

Příručka pro sadu *artus*[®] BK Virus RG PCR



24 (katalogové č. 4514263)



96 (katalogové č. 4514265)

Verze 1



In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q



4514263, 4514265



1056823CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

NĚMECKO

R4

MAT

1056823CS



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	7
Souhrn a vysvětlení	7
Informace o patogenu	7
Princip metody	8
Dodávané materiály	8
Obsah sady	8
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	9
Varování a bezpečnostní opatření	9
Všeobecná bezpečnostní opatření	10
Uchovávání a nakládání s reagensy	10
Postup	11
Izolace DNA	11
Interní kontrola	11
Protokol	
■ PCR a analýza dat	13
Interpretace výsledků	19
Kvantifikace	19
Výsledky	19
Řešení problémů	20
Řízení jakosti	22
Omezení	22
Charakteristiky chování	23
Analytická senzitivita	23
Specifická	24
Přesnost	25
Robustnost	26
Reprodukovatelnost	27
Diagnostické hodnocení	27
Literatura	27
Symboly	27
Kontaktní informace	28
Informace o způsobu objednávání	29

Zamýšlené použití

Sada *artus* BK Virus RG PCR je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci DNA viru BK (BKV) z lidské plazmy nebo moči. Tato diagnostická sada využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji Rotor-Gene Q.

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

Souhrn a vysvětlení

Sada *artus* BK Virus RG PCR je systém k přímému použití pro průkaz DNA viru BK pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístrojích Rotor-Gene Q. Směs BK Virus RG Master obsahuje reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci 274 bp dlouhého úseku genomu viru BK a také pro přímou detekci specifického amplikonu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000.

Kromě toho sada *artus* BK Virus 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 MDx, Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000. Limit detekce analytické PCR viru BK (viz „Analytická senzitivita“, strana 23) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (BK Virus RG QS 1–4), pomocí nichž lze určit množství virové DNA. Další informace viz „Interpretace výsledků“, strana 19.

Informace o patogenu

BK virus (BKV) je DNA virus patřící mezi polyomaviry. Primární infekce se vyskytuje hlavně v dětství a je obvykle asymptomatická. Séroprevalence u dospělých je až 90 %. Po primární infekci zůstává BKV latentní v ledvinových buňkách a může být opakovaně aktivován za podmínek imunitní deficience, například při transplantaci.

Infekce BKV může korelovat s tubulointersticiální nefritidou a stenózou uretry u příjemců renálních transplantátů a dále s hemoragickou cystitidou u příjemců transplantátů kostní dřeně. Je rovněž spojována s obrazem onemocnění, jako je vaskulopatie, pneumonitida, encefalitida, retinitida a dokonce i multiorgánové selhání.


Přetrvávající vysoká úroveň replikace BKV je typickou charakteristikou nefropatie spojované s polyomaviry (PAN) u pacientů po transplantaci ledvin. Klinicky relevantní infekce jsou většinou omezené na jedince s potlačenou imunitou.

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 BK Virus RG PCR Kit			(24)	(96)
Katalogové č.			4514263	4514265
Počet reakcí			24	96
Modrá	BK Virus RG Master		2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Žlutá	BK Virus RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	400 µl	400 µl
Červená	BK Virus RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kopií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	BK Virus RG QS2 [‡] (1 x 10 ³ kopií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	BK Virus RG QS3 [‡] (1 x 10 ² kopií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	BK Virus RG QS4 [‡] (1 x 10 ¹ kopií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Zelená	BK Virus 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 11)

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)
- 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* BK Virus 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 reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo pulzní třepačka) a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle a udržujte komponenty na ledu nebo v chladičím bloku (72-/96jamkový vkladací blok).

Uchovávání a nakládání s reagenty

Komponenty sady *artus* BK Virus 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 reagenty 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 lidské plazmy nebo moči pro použití se sadou *artus* BK Virus RG PCR. Purifikaci virové DNA proveďte podle pokynů v příručce pro sadu EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*) s počátečním objemem vzorku 400 µl.

Poznámka: Sada *artus* BK Virus 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* BK Virus RG PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“, strana 11).

Poznámka: Po izolaci pomocí sady EZ1 DSP Virus důrazně doporučujeme použít purifikované virové nukleové kyseliny ihned k PCR. Eluáty lze případně před analýzou PCR uchovávat až 3 tři dny při teplotě 4 °C.

Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává interní kontrola (BK Virus 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 11) 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 směst 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.

* Sada EZ1 DSP Virus je rovněž dostupná jako sada EASY*artus*[®] BK Virus RG PCR s certifikací CE-IVD v kombinaci se sadou *artus* BK Virus RG PCR (informace o možnostech objednávky viz strana 29).

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi BK Virus RG Master a BK Virus RG Mg-Sol, jak popisuje krok 2b protokolu (strana 14).

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 (BK Virus 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 reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběh 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 11). 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
BK Virus RG Master	7 µl	84 µl
BK Virus RG Mg-Sol	3 µl	36 µl
BK Virus RG IC	0 µl	0 µl
Celkový objem	10 µl	120 µl

- 2b. **Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi BK Virus RG Master a BK Virus 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 použitá výhradně ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
BK Virus RG Master	7 µl	84 µl
BK Virus RG Mg-Sol	3 µl	36 µl
BK Virus RG IC	1,5 µl	18 µl
Celkový objem	11,5 µl*	138 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 10 µl směsi Master Mix. Poté přidejte 15 µl eluátu z izolace DNA (viz tabulka 3). Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 15 µl alespoň jednoho kvantifikačního standardu (BK Virus RG QS 1–4) a jako negativní kontrolu 15 µl vody v kvalitě vhodné pro PCR (Water, PCR grade).**

Tabulka 3. Příprava PCR reakce

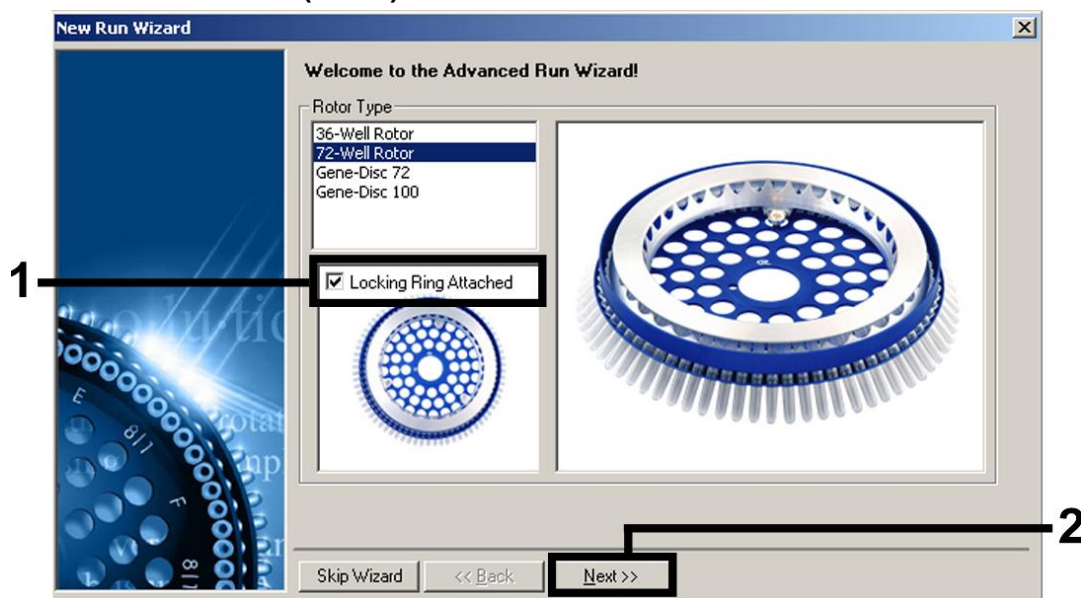
Počet vzorků	1	12
Master Mix	10 µl	po 10 µl
Vzorek	15 µl	po 15 µl
Celkový objem	25 µl	po 25 µl

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 viru BK 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

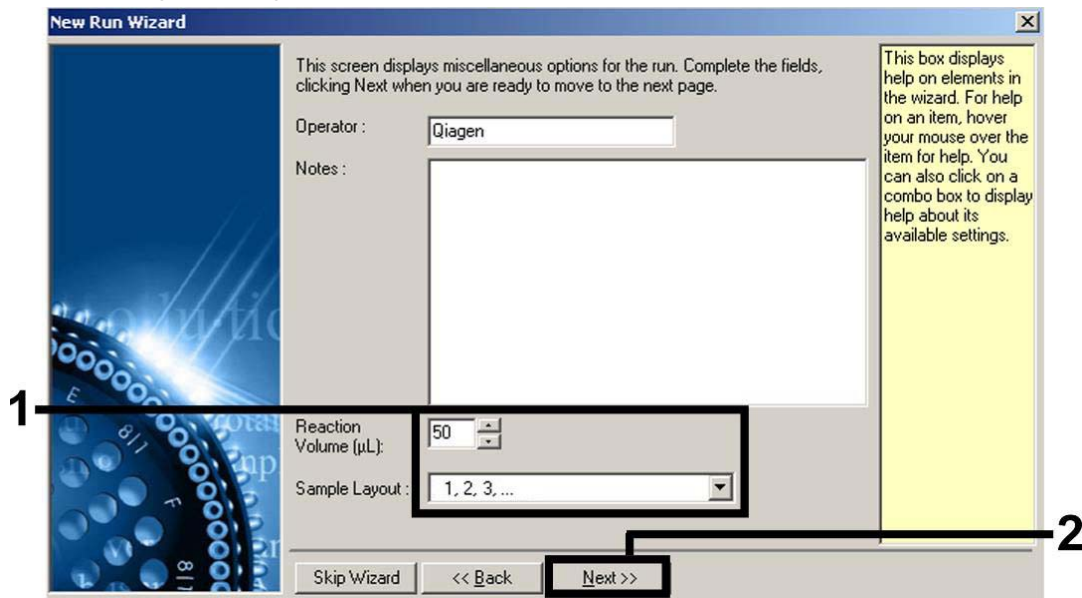
Všechny údaje se vztahují k softwaru Rotor-Gene Q MDx / Rotor-Gene Q verze 1.7.94 a softwaru Rotor-Gene 6000 verze 1.7.65. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Ilustrace se vztahují k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

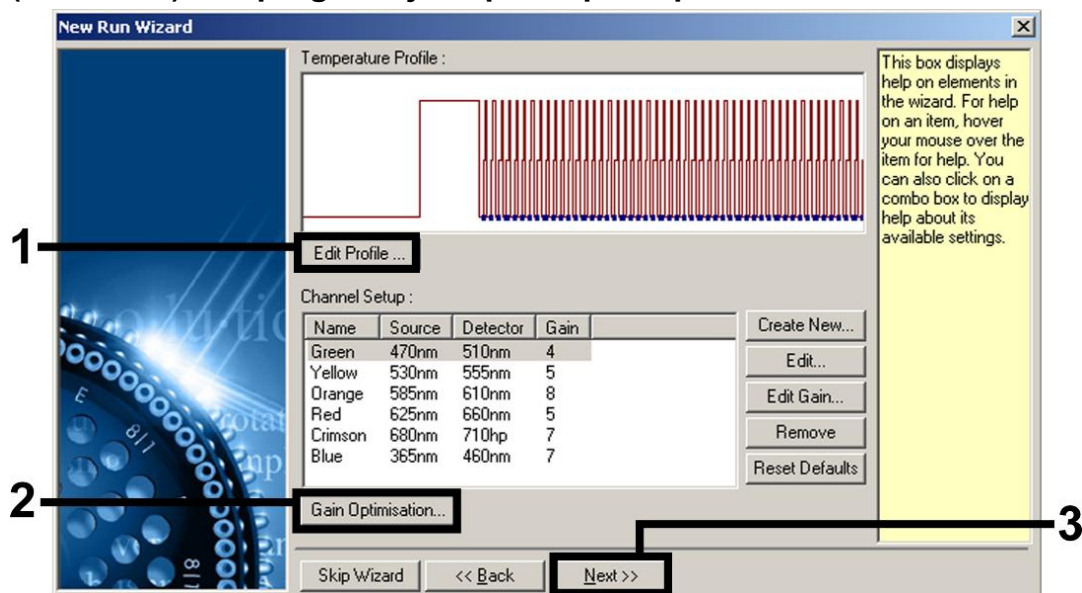
7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na “Next” (obrázek 2).



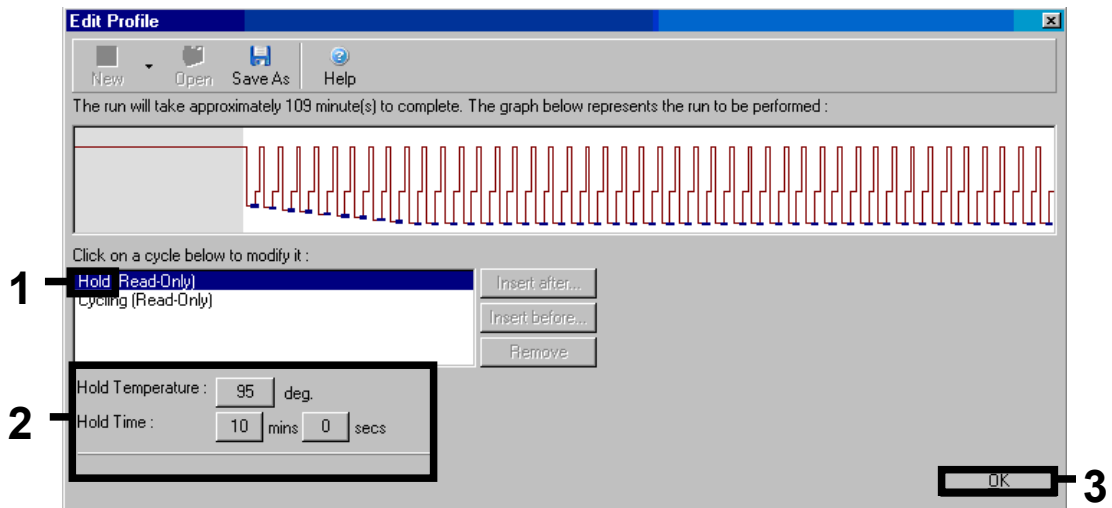
Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů analýzy.

Poznámka: I když reakční objem činí reálně 25 µl, v softwaru Rotor-Gene musíte zvolit reakční objem 50.

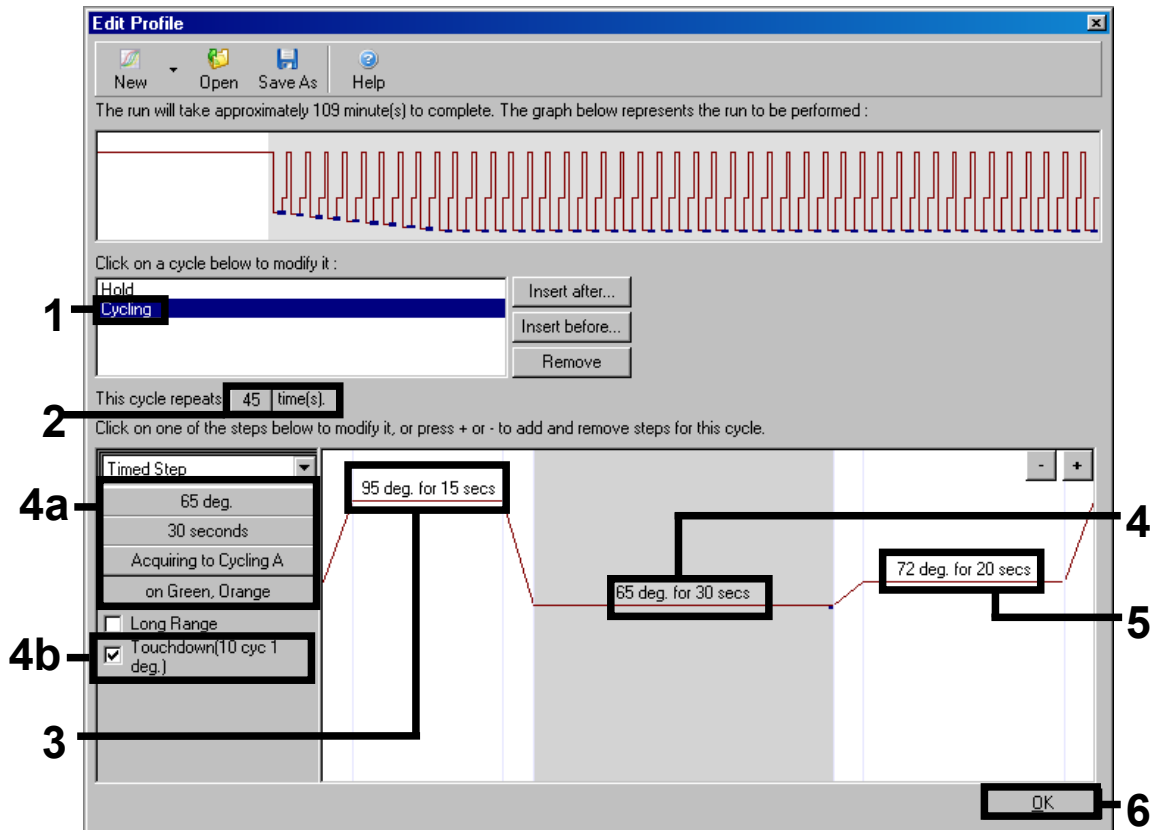
8. Klikněte na tlačítko “Edit Profile” v dalším okně “New Run Wizard” (obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 3-5.



Obrázek 3. Úprava profilu.



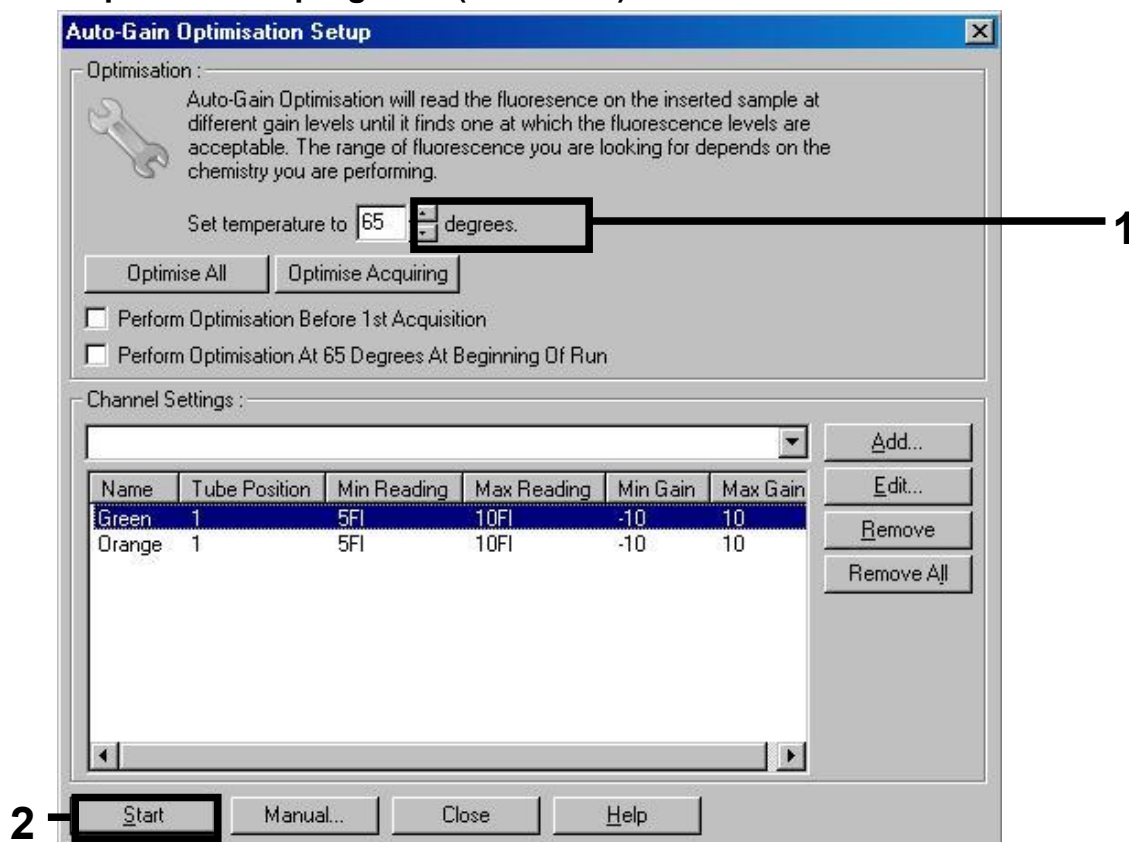
Obrázek 4. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



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

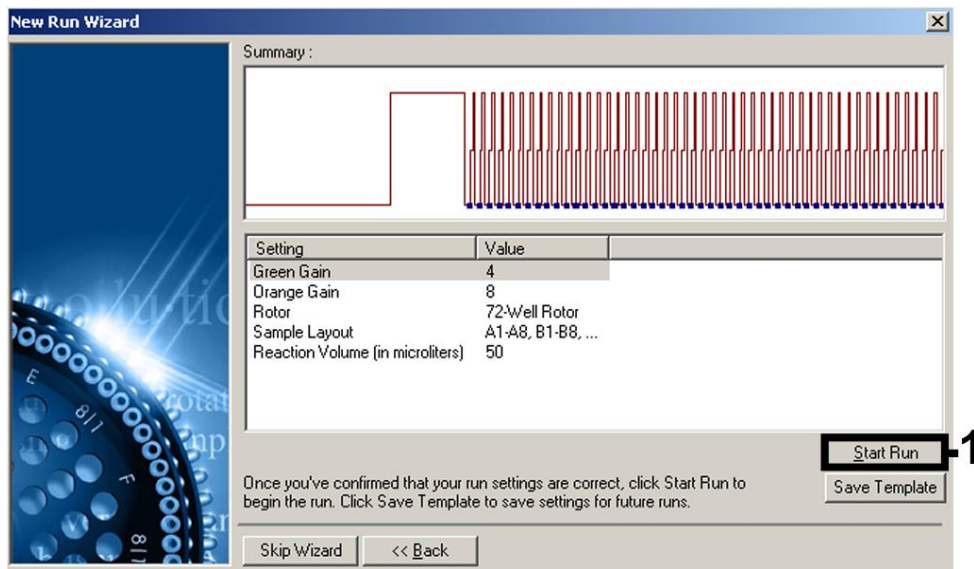
9. **Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity v PCR zkumavkách. Klikněte na “Gain Optimisation” v okně menu “New Run Wizard” (viz obrázek 3) pro otevření okna “Auto-Gain Optimisation Setup”. Nastavte kalibrační**

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).



Obrázek 7. Spuštění běhu.

Interpretace výsledků

Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (BK Virus RG QS 1–4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (15 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).

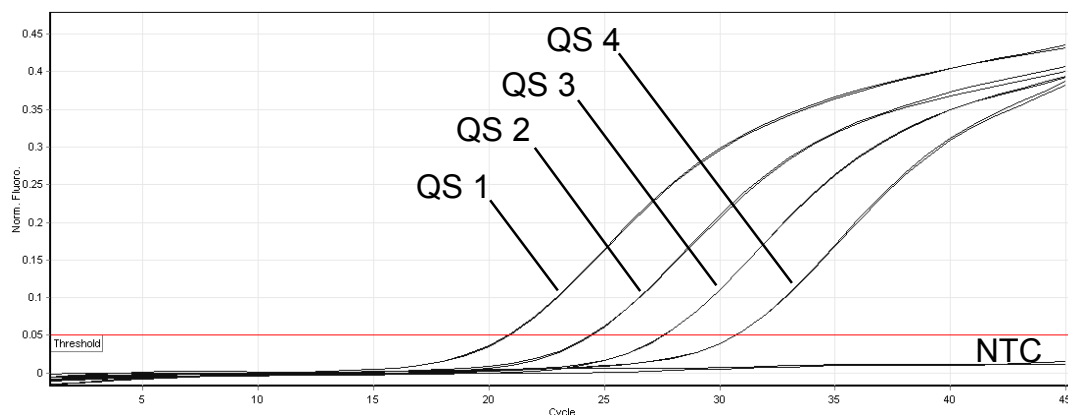
Poznámka: Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočítání hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

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

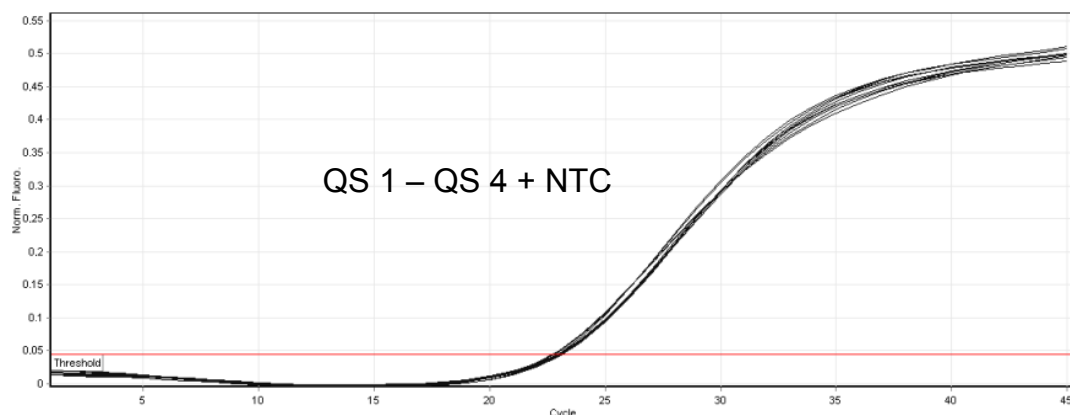
Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Výsledky

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



Obrázek 8. Průběh kvantifikačních standardů (BK Virus 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 (BK Virus RG QS 1–4). NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

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

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Orange podružná, protože vysoké výchozí koncentrace DNA viru BK (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 viru BK. Lze jej proto považovat za negativní.

Při negativní PCR na virus BK 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“ dále.

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 tomto manuálu 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 (BK Virus 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 PCR viru BK 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 13. |
| c) Chybná konfigurace PCR | Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem, případně PCR zopakujte. Viz „Protokol: PCR a analýza dat“, strana 13. |
| d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 10) | Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |
| e) Sada <i>artus</i> BK Virus RG PCR je prošlá | 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 plazmy nebo moči, který byl podroben purifikaci pomocí sady *artus* BK Virus RG PCR 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. |
| 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 11) a držte se přesně pokynů výrobce. |

Komentáře a návrhy

- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s **reagenciemi**“ (strana 10)
- e) Sada *artus* BK Virus RG PCR je prošlá
- Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- 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 reagenciemi.
- 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* BK Virus 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.

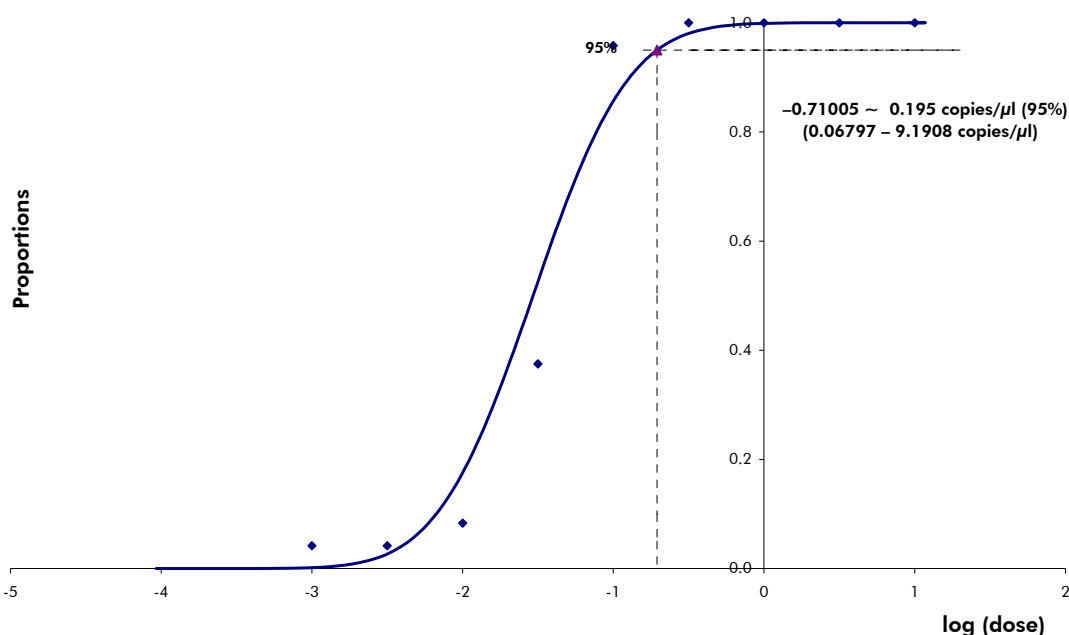
Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.

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* BK Virus RG PCR byla vytvořena řada ředění od 10 do nominálně 0,001 ekvivalentu kopie/ μ l. Ta byla následně analyzována za použití sady *artus* BK Virus 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* BK Virus RG PCR v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q MDx / Q / 6000 je 0,195 kopie/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95% pravděpodobností detekováno 0,195 kopie/ μ l.



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

Specificita

Specificita sady *artus* BK Virus 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 eventuelní homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách.

Detekovatelnost všech relevantních kmenů tak byla zajištěna na základě sladění databáze a běhu PCR na přístrojích Rotor-Gene s následujícími kmeny (viz tabulka 4).

Tabulka 4. Testování specificity relevantních kmenů

Virus	Kmen	Zdroj	Virus BK (Cycling Green)	Interní kontrola (Cycling Orange)
Virus BK	Dunlop	ATCC*	+	+
Virus BK	Gardner	ATCC	+	+
Virus BK	AB269822	Geneart	+	+
Virus BK	S72390	Geneart	+	+

* American Type Culture Collection.

Specificita byla navíc validována pomocí 30 různých vzorků plazmy negativních na BK virus. Ty negenerovaly žádné signály s primery a sondami specifickými pro virus BK, které jsou součástí směsi BK Virus RG Master.

Potenciální křížová reaktivita sady *artus* BK Virus RG PCR byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 5. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

Tabulka 5. Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů

Kontrolní skupina	BK Virus (Cycling Green)	Interní kontrola (Cycling Orange)
Cytomegalovirus	–	+
Virus Espteina-Barrové	–	+
Lidský herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (varicella-zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 6	–	+
Virus JC	–	+
Simian virus 40	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+

Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* BK Virus 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 sady *artus* BK Virus RG PCR byly stanoveny na základě kvantifikačního standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 1×10^1 kopií/ μ l). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě C_T hodnot amplifikačních křivek (C_T : prahový cyklus, viz tabulka 6). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 2,11 % (C_T) a 3,59 % (C_T) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 6. Data o přesnosti na základě hodnot C_T

	Hodnota C ^T	Směrodatná odchylka	Koeficient variace (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: BK Virus RG QS 4	29,45	0,17	0,56
Variabilita v rámci jednoho pokusu: Interní kontrola	24,31	0,12	0,49
Variabilita mezi různými pokusy: BK Virus RG QS 4	29,42	0,25	0,85
Variabilita mezi různými pokusy: Interní kontrola	23,30	0,77	3,30
Variabilita mezi různými šaržemi: BK Virus RG QS 4	30,31	0,64	2,10
Variabilita mezi různými šaržemi: Interní kontrola	22,53	0,40	1,78
Celková variabilita: BK Virus RG QS 4	29,80	0,63	2,11
Celková variabilita: Interní kontrola	23,12	0,83	3,59

Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* BK Virus RG PCR. 30 vzorků negativních na virus BK bylo smíšeno s 1 kopií/μl elučního objemu kontrolní DNA viru BK (přibližně pětinasobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí sady EZ1[®] DSP Virus (viz „Izolace DNA“, strana 11) byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus* BK Virus RG PCR. Četnost chyb činila u všech 30 vzorků 0 %. Dále byla přezkoušena robustnost interní kontroly na základě izolace a analýzy 30 vzorků negativních na virus BK. Celková četnost chyb činila 0%. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* BK Virus RG PCR činí tedy ≥ 99 %.

Reprodukovatelnost

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

Diagnostické hodnocení

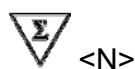
Sada *artus* BK Virus RG PCR je v současné době hodnocena v několika studiích.

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.

Symbols



Obsahuje reagenty 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> BK Virus RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, roztok hořčíku, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, roztok hořčíku, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4514265
Sady EASY<i>artus</i> BK Virus RG PCR – pro plně integrovanou, automatizovanou purifikaci vzorků a průkaz původce s certifikací CE-IVD		
EASY <i>artus</i> BK Virus 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> BK Virus RG PCR (24)	EA11423
EASY <i>artus</i> BK Virus 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> BK Virus RG PCR (24)	EA11424
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 reagensii, jednorázové držáky na špičky, jednorázové špičky s filtrem, zkumavky na vzorky, eluční zkumavky, pufry, 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.

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[®], EASYartus[®], EZ1[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group).

Omezená licenční smlouva

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

1. Sada artus BK Virus RG PCR může být používána výlučně v souladu s *Příručkou pro sadu artus BK Virus 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 komponent sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu artus BK Virus 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, přeprocessovat 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 zákazy 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)



Sample & Assay Technologies