlutá	VZV RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol 600 µl	600 µl
Červená	VZV RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kopií/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 2 [‡] (1 x 10 ³ kopií/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 3 [‡] (1 x 10 ² kopií/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 4 [‡] (1 x 10 ¹ kopií/µl)	QS 200 µl	200 µl
Zelená	VZV RG IC [§]	IC 1000 µl	2 x 1000 µl
Bílá	Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	1000 µl	1000 µl
	Příručka	 1	1

[†] Roztok hořčíku

[‡] Kvantifikační standard

[§] Interní kontrola

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

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Reagencie

- Sada k izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 10)

Spotřební materiál

- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Zkumavky v stripech s uzávěry, 0,1 ml, pro použití s 72jamkovým rotorem (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- Alternativně: Zkumavky PCR, 0,2 ml, pro použití s 36jamkovým rotorem (kat. čís. 981005 nebo 981008)

Vybavení

- Pipety (nastavitelné)*
- Třepačka vortex*
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2ml reakční zkumavky
- Přístroj Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene*[†] s fluorescenčními kanály Cycling Green a Cycling Orange
- Software Rotor-Gene Q MDx / Rotor-Gene Q verze 1.7.94 a vyšší (software Rotor-Gene 6000 verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94)
- Chladicí blok (vkládací blok 72 x 0,1ml zkumavky, kat. čís. 9018901, nebo vkládací blok 96 x 0,2ml zkumavky, kat. čís. 9018905)

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN[®] a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

[†] Sada *artus* VZV RG PCR se nesmí používat s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Vždy dbejte na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, pozitivní kontroly a amplifikáty) do reakční směsi na jiném místě než ostatní reagentie.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo pulzní třepačka) a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle a udržujte komponenty na ledu nebo v chladicím bloku (72-/96jamkový vkladací blok).

Uchovávání a nakládání s reagentiemi

Komponenty sady *artus* VZV RG PCR se skladují při teplotě –15 °C až –30 °C a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2x), snižuje se tím senzitivita analýzy. Pokud se reagentie mají používat pouze občasně, je nutné je zmrazit v alikvotních množstvích. Uchovávání při 2–8 °C by nemělo překročit dobu pěti hodin.

Postup

Izolace DNA

Sada EZ1 DSP Virus (QIAGEN, kat. čís. 62724)* je validována pro purifikaci virové nukleové kyseliny z lidského likvoru pro použití se sadou *artus* VZV RG PCR. Purifikaci virové nukleové kyseliny proveďte podle pokynů v *EZ1 DSP Virus Kit Manuálu* s počátečním objemem vzorku 200 µl.

Poznámka: Sada *artus* VZV RG PCR není vhodná pro izolační metody na základě fenolu.

Poznámka: Užití nosičové RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Ke každé izolaci přidejte odpovídající množství nosičové RNA podle pokynů v příručce pro sadu *EZ1 DSP Virus*.

Poznámka: Interní kontrolu sady *artus* VZV RG PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“ níže).

Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává interní kontrola (VZV RG IC). Uživatel má tak možnost kontrolovat jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR. Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci interní kontrolu v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže například používáte sadu EZ1 DSP Virus a eluujete virové nukleové kyseliny v 60 µl elučního pufru (AVE), potom přidejte na začátku 6 µl interní kontroly.

Poznámka: Interní kontrola a nosičová RNA (viz „Izolace DNA“, strana 10) by měly být přidávány pouze ke směsi lyzačního pufru a vzorku nebo přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Upozorňujeme, že při přidávání k lyzačnímu pufru musíte směr interní kontroly a lyzačního pufru / nosičové RNA připravit vždy čerstvou a ihned použít (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k selhání interní kontroly a ke snížení efektivity izolace).

Poznámka: Interní kontrolu a nosičovou RNA nepipetujte přímo do vzorku.

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi VZV RG Master a VZV RG Mg-Sol, jak popisuje krok 2b protokolu (strana 12).

* Sada EZ1 DSP Virus je rovněž dostupná jako sada EASY*artus*[®] VZV RG PCR s certifikací CE-IVD v kombinaci se sadou *artus* VZV RG PCR (informace o možnostech objednávky viz strana 28).

Protokol: PCR a analýza dat

Důležité body před zahájením

- Před zahájením procedury získajte základní informace o přístroji Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Dbejte na to, aby byl do každého běhu PCR zahrnut alespoň jeden kvantifikační standard a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR). Pro vytvoření standardní křivky použijte u každého běhu PCR všechny 4 kvantifikační standardy (VZV RG QS 1–4) dodávané spolu s produktem.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8 °C.
- Všechny reagensie se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Postup

1. Umístěte požadovaný počet zkumavek PCR do adaptérů chladicího bloku.
2. Chcete-li pomocí interní kontroly sledovat jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Chcete-li interní kontrolu použít výhradně ke kontrole inhibice PCR, postupujte podle kroku 2b.
- 2a. Interní kontrola již byla přidána k izolaci (viz „Interní kontrola“, strana 10). V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 1.

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 1. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá ke sledování izolace DNA a ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	0 µl	0 µl
Celkový objem	30 µl	360 µl

- 2b. Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi VZV RG Master a VZV RG Mg-Sol. V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 2.**

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 2. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použita výhradně ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	2 µl	24 µl
Celkový objem	32 µl*	384 µl*

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním interní kontroly se při přípravě reakce PCR nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není omezena.

- 3. Odměřte pipetou do každé zkumavky PCR 30 µl směsi Master Mix. Poté přidejte 20 µl eluátu z izolace DNA (viz tabulka 3). Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 20 µl alespoň jednoho kvantifikačního standardu (VZV RG QS 1–4) a jako negativní kontrolu 20 µl vody v kvalitě vhodné pro PCR (Water, PCR grade).**

Tabulka 3. Příprava PCR reakce

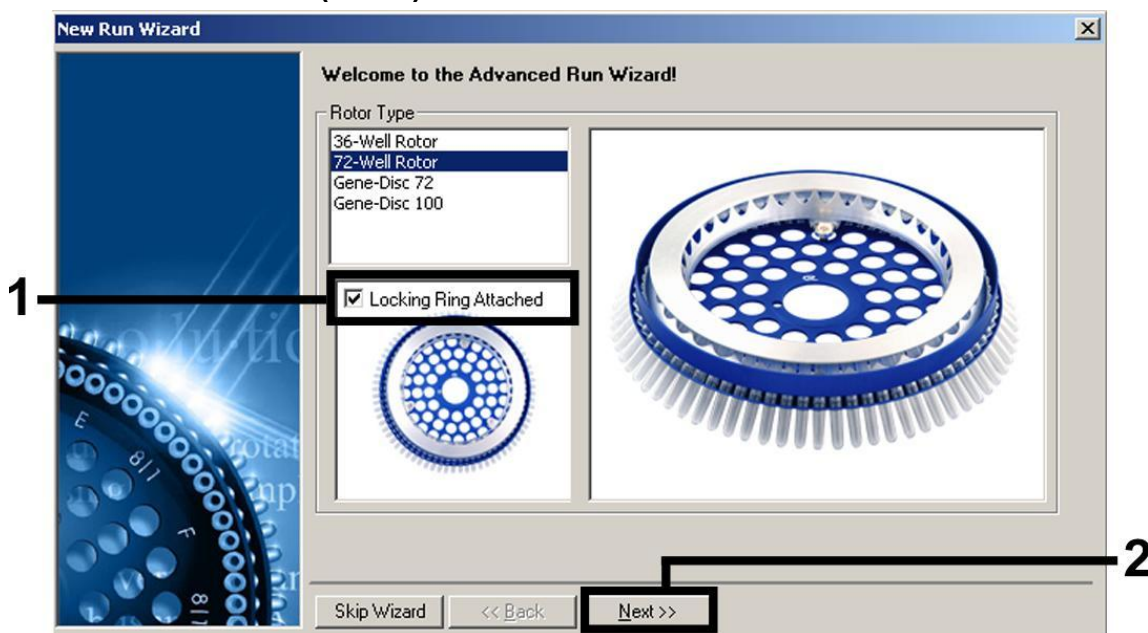
Počet vzorků	1	12
Master Mix	30 µl	po 30 µl
Vzorek	20 µl	po 20 µl
Celkový objem	50 µl	po 50 µl

- 4. Uzavřete zkumavky PCR. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen Locking Ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.**
- 5. Pro detekci DNA VZV vytvořte teplotní profil podle následujících kroků.**

Nastavení obecných parametrů	Obrázky 1, 2, 3
Počáteční aktivace Hot Start enzymu	Obrázek 4
Amplifikace DNA	Obrázek 5
Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů	Obrázek 6
Spuštění běhu	Obrázek 7

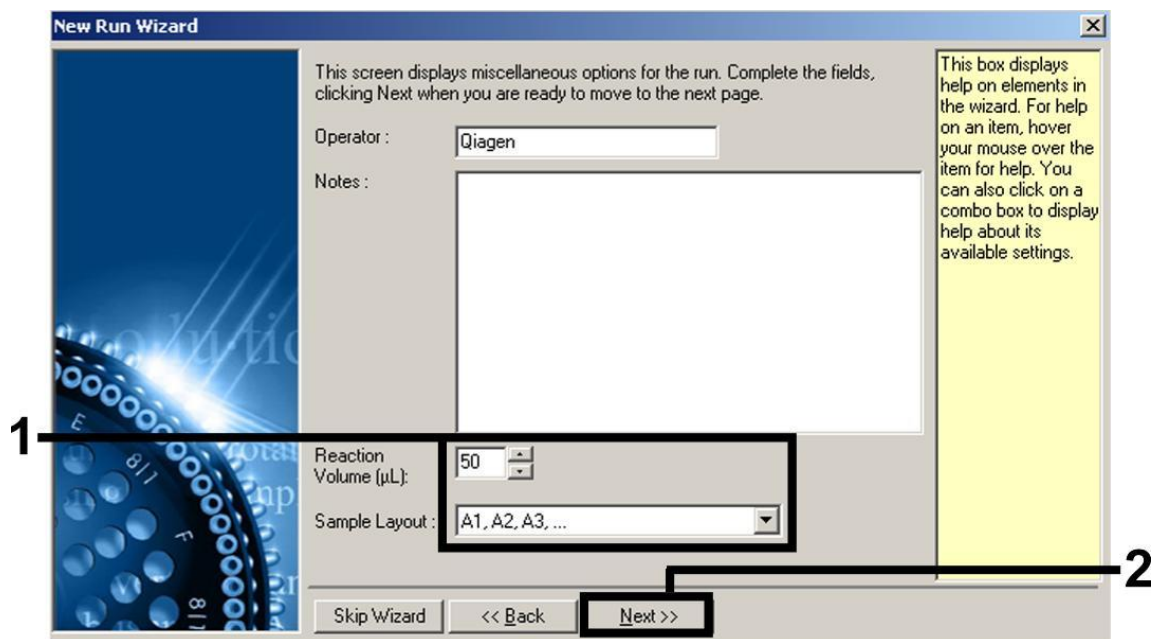
Všechny údaje se vztahují k softwaru Rotor-Gene Q MDx / Rotor-Gene Q verze 1.7.94 a softwaru Rotor-Gene 6000 verze 1.7.65, 1.7.87 a 1.7.94. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Ilustrace se vztahují k přístrojům Rotor--Gene Q.

6. Nejdříve otevřete okno “New Run Wizard” (obrázek 1). Zaškrtněte rámeček “Locking Ring Attached” (Přípevněn pojistný prstenec) a klikněte na “Next” (Další).



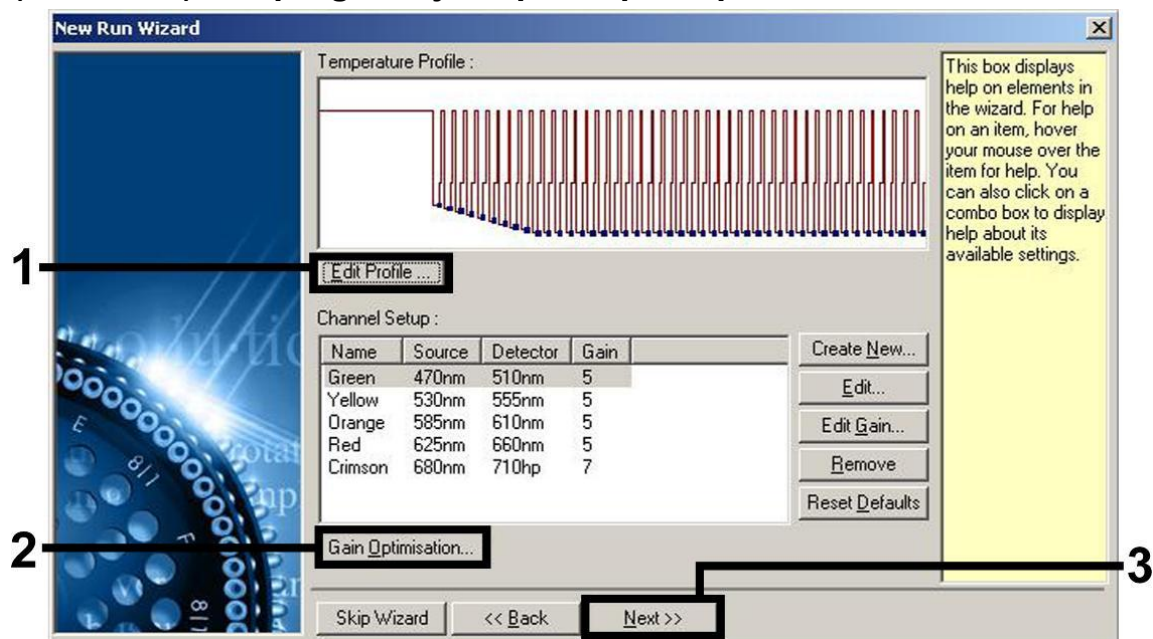
Obrázek 1. Dialogové okno “New Run Wizard“.

7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na “Next” (obrázek 2).

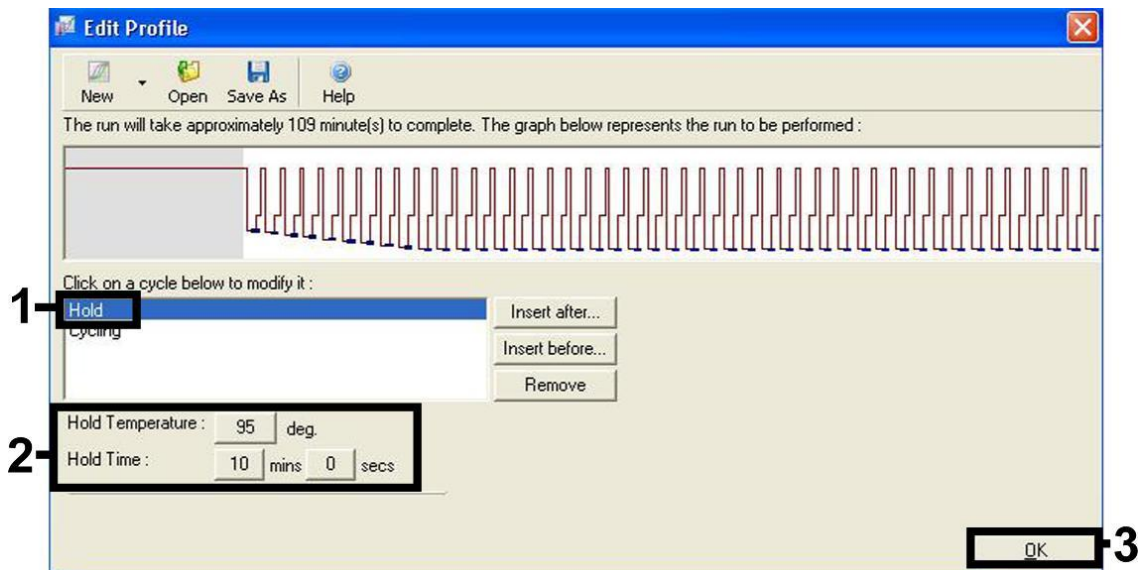


Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů analýzy.

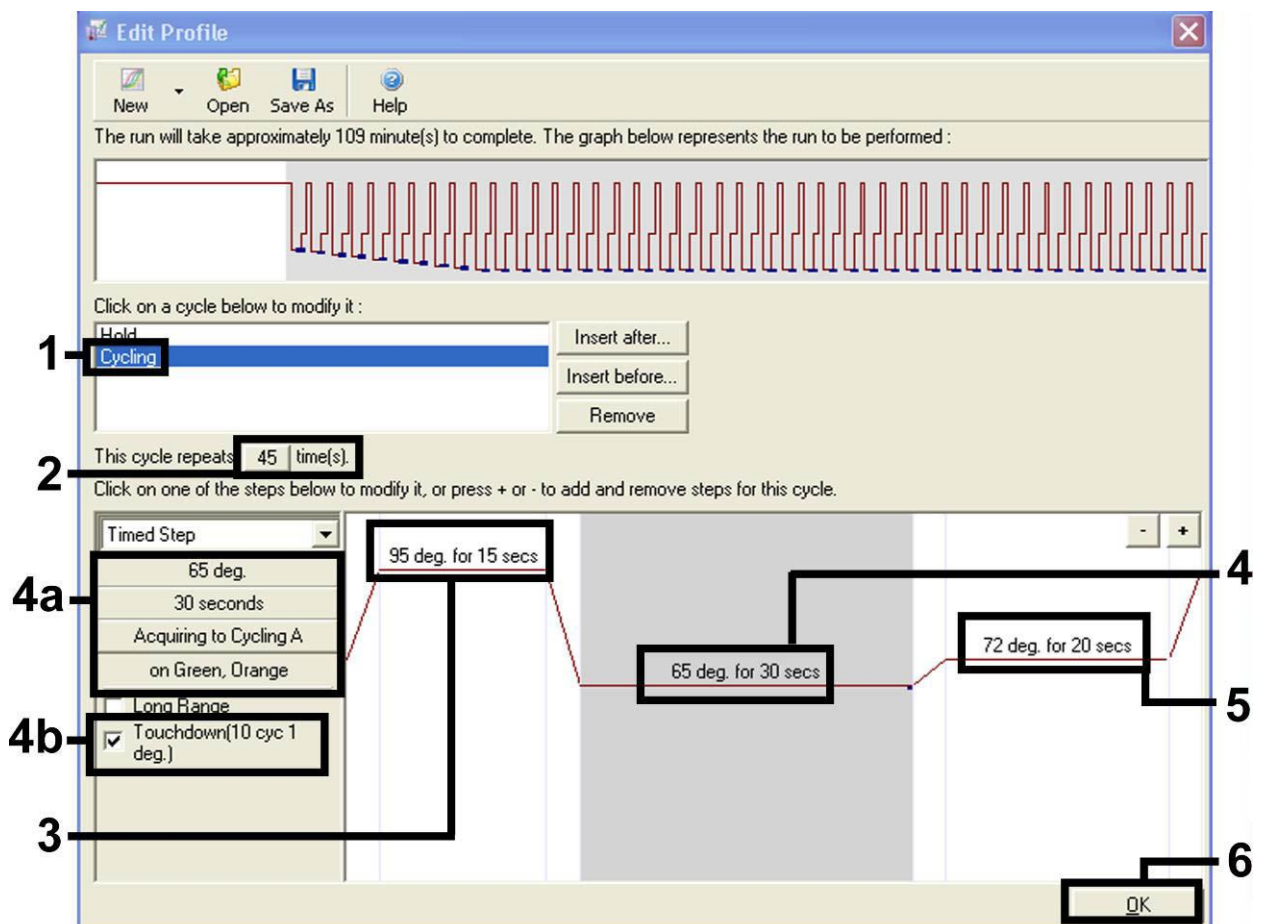
8. Klikněte na tlačítko “Edit Profile” v dalším okně “New Run Wizard” (obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 3-5.



Obrázek 3. Úprava profilu.



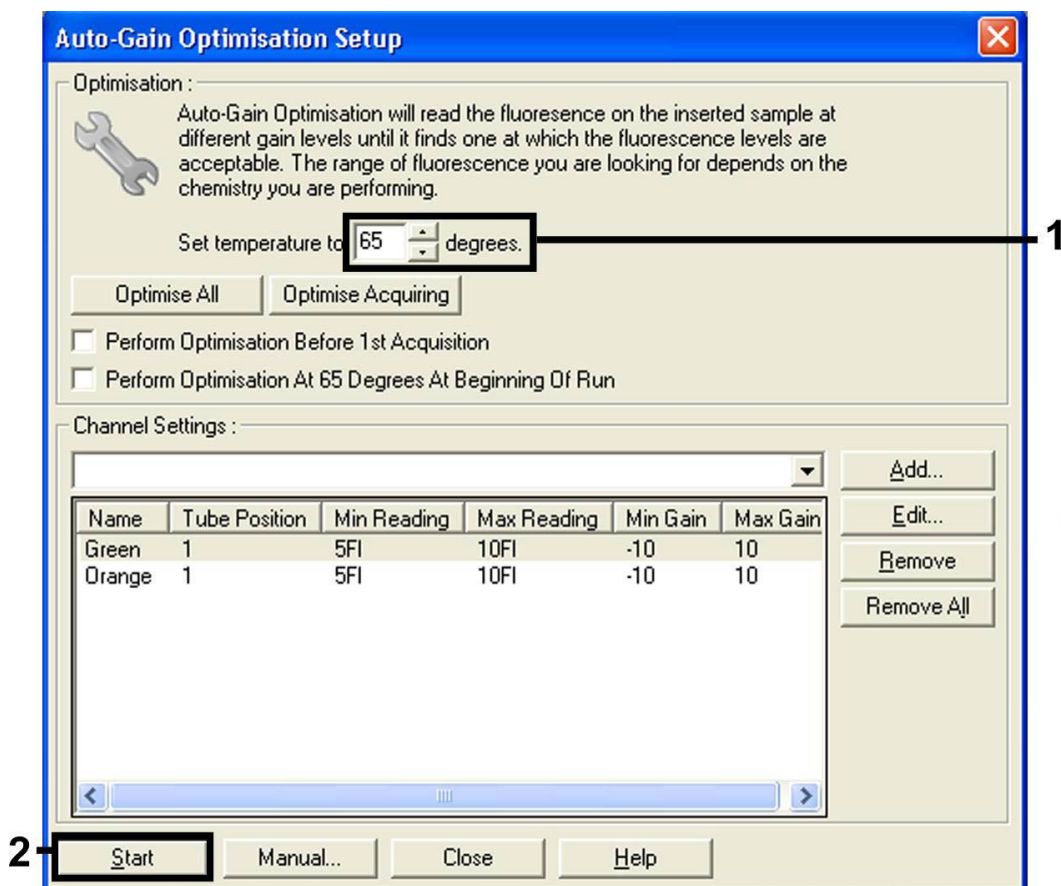
Obrázek 4. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



Obrázek 5. Amplifikace DNA. Ujistěte se, že je dotyková funkce u kroku žihání aktivována pro 10 cyklů.

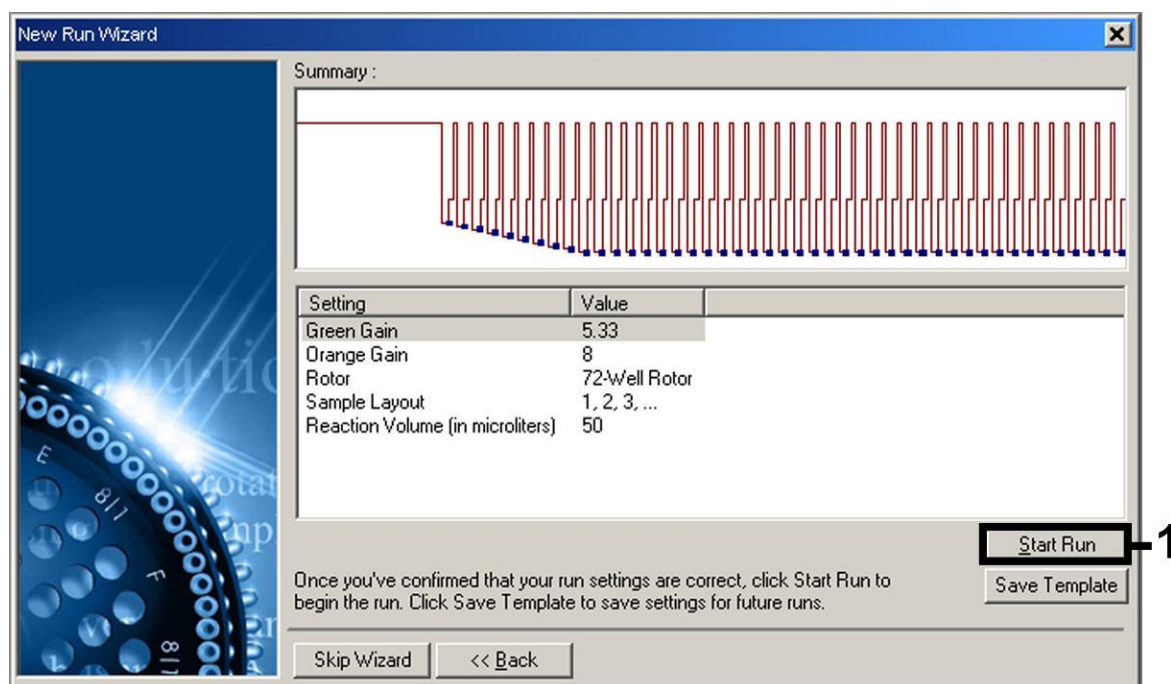
9. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity v PCR zkumavkách. Klikněte na "Gain Optimisation" v okně menu "New Run Wizard" (viz obrázek 3) pro otevření okna "Auto-Gain Optimisation Setup". Nastavte kalibrační

teplotu na 65, aby odpovídala reasociační (annealing) teplotě amplifikačního programu (obrázek 6).



Obrázek 6. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.

10. Hodnoty výsledků determinované kalibrací kanálů se automaticky uloží a jsou uvedené v seznamu v posledním okně programovací procedury (obrázek 7). Stiskněte “Start Run” (Spustit běh).



Interpretace výsledků

Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (VZV RG QS 1–4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Standardní křivku na přístroji Rotor-Gene Q vytvoříte tak, že použijete všech 4 kvantifikačních standardů, definujete je v dialogovém okně „Edit Samples“ (Upravit vzorky) jako standardy a zadáte odpovídající koncentrace (viz uživatelská příručka k přístroji).

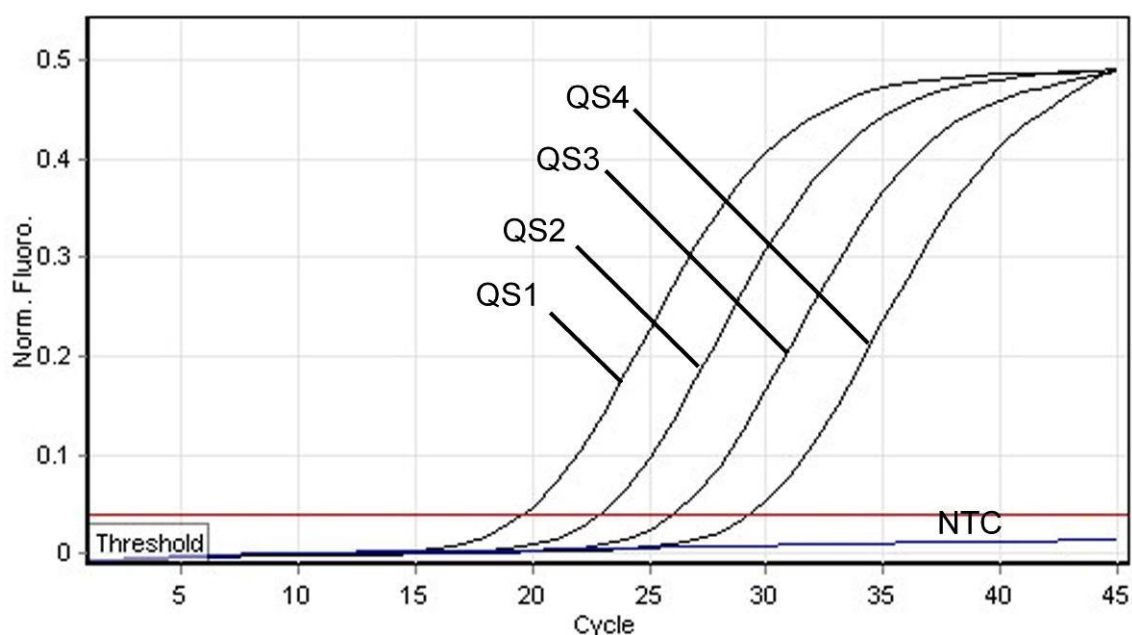
Poznámka: Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočtení hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{Výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

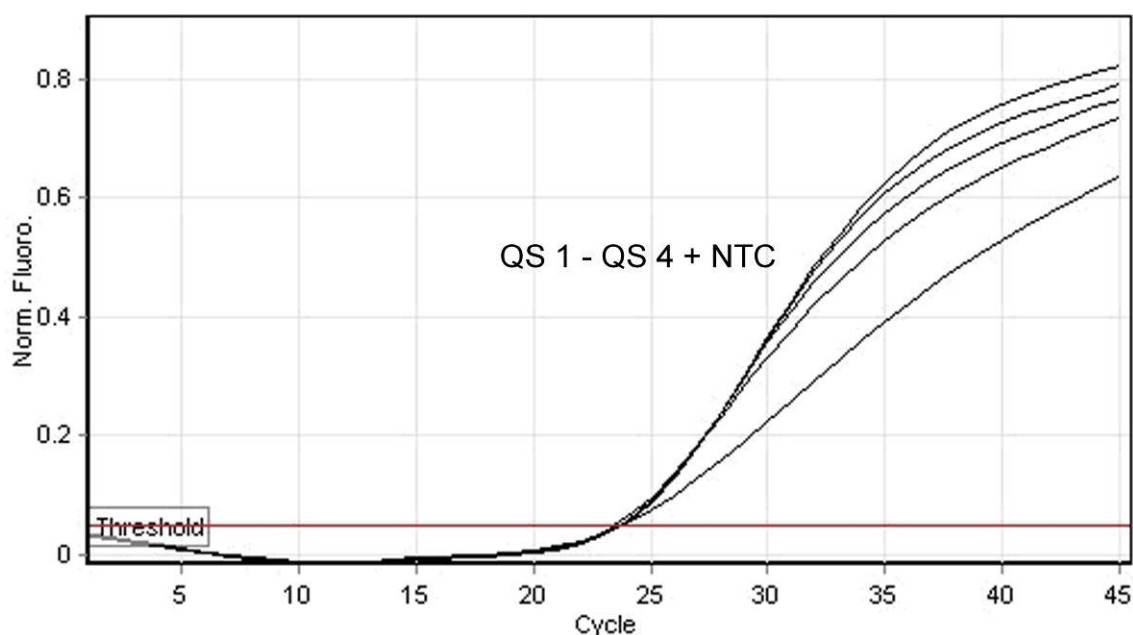
Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Výsledky

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích 8 a 9.



Obrázek 8. Průkaz kvantifikačních standardů (VZV RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obrázek 9. Průkaz interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange při současné amplifikaci kvantifikačních standardů (VZV RG QS 1–4). NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green je detekován signál. Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje DNA VZV.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Orange podružná, protože vysoké výchozí koncentrace DNA viru VZV (pozitivní signál v kanálu Cycling Green) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Orange (kompetice).

Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green není detekován žádný signál. Současně se v kanálu Cycling Orange objevuje signál interní kontroly. Ve vzorku není prokazatelná žádná DNA VZV. Lze jej proto považovat za negativní.

Při negativní VZV PCR vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost inhibice PCR.

Signál není detekován ani v kanálu Cycling Green ani v kanálu Cycling Orange. Není možné učinit závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole “Řešení problémů”, strana 19.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozboru (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Žádný signál u pozitivních kontrol (VZV RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green

- | | |
|--|---|
| a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu PCR dat neodpovídá protokolu | K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling Green pro analytickou VZV PCR a fluorescenční kanál Cycling Orange pro PCR interní kontroly. |
| b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene | Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu. Viz “Protokol: PCR a analýza dat”, strana 10. |
| c) Chybná konfigurace PCR | Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem, případně PCR zopakujte. Viz “Protokol: PCR a analýza dat”, strana 10. |
| d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 9) | Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |
| e) Doba životnosti sady <i>artus</i> VZV RG PCR vypršela | Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |

Slabý nebo chybějící signál interní kontroly negativního vzorku likvoru podrobeného purifikaci pomocí sady EZ1 DSP Virus ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu | Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením. |
|--|--|

Komentáře a návrhy

- b) Došlo k inhibici PCR Ujistěte se, že používáte doporučený postup izolace a držte se přesně pokynů výrobce.
- c) Během extrakce došlo k úbytku DNA Byla-li k izolaci přidána interní kontrola, může nepřítomnost signálu interní kontroly znamenat úbytek DNA během extrakce. Ujistěte se, že používáte doporučenou izolační metodu (viz „Izolace DNA“, strana 10) a držte se přesně pokynů výrobce.
- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 9) Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Doba životnosti sady *artus* VZV RG PCR vypršela Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály u negativních kontrol ve fluorescenčním kanálu Cycling Green při analytické PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
Pozitivní kontroly pipetujte zásadně jako poslední.
Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- b) Během extrakce došlo ke kontaminaci Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Řízení jakosti

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* VZV RG PCR

testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Omezení

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky *in vitro*.

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

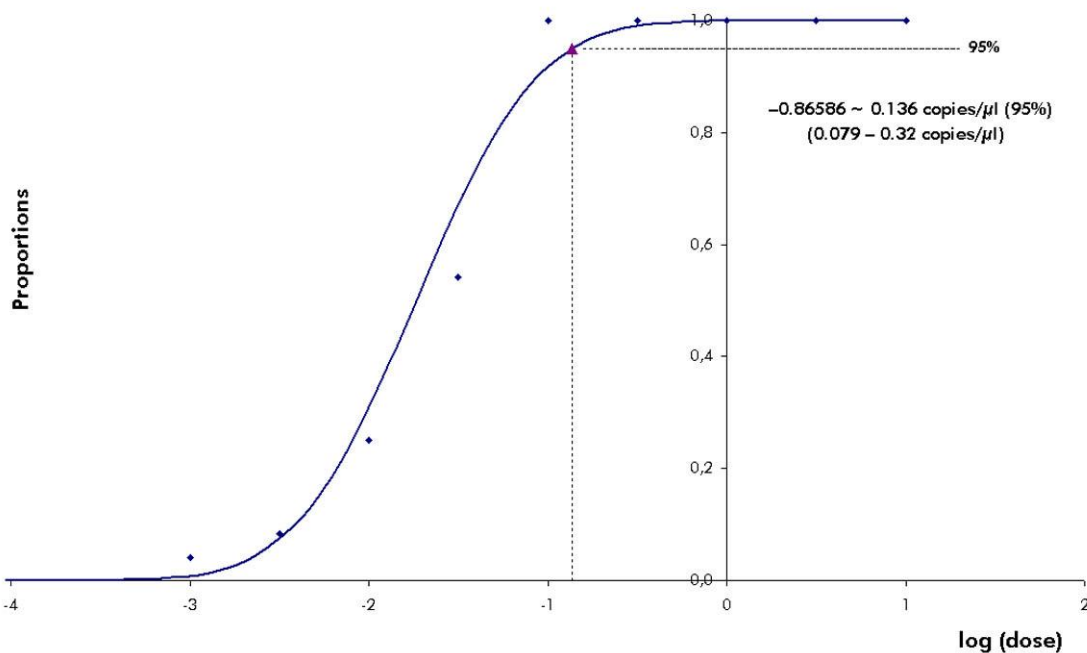
Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.

V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

Charakteristiky chování

Analytická senzitivita

Pro určení analytické senzitivity sady *artus* VZV RG PCR byla vytvořena řada ředění genomové DNA VZV od 10 do 0,001 kopie/ μ l. Ta byla následně analyzována za použití sady *artus* VZV RG PCR v přístroji Rotor-Gene 6000. Experimenty byly provedeny ve 3 různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy na přístroji Rotor-Gene 6000 naleznete na obrázku 10. Analytický limit detekce sady *artus* VZV RG PCR v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q MDx / Q / 6000 je 0,136 kopie/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95% pravděpodobností detekováno 0,136 kopie/ μ l.



Obrázek 10. Probitová analýza: VZV (Rotor-Gene 6000). Analytická senzitivita sady *artus* VZV RG PCR na přístroji Rotor-Gene 6000.

Specificita

Specificita sady *artus* VZV RG PCR je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě srovnávací sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Detekovatelnost všech relevantních genotypů byla takto zajištěna.

Specificita byla navíc validována pomocí 30 různých vzorků likvoru negativních na VZV, které spolu se specifickými primery a sondami pro VZV zahrnutými ve směsi VZV RG Master nevytvářely žádný signál.

Potenciální křížová reaktivita sady *artus* VZV RG PCR byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 4. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 4. Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů

Kontrolní skupina	VZV (Cycling Green)	Interní kontrola (Cycling Orange)
Lidský herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina a Barrové)	–	+
Lidský herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+
Lidský herpesvirus 6A	–	+
Lidský herpesvirus 6B	–	+
Lidský herpesvirus 7	–	+
Lidský herpesvirus 8 (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem)	–	+
Virus hepatitidy A	–	+
Virus hepatitidy B	–	+
Virus hepatitidy C	–	+
Virus lidské imunodeficiency (HIV)	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Virus západonilské horečky	–	+

Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* VZV RG PCR, které byly získány s využitím přístrojů Rotor-Gene, umožňují určit celkovou variabilitu testovacího systému.

Tato celková variabilita se skládá z intraassay variability (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z interassay variability (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a z interbatch variability (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Získaná data byla použita k vypočítání standardní odchylky, variance a koeficientu variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR interní kontroly.

Údaje o přesnosti byly pro sadu *artus* VZV RG PCR stanoveny na základě kvantifikačního standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/μl). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Data o přesnosti byla vypočítána na základě C_T hodnot amplifikačních křivek (C_T : prahový cyklus, viz tabulka 5, strana 25). Pomocí odpovídajících hodnot C_T byly navíc určeny údaje o přesnosti pro kvantitativní výsledky v kopiích/μl (viz tabulka 6, strana 26). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 0,45 % (C_T) resp. 8,32 % (koncentrace), a 2,81 % (C_T) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* VZV RG PCR. 30 VZV negativních vzorků likvoru bylo smíšeno s 0,4 kopie/μl elučního objemu kontrolní DNA VZV (přibližně trojnásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí sady EZ1[®] DSP Virus (viz „Izolace DNA“, strana 10) byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus* VZV RG PCR. Četnost chyb činila u všech 30 vzorků 0 %.

Robustnost interní kontroly byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 30 VZV negativních vzorků likvoru. Celková četnost chyb činila 0%. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* VZV RG PCR činí tedy ≥ 99 %.

Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* VZV RG PCR a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

Tabulka 5. Data o přesnosti na základě hodnot C_T

	Směrodatná odchylka	Variance	Koeficient variance (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Variabilita v rámci jednoho pokusu: Interní kontrola	0,04	0,002	0,17
Variabilita mezi různými pokusy: VZV QS 4	0,15	0,02	0,5
Variabilita mezi různými pokusy: Interní kontrola	0,39	0,15	1,63
Variabilita mezi různými šaržemi: VZV QS 4	0,1	0,01	0,34
Variabilita mezi různými šaržemi: Interní kontrola	0,66	0,43	2,65
Celková variabilita: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Celková variabilita: Interní kontrola	0,68	0,47	2,81

Tabulka 6. Údaje o přesnosti na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/μl).

	Směrodatná odchylka	Variance	Koeficient variace (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: VZV QS 4	0,5	0,25	5,46
Variabilita mezi různými pokusy: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Variabilita mezi různými šaržemi: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Celková variabilita: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu, atd.

Úplný seznam literatury naleznete v databance "QIAGEN Reference Database" (Databáze odkazů QIAGEN) na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte technický servis QIAGEN nebo Vašeho místního distributora.

Symboly



<N>

Obsahuje reagentie pro <N> testů



Použijte do











Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Katalogové číslo



Číslo šarže

	Číslo materiálu
	Díly
	Obsahuje
	Počet
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Další informace viz návod k použití

Kontaktní informace

Pro technické otázky a více informací navštivte naše Centrum technické podpory na stránkách www.qiagen.com/Support, zavolejte na některé Oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo kontaktujte místního distributora (viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, roztok hořčíku, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4502263
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, roztok hořčíku, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4502265
Sady EASY<i>artus</i> VZV RG PCR – pro plně integrovanou, automatizovanou purifikaci vzorků a průkaz původce s certifikací CE-IVD		
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 1	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 24 reakcí: 1 x sada EZ1 DSP Virus, 1 x sada <i>artus</i> VZV RG PCR (24)	EA10223
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 2	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 48 reakcí: 1 x sada EZ1 DSP Virus, 2 x sada <i>artus</i> VZV RG PCR (24)	EA10224
Sada EZ1 DSP Virus – pro automatizovanou souběžnou purifikaci virové DNA a RNA z 1–14 vzorků lidské plazmy, séra nebo likvoru		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin: předplněné zásobníky s reagensy, jednorázové držáky na špičky, jednorázové špičky s filtrem, zkumavky na vzorky, eluční zkumavky, puřry, nosičová RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002022

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednokanálové pipety s využitím zkumavek 72 x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce ve standardní sestavě 8 x 12 s využitím zkumavek 96 x 0,2 ml	9018905

Produkt	Obsah	Kat. č.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 10 000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tenkostěnných zkumavek pro 1000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostěnných zkumavek pro 10 000 reakcí	981008

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní in vitro diagnostiku. Tímto se neuděluje žádný jiný obecný patent nebo licence jiného druhu než toto specifické právo k používání vyplývající z nákupu.

Ochranné známky: QIAGEN[®], *artus*[®], EASY*artus*[®], EZ1[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group).

Omezená licenční smlouva

Použití tohoto produktu znamená, že jakýkoliv kupující či uživatel sady *artus* VZV RG PCR souhlasí s následujícími podmínkami:

1. Sada *artus* VZV RG PCR může být používána výlučně v souladu s *Příručkou pro sadu artus VZV RG PCR* a smí se používat pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponentů sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu artus VZV RG PCR* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může základy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

