

artus[®] VZV LC PCR komplekta rokasgrāmata



24 (kataloga Nr. 4502063)



96 (kataloga Nr. 4502065)

Kvantitatīva in vitro diagnostika

Lietošanai ar

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 un *LightCycler 2.0* ierīcēm

Janvāris 2015 – Versija 1



4502063, 4502065



1046899



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R3

MAT

1046899



artus VZV LC PCR komplekts

Preču zīmes un atrunas

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1® (QIAGEN Group), LightCycler®, (Roche Diagnostics).

Šajā dokumentā lietotie reģistrētie nosaukumi, preču zīmes u. tml., pat ja nav īpaši atzīmēti, ir aizsargāti ar likumu.

artus VZV LC PCR komplekts, BioRobot® EZ1® DSP darbstacija un EZ1 DSP Virus komplekts un karte ir diagnostikas ierīces ar CE-marķējumu, kas atbilst Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvai 98/79/EK par medicīnas ierīcēm, ko lieto *in vitro* diagnostikā. Nav pieejams visās valstīs.

QIAamp® komplekti ir paredzēti vispārējai izmantošanai laboratorijā. Netiek pieņemtas nekādas pretenzijas attiecībā uz informācijas sniegšanu par slimības diagnozi, profilaksi vai ārstēšanu.

Iegādājoties artus PCR komplektus, tiek piešķirta ierobežota licence, kas ļauj izmantot tos polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) procesos cilvēku un dzīvnieku *in vitro* diagnostikā kopā ar termocikleru, kura izmantošanu PCR procesa automatizētā funkcionēšanā paredz licences priekšapmaksu, veicot maksājumu uzņēmumam Applied Biosystems, vai pirkšana, t. i., autorizēts termociklers. Uz PCR procesu attiecas ārvalstu partneriem piemērojamie ASV patenti Nr. 5219727; 5322770; 5210015; 5176995; 6040166; 6197563; 5994056; 6171785; 5487972; 5804375; 5407800; 5310652 un 5994056, kuru īpašnieks ir F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007–2014 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

Satura rādītājs

1. Saturs	5
2. Uzglabāšana	6
3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces	6
4. Vispārējie piesardzības pasākumi	7
5. Informācija par slimības izraisītāju	7
6. Reāllaika PCR princips	7
7. Produkta apraksts	8
8. Protokols	9
8.1 DNS izolēšana.....	9
8.2 Iekšējā kontrole	12
8.3 Kvantitatīvā noteikšana.....	13
8.4 PCR sagatavošana.....	15
8.5 <i>LightCycler</i> ierīču programmēšana	22
8.5.1 <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i> ierīces programmēšana	22
8.5.2 <i>LightCycler 2.0</i> ierīces programmēšana	27

9. Datu analīze.....	31
9.1 PCR datu analīze <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i> ierīcē.....	31
9.2 PCR datu analīze <i>LightCycler 2.0</i> ierīcē.....	34
10. Problēmu novēršana	39
11. Tehniskie parametri.....	41
11.1 Analītiskā jutība	42
11.2 Specifiskums	43
11.3 Precizitāte.....	44
11.4 Robustums	47
11.5 Atrāžošanas spēja	48
11.6 Diagnostikas vērtējums.....	48
12. Produkta izmantošanas ierobežojumi.....	48
13. Drošības informācija	49
14. Kvalitātes kontrole	49
15. Atsauces.....	49
16. Simboli.....	50

artus VZV LC PCR komplekts

Izmantošanai ar *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīci.

1. Saturs

	Marķēšana un sastāvs	Art. Nr. 4502063 24 reakcijas	Art. Nr. 4502065 96 reakcijas
Zils	VZV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Sarkan s	VZV LC/TM QS 1 st 1 x 10 ⁴ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkan s	VZV LC/TM QS 2 st 1 x 10 ³ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkan s	VZV LC/TM QS 3 st 1 x 10 ² kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkan s	VZV LC/TM QS 4 st 1 x 10 ¹ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zaļš	VZV LC IC st	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Balts	Water (PCR grade) (Ūdens (PCR pakāpe))	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

- QS = Kvantitatīvās noteikšanas standarts
- IC = Iekšējā kontrole

2. Uzglabāšana

artus VZV LC PCR komplekta sastāvdaļas jāuzglabā no -15°C līdz -30°C temperatūrā un tās ir stabilas līdz derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Jāizvairās no atkārtotas (> 2 reizes) atkausēšanas un sasaldēšanas, jo tas var mazināt testa jutību. Ja reaģentus paredzēts izmantot neregulāri, tos nepieciešams sasaldēt alikvotās daļās. Uzglabāšanas ilgums $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūrā nedrīkst pārsniegt piecas stundas.

3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces

- Vienreizējās lietošanas cimdi bez pūdera
- DNS izolēšanas komplekts (skatīt **8.1 DNA Isolation**)
- Pipetes (pielāgojamas)
- Sterili pipetes uzgaļi ar filtriem
- Virpuļmikseris
- Galda centrifūga ar rotoru 2 ml reakcijas mēģenēm
- *Color Compensation Set* („Krāsu kompensācijas komplekts”) (Roche Diagnostics, kat. Nr. 2 158 850) *Crosstalk Color Compensation* faila instalācijai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcē
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (kat. Nr. 03 624 854 001) *LightCycler 2.0* ierīcei
- *LightCycler* kapilāri (20 μl)
- *LightCycler* dzesēšanas bloks
- *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (programmatūras versija 3.5) vai *LightCycler 2.0* (programmatūras versija 4.0) ierīce
- *LightCycler* ierīce vāciņu uzlikšanai/noņemšanai

4. Vispārējie piesardzības pasākumi

Lietotājam vienmēr jāpievērš uzmanība turpmāk minētajam:

- Izmantojiet sterilus pipetes uzgaļus ar filtriem.
- Uzglabājiet un ekstrahējiet pozitīvu materiālu (paraugus, kontroles un amplikonus) atsevišķi no pārējiem reaģentiem un pievienojiet to reakcijas maisījumam telpiski atdalītā iekārtā.
- Pirms testa sākšanas rūpīgi atkausējiet visas sastāvdaļas istabas temperatūrā.
- Pēc atkausēšanas sajauciet visas sastāvdaļas un īsu brīdi centrifugējiet.
- Strādājiet ātri uz ledu virsmas vai *LightCycler* dzesēšanas blokā.

5. Informācija par slimības izraisītāju

Varicella zoster vīruss (VZV) no cilvēka cilvēkam tiek pārnestis gaisa pilienu vai tieša kontakta ceļā. VZV infekcijai raksturīga neliela paaugstināta temperatūra un tā mēreni ietekmē vispārējo veselības stāvokli. Slimībai raksturīga polimorfa ekzēma ar pūslīšiem, čūlgām un krevelēm, kā arī stipra nieze (vējbakām). Smagas VZV infekcijas bieži novērojamas pacientiem ar imūnsupresiju un var radīt bīstamas komplikācijas, piemēram, pneimoniju un encefalītu. Pēc akūtas infekcijas slimības izraisītājs persistē sensoros spinālajos ganglijos un galvas smadzeņu nervu ganglijos. Novājinātas imunitātes gadījumā var attīstīties infekcijas uzliesmojumi (piemēram, labiālais herpes, jostas roze).

6. Reāllaika PCR princips

Slimības izraisītāja konstatēšana ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) pamatojas uz slimības izraisītāja genoma specifisku reģionu amplifikāciju. Reāllaika PCR amplificētais produkts tiek noteikts ar fluorescējošo krāsu palīdzību. Tās parasti ir saistītas ar oligonukleotīdu zondēm, kas ir tieši saistītas ar amplificēto produktu. Novērojot fluorescences intensitāti PCR norises laikā (t.i., reāllaikā), var konstatēt un kvantitatīvi noteikt uzkrājušos produktu, atkārtoti neatverot reakcijas stobriņus pēc PCR norises (Mackay, 2004).

7. Produkta apraksts

artus VZV LC PCR komplekts ir lietošanai gatava sistēma VZV DNS noteikšanai *LightCycler* ierīcēs, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). *VZV LC Master* satur reaģentus un enzīmus VZV genoma 82 bp reģiona specifiskai amplifikācijai un specifiskā amplikona tiešai noteikšanai *LightCycler*® 1.1/1.2/1.5 vai *LightCycler* 2.0 ierīcē. Turklāt *artus* VZV LC PCR komplekts satur otru heterologu amplifikācijas sistēmu iespējamai PCR inhibēšanas konstatēšanai.

PCR produkts	Fluorescences kanālu izvēle	
	<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5 ierīce	<i>LightCycler</i> ® 2.0 ierīce
VZV	F1/F2	530/640
VZV IC	F3/Back-F1	705/Back 530

Iekšējās kontroles (IC) amplifikācija un noteikšana nesamazina analītiskās VZV PCR noteikšanas robežu (skatīt **11.1 Analytical Sensitivity**). Ir nodrošinātas ārējās pozitīvās kontroles (*VZV LC/TM QS 1–4*), kas ļauj noteikt slimības izraisītāja slodzi. Detalizētu informāciju skatīt nodaļā **8.3 Quantitation**.

Uzmanību: Temperatūras profils VZV noteikšanai ar *artus* VZV LC PCR komplektu atbilst *artus* HSV-1/2 LC PCR komplekta, *artus* EBV LC PCR komplekta un *artus* CMV LC PCR komplekta profiliem. Tātad šo *artus* sistēmu PCR testus var veikt un analizēt vienā norisē. Lūdzu, ņemiet vērā PCR analīzes veikšanas rekomendācijas, kas sniegtas **8.3. Quantitation** un **9. Data Analysis** nodaļās.

8. Protokols

8.1 DNS izolēšana

Dažādi ražotāji piedāvā DNS izolēšanas komplektus. Paraugu daudzums DNS izolēšanas procedūrai ir atkarīgs no izmantotā protokola. Lūdzu, veiciet DNS izolēšanu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Ieteicams izmantot šādus izolēšanas komplektus:

Parauga materiāls	Nukleīnskābes izolēšanas komplekts	Kataloga numurs	Ražotājs	Nesēja RNS
Serums, plazma, CSF, uztriepes	QIAamp UltraSens Virus komplekts (50)	53 704	QIAGEN	iekļauta
	QIAamp DNA Mini komplekts (50)	51 304	QIAGEN	nav iekļauta
CSF	EZ1 DSP Virus komplekts (48)*	62 724	QIAGEN	iekļauta

*Lietošanai ar BioRobot EZ1 DSP darbstaciju (kat. Nr. 9001360) un EZ1 DSP Virus karti (kat. Nr. 9017707).

Svarīga piezīme QIAamp UltraSens Virus komplekta un QIAamp DNA Mini komplekta lietotājiem:

- **Nesēja RNS** izmantošana ir būtiski svarīga ekstrakcijas efektivitātei un tātad arī DNS/RNS iegūšanai. Ja izvēlētajā izolēšanas komplektā nav iekļauta nesēja RNS, ņemiet vērā, ka nesēja (RNS-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. Nr. 27-4110-01) pievienošana ir stingri ieteicama nukleīnskābju ekstrakcijai no bezšūnu organisma šķidrumiem un materiāliem ar zemu DNS/RNS saturu (piemēram, CSF). Šajos gadījumos rīkojieties šādi:
 - a) Izšķīdiniet liofilizēto nesēja RNS, izmantojot ekstrakcijas komplekta eluēšanas buferšķīduma (piemēram, QIAamp DNA Mini komplekta AE buferšķīdumu) (neizmantojiet līzes buferšķīdumu) un sagatavojiet atšķaidījumu ar 1 µg/µl koncentrāciju. Sadaliet šo nesēja RNS šķīdumu alikvotās daļās atbilstoši Jūsu vajadzībām un uzglabājiet tās -20°C temperatūrā. Izvairieties no atkārtotas RNS alikvoto daļu atkausēšanas un sasaldēšanas (> 2 reizes).
 - b) Izmantojiet 1 µg nesēja RNS uz 100 µl līzes buferšķīduma. Piemēram, ja saskaņā ar ekstrakcijas protokolu ieteicams izmantot 200 µl līzes buferšķīduma, pievienojiet 2 µl nesēja RNS (1 µg/µl) tieši līzes buferšķīdumam. Pirms katras ekstrakcijas jāgatavo svaigs līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījums (un *Iekšējā kontrole*, ja nepieciešams, skatīt **8.2 Internal Control**) saskaņā ar turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu:

Paraugu daudzums	1	12
Līzes buferšķīdums	piemēram, 200 µl	piemēram, 2,400 µl
Nesēja RNS (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Kopējais tilpums	202 µl	2424 µl
Tilpums uz ekstrakciju	200 µl	katrs 200 µl

- c) Lai veiktu ekstrakciju, uzreiz izmantojiet tikko sagatavotu līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījumu. Maisījuma uzglabāšana nav iespējama.

- **Nesēja RNS** izmantošana ir būtiski svarīga ekstrakcijas efektivitātei un tātad arī DNS/RNS iegūšanai. Lai palielinātu QIAamp UltraSens Virus komplektā iekļautās nesēja RNS stabilitāti, ieteicams veikt šādas darbības, kas atšķiras no ekstrakcijas komplekta lietotāja rokasgrāmatā aprakstītā:
 - Izšķīdiniet liofilizēto nesēja RNS pirms ekstrakcijas komplekta pirmās izmantošanas 310 µl komplektā iekļautā eluēšanas buferšķīduma (gala koncentrācija 1 µg/µl, neizmantojiet līzes buferšķīdumu). Sadaliet šo nesēja RNS šķīdumu alikvotās daļās atbilstoši Jūsu vajadzībām un uzglabājiet tās -20°C temperatūrā. Izvairieties no atkārtotas RNS alikvoto daļu atkausēšanas un sasaldēšanas (> 2 reizes).
 - Pirms katras ekstrakcijas jāgatavo svaigs līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījums (un *Iekšējā kontrole*, ja nepieciešams, skatīt **8.2. Internal Control**) saskaņā ar turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu:

Paraugu daudzums	1	12
Līzes buferšķīdums AC	800 µl	9600 µl
Nesēja RNS (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Kopējais tilpums	805,6 µl	9667,2 µl
Tilpums uz ekstrakciju	800 µl	katrs 800 µl

- Lai veiktu ekstrakciju, uzreiz izmantojiet tikko sagatavotu līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījumu. Maisījuma uzglabāšana nav iespējama.
- Lai sasniegtu visaugstāko *artus* VZV LC PCR komplekta jutību, DNS ir ieteicams eluēt 50 µl eluēšanas buferšķīduma.
 - **QIAamp UltraSens Virus komplekts** ļauj veikt parauga koncentrēšanu. Ja izmantojat parauga materiālu, kas nav serums vai plazma, pievienojiet paraugam vismaz 50% (tilpumkoncentrācijas) negatīvu cilvēka plazmu.
 - Izmantojot izolēšanas protokolus ar **etilspirtu** saturošiem mazgāšanas buferšķīdumiem, pirms eluēšanas veiciet papildu centrifugēšanu (trīs minūtes, 13 000 apgr./min), lai noņemtu atlikušo etilspirtu. Tas novērš iespējamo PCR inhibēšanu.

- *artus* VZV LC PCR komplektu nedrīkst izmantot ar **fenolu** saturošām izolēšanas metodēm.

Svarīga piezīme EZ1 DSP Virus komplekta lietotājiem:

- **Nesēja RNS** izmantošana ir būtiski svarīga ekstrakcijas efektivitātei un tāpat arī DNS/RNS iegūšanai. Pievienojiet atbilstošu nesēja RNS daudzumu katrai ekstrakcijai saskaņā ar *EZ1 DSP Virus komplekta rokasgrāmatas* norādījumiem.

Svarīgi: *artus* VZV LC PCR komplekta *Iekšējo kontroli* var lietot tieši izolēšanas procedūrā (skatīt **8.2. Internal Control**).

8.2 Iekšējā kontrole

Iekšējā kontrole (VZV LC IC) ietilpst komplektā. Tā ļauj lietotājam **gan kontrolēt DNS izolēšanas procedūru, gan pārbaudīt iespējamo PCR inhibēšanu** (skatīt Fig. 1). Izmantojot **EZ1 DSP Virus komplektu** ekstrakcijai, nepieciešams pievienot *Iekšējo kontroli* saskaņā ar norādījumiem *EZ1 DSP Virus komplekta rokasgrāmatā*. Izmantojot **QIAamp UltraSens Virus komplektu** vai **QIAamp DNA Mini komplektu**, pievienojiet izolējumam *Iekšējo kontroli* attiecībā 0,1 µl uz 1 µl eluēšanas tilpuma. Piemēram, izmantojot QIAamp DNA Mini komplektu, DNS tiek eluēta 50 µl AE buferšķīdumā. Tas nozīmē, ka sākumā jāpievieno 5 µl *Iekšējās kontroles*. *Iekšējās kontroles* daudzums ir atkarīgs **tikai** no eluēšanas tilpuma. *Iekšējā kontrole* un nesēja RNS (skatīt **8.1. DNA Isolation**) jāpievieno tikai

- līzes buferšķīduma un parauga materiāla maisījumam vai
- tieši līzes buferšķīdumam.

Iekšējo kontroli nedrīkst pievienot tieši parauga materiālam. Ja to pievieno līzes buferšķīdumam, ņemiet vērā, ka *Iekšējās kontroles* un līzes buferšķīduma/nesēja RNS maisījumam jābūt svaigi sagatavotam, un tas jāizmanto uzreiz (maisījuma uzglabāšana istabas

temperatūrā vai ledusskapī tikai dažas stundas var izraisīt *lekšējās kontroles* darbības zudumu un mazināt ekstrakcijas efektivitāti). **Nepievienojiet** *lekšējo kontroli* un nesēja RNS tieši parauga materiālam.

Pēc izvēles *lekšējo kontroli* var izmantot **tikai iespējamās PCR inhibēšanas pārbaudei** (skatīt Fig. 2). Šim nolūkam pievienojiet 0,5 µl *lekšējās kontroles* uz reakciju tieši 15 µl VZV LC Master šķīdumam. Katrai PCR reakcijai izmantojiet 15 µl Master Mix šķīduma, kas ir sagatavots pēc iepriekš minētā apraksta*, un pievienojiet 5 µl attīrītā parauga. Ja PCR norise ir paredzēta vairākiem paraugiem, palieliniet VZV LC Master un *lekšējās kontroles* tilpumu atbilstoši paraugu daudzumam (skatīt **8.4. Preparing the PCR**).

artus HSV-1/2 LC PCR komplekti un *artus* VZV LC PCR komplekti satur identisku *lekšējo kontroli (IC)*. *artus* EBV LC PCR komplekti un *artus* CMV LC PCR komplekti arī satur identisku *lekšējo kontroli*.

8.3 Kvantitatīvā noteikšana

Pievienotie *Kvantitatīvās noteikšanas standarti (VZV LC/TM QS 1–4)* tiek apstrādāti kā iepriekš attīrīti paraugi un tiek izmantots tāds pats tilpums (5 µl). Lai izveidotu standarta līkni *LightCycler* ierīcē, visi četri *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* jāizmanto šādi:

LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīce

Logā *Sample Loading Screen* definējiet VZV LC/TM QS 1–4 kā standartus ar norādītu koncentrāciju (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 3.5, B nodaļa, 2.4. punkts Paraugu datu ieraksts).

LightCycler 2.0 ierīce

* Tilpuma palielināšanās *lekšējās kontroles* pievienošanas rezultātā netiek ņemta vērā PCR testa sagatavošanas laikā. Detektēšanas sistēmas jutība netiek samazināta.

Lai definētu standartus, aktivizējiet funkciju *Analysis Type* loga *Samples* izvēlnē un izvēlieties *Absolute Quantification*. Tagad var definēt VZV LC/TM QS 1–4 kā standartus un ievadīt katram standartam atbilstošo koncentrāciju (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 4.0, 2.2. nodaļa Paraugu informācijas ievadīšana). Pārliecinieties, vai **nav** aktivizēta *Enable Controls* funkcija. Citādi analīzes iespēju izvēle datu analīzes veikšanai ir ierobežota (skatīt **9.2 PCR datu analīze *LightCycler 2.0* ierīcē**).

Pēc iepriekš minētā apraksta izveidoto standarta līkni iespējams izmantot turpmākajām norisēm, nodrošinot, lai vismaz viens standarts no **vienas** koncentrācijas ir izmantots pašreizējā norisē. Šim nolūkam jāimportē iepriekš izveidotā standarta līkne (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 3.5, B nodaļa, 4.2.5. punkts Kvantitatīvā noteikšana ar ārējo standarta līkni vai versija 4.0, 4.2.2 nodaļa Standarta līknes saglabāšana). Tomēr šī kvantitatīvās noteikšanas metode var izraisīt rezultātu novirzes variācijas dēļ starp dažādām PCR norisēm.

Ja PCR norisē integrēta vairāk nekā viena Herpes *artus* sistēma, lūdzu, analizējiet šīs dažādās sistēmas atsevišķi, izmantojot atbilstošos *Kvantitatīvās noteikšanas standartus*.

Uzmanību: *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* ir definēti kā kopijas/μl. Lai konvertētu ar standarta līkni iegūtās vērtības parauga materiāla kopijās/ml, izmantojiet šādu vienādojumu:

$$\text{Rezultāts (kopijas/ml)} = \frac{\text{Rezultāts (kop./}\mu\text{l)} \times \text{Eluēšanas tilpums (}\mu\text{l)}}{\text{Paugauga tilpums (ml)}}$$

Lūdzu, ņemiet vērā, ka iepriekš sniegtajā vienādojumā ir būtiski ievadīt sākotnējo parauga tilpumu. Tas jāievēro, ja parauga tilpums ir mainīts pirms nukleīnskābes ekstrakcijas (piemēram, samazinot tilpumu ar centrifugēšanu vai palielinot tilpumu atkārtotas papildināšanas rezultātā līdz izolējumam nepieciešamajam tilpumam).

Svarīgi: Norādījumi *artus* sistēmu kvantitatīvajai analīzei *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcē ir pieejami interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Tehniskā piezīme kvantitatīvai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcē).

8.4 PCR sagatavošana

Pārliecinieties, vai dzesēšanas bloks, kā arī kapilāru adapteri (*LightCycler* ierīces piederumi) ir iepriekš atdzesēti līdz +4°C temperatūrai. Ievietojiet vēlamo *LightCycler* kapilāru skaitu dzesēšanas bloka adapteros. Pārliecinieties, vai PCR norisē ir iekļauts vismaz viens *Kvantitatīvās noteikšanas standarts*, kā arī viena negatīva kontrole (*Water, PCR grade*). Lai izveidotu standarta līkni, katrai PCR norisei izmantojiet visus piedāvātos *Kvantitatīvās noteikšanas standartus* (*VZV LC/TM QS 1–4*). Pirms katras lietošanas reizes visi reaģenti pilnībā jāatkausē, jāsamaisa (atkārtoti ievielkot pipetē un izspiežot no tās vai ātri sajaucot virpuļmikserī) un īsu brīdi jācentrifugē.

Ja vēlaties izmantot *Iekšējo kontroli*, lai monitorētu DNS izolēšanas procedūru un pārbaudītu iespējamo PCR inhibēšanu, tā jau ir pievienota izolējumam (skatīt **8.2. Internal Control**). Šajā gadījumā, lūdzu, izmantojiet turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu (shematisku attēlojumu skatīt Fig. 1):

	Paraugu daudzums	1	12
1. Master Mix sagatavošana	<i>VZV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>VZV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Kopējais tilpums	15 µl	180 µl
2. PCR testa sagatavošana	Master Mix	15 µl	katrs 15 µl
	Paraugs	5 µl	katrs 5 µl
	Kopējais tilpums	20 µl	katrs 20 µl

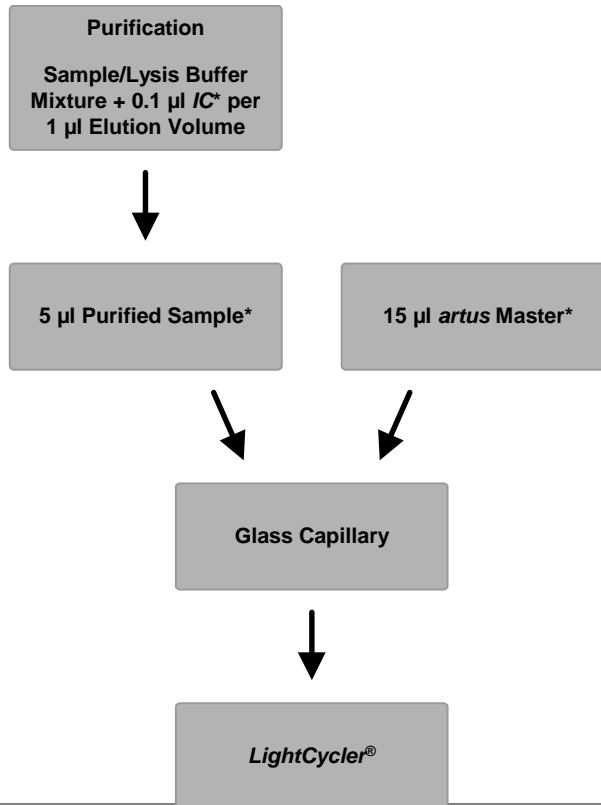
Ja vēlaties izmantot *Iekšējo kontroli tikai PCR inhibēšanas pārbaudei*, to jāpievieno tieši VZV LC Master šķīdumam. Šajā gadījumā, lūdzu, izmantojiet turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu (shematisku attēlojumu skatīt Fig. 2):

	Paraugu daudzums	1	12
1. Master Mix sagatavošana	VZV LC Master	15 µl	180 µl
	VZV LC IC	0,5 µl	6 µl
	Kopējais tilpums	15,5 µl*	186 µl
2. PCR testa sagatavošana	Master Mix	15 µl	katrs 15 µl
	Paraugs	5 µl	katrs 5 µl
	Kopējais tilpums	20 µl	katrs 20 µl

Ar pipeti iepiliniet 15 µl Master Mix katra kapilāra plastmasas rezervuārā. Tad pievienojiet 5 µl eluētā parauga DNS. Attiecīgi 5 µl vismaz viena *Kvantitatīvās noteikšanas standarta (VZV LC/TM QS 1–4)* jāizmanto kā pozitīvā kontrole un 5 µl ūdens (*Water, PCR grade*) kā negatīvā kontrole. Noslēdziet kapilārus. Lai pārnestu maisījumu no plastmasas rezervuāra uz kapilāru, 10 sekundes centrifugējiet adapterus ar kapilāriem galda centrifūgā ar maksimālo ātrumu 400 x g (2000 apgr./min).

* Tilpuma palielināšanās *Iekšējās kontroles* pievienošanas rezultātā netiek ņemta vērā PCR testa sagatavošanas laikā. Detektēšanas sistēmas jutība netiek samazināta.

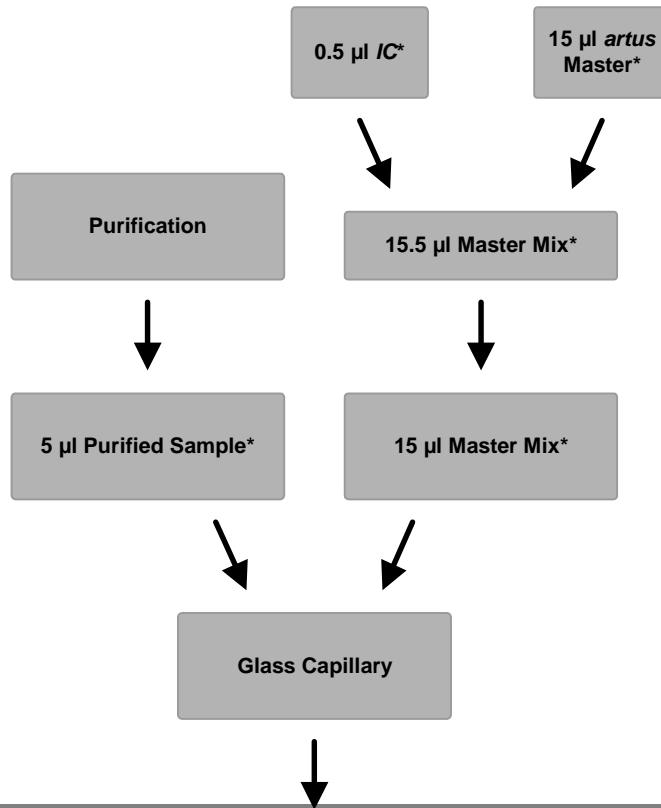
lekšējās kontroles pievienošana attīrīšanas procedūrai



1 att.: Shematiska darba plūsma attīrīšanas procedūras un PCR inhibēšanas kontrolei.

*Pārliecinieties, vai šķīdumi ir pilnībā atkausēti, rūpīgi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

lekšējās kontroles pievienošana artus Master šķīdumam



2att.: Shematiska darba plūsma PCR inhibēšanas kontrolei.

*Pārliecinieties, vai šķīdumi ir pilnībā atkausēti, rūpīgi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

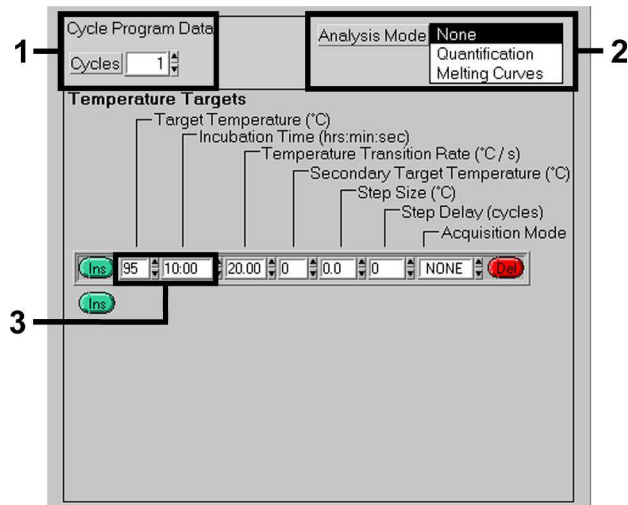
8.5 *LightCycler* ierīču programmēšana

8.5.1 *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīces programmēšana

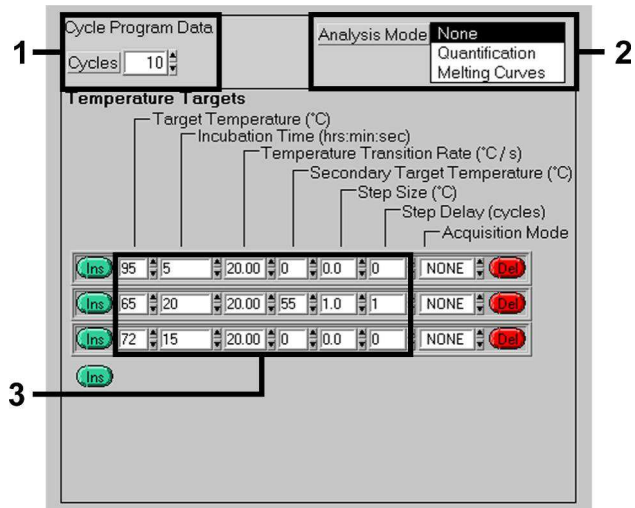
Lai noteiktu VZV DNS, izveidojiet temperatūras profilu savā *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīcē, ievērojot piecas turpmāk minētās darbības (skatīt 3.–7. attēlu).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana | Fig. 3 |
| B. | “Touch Down” solis | Fig. 4 |
| C. | DNS amplifikācija | Fig. 5 |
| D. | Kušanas līkne (pēc izvēles) | Fig. 6 |
| E. | Dzesēšana | Fig. 7 |

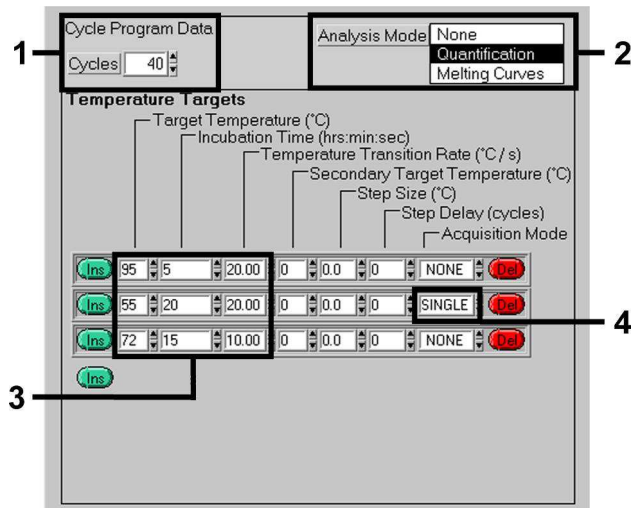
Īpašu uzmanību pievēršiet *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* un *Temperature Targets* iestatījumiem. Attēlos šie iestatījumi attēloti melnajos rāmjos. Detalizēta informācija par *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīces programmēšanu pieejama *LightCycler lietotāja instrukcijā*. Darbība D. PCR programma ir **izvēles** un nepieciešama tikai HSV 1 un 2 diferencēšanai, izmantojot *artus* HSV-1/2 LC PCR komplektu.



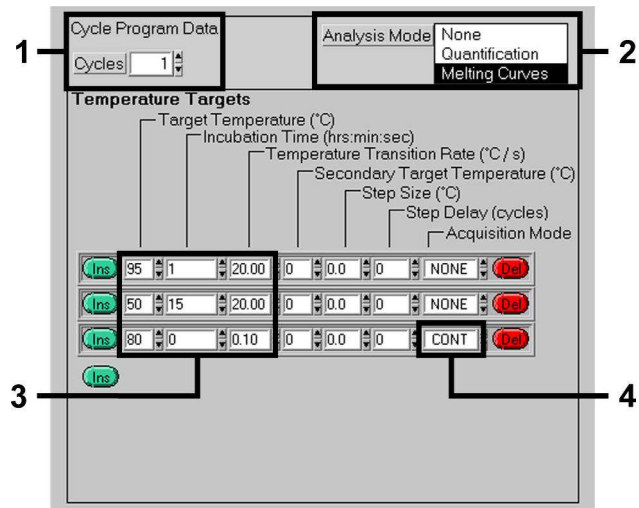
3 att.: Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana.



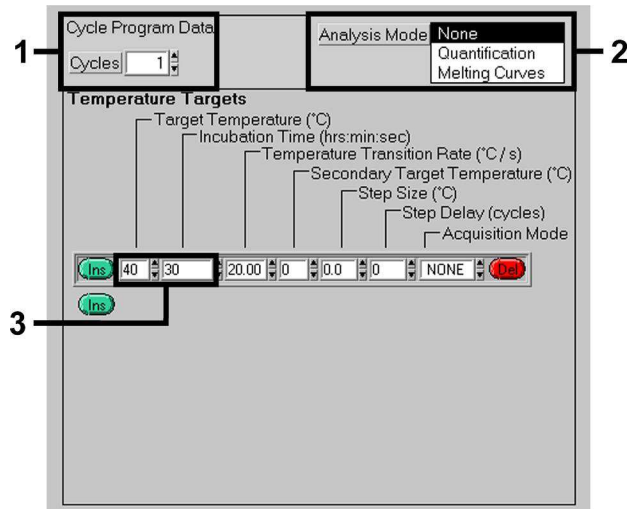
4. att.: "Touch Down" solis.



5. att.: DNS amplifikācija.



6. att.: Kušanas līkne.



7. att.: Dzesēšana.

8.5.2 *LightCycler 2.0* ierīces programmēšana

Lai programmētu PCR norisi *LightCycler 2.0* ierīcē, galvenajā izvēlnē aktivizējiet iespēju *New* un izvēlieties *LightCycler Experiment*.

Lai noteiktu VZV DNS, izveidojiet temperatūras profilu savā *LightCycler 2.0* ierīcē, ievērojot turpmāk minētās piecas darbības (skatīt Table 1).

- A. Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana
- B. "Touch Down" solis
- C. DNS amplifikācija
- D. Kušanas līkne (**pēc izvēles**)
- E. Dzesēšana

Darbība D. PCR programma ir **izvēles** un nepieciešama tikai HSV 1 un 2 diferencēšanai, izmantojot *artus* HSV-1/2 LC PCR komplektu.

Pārlicinieties, vai vispirms ir ievadīts PCR norisei sagatavoto kapilāru daudzums (*Max. Seek Pos.*, skatīt Fig. 8).

1. tabula: Temperatūras profila izveide.

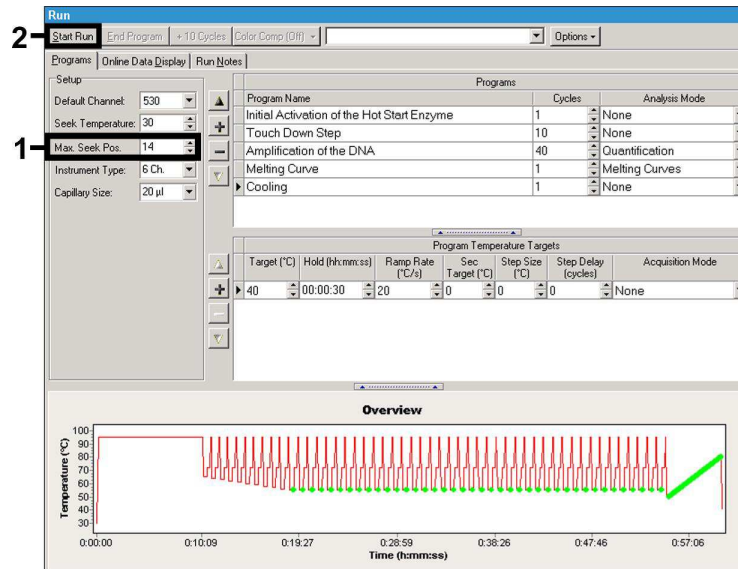
Program (Programma)	Target Mārkis [°C]	Hold (Aizture) [hh:mm:ss]	Ramp Rampveid [°C/s]	Sec Target Sekundā ais mārkis	Step Size (Solis) [°C]	Step Delay (Sola aizkave) [cikļi]	Acq. Mode (Ieguves režīms)	Cycles (Cikļi)	Analysis Mode (Testa režīms)
Activation (Aktivizācija)	95	00:10:00	20	0	0	0	None (Nav)	1	None (Nav)
Touch Down (Pakāpeniskā samazināšana)	95	00:00:05	20	0	0	0	None (Nav)	10	None (Nav)
	65	00:00:20	20	55	1	1	None (Nav)		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None (Nav)		
Amplification of the DNA (DNS amplifikācija)	95	00:00:05	20	0	0	0	None (Nav)	40	Quantificat on Kvantitatīv ā noteikšana
	55	00:00:20	20	0	0	0	Single Atsevišķs		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None (Nav)		

Melting Curve Kušanas līkne	95	00:00:01	20	0	0	0	None (Nav)	1	Melting Curve (Kušanas līkne)
	50	00:00:15	20	0	0	0	None (Nav)		
	80	00:00:00	0,1	0	0	0	Cont.		
Dzesēšana	40	00:00:30	20	0	0	0	None (Nav)	1	None (Nav)

Lai ievadītu parauga specifikācijas, aktivizējiet pogu *Samples*.

- Logā *Capillary View* vispirms ievadiet PCR norises kopējo PCR paraugu daudzumu (*Sample Count*).
- Logā *Sample Name* Jūs varat piešķirt paraugiem nosaukumus.
- Analītiskās VZV PCR noteikšanai zem *Selected Channels* izvēlieties fluorescences kanālu 530, bet *Iekšējās kontroles* PCR noteikšanai fluorescences kanālu 705.
- Lai definētu standartus un piešķirtu atbilstošu koncentrāciju, zem *Analysis Type* izvēlieties iespēju *Absolute Quantification* (skatīt **8.3. Quantitation**).
- Pārlicinieties, vai **nav** aktivizēta *Enable Controls* funkcija. Citādi analīzes iespēju izvēle datu analīzes veikšanai ir ierobežota (režīms *Fit Points* nav pieejams, skatīt **9.2 PCR datu analīze LightCycler 2.0 ierīcē**). Zem *Target Name* Jūs varat atlasīt izvēlētajos fluorescences kanālos 530 un 705 nosakāmās mērķa sekvenču (VZV vai *Iekšējā kontrole*). Kolonnas *Target Name* izpildi var atvieglot ar funkciju *Auto Copy...* *Target Name* uzstādīšana palīdz iegūt labāku pārskatu, bet tā nav obligāta datu analīzei.
- Lai izveidotu standarta līkni datu analīzei, jādefinē *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* ar to atbilstošu koncentrāciju. Lai to paveiktu, zem *Sample Type* izvēlieties *Standard* un zem *Concentration* ievadiet katram standartam atbilstošu koncentrāciju.

- Ieprogrammēto temperatūras profilu iespējams saglabāt datora cietajā diskā, lai to atkal izmantotu nākamajām norisēm. Šim nolūkam aktivizējiet funkciju *Save As...*, nospiežot izvēlnē uz *File*. Atvēršies jauns logs. Izvēlieties apakšizvēlni *Run Templates*, uzejot uz *Templates and Macros*, un saglabājiet datus ar atbilstošu nosaukumu.
- Lai sāktu PCR norisi, izvēlieties lauku *Run* un aktivizējiet funkciju *Start Run* (skatīt Fig. 8). PCR programma startēsies, kad ievadīsiet datu saglabāšanas vietu.



8. att.: PCR norises sākšana.

9. Datu analīze

9.1 PCR datu analīze *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīcē

LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīcē iegūto PCR datu analīzei ieteicams izmantot *LightCycler* programmatūras versiju 3.5.

Veicot daudzkrāsu analīzi, rodas traucējumi starp fluorimetra kanāliem. *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīces programmatūrā atrodas fails ar nosaukumu *Color Compensation File*, kas kompensē šos traucējumus. Atveriet šo failu pirms, pēc vai PCR norises laikā, aktivizējot pogu *Choose CCC File* vai *Select CC Data*. Ja fails *Color Compensation File* nav instalēts, izveidojiet to saskaņā ar *LightCycler lietotāja instrukcijas* norādījumiem. Pēc *Color Compensation File* aktivizēšanas parādās atsevišķi signāli fluorimetra kanālos F1, F2 un F3. PCR rezultātu, kas iegūti ar *artus VZV LC PCR* komplektu, analīzei izvēlieties fluorescences displeja iespēju F1/F2 analītiskajai VZV PCR un F3/Back-F1 *Iekšējās kontroles* PCR. Lai veiktu norišu kvantitatīvo analīzi, sekojiet **8.3. Quantitation** norādījumiem un **Tehniskajā piezīmē kvantitatīvajai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcē interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.**

Ja PCR norisē integrēta vairāk nekā viena Herpes *artus* sistēma, lūdzu, analizējiet šīs dažādās sistēmas atsevišķi, izmantojot atbilstošos *Kvantitatīvās noteikšanas standartus*. Atbilstoši izvēlieties rotora pozīcijas analīzes veikšanai.

Ir iespējami šādi rezultāti:

1. Signāls ir uztverts fluorimetra kanālā F1/F2.

Analīzes rezultāts ir pozitīvs: Paraugš satur VZV DNS.

Šajā gadījumā signāla uztveršana F3/Back-F1 kanālā nav obligāta, jo augstas VZV DNS sākotnējās koncentrācijas (pozitīvs signāls F1/F2 kanālā) var novest pie vāja *lekšējās kontroles* fluorescences signāla vai fluorescences signāla trūkuma F3/Back-F1 kanālā (konkurence).

2. Fluorimetra kanālā F1/F2 nav uztverts signāls. Vienlaicīgi *lekšējās kontroles* signāls parādās F3/Back-F1 kanālā.

Paraugā nav nosakāms VZV DNS. Rezultātu var uzskatīt par negatīvu.

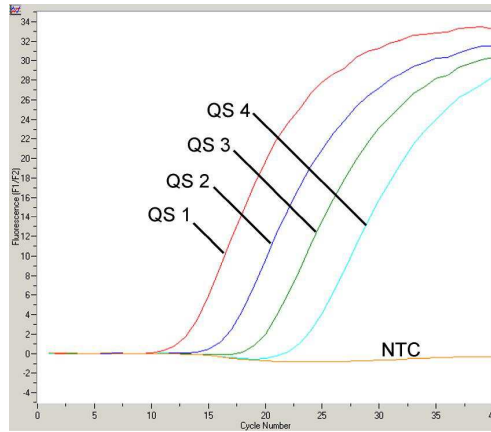
Negatīvas VZV PCR gadījumā uztverts *lekšējās kontroles* signāls izslēdz PCR inhibēšanas iespēju.

3. Signāls nav uztverts ne F1/F2, ne F3/Back-F1 kanālā.

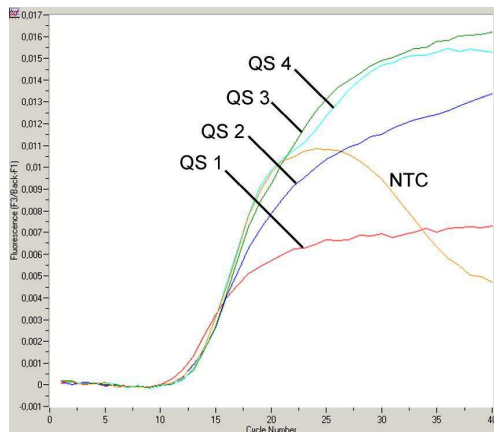
Diagnozi nevar uzstādīt.

Informācija par kļūdu avotiem un to risinājumu ir pieejama **10. Troubleshooting**.

Pozitīvo un negatīvo PCR reakciju piemēri attēloti Fig. 9 un Fig. 10.



9. att.: *Kvantitatīvās noteikšanas standartu (VZV LC/TM QS 1–4) detektēšana LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīces fluorimetra kanālā F1/F2. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).*



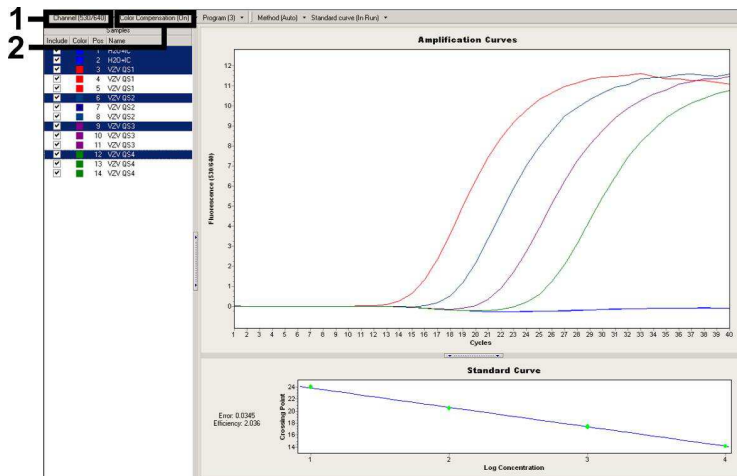
10. att.: *lekšējās kontroles (IC) detektēšana LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīces fluorimetra kanālā F3/Back-F1, vienlaicīgi veicot Kvantitatīvās noteikšanas standartu (VZV LC/TM QS 1–4) amplifikāciju. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole). Ierobežota krāsu kompensācija ir iemesls lekšējās kontroles signālu pārkļūjumam F3 ar pozitīvu signālu no F1. Šajā gadījumā nav iespējams analizēt lekšējās kontroles signālu (F3), kas pieder pie augsti pozitīviem parauga materiāliem vai kontrolēm.*

9.2 PCR datu analīze *LightCycler 2.0* ierīcē

LightCycler 2.0 ierīcē iegūto PCR datu analīzei izmantojiet *LightCycler* programmatūras versiju 4.0. Ievērojiet norādījumus, kas izklāstīti *LightCycler 2.0 ierīces lietotāja instrukcijā, versija 4.0*.

PCR datu analīzei veiciet šādas darbības (skatīt Fig. 11):

- Izvēlnes joslā aktivizējiet funkciju *Analysis* un izvēlieties iespēju *Absolute Quantification*. Būtiski, lai visi amplifikācijas dati, kas ir izveidoti ar *artus* LC PCR komplektu, tiktu analizēti ar šo funkciju.
- *LightCycler* programmatūras 4.0 versijā ir fails ar nosaukumu *Color Compensation File*, kas kompensē daudzkrāsu analīzes traucējumus starp fluorescences kanāliem. Atveriet šo failu pirms, pēc vai PCR norises laikā, aktivizējot *Color Comp (On/Off)*, un izvēlieties pogu *Select Color Compensation* (skatīt Fig. 11). Ja nav instalēts fails *Color Compensation File*, izveidojiet to saskaņā ar *LightCycler lietotāja instrukcijas* norādījumiem.
- Pēc *Color Compensation File* aktivizēšanas fluorescences kanālos parādās atsevišķi signāli. Ar *artus* VZV LC PCR komplektu iegūto PCR rezultātu analīzei izvēlieties fluorescences displeja iespēju 530/640 analītiskajai VZV PCR un 705/Back 530 *lekšējās kontroles* PCR.



11. att.: *Color Compensation File* aktivizēšana un fluorescences kanāla izvēle.

Lai veiktu norišu kvantitatīvo analīzi, sekojiet norādījumiem **8.3. Quantitation** un **Tehniskajā piezīmē** kvantitatīvajai noteikšanai **LightCycler 1.1/1.2/1.5** vai **LightCycler 2.0** ierīcē interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Kad analīzes iespējas ir iestatītas, ir iespējami šādi rezultāti:

1. Signāls ir uztverts fluorescences kanālā 530/640.

Analīzes rezultāts ir pozitīvs: Paraugs satur VZV DNS.

Šajā gadījumā signāla uztveršana 705/Back 530 kanālā nav obligāta, jo augstas VZV DNS sākotnējas koncentrācijas (pozitīvs signāls 530/640 kanālā) var novest pie *lekšējās kontroles* vāja fluorescences signāla vai fluorescences signāla trūkuma 705/Back 530 kanālā (konkurence).

2. Fluorescences kanālā 530/640 nav uztverts signāls. Vienlaicīgi *lekšējās kontroles* signāls parādās 705/Back 530 kanālā.

Paragā nav nosakāms VZV DNS. Rezultātu var uzskatīt par negatīvu.

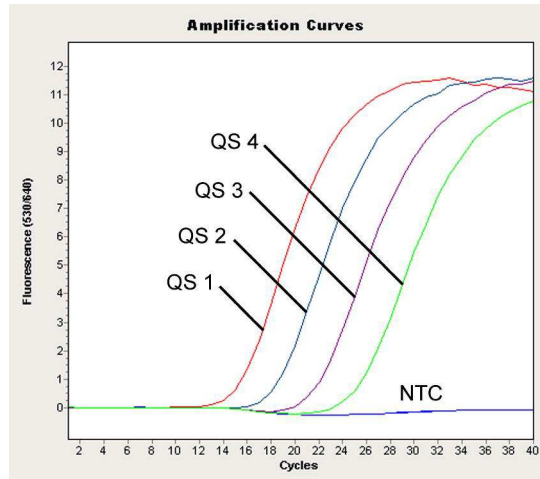
Negatīvas VZV PCR gadījumā uztverts *lekšējās kontroles* signāls izslēdz PCR inhibēšanas iespēju.

3. Signāls nav uztverts ne 530/640, ne 705/Back 530 kanālā.

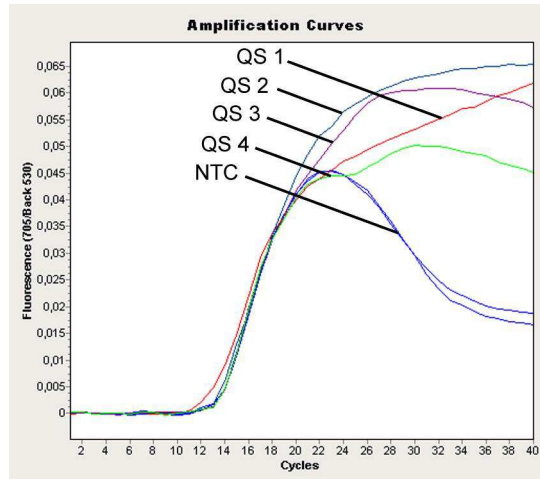
Diagnozi nevar uzstādīt.

Informācija par kļūdu avotiem un to risinājumu ir pieejama **10. Troubleshooting**.

Pozitīvo un negatīvo PCR reakciju piemēri attēloti Fig. 12 un Fig. 13.



12. att.: Kvantitatīvās noteikšanas standartu (VZV LC/TM QS 1–4) detektēšana *LightCycler* 2.0 ierīces fluorescences kanālā 530/640. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).



13. att.: *lekšējās kontroles (IC) detektēšana LightCycler 2.0 ierīces fluorescences kanālā 705/Back 530, vienlaicīgi veicot Kvantitatīvās noteikšanas standartu (VZV LC/TM QS 1–4) amplifikāciju. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).*

10. Problēmu novēršana

Nav signāla ar pozitīvām kontrolēm (VZV LC/TM QS 1–4) fluorescences kanālā F1/F2 vai 530/640:

- PCR datu analīzei izvēlētais fluorescences kanāls neatbilst protokolam.

- Analītiskajai VZV PCR datu analīzei izvēlieties fluorescences kanālu F1/F2 vai 530/640 un *lekšējās kontroles* PCR fluorescences kanālu F3/Back-F1 vai 705/Back 530.
- Nepareiza *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīces temperatūras profila programmēšana.
 - Salīdziniet temperatūras profilu ar protokolu (skatīt **8.5. LightCycler Instrumentu programmēšana**).
- Nepareiza PCR reakcijas konfigurācija.
 - Pārbaudiet darba soļus ar pipetēšanas shēmas palīdzību (skatīt **8.4. Preparing the PCR**) un nepieciešamības gadījumā atkārtojiet PCR.
- Uzglabāšanas nosacījumi vienai vai vairākām komplekta sastāvdaļām neatbilst norādījumiem **2. Storage** vai *artus* VZV LC PCR komplekta derīguma termiņš ir beidzies.
 - Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas nosacījumus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Vājš *lekšējās kontroles* signāls vai nav signāla fluorescences kanālā F3/Back-F1 vai 705/Back 530 un vienlaikus nav signāla kanālā F1/F2 vai 530/640:

- PCR apstākļi neatbilst protokolam.
 - Pārbaudiet PCR apstākļus (skatīt iepriekš) un nepieciešamības gadījumā atkārtojiet PCR ar pareiziem iestatījumiem.
- PCR ir inhibēta.
 - Pārliecinieties, vai pielietojat rekomendēto izolēšanas metodi (skatīt **8.1. DNA Isolation**) un stingri ievērojiet ražotāja norādījumus.
 - Pārliecinieties, vai DNS izolēšanas laikā pirms eluēšanas tika veikta rekomendētā papildu centrifugēšana, lai noņemtu jebkādus etilspirta atlikumus (skatīt **8.1. DNA Isolation**).
- DNS ekstrakcijas laikā ir pazaudēta.

- Ja ekstrakcijai tika pievienota *lekšējā kontrole*, *lekšējās kontroles* signāla trūkums var norādīt uz DNS pazaudēšanu ekstrakcijas laikā. Pārlicinieties, vai pielietojat rekomendēto izolēšanas metodi (skatīt **8.1. DNA Isolation**) un stingri ievērojiet ražotāja norādījumus.
- Uzglabāšanas nosacījumi vienai vai vairākām komplekta sastāvdaļām neatbilst norādījumiem **2. Storage** vai *artus VZV LC PCR* komplekta derīguma termiņš ir beidzies.
 - Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas nosacījumus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Signāli ar negatīvu kontroli analītiskās PCR fluorescences kanālā F1/F2 vai 530/640.

- PCR sagatavošanas laikā radās kontaminācija.
 - Atkārtojiet PCR ar jauniem reaģentiem replikātos.
 - Ja iespējams, noslēdziet PCR mēģenes tieši pēc testējamā parauga pievienošanas.
 - Pozitīvo kontroli vienmēr pipetējiet pēdējo.
 - Pārlicinieties, vai darba vieta un ierīces tiek regulāri tīrītas.
- Ekstrakcijas laikā radās kontaminācija.
 - Atkārtojiet testējamā parauga ekstrakciju un PCR, izmantojot jaunus reaģentus.
 - Pārlicinieties, vai darba vieta un ierīces tiek regulāri tīrītas.

Ja Jums rodas jautājumi vai problēmas, sazinieties ar mūsu tehnisko dienestu.

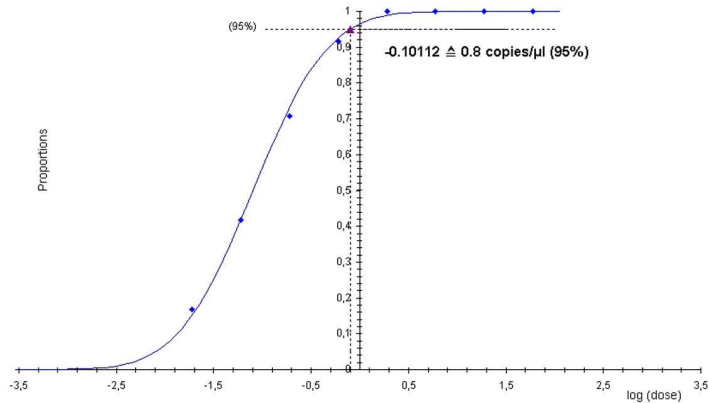
11. Tehniskie parametri

11.1 Analītiskā jutība

Lai noteiktu *artus* VZV LC PCR komplekta analītisko jutību, tika uzstādītas standarta atšķaidījumu sērijas no 60 līdz nominālam 0,019 VZV kopijas ekvivalenti/μl un analizētas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīcē, izmantojot *artus* VZV LC PCR komplektu. Testēšana tika veikta trīs dažādās dienās, izmantojot astoņus replikātus. Rezultāti tika noteikti ar probita analīzi. Probita analīzes grafiskais attēlojums ir redzams Fig. 14. *artus* VZV LC PCR komplekta analītiskās detektēšanas robeža kombinācijā ar *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīci vienmēr ir 0,8 kopijas/μl ($p = 0,05$). Tas nozīmē, ka pastāv 95% iespējamība, ka 0,8 kopijas/μl tiks detektētas.

Probita analīze: Varicella zoster vīruss (*LightCycler 1.1/1.2/1.5*)

* Standarts ir klonēts PCR produkts, kura koncentrācija ir noteikta absorbcijas un fluorescences spektroskopijas ceļā.



14. att.: *artus* VZV LC PCR komplekta analītiskā jutība *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīcē.

11.2 Specifiskums

artus VZV LC PCR komplekta specifiskumu pirmkārt un galvenokārt nodrošina praimeru un zonžu, kā arī stingru reakcijas apstākļu izvēle. Praimeru un zondes ar sekvenču salīdzināšanas analīzes palīdzību tika pārbaudīti uz iespējamām homologijām visām gēnu bankās publicētajām sekvencēm. Tādējādi ir nodrošināta visu attiecīgo celmu identificējamība.

Turklāt specifiskums tika apstiprināts ar 30 dažādiem VZV negatīviem cerebrospinālā šķidrums paraugiem. Paraugi nerādīja nekādus signālus ar VZV LC *Master* iekļautajiem VZV specifiskajiem praimeriem un zondēm.

Lai noteiktu *artus* VZV LC PCR komplekta specifiskumu, nākamajā tabulā (skatīt Table 2) minētā kontroles grupa tika pārbaudīta uz krustenisko reaktivitāti. Nevienš no pārbaudītajiem slimības izraisītājiem nebija reaktīvs.

2. tabula: Komplekta specifiskuma pārbaude ar potenciāli krusteniski reaģējošiem slimības izraisītājiem.

Kontroles grupa	VZV (F1/F2 vai 530/640)	Iekšējā kontrole (F3/Back-F1 vai 705/Back 530)
Cilvēka herpes vīruss 1 (Herpes simplex vīruss 1)	-	+
Cilvēka herpes vīruss 2 (Herpes simplex vīruss 2)	-	+
Cilvēka herpes vīruss 4 (Epšteina-Barra vīruss)	-	+
Cilvēka herpes vīruss 5 (Citomegalovīruss)	-	+
Cilvēka herpes vīruss 6A	-	+
Cilvēka herpes vīruss 6B	-	+
Cilvēka herpes vīruss 7	-	+
Cilvēka herpes vīruss 8 (ar Kapoši sarkomu asociētais herpes vīruss)	-	+

11.3 Precizitāte

artus VZB LC PCR komplekta precizitātes dati tika savākti ar *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīču palīdzību un tie ļauj noteikt kopējo testa novirzi. Kopējo novirzi veido **vienas analīzes rezultātu variācija** (daudzu paraugu rezultātu mainīgums tādai pašai koncentrācijai viena eksperimenta ietvaros), **dažādu analīžu rezultātu variācija** (daudzu testu rezultātu mainīgums, kas ir iegūti ar tāda paša tipa

dažādiem instrumentiem un ko ir veikuši dažādi operatori vienā laboratorijā) un **dažādu partiju analīžu rezultātu variācija** (daudzu testu rezultātu mainīgums, izmantojot dažādas partijas). Iegūtie dati tika izmantoti, lai noteiktu slimības izraisītājam specifiskās un *Iekšējās kontroles* PCR standartnovirzi, variāciju un variācijas koeficientu.

artus VZV LC PCR komplekta precizitātes dati tika savākti, izmantojot zemākās koncentrācijas *Kvantitatīvās noteikšanas standartu* (QS 4; 10 kopijas/μl). Testēšana tika veikta, izmantojot astoņus replikātus. Precizitātes dati tika aprēķināti, pamatojoties uz amplifikācijas līkņu Ct vērtībām (Ct: slietšķņa cikls, skatīt Table 3). Turklāt kvantitatīvo rezultātu precizitātes dati kā kopijas/μl tika noteikti, izmantojot atbilstošās Ct vērtības (skatīt Table 4). Pamatojoties uz šiem rezultātiem, katra dotā parauga vispārējā statistiskā izkliede ar minēto koncentrāciju ir 0,88% (Ct) vai 11,40% (konc.), *Iekšējās kontroles* detektēšanai 1,26 % (Ct). Šo vērtību pamatā ir noteikto variāciju visu atsevišķu vērtību kopums.

3. tabula: Precizitātes dati uz Ct vērtību pamata.

	Standartnovirze	Variācija	Variācijas koeficients [%]
Vienas analīzes rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Vienas analīzes rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,04	0,00	0,33
Dažādu analīžu rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	0,17	0,03	0,75
Dažādu analīžu rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,09	0,01	0,69
Dažādu partiju analīžu rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Dažādu partiju analīžu rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,15	0,02	1,16
Kopējā variācija: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,88
Kopējā variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,16	0,03	1,26

4. tabula: Precizitātes dati, balstoties uz kvantitatīviem rezultātiem (kopijās/μl)

	Standartnovirze	Variācija	Variācijas koeficients [%]
Vienas analīzes rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	1,33	1,77	13,19
Dažādu analīžu rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	0,97	0,94	9,66
Dažādu partiju analīžu rezultātu variācija: VZV LC/TM QS 4	1,29	1,67	12,83
Kopējā variācija: VZV LC/TM QS 4	1,15	1,32	11,40

11.4 Robustums

Robustuma pārbaude ļauj noteikt kopējo *artus* VZV LC PCR komplekta atteižu biežumu. 30 VZV negatīvos cerebrospīnālā šķidrums paraugos tika ievadītas 2,1 kopijas/μl VZV kontroles DNS eluēšanas tilpuma (analītiskās jutības robežas aptuveni trīskārtējā koncentrācija). Pēc ekstrakcijas, izmantojot QIAamp DNA Mini komplektu (skatīt **8.1. DNA Isolation**), šos paraugus analizēja ar *artus* VZV LC PCR komplektu. Visiem VZV paraugiem kļūdu intensitāte veidoja 0%. Turklāt *lekšējās kontroles* robustums tika novērtēts, attīrot un analizējot 30 VZV negatīvus cerebrospīnālā šķidrums paraugus. Kopējā kļūdu intensitāte veidoja 0%. Tātad *artus* VZV LC PCR komplekta robustums ir $\geq 99\%$.

11.5 Atražošanas

spēja

Atražošanas spējas dati ļauj veikt *artus* VZV LC PCR komplekta regulāru darbības vērtēšanu, kā arī efektivitātes salīdzināšanu ar citiem produktiem. Šie dati ir iegūti, piedaloties izveidotajās efektivitātes programmās.

11.6 Diagnostikas

vērtējums

Šobrīd *artus* VZV LC PCR komplekts ir pakļauts vairākiem vērtēšanas pētījumiem.

12. Produkta izmantošanas ierobežojumi

- Visi reaģenti paredzēti izmantošanai tikai in vitro diagnostikā.
- Produktu atļauts izmantot tikai personālam, kas ir speciāli apmācīts un trenēts in vitro diagnostikas procedūru veikšanā (EN375).
- Lai nodrošinātu optimālus PCR rezultātus, obligāti jāievēro lietotāja instrukcijas norādījumi.
- Nepieciešams pievērst uzmanību derīguma termiņam, kas norādīts uz kastes un visu sastāvdaļu etiķetēm. Neizmantojiet sastāvdaļas, kurām ir beidzies derīguma termiņš.

13. Drošības informācija

artus VZV LC PCR komplekta drošības informācija ir pieejama attiecīgajās drošības datu lapās (SDS). Drošības datu lapas ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas tiešsaistē www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitātes

kontrolē

Saskaņā ar QIAGEN ISO 9001 un ISO 13485 sertificēto Vispārējo kvalitātes kontroles sistēmu, katra *artus* VZV LC PCR komplekta partija ir pārbaudīta uz iepriekšnoteiktām specifikācijām, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti.

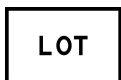
15. Atsauces

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190–212.

16. Simboli



Derīgs līdz



Partijas numurs



Ražotājs



Kataloga numurs



Materiāla numurs



Rokasgrāmata



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



<N>

Satur atbilstošu daudzumu <N> testiem

GTIN

Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs



Temperatūras ierobežojums

QS

Kvantitatīvās noteikšanas standarts

IC

Iekšējā kontrole

Šī lapa ar nolūku ir atstāta tukša

Šī lapa ar nolūku ir atstāta tukša

www.qiagen.com

Austrālija ■ techservice-au@qiagen.com

Austrija ■ techservice-at@qiagen.com

Beļģija ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazīlija ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Kanāda ■ techservice-ca@qiagen.com

Kīna ■ techservice-cn@qiagen.com

Dānija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Somija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Francija ■ techservice-fr@qiagen.com

Vācija ■ techservice-de@qiagen.com

Honkonga ■ techservice-hk@qiagen.com

Indija ■ techservice-india@qiagen.com

Īrija ■ techservice-uk@qiagen.com

Itālija ■ techservice-it@qiagen.com

Japāna ■ techservice-jp@qiagen.com

Dienvīdķoreja ■ techservice-kr@qiagen.com

Luksemburga ■ techservice-bnl@qiagen.com

Meksika ■ techservice-mx@qiagen.com

Nīderlande ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norvēģija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapūra ■ techservice-sg@qiagen.com

Zviedrija ■ techservice-nordic@qiagen.com

Šveice ■ techservice-ch@qiagen.com

Apvienotā Karaliste ■ techservice-uk@qiagen.com

ASV ■ techservice-us@qiagen.com

