Únor 2015

artus® HSV-1/2 LC PCR Kit

Manuál

Σ 24 (Kata ogové čís. 4500063)

Σ 96 (Kata ogové čís. 4500065)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení Pro použití s přístrojem

LightCycler®

Verze 1

CE

IVD

REF 4500063, 4500065

1046888

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse l, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2 MAT 1046888CS

QIAGEN®

Sample & Assay Technologies

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 pro:

- 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

1. Obsah 4
2. Skladování 4
3. Další potřebné vybavení 5
4. Všeobecná preventivní opatření 5
5. Informace o původcích 5
6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase 6
7. Popis produktu 6
8. Protokol 7
8.1 Izolace DNA 7
8.2 Interní kontrola 10
8.3 Kvantifikace 10
8.4 Příprava PCR 12
8.5 Programování přístroje LightCycler 16
9. Vyhodnocení 20
10. Řešení problémů 25
11. Specifikace 27
11.1 Analytická senzitivita 27
11.2 Specificita 29
11.3 Přesnost 30
11.4 Robustnost 33
11.5 Reprodukovatelnost 33
11.6 Diagnostické hodnocení 33
12. Zvláštní pokyny pro použití produktu 33
13. Bezpečnostní informace 34
14. Kontrola kvality 34
15. Literatura 34
16. Vysvětlení symbolů 35

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Pro použití s přístrojem *LightCycler*.

1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4500063 24 reakcí	Kat. čís. 4500065 96 reakcí
Modrá	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Červená	HSV1 LC/RG/TM QS 1¤ 1 x 10^4 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV1 LC/RG/TM QS 2¤ 1 x 10^3 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV1 LC/RG/TM QS 3¤ 1 x 10^2 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV1 LC/RG/TM QS 4¤ 1 x 10^1 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV2 LC/RG/TM QS 1¤ 1 x 10^4 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV2 LC/RG/TM QS 2¤ 1 x 10^3 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV2 LC/RG/TM QS 3¤ 1 x 10^2 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	HSV2 LC/RG/TM QS 4¤ 1 x 10^1 cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zelená	HSV LC IC¤	1 x 1 000 µl	2 x 1 000 µl
Bílá	Water (PCR grade)	1 x 1 000 µl	1 x 1 000 µl

¤ QS = *Kvantifikační standard*
IC = *Interní kontrola*

2. Skladování

Komponenty *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit se skladují při –30 °C až –15 °C mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2 x), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagencie alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě +4°C, skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní, rukavice bez pudru
- DNA-izolační souprava (viz 8.1 Izolace DNA)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- Color Compensation Set (Roche Diagnostics, kat. č. 2 158 850) pro vytvoření souboru *Crosstalk Color Compensation*
- *LightCycler* kapiláry (20 µl)
- *LightCycler* Cooling Block
- *LightCycler* přístroj
- *LightCycler* Capping Tool

4. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagencie.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte plynule na ledu nebo v *LightCycler* Cooling Block.

5. Informace o původcích

Herpes simplex virus (HSV) se nachází v tekutině puchýřku, ve slinách a vaginálním sekretu. Přenáší se přímým kontaktem s postiženými místy, pohlavním stykem a perinatálně. U velké části onemocnění vyvolaných HSV dominuje tvorba puchýřků na kůži a sliznicích (ústa a genitálie).

Infekce HSV se může vyskytovat jako primární infekce, která u více než 90 % případů probíhá asymptomaticky, případně jako recidiva. Mezi primární infekce způsobené zvláště HSV-1 patří gingivostomatitida, ekzema herpeticum, keratokonjunktivitida a encefalitida. HSV-2 se vyskytuje v rámci primární infekce především jako vulvovaginitida, meningitida a jako generalizovaný herpes novorozenců. Při recidivě infekce HSV dochází především k tvorbě puchýřků v nazolabiální a genitální oblasti. Recidivy keratokonjunktivitidy a meningitidy se klasifikují jako více nebezpečné.

6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou 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 testovací kapiláry (Mackay, 2004).

7. Popis produktu

artus HSV-1/2 LC PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz a rozlišení DNA herpes simplex viru 1 a 2 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následné křivky tání v přístroji *LightCycler*. *HSV LC Master* obsahuje reagencie a enzymy pro specifickou amplifikaci 148 bp dlouhého úseku genomu herpes simplex viru a také pro bezprostřední detekci amplifikátu ve fluorimetrickém kanálu F2 přístroje *LightCycler*. Kromě toho obsahuje *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako *InternÝ kontrola* (IC) ve fluorimetrickém kanálu F3. Limit detekce analytické HSV PCR (viz 11.1 Analytická senzitivita) přitom není negativně ovlivněn. Pro určení subtypů používá systém specifickou teplotu tání sond, která v průběhu křivky tání vytváří ve fluorimetrickém kanálu F2 signál. Pro HSV-1 u 69°C, pro HSV- 2 u 66°C. V závislosti na rozdílných extrakčních podmínkách a z nich vyplývajících vlastností pufru může dojít ke kolísání teplot o 1 - 2°C, které se však stejnou měrou vztahuje na oba amplikony HSV-1 a HSV-2. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4), s jejichž pomocí lze určit množství původce ve vzorku. Prostudujte si prosím oddíl 8.3 Kvantifikace.

Upozornění: Teplotní profil pro detekci DNA herpes simplex viru pomocí *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit odpovídá teplotním profilům souprav *artus* EBV LC PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit a *artus* CMV LC PCR Kit. Díky tomu mohou být reakce PCR pro tyto *artus* systémy provedeny a analyzovány v jednom běhu. Dbejte přitom prosím speciálních pokynů pro vyhodnocení v kapitolách 8.3 Kvantifikace a 9. Vyhodnocení.

8. Protokol

8.1 Izolace DNA

DNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. V závislosti na protokolu zvoleného výrobce použijte dané množství vzorku a provedte izolaci DNA podle návodu. Doporučujeme následující izolační soupravy:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
sérum, plazma, likvor, výtěry	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	obsažen
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	neobsažen
likvor	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	obsažen

*Pro použití v kombinaci s BioRobot® EZ1 DSP Workstation (Kat. čís. 9001360) a EZ1 DSP Virus Card (Kat. čís. 9017707).

Důležité pokyny pro použití souprav QIAamp UltraSens Virus Kit a QIAamp DNA Mini Kit:

- Užití nosiče RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Pokud použitá izolační souprava neobsahuje žádný nosič RNA, povšimněte si prosím, že je při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin resp. materiálů s malým obsahem DNA/RNA (např. likvor) důrazně doporučeno přidat nosič RNA (RNA homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. čís. 27-4110-01). Prosím postupujte následujícím způsobem:

a) Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační soupravy (např. AE pufr soupravy QIAamp DNA Mini Kit) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1 µg/µl. Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení (> 2 x) alikvotu nosiče RNA.

b) Používejte 1 µg nosiče RNA na 100 µl lyzačního pufru. Je-li extrakčním protokolem stanoveno 200 µl lyzačního pufru na jeden vzorek, vložte 2 µl nosiče RNA (1 µg/µl) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *InternÝ kontroly*, viz 8.2 *InternÝ kontrola*):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr	např. 200 µl	např. 2 400 µl
Nosič RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Celkový objem	**202 µl**	**2 424 µl**
Objem pro izolaci	**200 µl**	**po 200 µl**

c) Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosiče RNA dodávaného s QIAamp UltraSens Virus Kit, doporučujeme následující postup lišící se od údajů uvedených v příručce izolační soupravy:

  a) Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA před prvním použitím izolační soupravy v 310 µl elučního pufru obsaženého v soupravě (konečná koncentrace 1 µg/µl, nepoužívejte lyzační pufr). Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení (> 2 x) alikvotu nosiče RNA.

b) Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *InternÝ kontroly*, viz 8.2 *InternÝ kontrola*):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr AC	800 µl	9 600 µl
Nosič RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Celkový objem	**805,6 µl**	**9 667,2 µl**
Objem pro izolaci	**800 µl**	**po 800 µl**

c) Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.

- Použitím QIAamp UltraSens Virus Kit lze docílit zkoncentrování vzorku.

Pokud se v případě vašeho vzorku nejedná o sérum nebo plazmu, přidejte k vzorku alespoň 50 % (v/v) negativní lidské plazmy.

- Při izolaci využívající promývací pufr s obsahem **etanolu** bezpodmínečně zajistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
- *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit není vhodný pro izolace na bázi **fenolu**.

Důležité upozornění k použití soupravy EZ1 DSP Virus Kit:

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Přidejte tedy prosím ke každé izolaci potřebné množství nosiče RNA a držte se pokynů v *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Důležité: *InternÝ kontrolu* soupravy *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit lze vložit přímo do izolace (viz **8.2 *InternÝ kontrola***).

8.2 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *InternÝ kontrola* (HSV LC IC). Máte tak možnost kontrolovat jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR (viz Obr. 1). Při použití EZ1 DSP Virus Kit musí být *InternÝ kontrola* vložena podle instrukcí v EZ1 DSP Virus Kit Handbook. Používáte-li QIAamp UltraSens Virus Kit nebo QIAamp DNA Mini Kit, přidejte *InternÝ kontrolu* k izolaci v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže například používáte QIAamp DNA Mini Kit a eluujete DNA v 50 µl AE pufru, vložte 5 µl *InternÝ kontroly*. Množství vkládané *InternÝ kontroly* závisí pouze na elučním objemu. *InternÝ kontrola* a nosič RNA (viz 8.1 Izolace DNA) by měly být přidávány pouze k

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

InternÝ kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs Interní kontroly, lyzačního pufru a nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *InternÝ kontroly* a ke snížení efektivity izolace).

Volitelně lze *InternÝ kontrolu* použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 0,5 µl Interní kontroly na jednu testovací směs přímo do 15 µl HSV LC Master. Pro každou PCR reakci použijte 15 µl takto vytvořeného Master Mixu* a přidejte následně 5 µl izolátu. Jestliže připravujete jeden běh pro více vzorků, zvyšte potřebná množství HSV LC Master a Interní kontroly podle počtu vzorků (viz 8.4 Příprava PCR).

Soupravy *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit a *artus* VZV LC PCR Kit obsahují identickou Interní kontrolu (IC). Také *artus* EBV LC PCR Kit a *artus* CMV LC PCR Kit obsahují identickou Interní kontrolu.

8.3 Kvantifikace

S Kvantifikačními standardy (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (5 µl). Standardní křivku v přístroji *LightCycler* vytvoříte tak, že vložíte pro HSV-1 i pro HSV-2 všechny čtyři *KvantifikačnÝ* standardy dodávané s produktem, definujete je v Sample Loading Screen jako standardy a zadáte uvedené

koncentrace (viz *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Tuto standardní křivku lze použít také pro následné kvantifikace, pokud je během aktuálního běhu použit alespoň jeden standard **jedné** definované koncentrace. K tomu je zapotřebí dříve vytvořenou standardní křivku importovat (viz *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). U této formy kvantifikace je však třeba zohlednit skutečnost, že v důsledku variability mezi PCR běhy může nastat odchylka ve výsledku.

Pokud máte v běhu integrován více než jeden Herpes-*artus* systém, dbejte na to, aby byly analyzovány odděleně příslušnými *KvantifikačnÝmi* standardy.

Upozornění: *KvantifikačnÝ standardy* jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/µl) x eluční objem (µl)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Prosím povšimněte si, že se do výše uvedeného vzorce 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).

Důležité: Na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX je k dispozici příručka pro zjednodušení kvantitativního vyhodnocení systémů *artus* na přístroji *LightCycler*(**Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler2.0* Instrument**).

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním Interní kontroly je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

8.4 Příprava PCR

Ověřte, že je Cooling Block s uvnitř obsaženými adaptéry (příslušenství přístroje *LightCycler*) předem vychlazen přibližně na +4°C. Do adaptérů Cooling Blocku vložte takový počet kapilár *LightCycler*, který je potřebný pro plánované reakce. Dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR

proveden alespoň jeden Kvantifikační *standard* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) a jedna negativní kontrola (Water, PCR grade). Pro vytvoření standardní křivky použijte prosím u každého běhu PCR všechny spolu s produktem dodávané *KvantifikačnÝ standardy* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). Všechny reagencie 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.

Chcete-li *InternÝ kontrolou* kontrolovat **jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR**, musí být napřed *InternÝ kontrola* přidána k izolaci (viz **8.2 *InternÝ kontrola***). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	HSV LC Master	15 µl	180 µl
	HSV LC IC	0 µl	0 µl
	celkový objem	**15 µl**	**180 µl**
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 µl	po 15 µl
	vzorek	5 µl	po 5 µl
	celkový objem	**20 µl**	**po 20 µl**

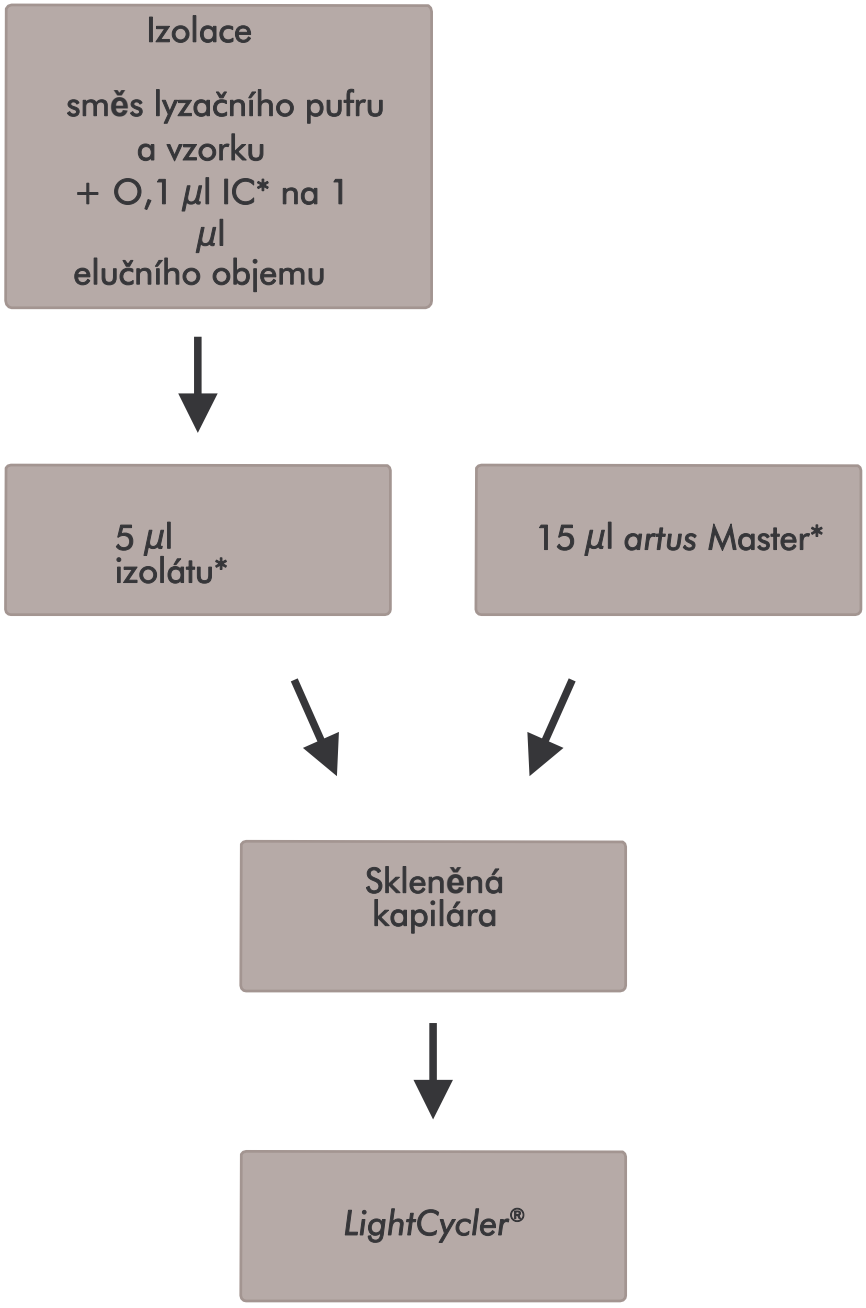
Jestliže chcete Interní kontrolu použít **výhradně ke kontrole PCR inhibice**, je třeba ji přidat přímo do HSV LC Master. V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	HSV LC Master	15 µl	180 µl
	HSV LC IC	0,5 µl	6 µl
	celkový objem	**15,5 µl***	**186 µl***
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 µl*	po 15 µl*
	vzorek	5 µl	po 5 µl
	celkový objem	**20 µl**	**po 20 µl**

Do plastikového zásobníku každé kapiláry pipetujte 15 µl Master Mixu. Následně přidejte 5 µl eluátu z izolace DNA. Podobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 5 µl alespoň jednoho *KvantifikačnÝho* standardu z každé řady (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) a jako negativní kontrolu 5 µl vody (Water, PCR grade). Uzavřete kapiláry. Směs převedete z plastikového zásobníku do kapiláry tak, že na stolní centrifuze centrifugujete adaptéry s uvnitř obsaženými kapilárami po dobu deseti sekund při maximálně 400 x g (2 000 ot/min).

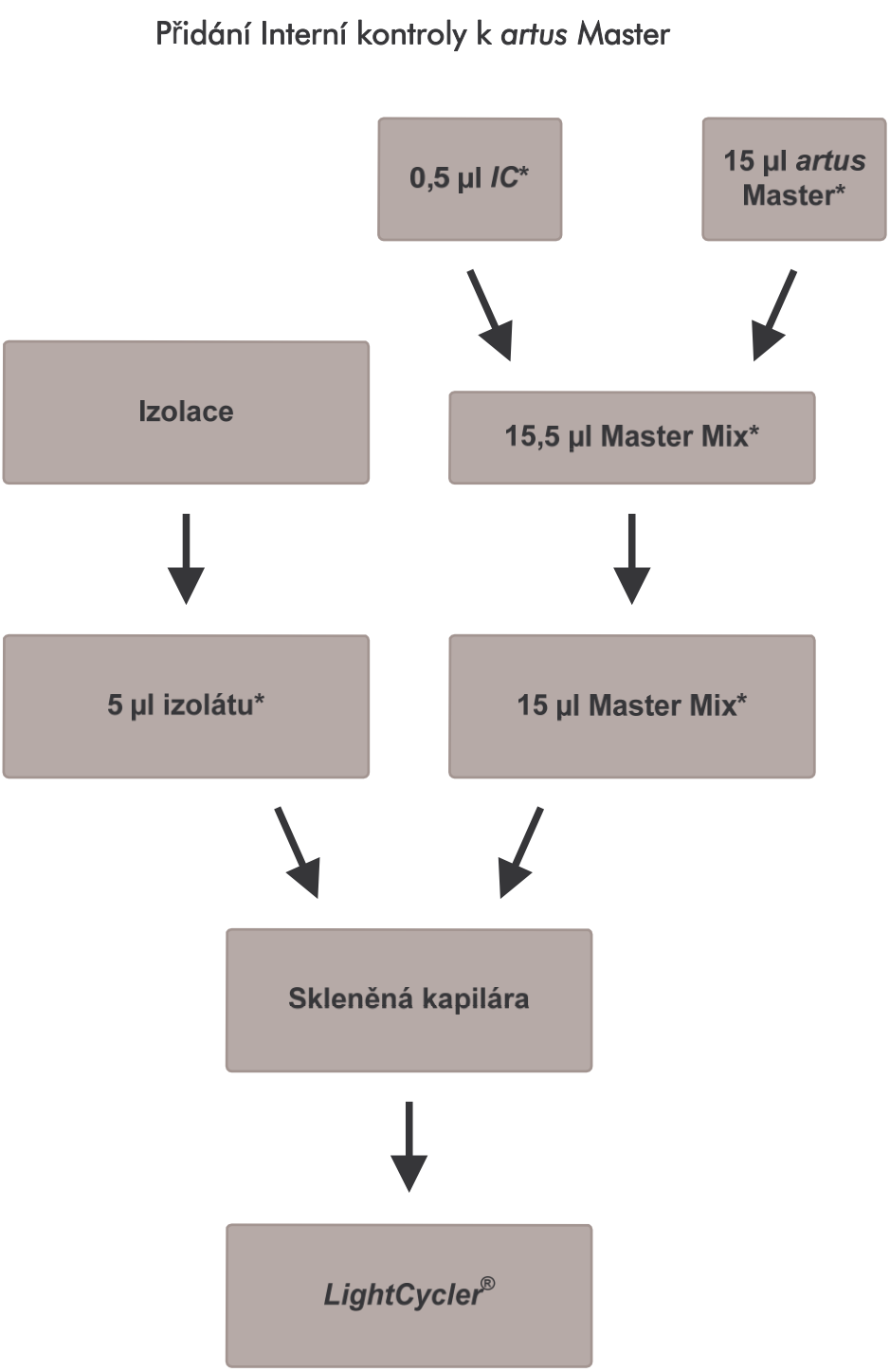
* Zvýšení objemu podmíněné přidáním Interní kontroly je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

Přidání Interní kontroly k izolaci



Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a PCR inhibice.

* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu PCR inhibice.

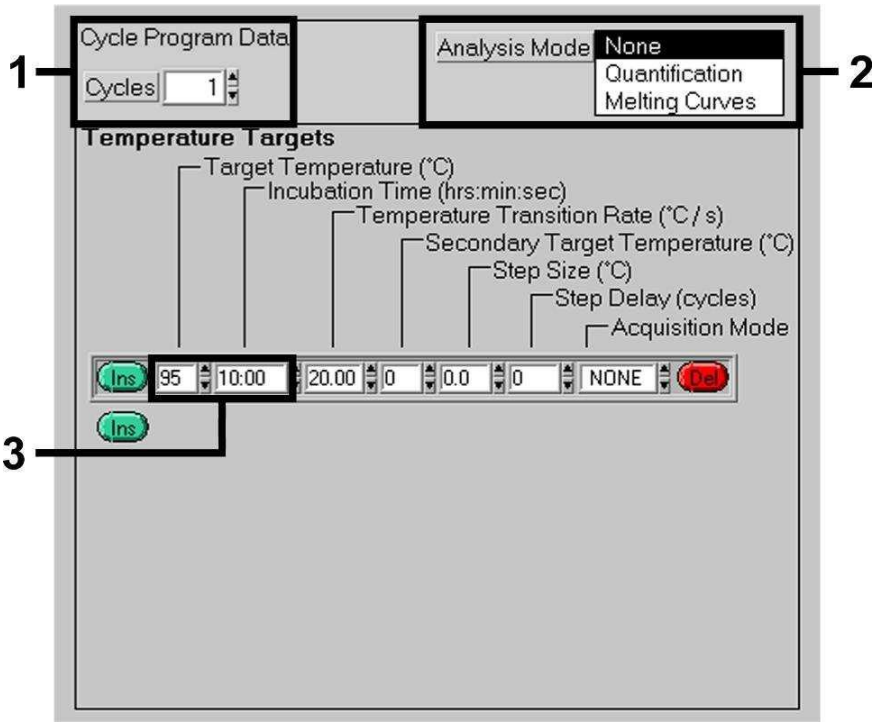
* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

8.5 Programování přístroje LightCycler

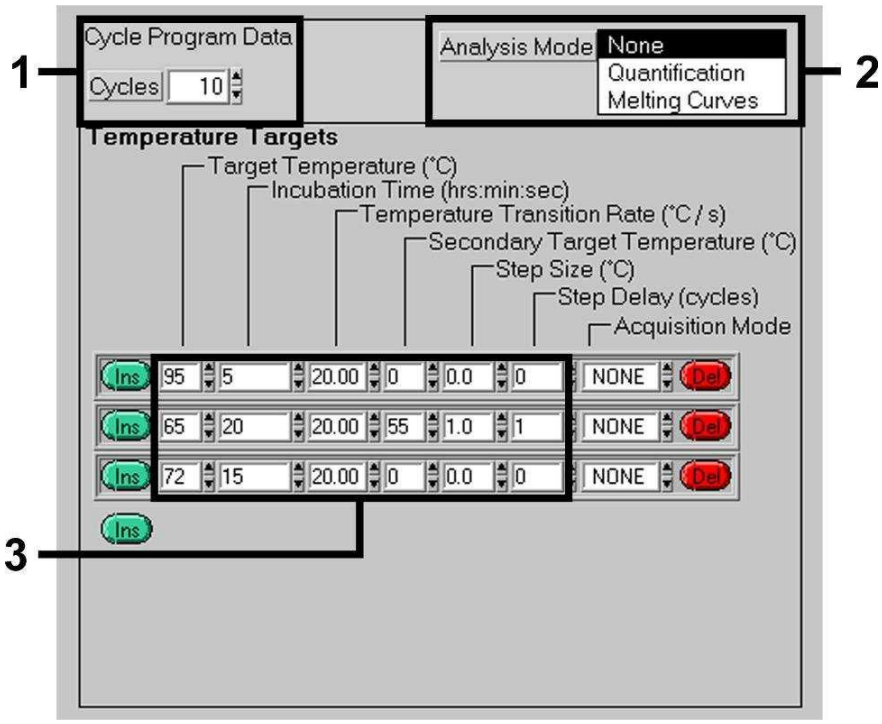
Pro detekci DNA herpes simplex viru vytvořte na přístroji *LightCycler* teplotní profil následujícími pěti pracovními kroky (viz Obr. 3 - 7):

A.	Počáteční aktivace Hot Start enzymu	Obr.
B.	Krok "Touch Down"	Obr.
C.	Amplifikace DNA	Obr.
D.	Křivka tání	5
E.	Chlazení	Obr.

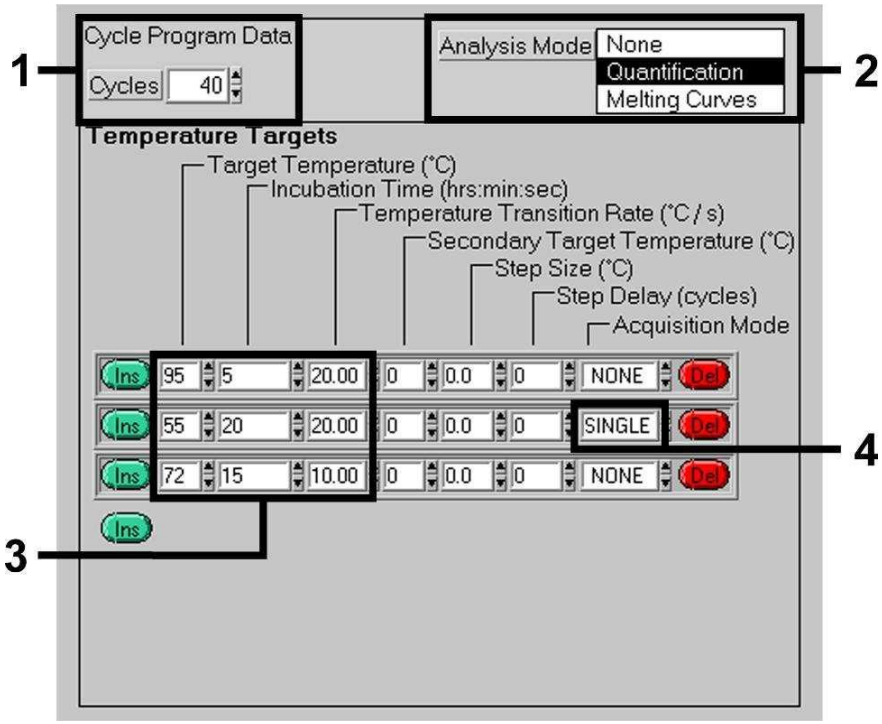
Dbejte zvláště na nastavení *Analysis Mode, Cycle Program Data* a Temperature Targets. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Pokyny pro programování přístroje *LightCycler*naleznete v příručce *LightCycler Operator's Manual*.



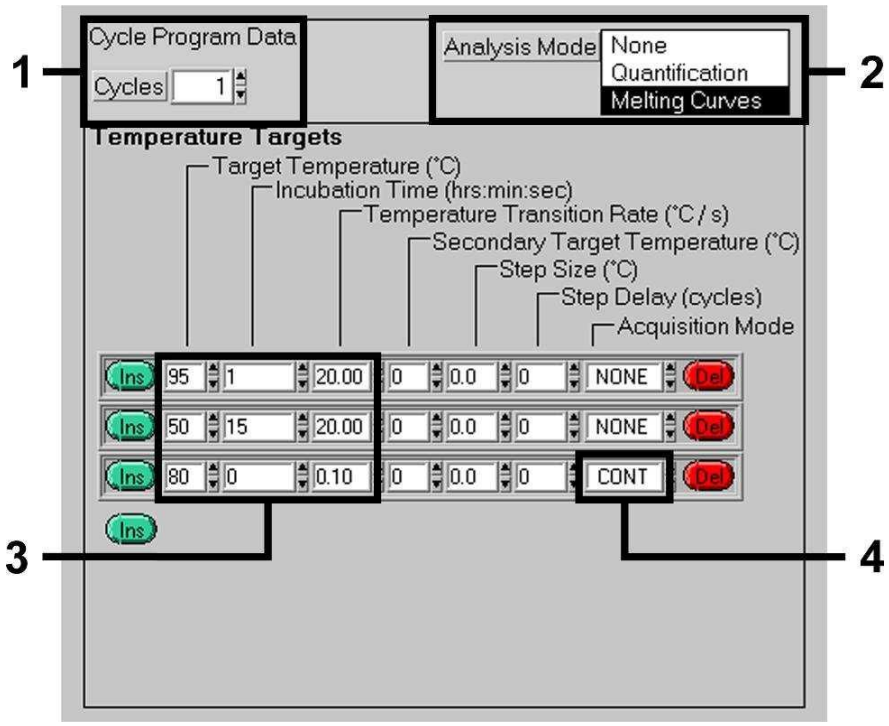
Obr. 3: Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



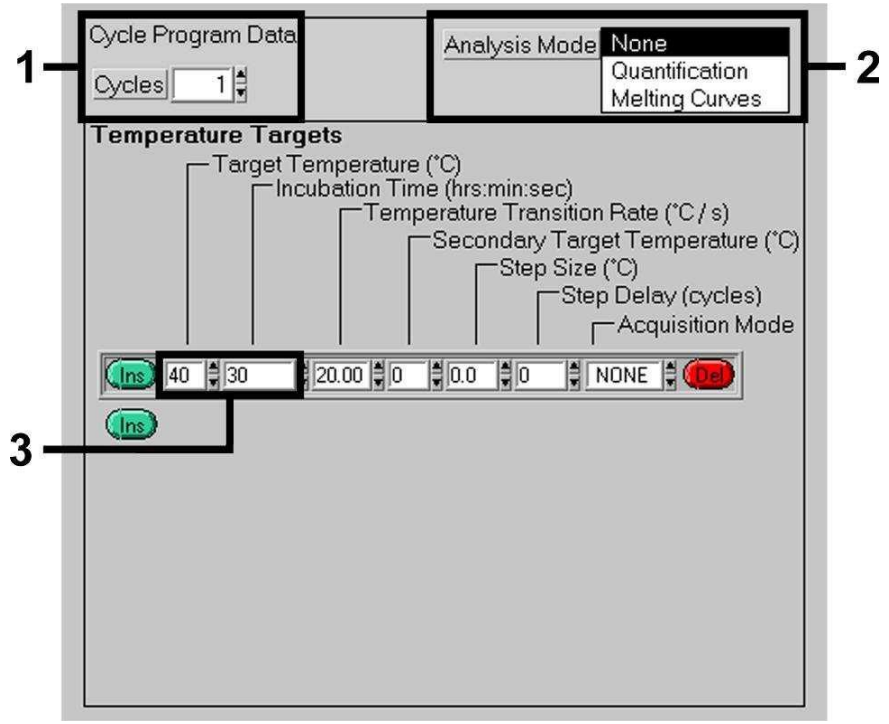
Obr. 4: Krok "Touch Down".



Obr. 5: Amplifikace DNA.



Obr. 6: Křivka tání.



Obr. 7: Chlazení.

9. Vyhodnocení

U vícebarevných analýz se mezi fluorimetrickými kanály vyskytují interference. Software přístroje *LightCycler*obsahuje soubor označený jako *Color Compensation File*, který tato záření kompenzuje. Tento soubor otevřete před, v průběhu nebo po skončení PCR aktivací přepínací plochy *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Není-li instalován žádný soubor *Color Compensation File*, vytvořte soubor podle návodu v příručce *LightCycler Operator's Manual*.
Po aktivaci souboru *Color Compensation File* se ve fluorimetrických kanálech F1, F2 a F3 objeví oddělené signály. Pro analýzu výsledků PCR, které byly získány pomocí *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, zvolte prosím pro analytickou HSV PCR pohledovou funkci F2/Back-F1 resp. F3/Back-F1 pro PCR *InternÝ kontroly*. Při analýze kvantitativních běhů dodržujte bezpodmínečně oddíl 8.3 Kvantifikace a Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler2.0 Instrument, která je k dispozici na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Pokud máte v běhu PCR integrován více než jeden Herpes-*artus* systém, dbejte na to, aby byly vzorky HSV a příslušné standardní křivky analyzovány od všech ostatních systemů odděleně. Přitom dbejte na to, že vzorky HSV-1 musí být analyzovány standardní křivkou příslušných HSV-1 standardů (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*) a vzorky HSV-2 standardní křivkou příslušných HSV-2 standardů (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*).

Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 je detekován signál.

   Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje HSV DNA.

   V tomto případě je detekce signálu v kanálu F3/Back-F1 podružná, protože vysoké výchozí koncentrace HSV DNA (pozitivní signál v kanálu F2/Back-F1) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu Interní kontroly v kanálu F3/Back-F1 (kompetice).

   Diferenciace může být provedena na základě bodu tání (kanál F2/Back-F1, program *Melting Curve*). Pro amplikon HSV-1 při 69°C, pro amplikon HSV-2 při
   66°C. V závilosti na rozdílných extrakčních podmínkách a z nich vyplývajících

vlastností pufru může dojít ke kolísání teplot o 1 - 2°C, které se však stejnou měrou vztahuje na oba amplikony HSV-1 a HSV-2.

2. Ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu F3/Back-F1 (signál *InternÝ kontroly*).

   Ve vzorku není prokazatelná žádná HSV DNA. Lze jej proto považovat za negativní.

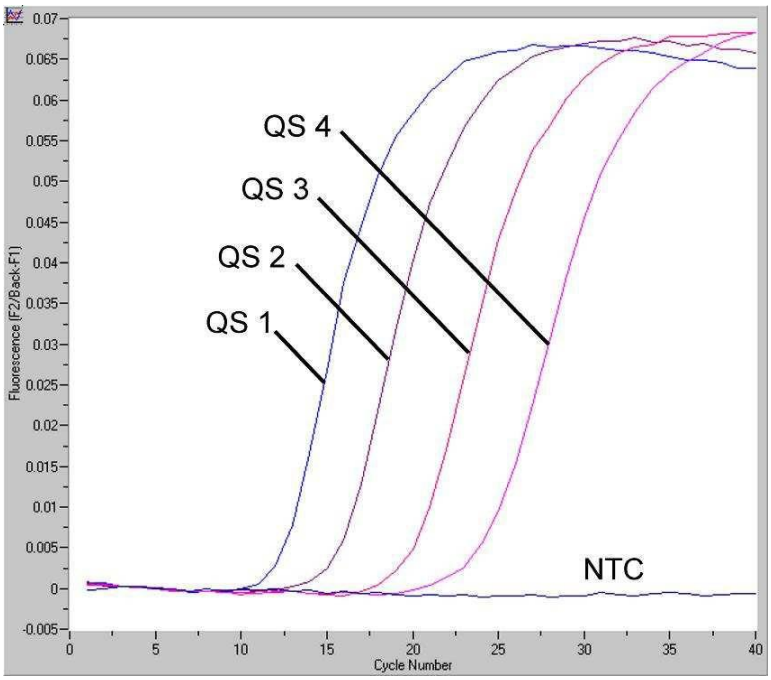
   Při negativní HSV PCR vylučuje detekovaný signál Interní kontroly možnost inhibice PCR.

3. Signál není detekován ani v kanálu F2/Back-F1 ani v kanálu F3/Back-F1.

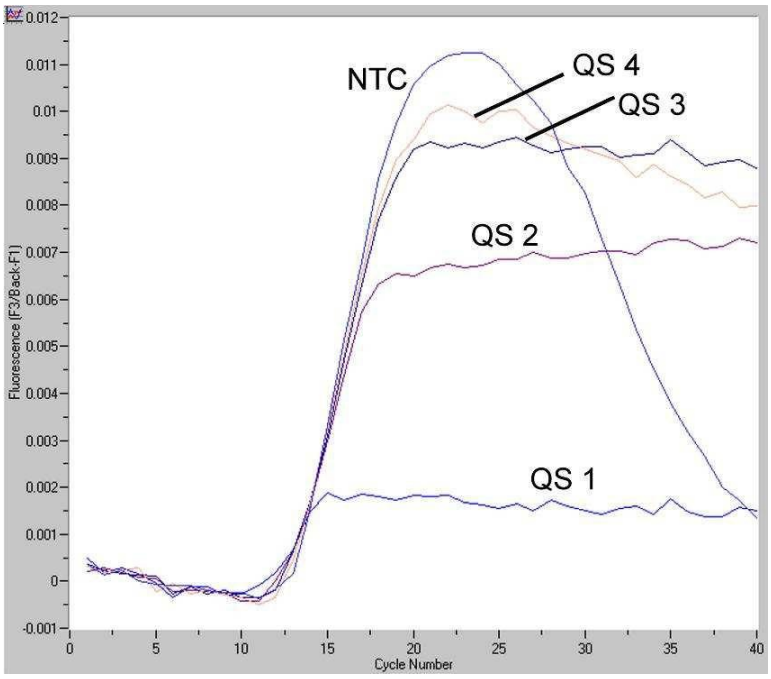
   Není možné učinit diagnostický závěr.

   Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole **10. Řešení problémů**.

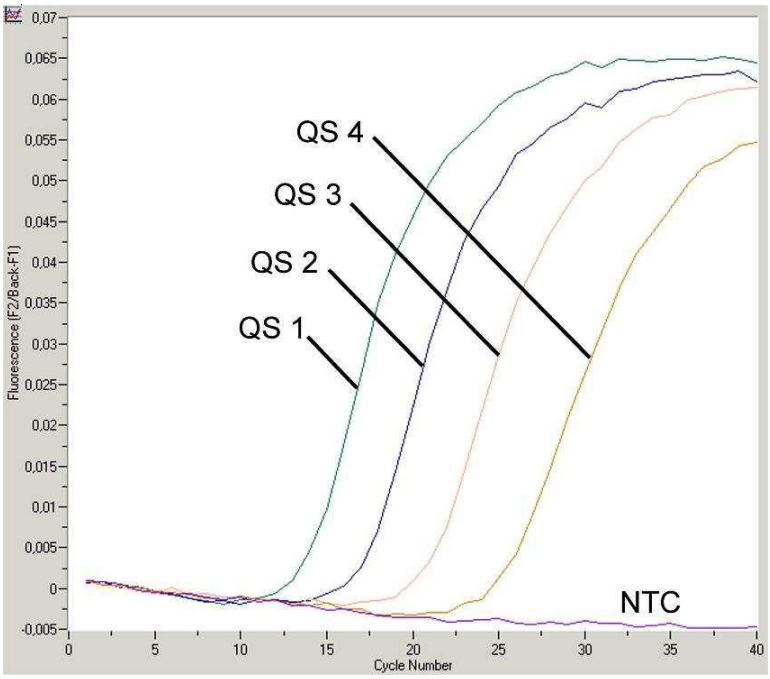
Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí a analýza křivek tání jsou uvedeny na Obr. 8 až Obr. 12.



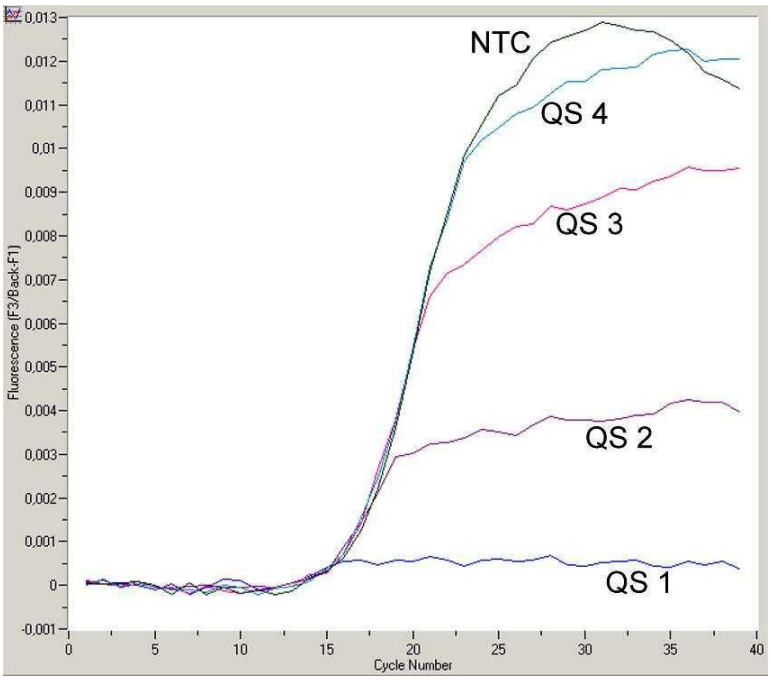
Obr. 8: Průkaz Kvantifikačních standardů (***HSV1*** *LC/RG/TM QS 1 - 4*) ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativní kontrola).



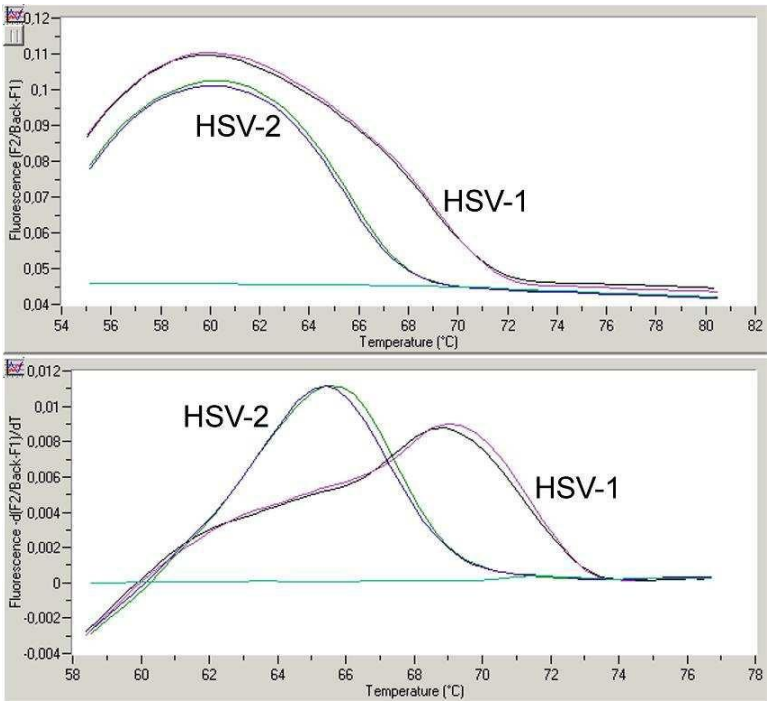
Obr. 9: Průkaz *InternÝ kontroly* (*IC*) ve fluorimetrickém kanálu F3/Back-F1 při současné amplifikaci Kvantifikačních standardů (***HSV1*** *LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 10: Průkaz *KvantifikačnÝch* standardů (***HSV2*** *LC/RG/TM QS 1 - 4*) ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 11: Průkaz *InternÝ kontroly* (IC) ve fluorimetrickém kanálu F3/Back-F1 při současné amplifikaci *KvantifikačnÝch standardů* (***HSV2*** *LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 12: Diferenciace mezi HSV-1 a HSV-2 ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 (program *Melting Curve*).

10. Řešení problémů

Žádný signál při pozitivních kontrolách (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1:

- Volba fluorimetrického kanálu při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.
  → K analýze dat zvolte fluorimetrický kanál F2/Back-F1 pro analytickou
  HSV PCR a fluorimetrický kanál F3/Back-F1 pro PCR Interní kontroly.
- Naprogramování teplotního profilu přístroje *LightCycler*je chybné.
  → Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz 8.5 Programování přístroje *LightCycler*).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
  Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem (viz 8.4 Příprava PCR) a popř. PCR zopakujte.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole 2. Skladování nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit.
  →Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagencií (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *InternÝ kontroly* ve fluorimetrickém kanálu F3/Back-F1 při současné nepřítomnosti signálu v kanálu F2/Back-F1.

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
  → Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- PCR byla inhibována.
  → Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz 8.1 Izolace DNA) a držte se přesně předpisů výrobce.
  → Přesvědčte se, že byl při izolaci DNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz 8.1 Izolace DNA).
- Během izolace dochází k úbytku DNA.
  → Byla-li k izolaci přidána *InternÝ kontrola*, může nepřítomnost signálu
  InternÝ kontroly znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že

používáte námi doporučený postup izolace (viz 8.1 Izolace DNA) a držte se přesně předpisů výrobce.

- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole 2. Skladování nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit.

  → Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagencií (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály při negativních kontrolách ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 analytické PCR.

- Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci.

  → Zopakujte PCR v replikátech s novými reagenciemi.

  → Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.

  → Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.

  → Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

- Během izolace dochází ke kontaminaci.

  → Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagencií.

  → Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naší technickou podporu.

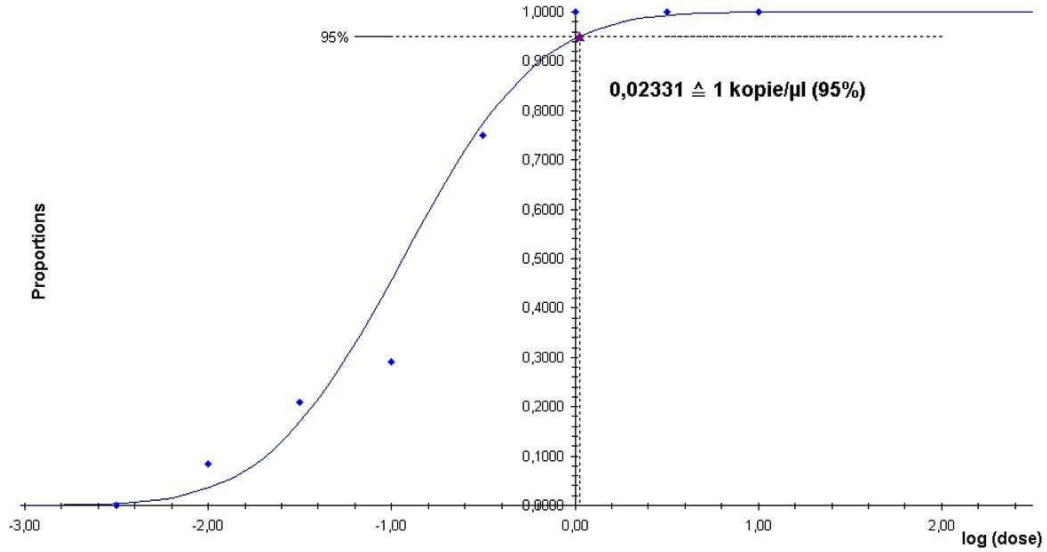
11. Specifikace

11.1 Analytická senzitivita

Pro zjištění analytické senzitivity *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit byla vytvořena řada ředění standardů od 31,6 do nominálně 0,01 HSV-1 resp. HSV-2 ekvivalentů kopie*/µl a analyzována pomocí *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledek byl zjištěn pomocí probitové analýzy. Jeho grafické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 13 a Obr. 14. Limit detekce
artus HSV-1/2 LC PCR Kit leží proto pro HSV-1 i pro HSV-2 u 1 kopie/µl (p = 0,05). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekována 1 kopie/µl.

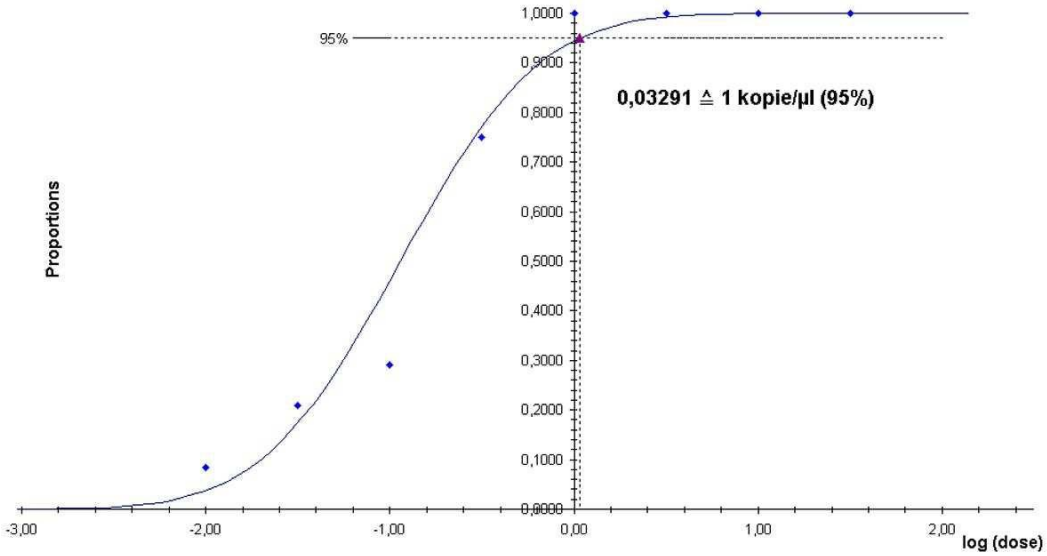
* U zde použitého standardu se jedná o klonovaný PCR produkt, jehož koncentrace byla zjištěna spektrální a fluorescenční fotometrií.

Probitová analýza: Herpes simplex virus 1 (*LightCycler*)



Obr. 13: Analytická senzitivita *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit (**HSV-1**).

Probitová analýza: Herpes simplex virus 2 (*LightCycler*)



Obr. 14: Analytická senzitivita *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit (**HSV-2**).

11.2 Specificita

Specificita *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech relevantních kmenů.

Validace specificity byla provedena na 30-ti různých HSV negativních vzorcích likvoru, které spolu s HSV specifickými primery a sondami obsaženými v *HSV LC Master* negenerovaly žádný signál.

K určení specificity *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v Tabulce 1 testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1: Testování specificity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců.

Kontrolní skupina	HSV 1/2 (F2/Back-F1)	Interní kontrola (F3/Back-F1)
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	-	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina a Barrové)	-	+
Lidský herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Lidský herpesvirus 6 A	-	+
Lidský herpesvirus 6 B	-	+
Lidský herpesvirus 7	-	+
Lidský herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti pro *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z Intra- Assay variability (variabilita vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z Inter-Assay variability (variabilita způsobená provedením experimentu různými osobami v jedné laboratoři a užitím různých přístrojů stejného typu) a z Inter-Batch variability (variabilita způsobená použitím různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *InternÝ kontroly*.

Tyto údaje byly pro *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit stanoveny na základě *KvantifikačnÝho* standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/µl). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: threshold cycle, viz Tabulka 2/Tabulka 4) a z toho určených kvantitativních hodnot v kopiích/µl (viz Tabulka 3/Tabulka 5). Celková variabilita libovolného vzorku uvedené koncentrace činí tedy 1,67 % (Ct, HSV-1) a 1,95 % (Ct, HSV-2) resp. 20,66 % (konc., HSV-1) a 22,42 % (konc., HSV-2), pro průkaz *InternÝ kontroly* 1,23 % (Ct, HSV-1) resp. 1,04 % (Ct, HSV-2). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti pro HSV-1 na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace[%]
Intra-Assay variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	0,27	0,07	1,13
Intra-Assay variabilita: *InternÝ kontrola*	0,03	0,00	0,23
Inter-Assay variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	0,39	0,15	1,66
Inter-Assay variabilita: *InternÝ kontrola*	0,12	0,01	0,99
Inter-Batch variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	0,41	0,17	1,72
Inter-Batch variabilita: *InternÝ kontrola*	0,17	0,03	1,40
Celková variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	0,39	0,15	1,67
Celková variabilita: *InternÝ kontrola*	0,15	0,02	1,23

Tabulka 3: Údaje o přesnosti pro HSV-1 na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/µl).

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace[%]
Intra-Assay variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	1,76	3,08	17,34
Inter-Assay variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	2,02	4,08	19,82
Inter-Batch variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	2,37	5,64	23,10
Celková variabilita: *HSV1 LC/RG/TM QS 4*	2,11	4,46	20,66

Tabulka 4: Údaje o přesnosti pro HSV-2 na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace[%]
Intra-Assay variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	0,22	0,05	0,90
Intra-Assay variabilita: *InternÝ kontrola*	0,04	0,00	0,33
Inter-Assay variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	0,62	0,38	2,51
Inter-Assay variabilita: *InternÝ kontrola*	0,12	0,01	0,98
Inter-Batch variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	0,38	0,14	1,52
Inter-Batch variabilita: *InternÝ kontrola*	0,14	0,02	1,12
Celková variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	0,48	0,23	1,95
Celková variabilita: *InternÝ kontrola*	0,13	0,02	1,04

Tabulka 5: Údaje o přesnosti pro HSV-2 na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/µl).

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace[%]
Intra-Assay variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	1,39	1,94	13,82
Inter-Assay variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	2,86	8,20	27,46
Inter-Batch variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	1,96	3,85	19,27
Celková variabilita: *HSV2 LC/RG/TM QS 4*	2,30	5,31	22,42

11.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Za tímto účelem bylo 30 HSV negativních vzorků likvoru smíseno vždy se 3 kopiemi/µl elučního objemu kontrolní HSV-1 DNA (třínásobná koncentrace analytického limitu senzitivity), pomocí QIAamp DNA Mini Kit izolováno (viz 8.1 Izolace DNA) a pomocí *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit analyzováno. Stejným způsobem byl proveden experiment pro HSV-2 (30 vzorků likvoru, 3 kopie/µl kontrolní HSV-2 DNA). četnost chyb pro HSV-1 i pro HSV-2 činila u všech vzorků 0 %. Robustnost *Interní kontroly* byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 30-ti HSV negativních vzorků likvoru. Celková četnost chyb činila 0 %. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit činí tedy ≥ 99 %.

11.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaj jsou získávány na základě účastí na mezilaboratorních pokusech.

11.6 Diagnostické hodnocení

artus HSV-1/2 LC PCR Kit je v současné době evaluován v několika studiích.

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagencie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Prostředek 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 reagencie s prošlou trvanlivostí.

13. Bezpečnostní informace

Bezpečnostní informace k soupravě *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit naleznete v odpovídajících bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/safety.

14. Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO 9001 a ISO 13485 byla každá šarže *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

15. Literatura

(1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol.

Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

(2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 - 767.

16. Vysvětlení symbolů

	Použitelné do
	číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	číslo materiálu
	Manuál
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Teplotní rozmezí
	Obsah postačující pro <N> testů
	Ethanol
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Kvantifikační standard
	Interní kontrola

artus HSV-I/2 LC PCR Kit

Ochranné známky a vy oučení odpovědnosti
QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Diagnostics).

Registrované názvy, ochranné známky etc. použité v tomto manuá u ne ze považovat za nechráněné zákonem, ani když nejsou jako takové označeny.

artus HSV-I/2 LC PCR Kit, BioRobot EZI DSP Workstation, EZI DSP Virus Kit a EZI DSP Virus Card jsou diagnostické soupravy a přístroje označené značkou CE v sou adu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkty nejsou dostupné ve všech zemích.

Soupravy QIAamp Kit jsou určeny pro obecné aboratorní použití. Údaje produktu nebo jeho prezentace nejsou určeny k tomu, aby podáva y informace o diagnóze, prevenci nebo éčení nemoci.

Koupě souprav artus PCR Kit zahrnuje imitovanou icenci pro jejich použití v procesu po ymerázové řetězové reakce (PCR) v rámci humánní a veterinární in vitro diagnostiky, ve spojení s termocyk erem, jehož použití při automatizovaném provedení PCR je kryto předem sp atným icenčním pop atkem, který se odvádí bud p atbou spo ečnosti App ied Biosystems nebo koupí autorizovaného termocyk eru. Technologie PCR je chráněna národními patentními právy ekviva entními k USA patentům čís. 5.2I9.727 a 5.322.770 a 5.2I0.0I5 a 5.I76.995 a 6.040.I66 a 6.I97.563 a 5.994.056 a 6.I7I.785 a 5.487.972 a 5.804.375 a 5.407.800 a 5.3I0.652 a 5.994.056; v astněno firmou F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

1046888 151014026

Sample & Assay Technologies