

# Наръчник за *artus*<sup>®</sup> HSV-1/2 RG PCR кит



24 (Каталожен номер 4500263)



96 (Каталожен номер 4500265)

Версия 1

**IVD**

Количествено определяне за ин витро диагностична употреба

Да се използва с Rotor-Gene<sup>®</sup> Q инструменти



**REF**

4500263, 4500265

**HB**

1060171BG



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R2

**MAT**

1060171BG



## **QIAGEN Иновативни технологии за експериментален анализ**

QIAGEN е водещ доставчик на иновативни технологии за експериментален анализ, предоставящ възможности за изолиране и определяне съдържанието на биологични проби от всякакъв произход. Нашите модерни, висококачествени продукти и услуги гарантират успех от пробата до самия резултат.

### **QIAGEN поставя стандарти за:**


- Пречистване на ДНК, РНК и протеини
- Анализ на нуклеинови киселини и белтъци
- Микро РНК изследвания и РНК интерференция
- Автоматизация на експерименталните технологии

Мисията ни е да ви помогнем да постигнете изключителни успехи и научни постижения. За повече информация посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# **Съдържание**

<b>Съдържание на кита</b>	<b>4</b>
<b>Символи</b>	<b>4</b>
<b>Съхранение</b>	<b>5</b>
<b>Предназначение</b>	<b>5</b>
<b>Ограничения в използването на продукта</b>	<b>5</b>
<b>Техническо съдействие</b>	<b>6</b>
<b>Контрол на качеството</b>	<b>6</b>
<b>Предупреждения и предпазни мерки</b>	<b>7</b>
<b>Въведение</b>	<b>8</b>
Принцип	8
Информация за патогена	8
Работни характеристики	9
<b>Оборудване и реактиви, които се осигуряват от потребителя</b>	<b>16</b>
<b>Важни забележки</b>	<b>18</b>
Общи предпазни мерки	18
Изолиране на ДНК	18
Вътрешна контрола	19
<b>Протокол</b>	
■ PCR и анализ на данните	<b>20</b>
<b>Ръководство за отстраняване на проблеми</b>	<b>30</b>
<b>Референции</b>	<b>33</b>
<b>Информация за поръчки</b>	<b>34</b>

## Съдържание на кита

<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит		(24)	(96)
Каталожен номер		4500263	4500265
Брой на реакциите		24	96
Син	HSV-1/2 RG Master	2 x 300µl	8 x 300µl
Жълт	HSV-1/2 RG Mg-Sol* <b>Mg-Sol</b>	600 µl	600 µl
Червен	HSV-1 RG PC <sup>†</sup> (100 копия/µl)	200 µl	200 µl
Кафяв	HSV-2 RG PC <sup>†</sup> (100 копия/µl)	200 µl	200 µl
Зелен	HSV-1/2 RG IC <sup>‡</sup> <b>IC</b>	1000 µl	2 x 1000 µl
Бял	Вода (PCR клас)	1000 µl	1000 µl
	Наръчник за кита 	1	1

\* Магнезиев разтвор

† Положителна контрола

‡ Вътрешна контрола

## СИМВОЛИ



<N>

Съдържа реактиви за <N> на брой тестове



Използвайте с



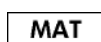
Медицинско средство за ин витро диагностика



Каталожен номер



Номер на партида



Номер на материал



Компоненти



Съдържа



Номер



Номер на продукта за международна търговия



Температурни ограничения



Законен производител



Вижте информацията, дадена в наръчника



Важна забележка

## Съхранение

Компонентите на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит трябва да се съхраняват при температури от  $-15^{\circ}\text{C}$  до  $-30^{\circ}\text{C}$  и те са стабилни до изтичането на срока на годност, посочен на етикета. Трябва да се избягва повтарящо се размразяване и замразяване (повече от 2 пъти), тъй като това може да намали чувствителността на анализа. Ако реактивите се използват само частично, те трябва да се замразяват на порции. Времето за съхранение при температури между  $2-8^{\circ}\text{C}$  не трябва да бъде повече от 5 часа.

## Предназначение

*Artus* HSV-1/2 RG PCR кит представлява комплект от реактиви за извършване на анализ, основан на полимеразна верижна реакция (PCR), в реално време за откриване и разграничаване на ДНК на човешки херпес симплекс вирус 1 и 2 на инструмент Rotor-Gene Q след напълно автоматизирано пречистване на проби от гръбначно-мозъчна течност (CSF) от заразени с HSV индивиди чрез използване на EZ1<sup>®</sup> DSP Virus кит.



*Artus* HSV-1/2 RG PCR кит не може да се използва с инструменти Rotor-Gene Q 2plex.

*Artus* HSV-1/2 RG PCR кит е предназначен за използване съвместно с клиничната картина и другите лабораторни маркери за прогнозиране на заболяването.

## Ограничения в използването на продукта

Всички реагенти могат единствено да бъдат използвани за ин витро диагностика. Продуктът трябва да се използва от персонал, специално инструктиран и обучен за извършване само на ин витро диагностични процедури (EN375).

Изисква се точно спазване на изискванията от наръчника за потребителя за получаване на оптимални PCR резултати.

Трябва да се обръща внимание на сроковете на годност, отпечатани върху кутията и етикетите на всички компоненти. Не трябва да се използват компоненти с изтекъл срок на годност.

## Техническо съдействие

В QIAGEN, ние се гордеем с качеството и достъпността на нашата техническа поддръжка. В нашият технически център разполагаме с учени с богат практически и теоретичен опит в областта на технологиите за анализ и използването на Qiagen® продукти. Ако имате въпроси или срещате някакви трудности, свързани с *artus* HSV-1/2 RG PCR кит или продукти QIAGEN като цяло, моля, не се колебайте да се свържете с нас.

Клиентите, използващи продукти QIAGEN са основния източник на информация за напреднали или специализирани приложения на нашите продукти. Тази информация е полезна на други учени, както и на разработчиците на QIAGEN. Затова ние Ви окуражаваме да се свързвате с нас, ако имате предложения, свързани с работата на продукта или за нови приложения и техники.

За получаване на техническо съдействие и повече информация, моля да посетите нашия технически помощен център на [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) или се обадете на техническия отдел на QIAGEN или на местния дистрибутор (вижте последната страница от наръчника или посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Контрол на качеството

В съответствие с ISO-сертифицираната система за управление на качеството на QIAGEN, всяка партида от *artus* HSV-1/2 RG PCR кит е тествана спрямо предварително определени характеристики, за да се гарантира постоянно качество на продукта.

## Предупреждения и предпазни мерки

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация прочетете съответните таблици с данни за безопасността на материалите (SDSs). Те са достъпни в интернет в удобен и компактен PDF формат на адрес [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), където можете да намерите, прегледате и принтирате данни за безопасността на материалите (SDS) за всеки QIAGEN® кит и компонент на кит.

Изхвърляйте пробите и отпадъците от анализите в съответствие с местните процедури и наредби за безопасност.

## Въведение

*Artus* HSV-1/2 RG PCR кит представлява готова за използване система за откриване на ДНК на HSV-1 и HSV-2 чрез прилагане на полимеразна верижна реакция (PCR) с инструменти Rotor-Gene Q. HSV-1/2 RG Master съдържа реактиви и ензими за специфично размножаване на 154 bp регион на геномите HSV-1 и HSV-2 и за директно откриване на специфичния апликон във флуоресцентен канал Cycling Green (източник 470 nm, детектор 510 nm) и в канал Cycling Orange (източник 585 nm, детектор 610 nm) с инструменти Rotor-Gene Q.

В допълнение, *artus* HSV-1/2 RG PCR кит съдържа втора хомоложна система за размножаване за установяване на вероятно PCR инхибиране. Това се установява като вътрешна контрола (IC) във флуоресцентен канал Cycling Yellow (източник 530 nm, детектор 555 nm) с инструменти Rotor-Gene Q. Работният обхват на аналитичния HSV-1/2 RG PCR (вижте “Аналитична чувствителност”, стр. 9) не е намален. Доставени са също външни положителни контроли (HSV-1 RG PC и HSV-2 RG PC).

## Принцип

Откриването на патогена чрез полимеразна верижна реакция (PCR) се основава на размножаване на специфични региони на патогенния геном. При PCR анализа в реално време размноженият продукт се открива чрез флуоресцентни багрила.

Те обикновено са свързани с олигонуклеотидни сонди, които са съединени по специфичен начин към размножения продукт. Следенето на интензитета на флуоресценцията по време на PCR опита (например, в реално време) позволява акумулираният продукт да се открива и определя количествено без да се налага да се отварят реакционните епруветки след приключването на PCR опита.\*

## Информация за патогена

Херпес симплекс вирус (HSV) се намира в лезиини течности, слюнка, гръбначно-мозъчната течност (CSF) и вагинални секрети. Той се предава основно чрез директен контакт с лезии и чрез сексуален контакт, както и перинатално. Повечето HSV положителни случаи се характеризират с поражения по кожата, лигавиците на устата и гениталиите. HSV инфекцията може да бъде или първична (> 90 % от тези случаи са асимптоматични) или рецидивираща (вторична). Първичната инфекция с HSV-1 може да доведе, между другото, до гингивостоматит, екзема herpeticum, кератоконюнктивит и енцефалит; първичното заразяване с вирус HSV-2, между другото, се проявява като вулвовагинит, менингит и генерализирани херпеси при новородени. Първичните симптоми на вторична инфекция са поражения по кожата в носа, устата и гениталните зони. Още по-тежки са повтарящите се форми на кератоконюнктивит и менингит.

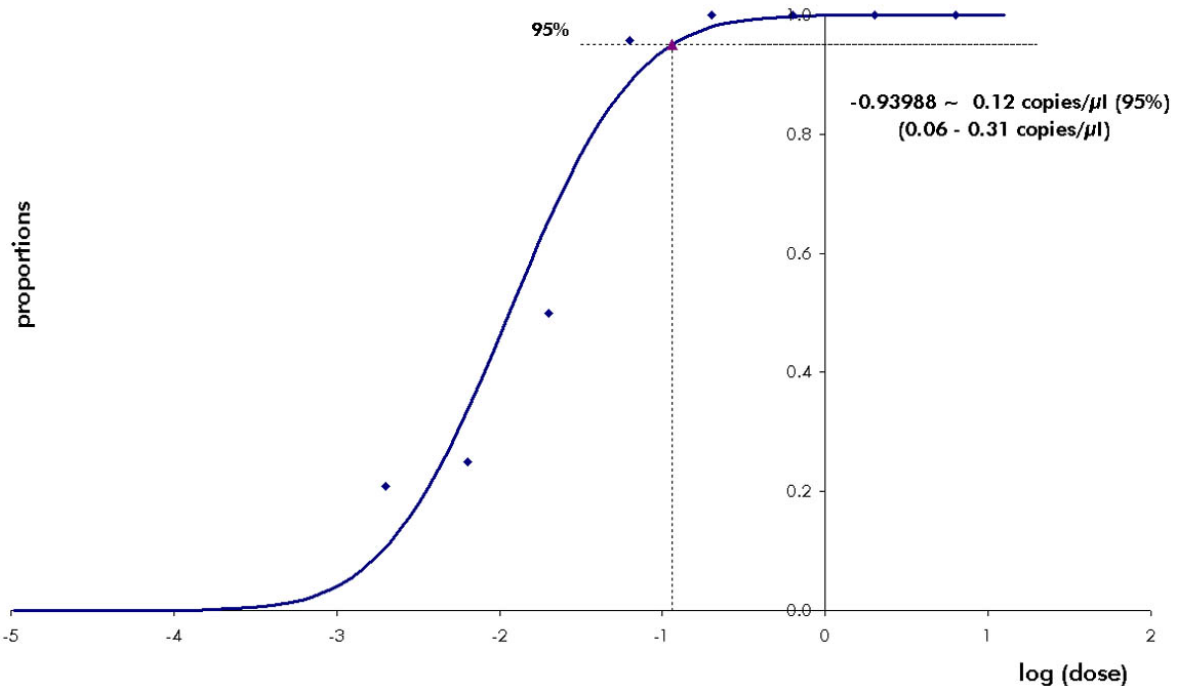


\* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

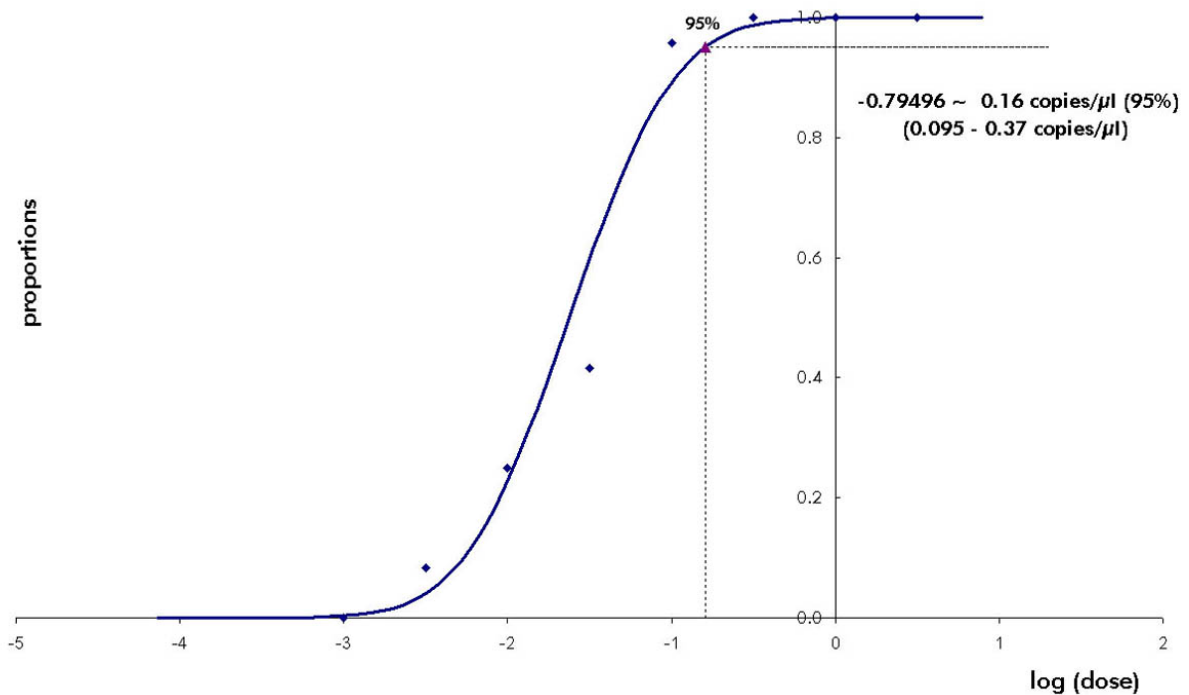
## Работни характеристики

### Аналитична чувствителност

С цел определяне на аналитичната чувствителност на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит бяха приготвени стандартни серии от разтвори от 10 до 0.001 копия/μl и същите бяха анализирани с инструмент Rotor-Gene Q/6000 в комбинация с *artus* HSV-1/2 RG PCR кит. Тестовете бяха проведени в три различни дни с по 8 повторения. Резултатите бяха определени чрез probit анализ. Аналитичният работен обхват на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит в комбинация с инструмент Rotor-Gene Q/6000 е систематично 0.12 копия/μl ( $p = 0.05$ ) за вирус HSV-1 и 0.16 копия/μl ( $p=0.05$ ) за вирус HSV-2. Това означава, че има 95% вероятност да бъдат открити 0.12 копия/μl от ДНК на вирус HSV-1 или 0.16 копия/μl от ДНК на вирус HSV-2. Графична илюстрация на probit анализа за вирус HSV-1 е показана на Фигура 1 по-надолу; диаграмата за probit анализа за вирус HSV-2 е показана на Фигура 2.



**Фигура 1. Probit анализ: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000).** Аналитична чувствителност към вирус HSV-1 на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит с инструмент Rotor-GeneQ/ 6000.



**Фигура 2. Probit анализ: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000).** Аналитична чувствителност към вирус HSV-2 на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит с инструмент Rotor-Gene Q/6000.

## Специфика

Специфичността на *artus* HSV-1/2 PCR кит е осигурена на първо място от избора на праймери и сонди, както и от избора на строги условия на реакцията. Праймерите и сондите са проверени за възможни хомологии към всички публикувани секвенции в геномни банки чрез сравнителен анализ на секвенциите. Откриваемостта на всички съответстващи генотипове по този начин е осигурена чрез сравняване на базите с данни и чрез PCR обработка с инструменти Rotor-Gene с посочване на щамовете в Таблица 1.

Нещо повече, специфичността беше валидирана със 30 различни HSV-1 и HSV-2 отрицателни CSF проби. Те не генерират никакви сигнали с HSV-1 и HSV-2 специфични праймери и сонди, които са включени в HSV-1/2 RG Master.

Бяха направени тестове за потенциална кръстосана реактивност на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит чрез използване на контролната група, включена в Таблица 2. Никой от тестваните патогени не реагира.

**Таблица 1. Тестване на спецификата на съответните генотипове**

Вирус	Щам	Източник	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Вътрешна контрола (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	-	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	-	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	-	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	-	+	+
HSV-2	G	ATCC*	-	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	-	+	+

\* ATCC Събиране на американски тип култури.

† INSTAND Дружество за насърчаване на осигуряване на качеството в медицински лаборатории.

‡ QCMD Контрол на качеството за молекулярна диагностика.

§ NCPV Национална колекция от патогенни вируси

**Таблица 2. Тестване на спецификата на кита с потенциално кръстосано реактивни патогени**

<b>Контролна група</b>	<b>HSV-1 (Cycling Green)</b>	<b>HSV-2 (Cycling Orange)</b>	<b>Вътрешна контрола (Cycling Yellow)</b>
Човешки херпес вирус 3 (варицела-зостер вирус)	–	–	+
Човешки херпес вирус 4 (Епщайн-Бар вирус)	–	–	+
Човешки херпес вирус 5 (цитомегаловирус)	–	–	+
Човешки херпес вирус 6А	–	–	+
Човешки херпес вирус 6В	–	–	+
Човешки херпес вирус 7	–	–	+
Човешки херпес вирус 8 (Асоцииран херпес вирус Капози саркома)	–	–	+
Вирус Хепатит А	–	–	+
Вирус Хепатит В	–	–	+
Вирус Хепатит С	–	–	+
Човешки имунодефицитен вирус (HIV)	–	–	+
Вирус Човешка Т клетъчна левкемия 1	–	–	+
Вирус Човешка Т клетъчна левкемия 2	–	–	+
Ентеровирус	–	–	+
Парвовирус В19	–	–	+
Вирус Западен Нил	–	–	+

## Точност

Данните за точността на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит при работа с Rotor-Gene инструменти дават възможност за определяне на общата вариация на анализа. Общата вариация се състои от интра-анализна променливост (променливост на множеството резултати от проби с еднаква концентрация при провеждане на един експеримент), интер-анализна променливост (променливост на множество резултати от анализ, генериран на различни инструменти от един и същи тип от различни оператори в една лаборатория) и интер-партидна променливост (променливост на множеството резултати от анализ, при който са използвани различни партии). Получените данни са използвани за определяне на стандартното отклонение, вариацията и коефициента на вариация при PCR обработка на специфичен патоген и вътрешна контрола.

Данните за точността на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит са събрани чрез използване на ДНК на вирус HSV-1 и HSV-2 с концентрация 10 копия/ $\mu$ l. Тестът е проведен с 8 повторения. Данните за точността бяха изчислени на основата на  $C_T$  стойности на кривите на намножаване ( $C_T$ : праг на цикъла, вижте Таблица 3 и Таблица 4). На базата на тези резултати общото статистическо разпределение на дадена проба с посочената концентрация е 1.82% ( $C_T$ ) за HSV-1, 0.67% ( $C_T$ ) за HSV-2, и 1.24% ( $C_T$ ) и 1.58% ( $C_T$ ) съответно за откриване на вътрешната контрола. Тези стойности бяха базирани на съвкупността на всички единични стойности на определените променливи.

**Таблица 3. Данни за точността за вирус HSV-1 на основата на C<sub>T</sub> стойностите**

	<b>C<sub>T</sub> стойност</b>	<b>Стандартно отклонение</b>	<b>Коефициент на вариация (%)</b>
Интра-анализна променливост: HSV-1 10 копия/μl	30.46	0.25	0.81
Интра-анализна променливост: Вътрешна контрола	25.29	0.08	0.3
Интер-анализна променливост: HSV-1 10 копия/μl	29.69	0.69	2.05
Интер-анализна променливост: Вътрешна контрола	24.97	0.31	1.25
Интер-партидна променливост: HSV-1 10 копия/μl	29.95	0.40	1.35
Интер-партидна променливост: Вътрешна контрола	24.90	0.30	1.20
Обща вариация: HSV-1 10 копия/μl	29.91	0.55	1.82
Обща вариация: Вътрешна контрола	24.99	0.31	1.24

**Таблица 4. Данни за точността за вирус HSV-2 на основата на C<sub>T</sub> стойностите**

	<b>C<sub>T</sub> стойност</b>	<b>Стандартно отклонение</b>	<b>Коефициент на вариация (%)</b>
Интра-анализна променливост: HSV-2 10 копия/μl	29.85	0.15	0.50
Интра-анализна променливост: Вътрешна контрола	25.17	0.39	1.55
Интер-анализна променливост: HSV-2 10 копия/μl	29.92	0.15	0.49
Интер-анализна променливост: Вътрешна контрола	25.11	0.41	1.63
Интер-партидна променливост: HSV-2 10 копия/μl	29.80	0.23	0.79
Интер-партидна променливост: Вътрешна контрола	24.89	0.33	1.32
Обща вариация: HSV-2 10 копия/μl	29.88	0.20	0.67
Обща вариация: Вътрешна контрола	25.07	0.40	1.58

## Безпроблемна работа на кита

Потвърждението на безпроблемната работа позволява определяне на общия процент на възникване на проблеми при *artus* HSV-1/2 RG PCR китовете. За получаване на много ниски вирусни титри от HSV-1 и HSV-2, 30 отрицателни проби от CSF бяха напръскани с елуиран обем от 0.36 копия/ $\mu$ l от HSV-1 или с елуиран обем от 0.48 копия/ $\mu$ l на ДНК на HSV-2 (прагова концентрация на аналитичната граница на чувствителност). След извличането с EZ1 DSP Virus кит, тези проби бяха анализирани с *artus* HSV-1/2 RG PCR кит. Всичките 30 проби бяха оценени правилно като слабо положителни към всеки HSV тип, което в резултат определя степента на грешка на 0%. В допълнение, безпроблемната работа на вътрешната контрола беше оценена чрез пречистване и анализ на 30 HSV-1 и HSV-2 отрицателни CSF проби. Не беше отчетено PCR инхибиране, което в резултат определя общата степен на грешка на 0%. Следователно, *artus* HSV-1/2 RG PCR кит работи безпроблемно в  $\geq 99\%$  от случаите.

## Възпроизводимост

Данните за възпроизводимостта позволяват да се извършва периодична оценка на работата на *artus* HSV 1/2 RG PCR кит, както и да се сравнява неговата ефикасност с тази на други продукти. Тези данни са получени чрез участие в установени програми за пригодност



## Оборудване и реактиви, които се осигуряват от потребителя

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация прочетете съответните таблици с данни за безопасността на материалите (SDSs), предоставени от доставчика на продукта.

- Кит за изолиране на ДНК (вижте “Изолиране на ДНК”, стр. 18)
- Пипети (регулируеми)\*
- Стерилни пипетни връхчета с филтри
- Вортекс смесител\*
- Настолна центрофуга\* с ротор за 2 ml реакционни епруветки
- Rotor-Gene Q или Rotor-Gene instrument\*<sup>†</sup> с флуоресцентни канали за Cycling Green, Cycling Orange и Cycling Yellow
- Rotor-Gene Q софтуерна версия 1.7.94 и по-нова (Rotor-Gene 6000 софтуерна версия 1.7.65 и по-нова)
- Стрипчета и капачки 0.1 ml за използване с 72-ямков ротор (каталожен номер 981103 или 981106)
- Като алтернатива: PCR епруветки 0.2 ml за използване с 36-ямков ротор (каталожен номер 981005 или 981008)
- Охладителен блок (Блок за зареждане 72 x 0.1 ml епруветки, каталожен номер 9018901 или Блок за зареждане 96 x 0.2 ml епруветки, каталожен номер 9018905).

\* Уверете се, инструментите са били проверени и калибрирани според препоръките на производителя.

<sup>†</sup> *artus* HSV-1/2 RG PCR кит не трябва да се използва с Rotor-Gene Q 2plex инструменти

## Важни забележки

### Общи предпазни мерки

Потребителят винаги трябва да отделя внимание на следното:

- Да използва стерилни пипетни филтърни типчета.
- Да съхранява и изважда положителни материали (проби, положителни контроли и апликони) отделно от всички други реактиви и да ги добавя към реакционната смес в пространствено отделено съоръжение.
- Размразявайте всички компоненти при стайна температура (15–25°C) преди да започнете опита.
- Когато се размразят, смесете компонентите (чрез повтарящо се на капване нагоре надолу или чрез импулсно смесване с Вортекс) и центрофугирайте за кратко.
- Работете бързо и пазете компонентите върху лед или в охлаждателен блок (72/96-ямков блок за зареждане).

### Изолиране на ДНК

EZ1 DSP Virus кит (QIAGEN, каталожен номер 62724\*) е валидиран за пречистване на ДНК на вируса от човешка CSF за използване с *artus* HSV-1/2 RG PCR кит. Извършете пречистването на вирусната ДНК съгласно инструкциите дадени в наръчника *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

ⓘ *artus* HSV-1/2 RG PCR кит не трябва да се използва с методи за изолиране на основата на фенол.


ⓘ Използването на преносител на РНК е критично за ефикасността на извличането и съответно за обема на събрана ДНК. Добавете необходимото количество преносител на РНК към всяка екстракция като спазвате инструкциите дадени в наръчника *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

ⓘ Вътрешната контрола на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит може да се използва директно в процедурата за изолиране (вижте “Вътрешна контрола”, по-надолу).

\* EZ1 DSP Virus кит също се предлага като CE-IVD-маркиран EASY*artus*<sup>®</sup> HSV-1/2 RG PCR китове, комбинирани с *artus* HSV-1/2 RG PCR кит (вижте страница 34 с информация за поръчки).

## Вътрешна контрола

Доставена е вътрешна контрола (HSV-1/2 RG IC). По този начин потребителят има възможност едновременно да контролира процеса на изолиране на ДНК и да проверява за възможно PCR инхибиране. За тази цел добавете вътрешната контрола към изолирания материал в съотношение 0.1 µl на 1 µl елуиран обем. Например, като използвате EZ1 DSP Virus кит ДНК е елуирана в 60 µl буфер за елуиране (AVE). Следователно, първоначално трябва да добавите 6 µl от вътрешната контрола.

 Не добавяйте вътрешната контрола и преносителя на РНК директно към материала на пробата.

Вътрешната контрола може евентуално да се използва за проверка на вероятно PCR инхибиране. За тази цел, добавете вътрешната контрола директно към сместа от HSV-1/2 RG Master и HSV-1/2 RG Mg-Sol, както е описано в стъпка 2b на протокола (страница 21).

## Протокол: PCR и анализ на данните

### Важни точки преди стартиране

- Преди да започнете да изпълнявате процедурата, прочетете “Важни забележки”, страница 18.
- Отделете време, за да се запознаете с инструмента Rotor-Gene Q преди да стартирате протокола. Прочетете наръчника за потребителя на инструмента.
- Уверете се, че положителните контроли и една отрицателна контрола (Вода, PCR клас) са включени в PCR опита.

### Неща, които трябва да направите преди стартиране

- Уверете се, че охладителният блок (аксесоар към инструмента Rotor-Gene Q) е предварително охладен до 2–8°C.
- Преди всяко използване всички реактиви трябва да се размразят напълно, да се смесят (чрез повратящо се пипетиране нагоре и надолу или чрез бързо смесване във Вортекс) и да се центрофугират за кратко.

### Процедура

1. Поставете желаният от Вас брой PCR епруветки в адаптерите на охладителния блок.
2. Ако използвате вътрешна контрола, за да следите процедурата по изолиране на ДНК и за проверка за възможно PCR инхибиране, следвайте стъпка 2a.  
Ако използвате вътрешна контрола само за проверка за PCR инхибиране, следвайте стъпка 2b.  
Използвайте вътрешната контрола съгласно стъпка 2b за всички положителни и отрицателни контроли.
- 2a. Вътрешната контрола вече е била добавена към изолирания материал (вижте “Вътрешна контрола”, страница 19). В този случай, подгответе смес Мастер микс според Таблица 5.

Реакционната смес обикновено съдържа всички компоненти, необходими за провеждане на PCR опит с изключение на пробата.

**Таблица 5. Подготовка на смес Мастер микс (вътрешна контрола, използвана за следене на изолирането на ДНК и за проверка за PCR инхибиране)**

<b>Брой проби</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HSV-1/2 RG Master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	0 µl	0 µl
<b>Общ обем</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>

- 2b. Вътрешната контрола трябва да се добави директно към сместа от HSV-1/2 RG Master и HSV-1/2 RG Mg-Sol. В този случай, подгответе смес Мастер микс съгласно Таблица 6.**

Реакционната смес обикновено съдържа всички компоненти, необходими за провеждане на PCR опит с изключение на пробата.

**Таблица 6. Подготовка на смес Мастер микс (вътрешна контрола, използвана специално за проверка за PCR инхибиране)**

<b>Брой проби</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HSV-1/2 RG Master	25 µl	300 µl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG IC	2 µl	24 µl
<b>Общ обем</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>

\* Увеличението на обема поради добавяне на вътрешната контрола се пренебрегва при подготовката на PCR опита. Чувствителността на системата за откриване не е нарушена.

- 3. Накапете по 30 µl от сместа „master mix“ във всяка PCR епруветка. След това добавете 20 µl от елуираната проба с ДНК (вижте Таблица 7), и смесете добре чрез повтарящо се накапване нагоре и надолу. Съответно трябва да използвате 20 µl от HSV-1 RG PC и HSV-2 RG PC като положителни контроли и 20 µl вода (Вода, PCR клас) като отрицателна контрола.**

**Таблица 7. Подготовка на PCR опита**

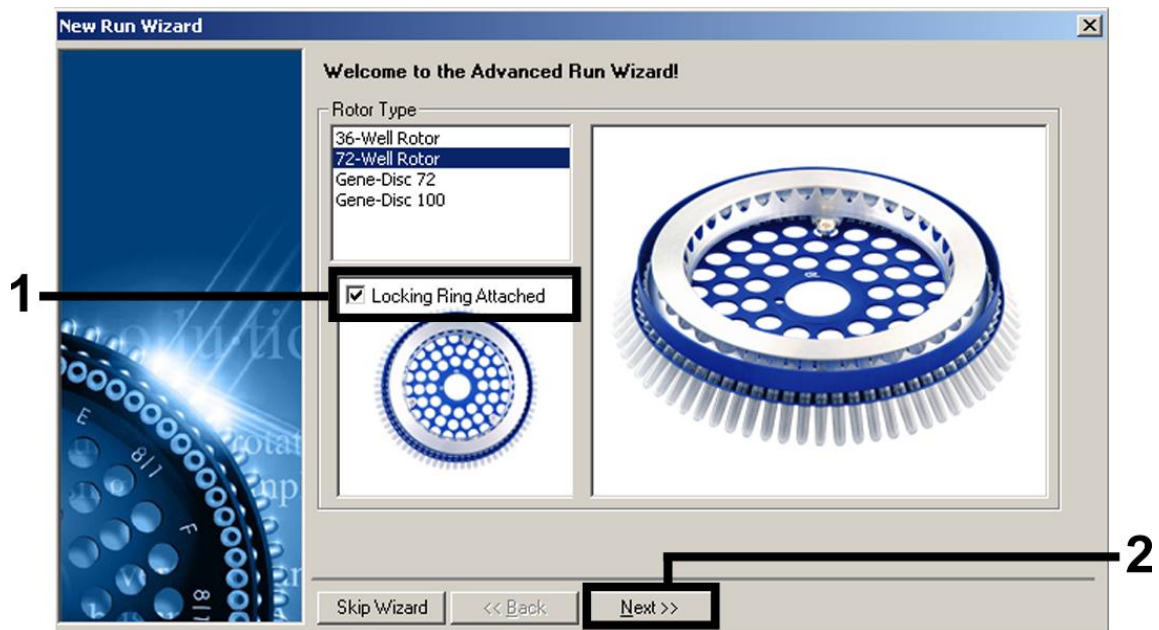
<b>Брой проби</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Смес „Master mix“	30 µl	30 µl във всяка
Проба	20 µl	20 µl във всяка
<b>Общ обем</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl във всяка</b>

4. Затворете PCR епруветките. Уверете се, че заключващият пръстен (аксесоар на инструмента Rotor-Gene) е поставен върху ротора, за да предпазва от отваряне на епруветките по невнимание по време на опита.
5. За откриване на ДНК на вирус HSV-1 или HSV-2 създайте температурен профил съгласно следните стъпки:

<b>Задаване на основните параметри на опита</b>	<b>Фигури 3, 4, 5</b>
<b>Първоначално активиране на ензима за горещ старт</b>	<b>Фигура 6</b>
<b>Намножаване на ДНК</b>	<b>Фигура 7</b>
<b>Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал</b>	<b>Фигура 8</b>
<b>Стартиране на опита</b>	<b>Фигура 9</b>

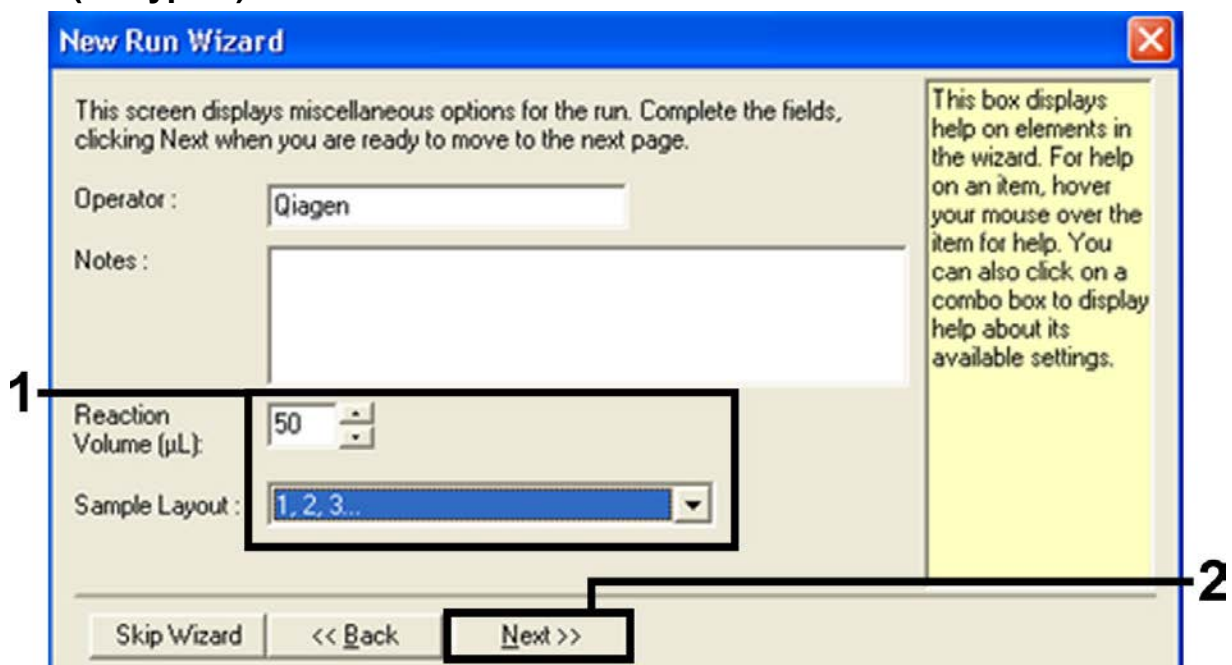
Всички спецификации се отнасят за Rotor-Gene Q софтуерни версии 1.7.94, или по-нови, Rotor-Gene 6000 софтуерни версии 1.7.65 или по-нови. Вие ще намерите допълнителна информация за програмиране на Rotor-Gene инструменти в наръчника за потребителя на съответния инструмент. На илюстрациите тези настройки са оградени с удебелена черна лента. За инструменти Rotor-Gene Q са включени илюстрации.

6. Първо отворете диалоговия прозорец “New Run Wizard” с “Advanced” версия (Фигура 3). Кликнете, за да изберете кутията “Locking Ring Attached” и кликнете върху “Next”.



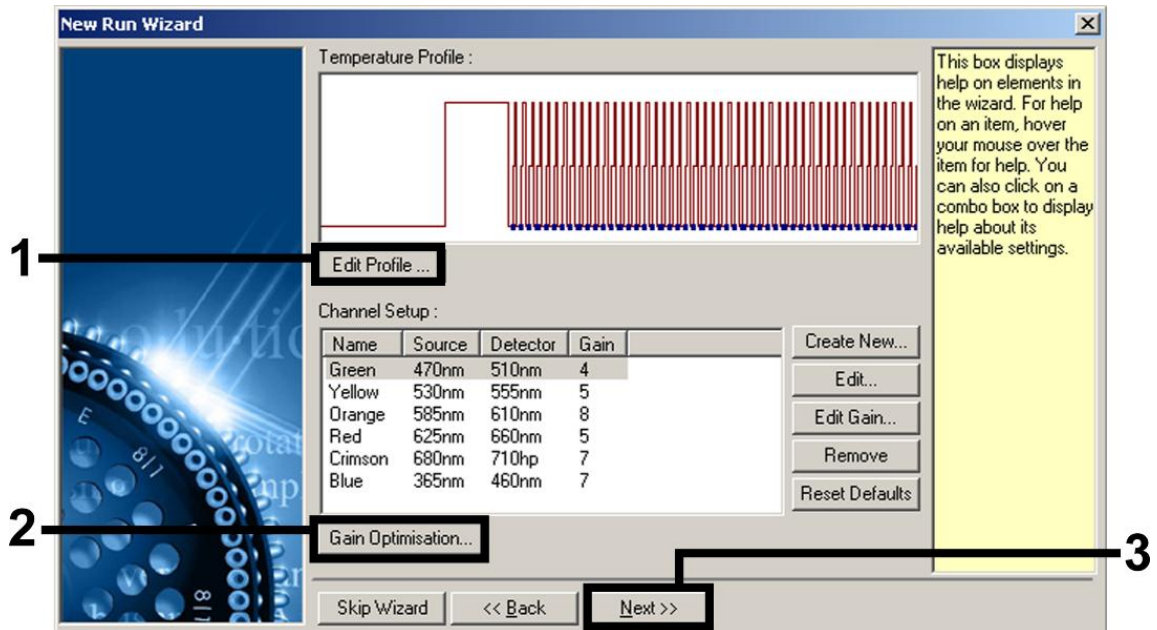
Фигура 3. Диалогов прозорец “New Run Wizard”.

7. Изберете 50 за PCR реакционен обем и кликнете върху “Next” (Фигура 4).

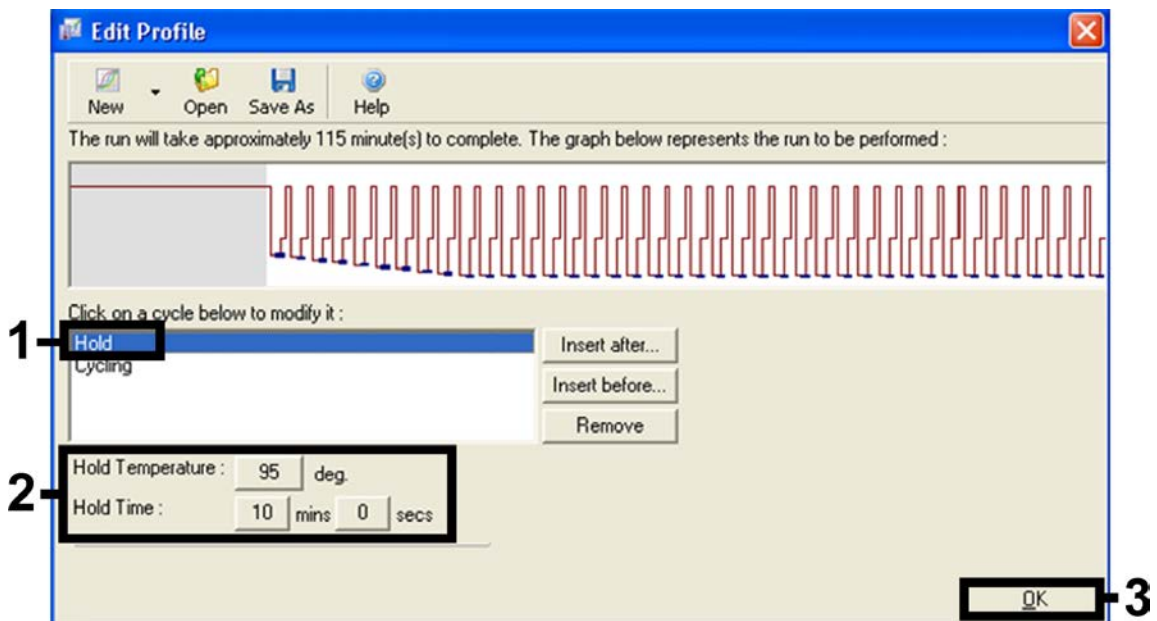


Фигура 4. Задаване на основните параметри на опита.

8. Кликнете върху бутона “Edit Profile” в следващият диалогов прозорец “New Run Wizard” (Фигура 5) и програмирайте температурния профил, както е показано на Фигури 6–7.

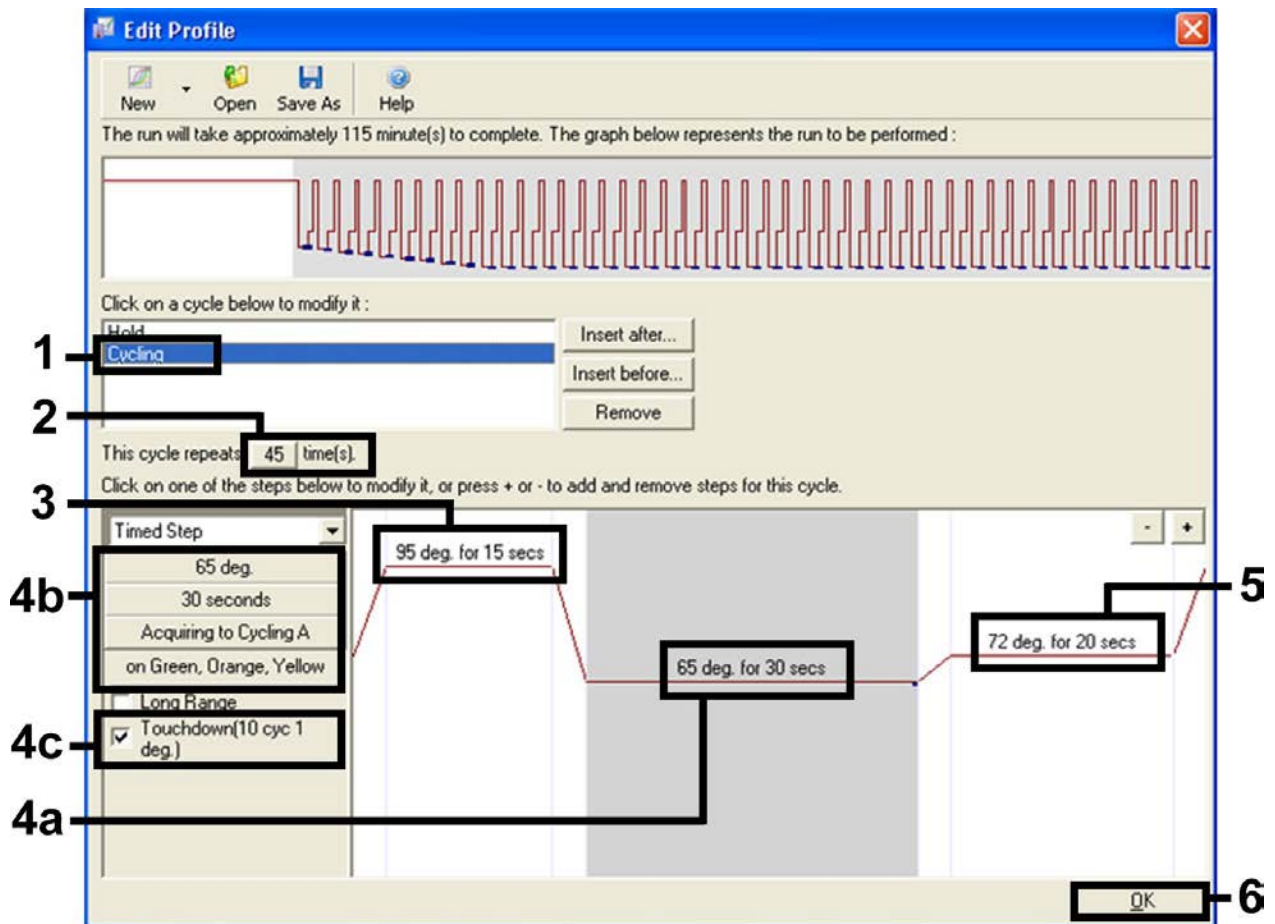


Фигура 5. Редактиране на профила.



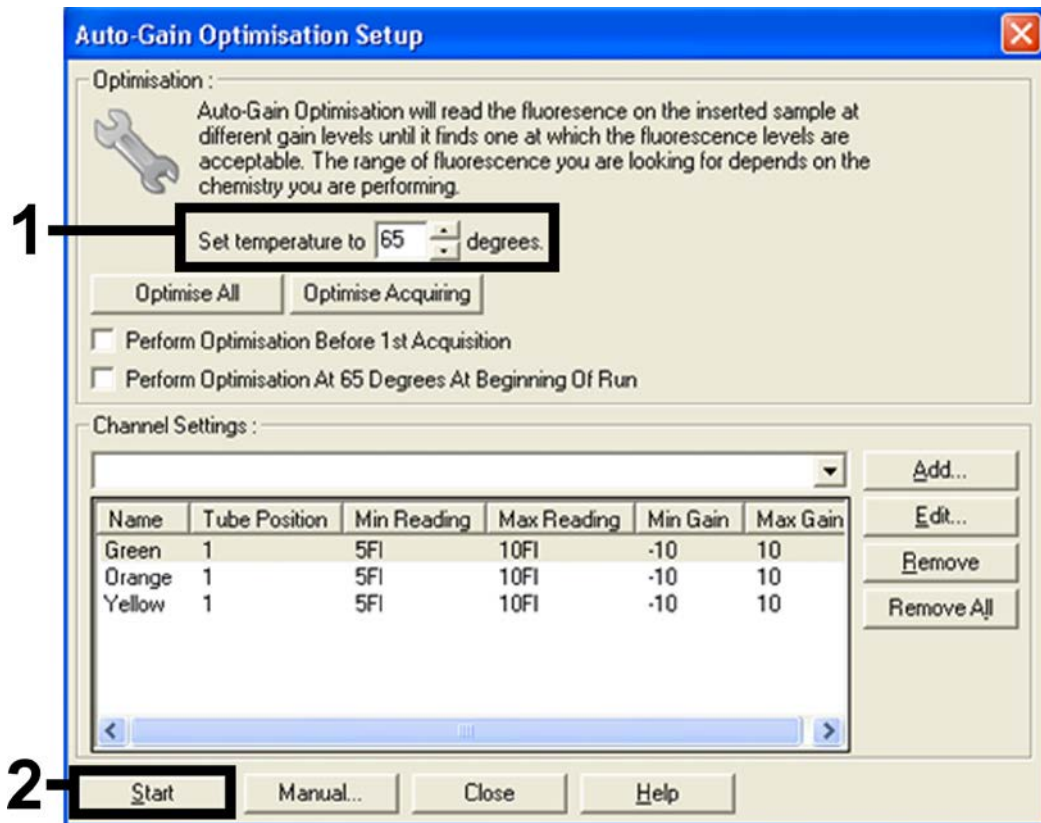
Фигура 6. Първоначално активиране на ензима за горещ старт.





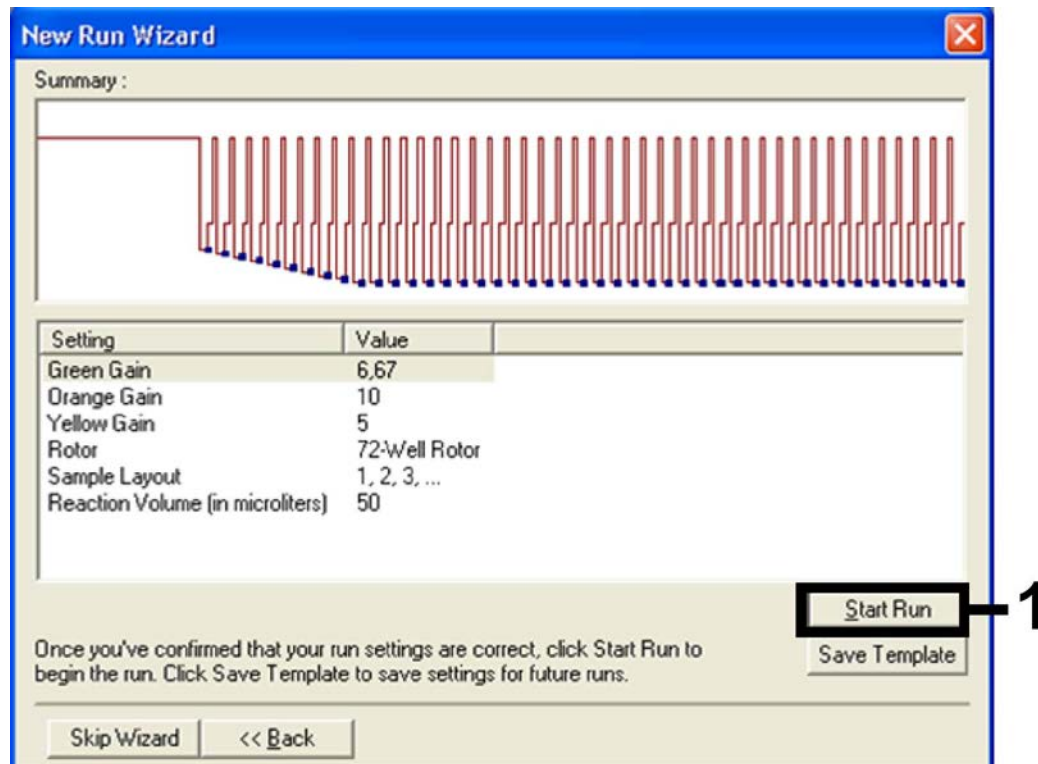
Фигура 7. Намножаване на ДНК. Уверете се, че сте активирали функцията „touchdown“ за 10 цикъла в стъпката на полепване.

9. Работният обхват на флуоресцентните канали трябва да се определи според интензитетите на флуоресценция в PCR епруветките. Кликнете върху “Gain Optimisation” (постигане на оптимизация) в диалоговия прозорец “New Run Wizard” (вижте , Стъпка 2), за да отворите диалоговия прозорец “Auto-Gain Optimisation Setup” (Фигура 8). Настройте температурата за калибриране на 65 , за да отговаря на температурата в програмата за намножаване (Фигура 7, Стъпка 4b). Уверете се, че и трите канала (зелен, оранжев и жълт) са избрани за “Auto-Gain Optimisation”. (намерете каналите в падащото меню под “Channel Settings” и кликнете “Add”, за да ги добавите). Кликнете “Start”, за да започне оптимизацията. Кликнете “Close” на диалоговия прозорец “Auto-Gain Optimisation Setup”, когато оптимизацията завърши.



Фигура 8. Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал

10. Получените стойности при калибрирането на канала се запазват автоматично и се извеждат в списък в последния прозорец на менюто на процедурата за програмиране (Фигура 9). Кликнете върху “Start Run”.



Фигура 9. Стартиране на опита.

**11. Анализирайте данните след завършването на опита. Възможно е да получите следните резултати (11a, 11b, 11c, 11d, 11e, и 11f).**

Примери на положителни и отрицателни PCR реакции са дадени на Фигура 10, Фигура 11, и Фигура 12.

**11a. Открива се сигнал във флуоресцентен канал Cycling Green. Резултатът от анализа е положителен: пробата съдържа ДНК на вирус HSV-1.**

В този случай, откриването на сигнал в канал Cycling Yellow не е задължително, тъй като високите първоначални концентрации на ДНК на вирус HSV-1 (положителен сигнал в канал Cycling Green) могат да доведат до намален сигнал или да липсва такъв на вътрешната контрола в канал Cycling Yellow (състезание).

**11b. Във флуоресцентен канал Cycling Green не се открива сигнал. В същото време сигнал от вътрешната контрола се появява в канал Cycling Yellow.**

**В пробата не се открива ДНК на вирус HSV-1. Тя може да се счита за отрицателна.**

В случай на отрицателен HSV-1 PCR, откритият сигнал на вътрешната контрола отхвърля вероятността за PCR инхибиране.

**11c. Открива се сигнал във флуоресцентен канал Cycling Orange. Резултатът от анализа е положителен: пробата съдържа ДНК на вирус HSV-2.**

В този случай, откриването на сигнал в канал Cycling Yellow не е задължително, тъй като високите първоначални концентрации на ДНК на вирус HSV-2 (положителен сигнал в канал Cycling Orange) могат да доведат до намален сигнал или да липсва такъв на вътрешната контрола в канал Cycling Yellow (състезание).

**11d. Не се открива сигнал във флуоресцентен канал Cycling Orange. В същото време сигнал от вътрешната контрола се появява в канал Cycling Yellow.**

**В пробата не се открива ДНК на вирус HSV-2. Тя може да се счита за отрицателна към вирус HSV-2.**

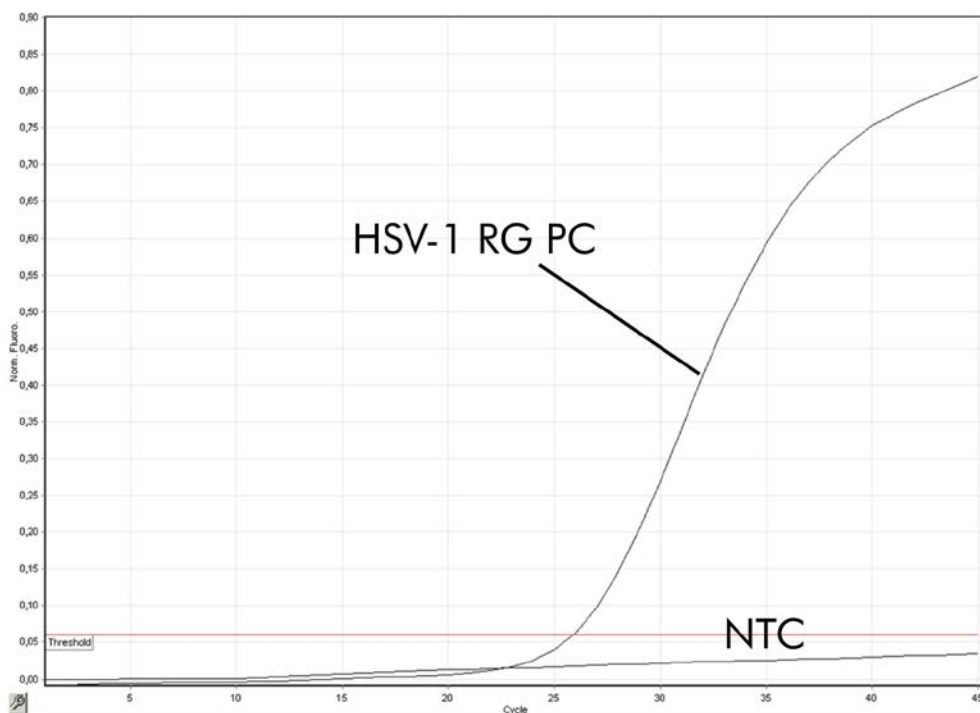
В случай на отрицателен HSV-2 PCR, откритият сигнал на вътрешната контрола отхвърля вероятността за PCR инхибиране.

**11e. Открива се сигнал във флуоресцентен канали Cycling Green и Cycling Orange.**

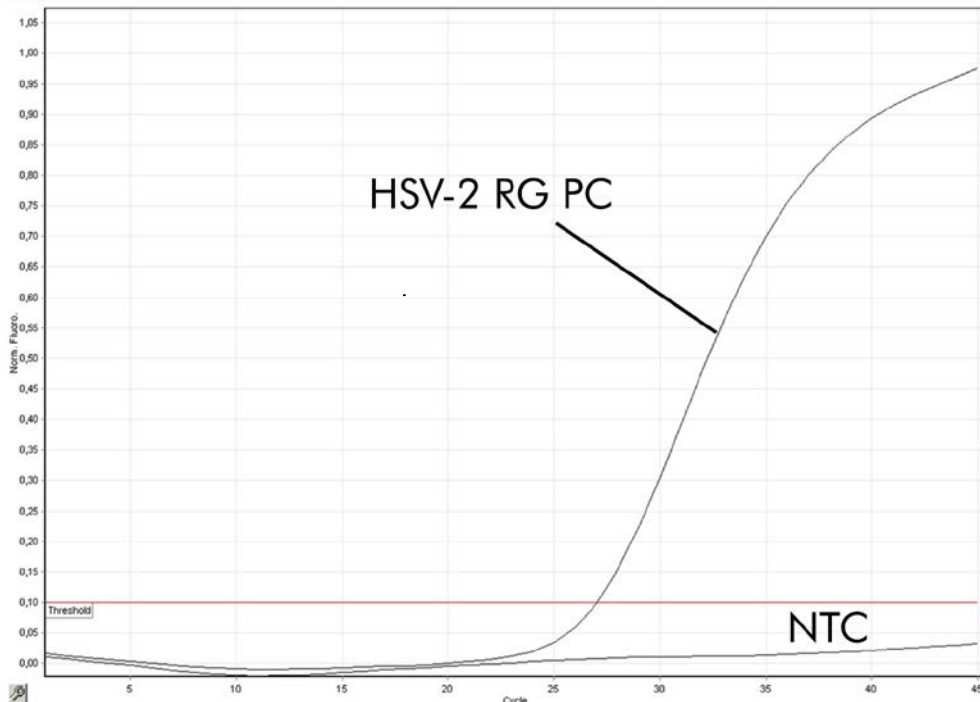
**Резултатът от анализа е положителен: пробата съдържа ДНК на вирус HSV-1, както и ДНК на вирус HSV-2.**

В този случай, откриването на сигнал в канал Cycling Yellow не е задължително, тъй като първоначалните високи концентрации и от двете ДНК на вирус HSV-1 и на вирус HSV-2 (положителен сигнал в канали Cycling Green и Cycling Orange) могат да доведат до намален сигнал или липса на такъв от вътрешната контрола в канал Cycling Yellow (състезание).

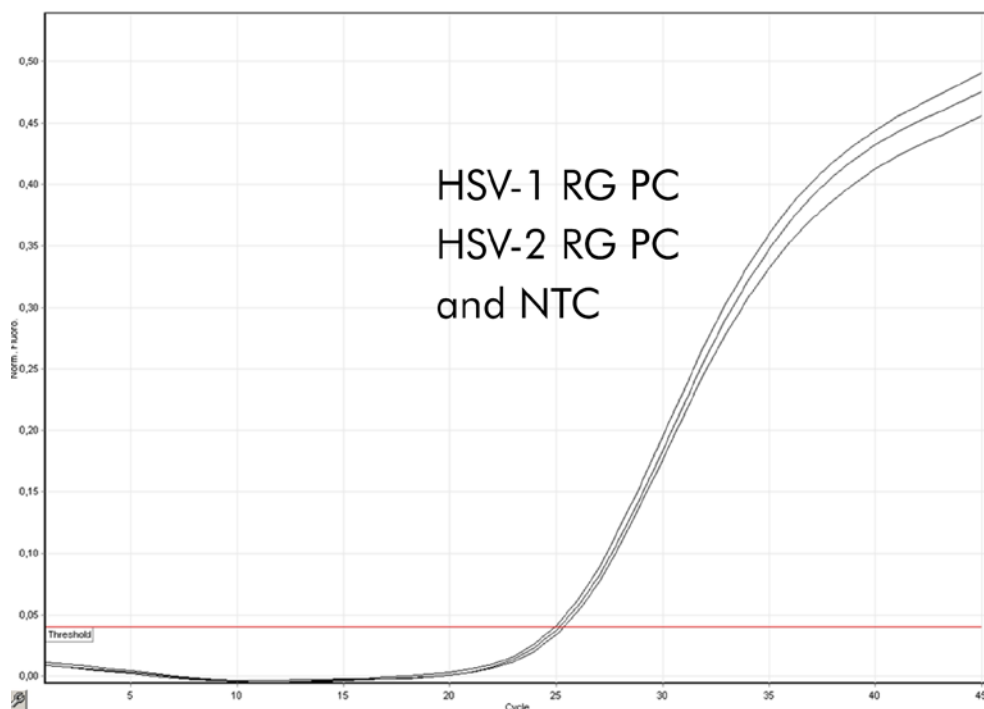
**11f. Не се открива сигнал в канали Cycling Green, Cycling Orange или Cycling Yellow. Не може да се направи заключение за резултата.** Информацията относно източниците на грешки и начините за тяхното отстраняване можете да намерите в “Ръководство за отстраняване на проблеми”, страница 30.



**Фигура 10. Откриване на HSV-1 положителна контрола (HSV-1 RG PC) във флуоресцентен канал Cycling Green. NTC: контрола без матрица (отрицателна контрола).**



**Фигура 11. Откриване на HSV-2 положителна контрола (HSV-2 RG PC) във флуоресцентен канал Cycling Orange. NTC: контрола без матрица (отрицателна контрола).**



**Фигура 12. Откриване на вътрешната контрола (IC) във флуоресцентен канал Cycling Yellow с едновременно намножаване на положителни контроли (HSV-1 RG PC и HSV-2 RG PC). NTC: контрола без матрица (отрицателна контрола).**






## Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство може да Ви бъде полезно за решаване на проблеми, които възникват. За повече информация вижте също интернет страницата с често задавани въпроси, поддържана от нашия технически център: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Учените от техническия център на QIAGEN винаги с радост ще отговорят на Вашите въпроси, свързани с информацията и протокола в този наръчник или за иновативните технологии за експериментален анализ (информация за контакт, вижте последната страница или посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Коментари и предложения

---






#### Липсва сигнал от положителните контроли (HSV-1 RG PC и HSV-2 RG PC) във флуоресцентен канал Cycling Green или Cycling Orange

- |   |   |
|---|---|
| a) Избраният флуоресцентен канал за PCR анализ на данните не отговаря на протокола  |  За анализиране на данните изберете флуоресцентен канал Cycling Green и Cycling Orange за аналитичен HSV-1/2 PCR и флуоресцентен канал Cycling Yellow за PCR на вътрешната контрола. |
| b) Неправилно програмиране на температурният профил на инструмент Rotor-Gene  |  Сравнете температурният профил с протокола. Вижте “Протокол: PCR и анализ на данните”, страница 20.   |
| c) Неправилна конфигурация на PCR   |  Проверете и сравнете Вашите работни стъпки със схемата на накапване и повторете PCR обработката, ако е необходимо. Вижте “Протокол: PCR и анализ на данните”, страница 20.        |
| d) Условието на съхранение на един и повече компоненти на кита не отговарят на инструкциите, дадени в “Съхранение” (страница 5) |  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.   |
| e) Срокът на годност на <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит е изтекъл   |  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.   |

## Коментари и предложения

---

**Слаб сигнал или липса на такъв от вътрешната контрола на отрицателна CSF проба, подложена на пречистване чрез използване на EZ1 DSP Virus кит във флуоресцентен канал Cycling Yellow и същевременно липса на сигнал в канал Cycling Green или Cycling Orange.**

- a) PCR условията не отговарят на протокола  Проверете PCR условията (вижте по-нагоре) и повторете PCR опита с коригирани настройки, ако е необходимо
- b) PCR опитът е инхибиран  Уверете се, че използвате препоръчания метод на изолиране и спазвате стриктно инструкциите, дадени от производителя.
- c) ДНК е изгубена по време на извличането  Ако е добавена вътрешна контрола при извличането, липсата на сигнал от вътрешната контрола сочи, че ДНК е изгубена по време на извличането. Уверете се, че използвате препоръчания метод на изолиране (вижте “Изолиране на ДНК”, страница 18) и спазвайте точно инструкциите, дадени от производителя.
- d) Условията за съхранение на един или няколко компонента от кита не отговарят на инструкциите, дадени в параграф “Съхранение” (страница 5)  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.
- e) Срокът на годност на *artus* HSV-1/2 RG PCR кит е изтекъл  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.

## Коментари и предложения

---

### Сигнали от отрицателните контроли във флуоресцентен канал Cycling Green или Cycling Orange на аналитичния PCR

- a) Замърсяване при подготовката на PCR
- ① Повторете PCR опита с нови реактиви с повторения
  - ① Ако е възможно, затваряйте PCR епруветките веднага след добавянето на пробите, които ще се тестват.
  - ① Уверете се, че сте накапали положителните контроли последни.
  - ① Уверете се, че работното място и инструментите се почистват периодично.
- b) Замърсяване по време на извличането
- ① Повторете извличането и PCR опита с пробата, която трябва да се тества като използвате нови реактиви.
  - ① Уверете се, че работното място и инструментите се почистват периодично.



## Референции

Фирма QIAGEN поддържа обширна, актуална база с данни в интернет с научни публикации, използващи QIAGEN продукти. Опциите за подробно търсене Ви позволяват да откривате статиите, от които се нуждаете, или чрез обикновено търсене с помощта на клавиатурата, или чрез точно посочване на приложението, зоната за търсене, заглавието и т.н.

За да видите пълният списък на референциите, влезте в базата с данни на QIAGEN на адрес [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp)\_обърнете се към техническия сервиз на QIAGEN, или към местния дистрибутор.

## Информация за поръчки

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит (24)	За 24 реакции: Master, магнезиев разтвор, 2 положителни контроли, вътрешна контрола, вода (PCR клас)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит (96)	За 96 реакции: Master, магнезиев разтвор, 2 положителни контроли, вътрешна контрола, вода (PCR клас)	4500265
<b>EZ1 DSP Virus кит — за пречистване на нуклеинови киселини на вируси от човешка CSF за ин витро диагностични цели</b>		
EZ1 DSP Virus кит	За подготовка на 48 броя нуклеинови киселини от вируси: предварително напълнени касетки с реактиви, държачи за типчета за еднократна употреба, филтърни типчета за еднократна употреба, епруветки за проби, епруветки за елуати, буфери, преносители на РНК.	62724
<b>EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR китове — за пълно CE-IVD-съответстващо интегрирано автоматично пречистване на проби и откриване на патогени</b>		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит 1	За подготовка на 48 броя нуклеинови киселини от вируси и 24 анализа: 1 x EZ1 DSP Virus кит, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит 2	За подготовка на 48 броя нуклеинови киселини от вируси и 48 анализа: 1 x EZ1 DSP Virus кит, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR кит (24)	EA10024
<b>Rotor-Gene Q и аксесоари</b>		

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
Rotor-Gene Q 5plex HRM	PCR апарат за използване в реално време и Анализатор на разделянето с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс HRM канал, лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда	Трябва да изпратите запитване.
Блок за зареждане на 72 x 0.1 ml епруветки	Алуминиев блок за ръчна подредба на реакцията с едноканална пипета в 72 x 0.1 ml епруветки	9018901
Блок за зареждане на 96 x 0.2 ml епруветки	Алуминиев блок за ръчна подредба на реакцията в стандартни 8 x 12 ареи за използване на 96 x 0.2 ml епруветки	9018905
Стрипчета и капачки, 0.1 ml (250)	250 стрипчета за 4 епруветки и капачки за 1000 реакции	981103
Стрипчета и капачки, 0.1 ml (2500)	10 x 250 стрипчета за 4 епруветки и капачки за 10,000 реакции	981106
PCR епруветки, 0.2 ml (1000)	1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции	981005
PCR епруветки, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции	981008

За актуална информацията за лиценза и специфични за продукта оповестявания, вижте съответния наръчник за QIAGEN кита или ръководството за употреба. Наръчниците за китове QIAGEN и ръководствата за експлоатация са достъпни на интернет страницата [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Също така, Вие можете да изпратите запитване до техническия сервиз на QIAGEN или към местния дистрибутор.

Тази страница нарочно е оставена празна.

Тази страница нарочно е оставена празна.

Тази страница нарочно е оставена празна.

Закупуването на този продукт Ви позволява да го използвате за извършване на ин витро човешка диагностика. С неговото закупуване не се предоставя общ патент или други лицензи, освен специфичните права на използване, произтичащи от покупката.

Запазени марки: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, EASY*artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

*Artus HSV-1/2 RG PCR* кит и *EZ1 DSP Virus* кит имат CE-маркировка. Те са диагностични китове съгласно Европейската директива за ин витро диагностика 98/79/EC. Те не се предлагат във всички страни.

#### Ограничено лицензионно споразумение

Със закупуването и използването на този продукт всеки купувач или потребител на *artus HSV-1/2 RG PCR* кит се съгласява за следното:

1. *Artus HSV-1/2 RG PCR* кит може да се използва само в съответствие с Наръчника *artus HSV-1/2 RG PCR Kit Handbook* и само с компонентите, съдържащи се в кита. QIAGEN не предоставя лиценз за никое от своите интелектуални права за използване или включване на компонентите на този кит към други компоненти, които не са включени в този кит, както е описано в Наръчника *artus HSV-1/2 RG PCR Kit Handbook* и в допълнителните протоколи налични на [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. При всякакви други условия, различни от изрично посочените в лицензите, QIAGEN не дава гаранция, че този кит и/или неговата употреба(и) няма да наруши правата на трети лица..
3. Този кит и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повече от веднъж, да се почистват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всякакви други лицензи, преки или косвени, освен тези, които са изрично одобрени.
5. Купувачът или потребителят на кита се съгласява да не предприема или да позволява на някой друг да предприема стъпки, които биха довели до или до улесняване на каквито и да било действия, посочени като забранени по-нагоре. QIAGEN е в правото си да налага забрани по този ограничен лиценз във всеки съд, и ще си възстановява всички съдебни разходи и разходи за разследвания, включително хонорари на адвокати, при действия за изпълнение на настоящото лицензно споразумение или за защита на своите интелектуални права, свързани с този кит и/или неговите компоненти.

Актуални условия на лицензите можете да намерите на [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2009–2014 QIAGEN, Всички права са запазени.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Австралия** ■ Телефон за поръчки 1-800-243-800 ■ Факс 03-9840-9888 ■ Технически сервиз 1-800-243-066

**Австрия** ■ Телефон за поръчки 0800-28-10-10 ■ Факс 0800-28-10-19 ■ Технически сервиз 0800-28-10-11

**Белгия** ■ Телефон за поръчки 0800-79612 ■ Факс 0800-79611 ■ Технически сервиз 0800-79556

**Бразилия** ■ Телефон за поръчки 0800-557779 ■ Факс 55-11-5079-4001 ■ Технически сервиз 0800-557779

**Канада** ■ Телефон за поръчки 800-572-9613 ■ Факс 800-713-5951 ■ Технически сервиз 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**Китай** ■ Телефон за поръчки 86-21-3865-3865 ■ Факс 86-21-3865-3965 ■ Технически сервиз 800-988-0325

**Дания** ■ Телефон за поръчки 80-885945 ■ Факс 80-885944 ■ Технически сервиз 80-885942

**Финландия** ■ Телефон за поръчки 0800-914416 ■ Факс 0800-914415 ■ Технически сервиз 0800-914413

**Франция** ■ Телефон за поръчки 01-60-920-926 ■ Факс 01-60-920-925 ■ Технически сервиз 01-60-920-930 ■ Телефон за получаване на оферти 01-60-920-928

**Германия** ■ Телефон за поръчки 02103-29-12000 ■ Факс 02103-29-22000 ■ Технически сервиз 02103-29-12400

**Хонг Конг** ■ Телефон за поръчки 800 933 965 ■ Факс 800 930 439 ■ Технически сервиз 800 930 425

**Ирландия** ■ Телефон за поръчки 1800 555 049 ■ Факс 1800 555 048 ■ Технически сервиз 1800 555 061

**Италия** ■ Телефон за поръчки 800-789-544 ■ Факс 02-334304-826 ■ Технически сервиз 800-787980

**Япония** ■ Телефон 03-6890-7300 ■ Факс 03-5547-0818 ■ Технически сервиз 03-6890-7300

**Южна Корея** ■ Телефон за поръчки 080-000-7146 ■ Факс 02-2626-5703 ■ Технически сервиз 080-000-7145

**Люксембург** ■ Телефон за поръчки 8002-2076 ■ Факс 8002-2073 ■ Технически сервиз 8002-2067

**Мексико** ■ Телефон за поръчки 01-800-7742-639 ■ Факс 01-800-1122-330 ■ Технически сервиз 01-800-7742-436

**Холандия** ■ Телефон за поръчки 0800-0229592 ■ Факс 0800-0229593 ■ Технически сервиз 0800-0229602

**Норвегия** ■ Телефон за поръчки 800-18859 ■ Факс 800-18817 ■ Технически сервиз 800-18712

**Сингапур** ■ Телефон за поръчки 1800-742-4362 ■ Факс 65-6854-8184 ■ Технически сервиз 1800-742-4368

**Испания** ■ Телефон за поръчки 91-630-7050 ■ Факс 91-630-5145 ■ Технически сервиз 91-630-7050

**Швеция** ■ Телефон за поръчки 020-790282 ■ Факс 020-790582 ■ Технически сервиз 020-798328

**Швейцария** ■ Телефон за поръчки 055-254-22-11 ■ Факс 055-254-22-13 ■ Технически сервиз 055-254-22-12

**Великобритания** ■ Телефон за поръчки 01293-422-911 ■ Факс 01293-422-922 ■ Технически сервиз 01293-422-999

**САЩ** ■ Orders 800-426-8157 ■ Факс 800-718-2056 ■ Технически сервиз 800-DNA-PREP (800-362-7737)

