



Príručka pre súpravu *artus*[®] VZV RG PCR Kit

 24 (katalógové č. 4502263)
 96 (katalógové č. 4502265)

Verzia 1

IVD

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s prístrojmi Rotor-Gene[®] Q



REF 4502263, 4502265

HB 1056824EN

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R4 **MAT** 1056824SK



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

QIAGEN stanovuje normy v:

- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Obsah

Účel použitia	4
Súhrn a vysvetlenie	4
Informácie o patogéne	4
Princíp postupu	5
Dodávané materiály	5
Obsah súpravy	5
Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú	6
Varovania a preventívne opatrenia	6
Preventívne opatrenia	7
Skladovanie a manipulácia s reagensiami	7
Postup	8
Izolovanie DNA	8
Interný kontrolný roztok	8
Protokol: PCR a analýza údajov	9
Interpretácia výsledkov	15
Kvantifikácia	15
Výsledky	16
Sprievodca riešením problémov	17
Kontrola kvality	19
Obmedzenia	19
Charakteristiky účinnosti	20
Analytická senzitivita	20
Špecificita	20
Presnosť	22
Referenčná literatúra	24
Symboly	24
Kontaktné informácie	25
Informácie o objednávaní	26

Účel použitia

Súprava *artus* VZV RG PCR Kit je amplifikačný test nukleovej kyseliny používaný in vitro na kvantitatívne vyjadrenie DNA VZV DNA v ľudskom mozgomiešnom moku (MMM). Táto súprava diagnostického testu využíva polymerázovú reťazovú reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) a je nakonfigurovaná na použitie s prístrojmi Rotor-Gene Q.

Poznámka: Súprava *artus* VZV RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

Súhrn a vysvetlenie

Súprava *artus* VZV RG PCR Kit sa skladá zo systému pripraveného na použitie na detegovanie VZV DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) na prístrojoch Rotor-Gene Q. VZV RG Master obsahuje reagensie a enzýmy na špecifickú amplifikáciu regiónu 82 bp genómu VZV a na priamu detekciu špecifického amplikónu vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green prístroja Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 (zdroj 470 nm, detektor 510 nm).

Okrem toho obsahuje súprava *artus* VZV RG PCR Kit druhý heterológny amplifikačný systém na identifikovanie možnej inhibície PCR. Tá sa zistí ako interný kontrolný roztok (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange prístroja Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 (zdroj 585 nm, detektor 610 nm). Detekčný limit analytickej VZV PCR (pozri „Analytická senzitivita“, strana 20) sa nezníži. Dodávajú sa externé pozitívne kontrolné roztoky (VZV RG QS 1–4), ktoré umožňujú zistenie množstva vírusovej DNA. Ďalšie informácie nájdete v časti „Kvantifikácia“, strana 15.

Informácie o patogéne

Vírus varicella zoster (VZV) je DNA vírus, ktorý sa prenáša z osoby na osobu ako kvapôčková infekcia alebo priamym kontaktom. Infekcia VZV spôsobuje mierne zvýšenú teplotu a na všeobecné zdravie vplýva mierne.


Charakteristickými príznakmi tejto choroby je polymorfný ekzém s podliatinami, pľuzgiermi a chrastami spolu s intenzívnym svrbením (ovčie kiahne). Vážne infekcie VZV sú často pozorované u imunosuprimovaných pacientov a môžu mať za následok nebezpečné komplikácie, ako napríklad zápal pľúc a encefalitídu. Po akútnej infekcii zostáva patogén v zmyslových miechových gangliách a v gangliách lebečných nervov. Ak je imunita oslabená, môže dôjsť k zhoršeniu stavu (napr. pásový opar).

Princíp postupu

Detekcia patogénov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) je založená na amplifikácii špecifických regiónov genómu patogénu. Pri real-time PCR sa amplifikovaný produkt deteguje prostredníctvom fluorescenčných farbív. Tie sú zvyčajne spojené so sondami oligonukleotidov, ktoré sa špecificky viažu na amplifikovaný produkt. Monitorovanie intenzity fluorescencie počas PCR cyklu (t. j. v reálnom -čase) umožňuje detekciu a vyčíslenie akumulujúceho sa produktu bez nutnosti opätovného otvorenia reakčných skúmaviek po PCR cykle.*

Dodávané materiály

Obsah súpravy

artus VZV RG PCR Kit			(24)	(96)
Katalógové č.			4502263	4502265
Počet reakcií			24	96
Modrá	VZV RG Master		2 x 12 reakcie	8 x 12 reakcie
Žltá	VZV RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	600 µl	600 µl
Červená	VZV RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kópií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 2 [‡] (1 x 10 ³ kópií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 3 [‡] (1 x 10 ² kópií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Červená	VZV RG QS 4 [‡] (1 x 10 ¹ kópií/µl)	QS	200 µl	200 µl
Zelená	VZV RG IC [§]	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Biela	Voda (stupeň PCR)		1000 µl	1000 µl
	Príručka		1	1

[†] Roztok magnézia.

[‡] Kvantifikačný štandard.

[§] Interný kontrolný roztok.

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

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

Reagencie

- Súprava na izoláciu DNA (pozri „Izolovanie DNA“, strana 8)

Spotrebný materiál

- Sterilné špičky pipiet s filtrami
- Skúmavky a uzávery Strip Tubes and Caps, 0.1 ml na použitie s rotorom 72-well rotor (kat. č. 981103 alebo 981106)
- Prípadne: Skúmavky PCR Tubes, 0.2 ml na použitie s rotorom 36-well rotor (kat. č. 981005 alebo 981008)

Zariadenie

- Pipety (nastaviteľné)*
- Vírivý mixér*
- Stolná centrifúga* s rotorom na reakčné skúmavky s objemom 2 ml
- Prístroj Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene Instrument*† s fluorescenčnými kanálmi pre farbivá Cycling Green a Cycling Orange
- Verzia softvéru 1.7.94 alebo vyššia prístroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q (verzia softvéru 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 prístroja Rotor-Gene 6000)
- Chladiaci blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901 alebo Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. č. 9018905)

Varovania a preventívne opatrenia

Na diagnostické použitie in vitro

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety, kde môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť KBÚ pre každú súpravu QIAGEN® a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

* Zabezpečte, aby sa prístroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

† Súprava *artus* VZV RG PCR Kit sa nemôže používať s prístrojmi Rotor-Gene Q 2plex.

Preventívne opatrenia

Používateľ by mal vždy dodržiavať tieto kroky:

- Používajte sterilné špičky pipiet s filtrami.
- Pozitívne materiály (vzorky, pozitívne kontrolné roztoky a amplikóny) skladujte a extrahujte oddelene od všetkých ostatných reagensí a pridávajte ich do reakčnej zmesi v oddelenom priestore.
- Pred začatím testu všetky komponenty dôkladne rozmrazte na izbovú teplotu (15 – 25 °C).
- Po rozmrazení komponenty zmiešajte (opakovaným pipetovaním hore a dole alebo pulzným vírivým miešaním) a krátko vložte do centrifúgy.
- Pracujte rýchlo a komponenty držte na ľade alebo v chladiacom bloku (72/96-jamkový zavádzací blok).

Skladovanie a manipulácia s reagensiami

Komponenty súpravy *artus* VZV RG PCR Kit by sa mali skladovať pri teplote -15 °C až -30 °C a sú stabilné do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku. Nemalo by dôjsť k opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu (> 2 x), pretože tým sa môže znížiť senzitivita testu. Ak sa reagensie nepoužívajú nepretržite, mali by sa zamraziť v alikvótach. Skladovanie pri teplote 2 – 8 °C by nemalo byť dlhšie ako 5 hodín.

Postup

Izolovanie DNA

Súprava EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. č. 62724)* sa validuje na purifikáciu vírusovej nukleovej kyseliny z ľudského MMM na použitie so súpravou *artus* VZV RG PCR Kit. Purifikáciu nukleovej kyseliny vykonajte podľa pokynov v *príručke k súprave EZ1 DSP Virus Kit* sp štandardnou veľkosťou vzorky 200 µl.

Poznámka: Súprava *artus* VZV RG PCR Kit by sa nemala používať s izolačnými metódami na báze fenolu.

Poznámka: Použitie nosnej RNA je dôležité pre efektívnosť extrakcie a následne pre výťažok DNA/RNA. Pridajte vhodné množstvo nosnej RNA do každej extrakcie podľa pokynov v *príručke k súprave EZ1 DSP Virus Kit*.

Poznámka: Interný kontrolný roztok súpravy *artus* VZV RG PCR Kit sa môže použiť priamo počas procesu izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“ nižšie).

Interný kontrolný roztok

Dodáva sa interný kontrolný roztok (VZV RG IC). Tá umožňuje používateľovi regulovať proces izolácie DNA aj skontrolovať možnú inhibíciu PCR. Na toto použitie pridajte interný kontrolný roztok do izolácie v pomere 0,1 µl na 1 µl elučného objemu. Napríklad pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit, ak sa virálne nukleové kyseliny eluujú v 60 µl elučného pufru (AVE), potom by sa na začiatku malo pridať 6 µl interného kontrolného roztoku.

Poznámka: Interný kontrolný roztok a nosná RNA (potri „Izolovanie DNA“, strana 8) by sa mali pridať len do zmesi pufru lýzy a materiálu vzorky alebo priamo do pufru lýzy.

Interný kontrolný roztok sa nesmie pridať priamo do materiálu vzorky. Po pridaní do pufru lýzy nezabudnite, že je potrebné pripraviť čerstvú zmes interného kontrolného roztoku a pufru nosnej RNA lýzy, ktorá sa musí okamžite použiť (skladovanie zmesi pri izbovej teplote alebo v mrazničke aj keď len na niekoľko hodín môže viesť ku chybe interného kontrolného roztoku a zníženej efektívnosti extrakcie).

Poznámka: Nepridávajte interný kontrolný roztok a nosnú RNA priamo do materiálu vzorky.

Interný kontrolný roztok sa môže voliteľne použiť výhradne na kontrolu novej inhibície PCR. V prípade tohto použitia pridajte interný kontrolný roztok priamo do zmesi VZV RG Master a VZV RG Mg-Sol podľa popisu v krok 2b protokole (strana 10).

* Súprava EZ1 DSP Virus Kit je k dispozícii aj ako súprava EASY*artus*[®] VZV RG PCR Kits s označením CE-IVD v kombinácii so súpravou *artus* VZV RG PCR Kit (pozri stranu 26 s informáciami o objednávaní).

Protokol: PCR a analýza údajov

Dôležité body pred začatím činnosti

- Vyhradte si dostatok času a oboznámte sa s prístrojom Rotor-Gene Q pred začatím protokolu. Pozri používateľskú príručku prístroja.
- Uistite sa, že cyklus PCR zahŕňa aspoň jeden kvantitatívny štandard, ako aj jednu negatívny kontrolný roztok (voda, stupeň PCR). Na vygenerovanie štandardnej krivky použijete všetkých 4 dodaných kvantitatívnych štandardov (VZV RG QS 1 – 4) pre každý cyklus PCR.

Postup, ktorý sa má vykonať pred začatím

- Uistite sa, že chladiaci blok (príslušenstvo prístroja Rotor-Gene Q) je vopred vychladený na 2 – 8 °C.
- Pred každým použitím sa musia všetky reagenty úplne rozmraziť, zmiešať (opakovaným pipetovaním nahor a nadol alebo rýchlym vortexovaním) a nakrátko centrifugovať.

Postup

1. Umiestnite želaný počet skúmaviek PCR do adaptérov chladiaceho bloku.
2. Ak používate interný kontrolný roztok na monitorovanie izolačného procesu DNA a na kontrolu možnej inhibície PCR, postupujte krokom 2a. Ak používate interný kontrolný roztok len na kontrolu inhibície PCR, postupujte krokom 2b.
- 2a. Interný kontrolný roztok už bola pridaná do izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, strana 8). V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 1.

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 1. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý na monitorovanie izolácie DNA a na kontrolu inhibície PCR)

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

- 2b. Interný kontrolný roztok sa musí pridať priamo do zmesi VZV RG Master a VZV RG Mg-Sol. V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 2.**

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 2. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý len na kontrolu inhibície PCR)

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

* Zväčšenie objemu spôsobené pridaním interného kontrolného roztoku sa pri príprave PCR testu zanedbá. Senzitivita detekčného systému sa tým nezníži.

- 3. Napipetujte 30 µl hlavnej zmesi do každej PCR skúmavky. Potom pridajte 20 µl eluovanej DNA vzorky (pozri Tabuľka 3). Zodpovedajúco sa musí použiť 20 µl z aspoň jedného kvantitatívneho štandardu (VZV RG QS 1 – 4) ako pozitívny kontrolný roztok a 20 µl vody (voda, stupeň PCR) ako negatívny kontrolný roztok.**

Tabuľka 3. Príprava PCR testu

Počet vzoriek	1	12
Hlavná zmes	30 µl	30 µl každá
Vzorka	20 µl	20 µl každá
Celkový objem	50 µl	50 µl každá

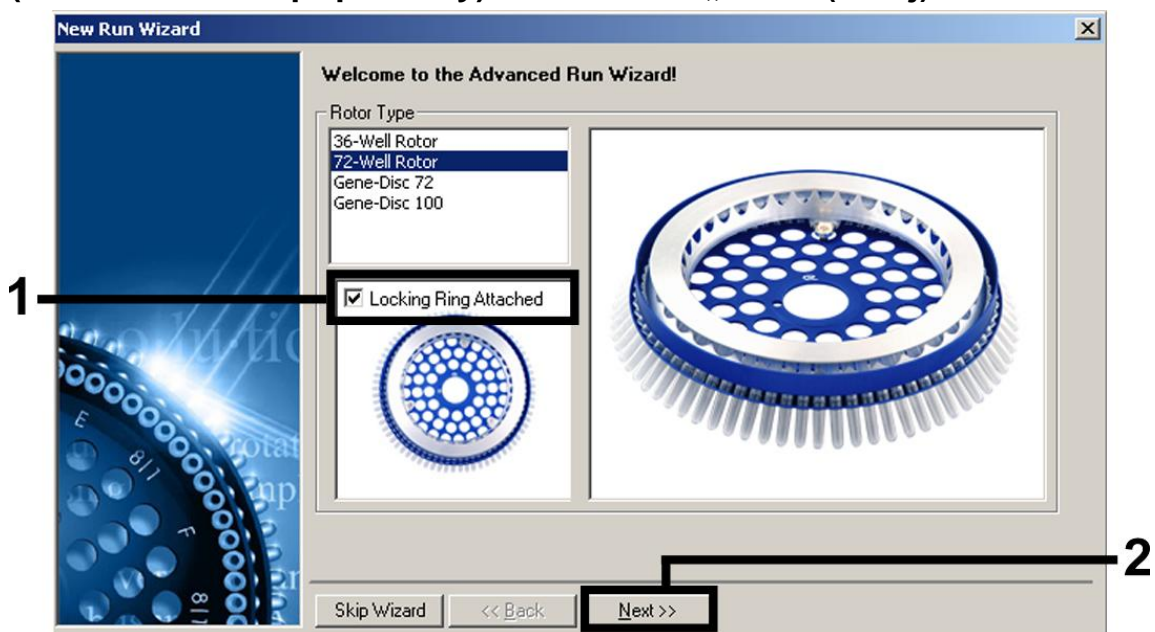
- 4. Zatvorte PCR skúmavky. Uistite sa, že poistný krúžok (príslušenstvo prístroja Rotor-Gene) je umiestnený na vrchu rotora, aby sa zabránilo náhodnému otvoreniu skúmaviek počas cyklu.**

5. Na detekciu DNA VZV vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.

Nastavenie všeobecných parametrov testu	Obrázky 1, 2, 3
Prvotná aktivácia enzýmu hot-start	Obrázok 4
Amplifikácia DNA	Obrázok 5
Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála	Obrázok 6
Spustenie cyklu	Obrázok 7

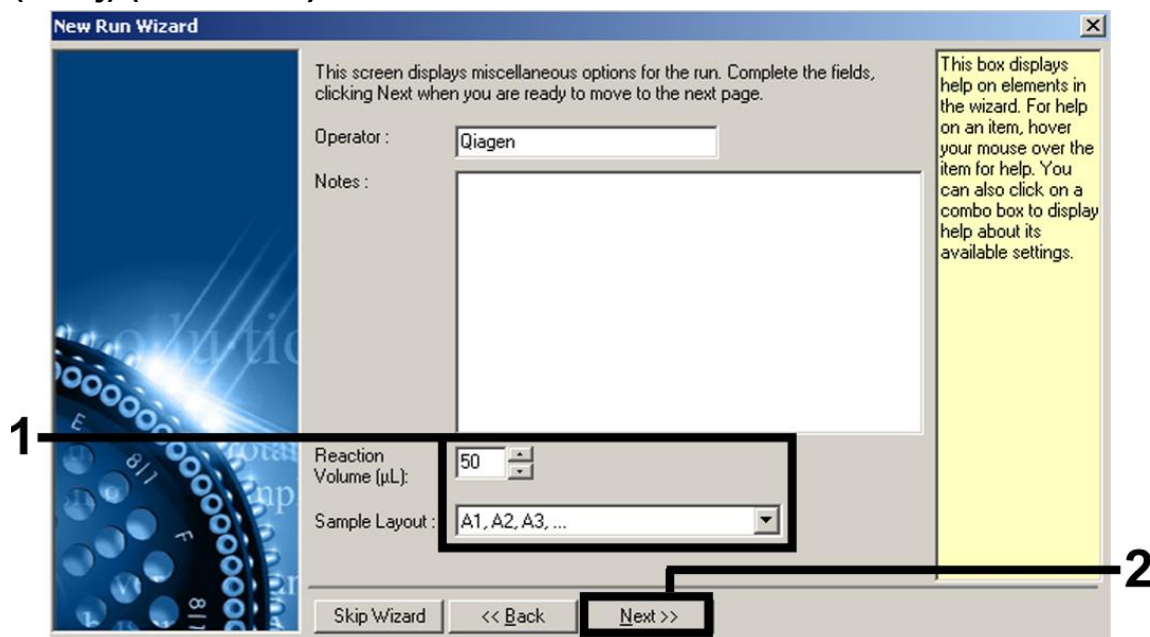
Všetky špecifikácie odkazujú na verziu softvéru 1.7.94 prístroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q a verzie softvéru 1.7.65, 1.7.87 a 1.7.94 prístroja Rotor-Gene 6000. Ďalšie informácie o programovaní prístrojov Rotor-Gene nájdete v používateľskej príručke prístroja. Na ilustráciách sú tieto nastavenia softvéru orámované čiernou tučnou farbou. Ilustrácie sú zahrnuté pre prístroje Rotor-Gene Q.

6. Najprv otvorte dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 1). Skontrolujte pole „Locking Ring Attached“ (Tesniaci krúžok pripevnený) a kliknite na „Next“ (Ďalej).



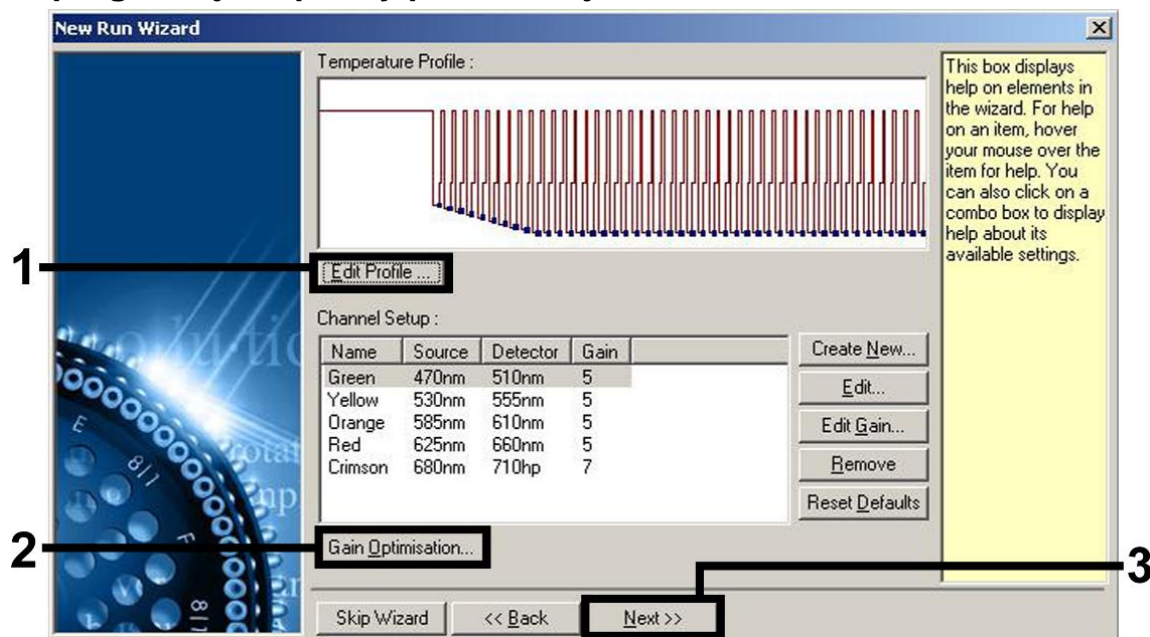
Obrázok 1. Dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom).

7. Vyberte hodnotu 50 pre PCR reakčný objem a kliknite na „Next“ (Dalej) (Obrázok 2).

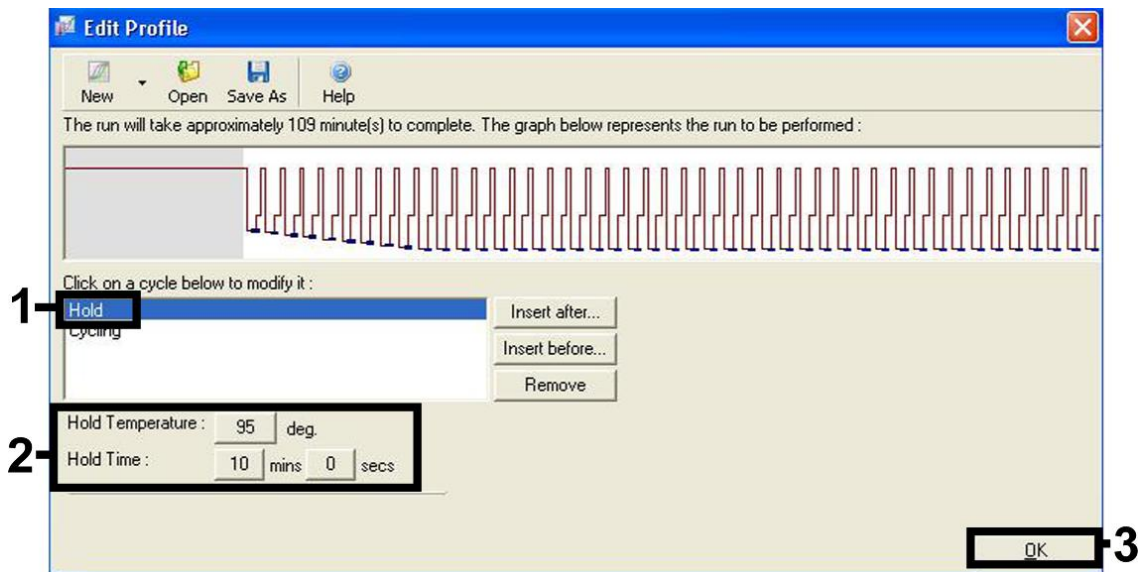


Obrázok 2. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

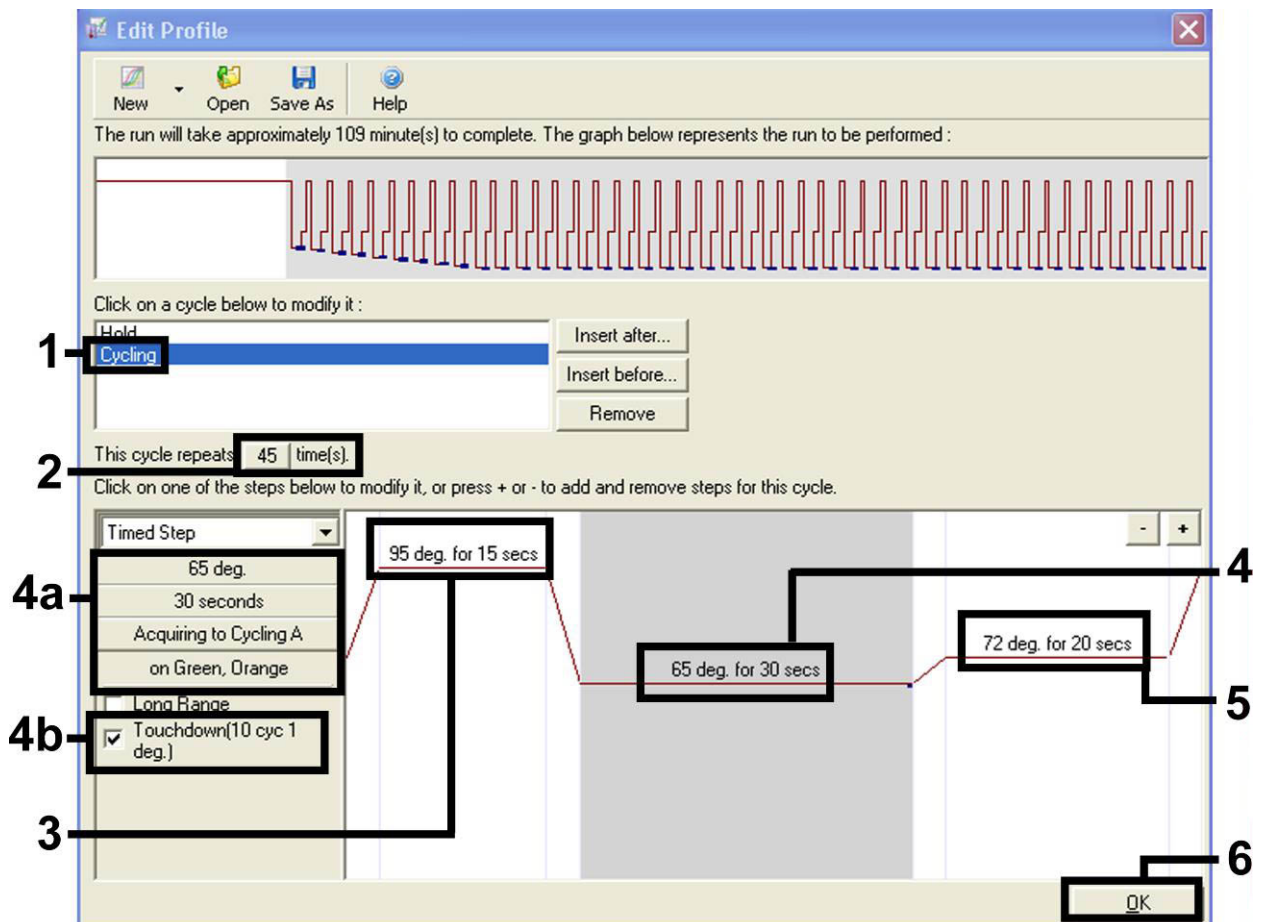
8. Kliknite na tlačidlo „Edit Profile“ (Upraviť profil) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 3) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené na obrázkoch 3 – 5.



Obrázok 3. Úprava profilu.

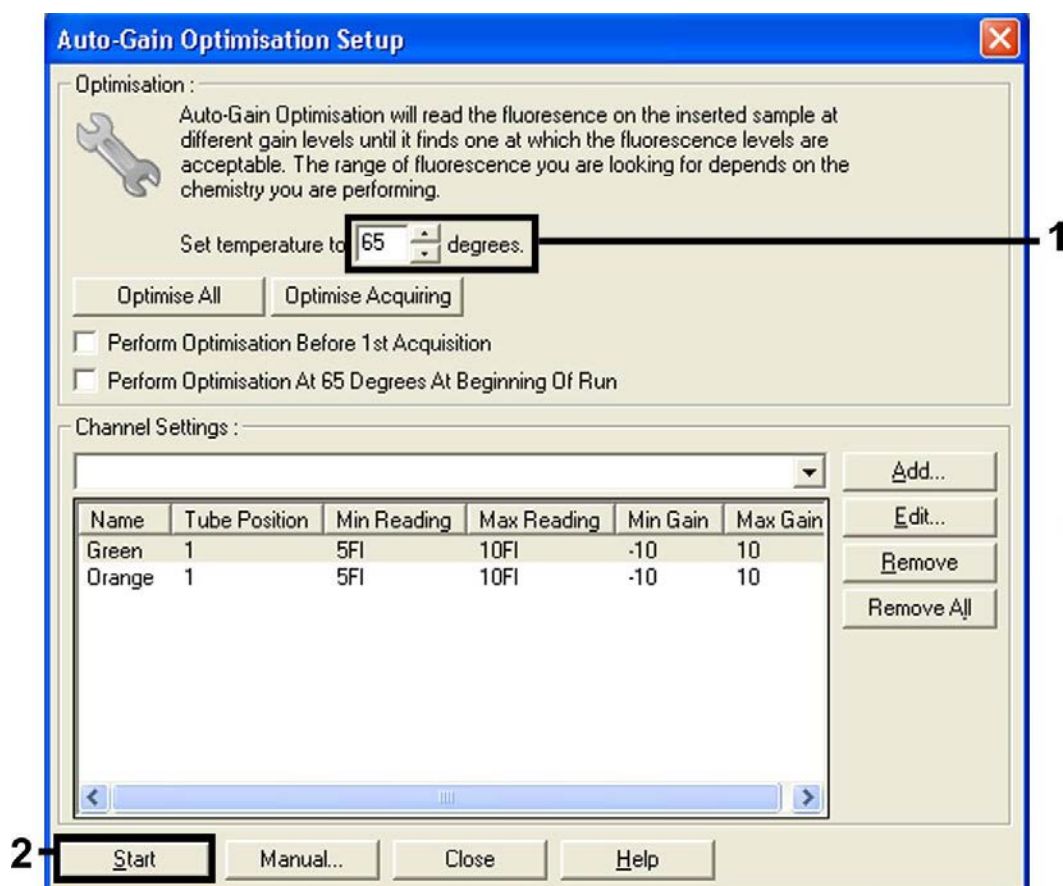


Obrázok 4. Prvotná aktivácia enzýmu hot-start.



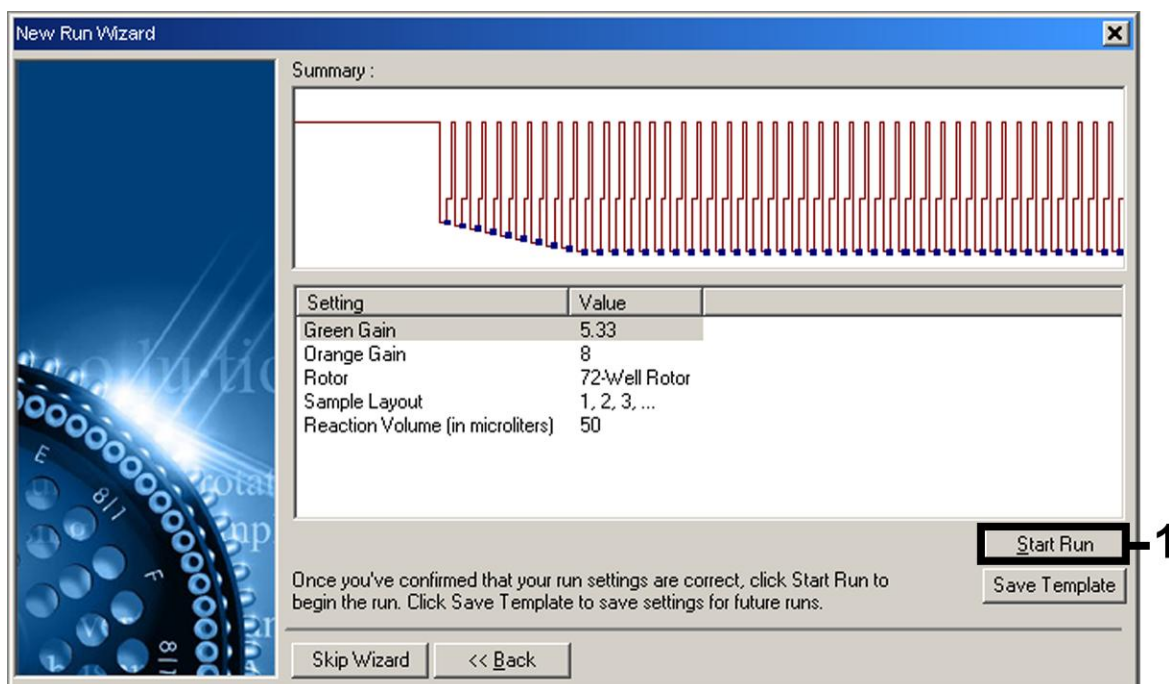
Obrázok 5. Amplifikácia DNA. Nezabudnite aktivovať funkciu dosadnutia pre 10 cyklov v temperovacom kroku.

9. Detekčný rozsah fluorescenčných kanálov sa musí určiť podľa intenzity fluorescence v skúmavkách PCR. Kliknutím na „Gain Optimisation“ (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (pozri Obrázok 3) otvoríte dialógové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie výťažku). Kalibračnú teplotu nastavte na hodnotu 65, aby sa zhodovala s teplotou temperovania amplifikačného programu (Obrázok 6).



Obrázok 6. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála.

10. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania (Obrázok 7). Kliknite na „Start Run“ (Spustiť cyklus).



Obrázok 7. Spustenie cyklu.

Interpretácia výsledkov

Kvantifikácia

Priložené kvantitatívne štandardy (VZV RG QS 1 – 4) sa považujú za predtým purifikované vzorky a použije sa rovnaký objem vzorky (20 µl). Na vygenerovanie štandardnej krivky na prístrojoch Rotor-Gene Q by sa mali použiť všetky 4 kvantitatívne štandardy, ktoré by sa mali definovať v dialógovom poli „Edit Samples“ (Upraviť vzorky) ako normy s konkrétnymi koncentraciami (pozri používateľskú príručku prístroja).

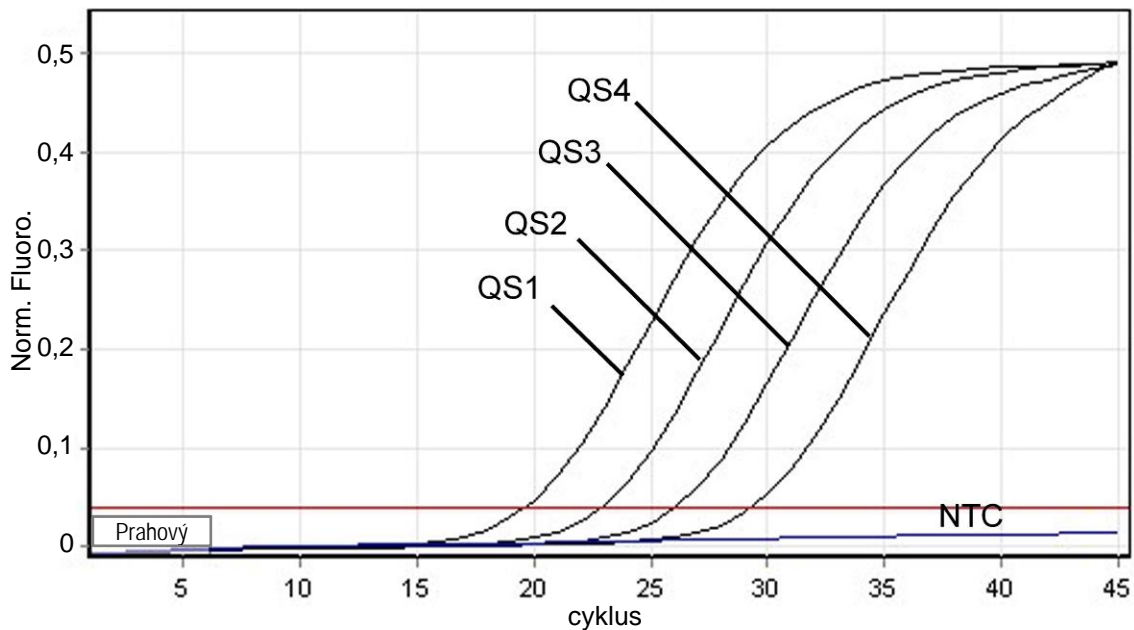
Poznámka: Kvantitatívne štandardy sú definované ako kópie/µl. Táto rovnica sa musí použiť na premenu hodnôt stanovených pomocou štandardnej krivky do kópie/ml materiálu vzorky:

$$\text{výsledok (kópie/ml)} = \frac{\text{výsledok (kópie/}\mu\text{l)} \times \text{elučný objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorky (ml)}}$$

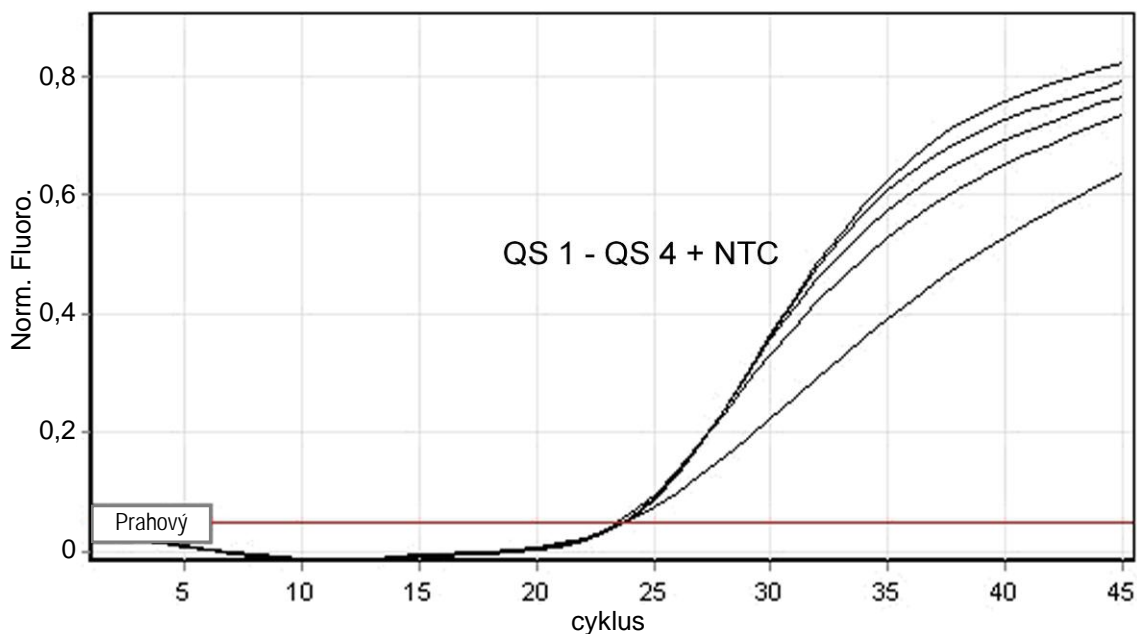
Z princípu by sa mal pôvodný objem vzorky zadať do vyššie uvedenej rovnice. Toto je potrebné zväžiť, ak sa objem vzorky pred extrakciou nukleovej kyseliny zmenil (napr. zníženie objemu v centrifúge alebo zvýšenie objemu pridaním objemu potrebného na izolovanie).

Výsledky

Príklady pozitívnych a negatívnych PCR reakcií sú uvedené na obrázku Obrázok 8 a Obrázok 9.



Obrázok 8. Detekcia kvantitatívnych štandardov (VZV RG QS 1 – 4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).



Obrázok 9. Detekcia interného kontrolného roztoku (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange so súčasou amplifikáciou kvantitatívnych štandardov (VZV RG QS 1–4). NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).

Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Green sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA VZV.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Orange nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie VZV DNA (pozitívny signál v kanáli Cycling Green) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Orange (konkurencia).

Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Orange.

Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu DNA VZV. Môže sa považovať za negatívnu.

V prípade negatívneho testu VZV PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície PCR.

V kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange sa nezistil žiadny signál. Nie je možné vyvodit' žiadny výsledok.

Informácie týkajúce sa zdrojov chýb a ich riešení nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“, strana 17.

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolu v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na zadnej strane alebo na lokalite www.qiagen.com).

Komentáre a návrhy

Žiadny signál s pozitívnymi kontrolnými roztokmi (VZV RG QS 1 – 4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) Vybraný fluorescenčný kanál na analýzu PCR údajov nie je v súlade s protokolom | Na analýzu údajov vyberte fluorescenčný kanál Cycling Green pre analytický test VZV PCR a fluorescenčný kanál Cycling Orange pre PCR interného kontrolného roztoku. |
| b) Nesprávne naprogramovanie teplotného profilu prístroja Rotor-Gene | Porovnajte teplotný profil s protokolom. Pozri časť „Protokol: PCR a analýza údajov“, strana 9. |

Komentáre a návrhy

- c) Nesprávna konfigurácia PCR Skontrolujte svoje pracovné kroky pomocou pipetovacej schémy a PCR v prípade potreby zopakujte. Pozri časť „Protokol: PCR a analýza údajov“, strana 9.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ (strana 7) Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* VZV RG PCR Kit exspirovala Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

Slabý alebo žiadny signál interného kontrolného roztoku negatívnej vzorky MMM, ktorá bola vystavená purifikácii pomocou súpravy EZ1 DSP Virus Kit vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange a súčasná absencia signálu v kanáli Cycling Green

- a) Podmienky PCR nie sú v súlade s protokolom Skontrolujte podmienky PCR (pozri vyššie) a v prípade potreby PCR zopakujte so správnymi nastaveniami.
- b) PCR bolo inhibované Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- c) Počas extrakcie sa stratila DNA Ak sa do extrakcie pridal interný kontrolný roztok, absentujúci signál interného kontrolného roztoku môže znamenať stratu DNA počas extrakcie. Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 8) a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie a manipulácia s reagensiami“ (strana 7) Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

- e) Súprava *artus* VZV RG PCR Kit exspirovala Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

Signály s negatívnymi kontrolnými roztokmi vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green analytickej PCR

- a) Počas prípravy PCR došlo ku kontaminácii Zopakujte PCR s novými reagensiami v kópiách.
Ak je to možné, zatvorte PCR skúmavky hneď po pridaní vzorky na testovanie.
Pozitívny kontrolný roztok napipetujte ako poslednú.
Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a prístroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.
- b) Počas extrakcie došlo ku kontaminácii Zopakujte extrakciu a PCR vzorky na testovanie pomocou nových reagensí.
Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a prístroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *artus* VZV RG PCR Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

Obmedzenia

Tento výrobok používa personál, ktorý absolvoval špeciálne školenie ohľadom diagnostických postupov *in vitro*.

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov PCR je potrebné presne dodržiavať používateľskú príručku.

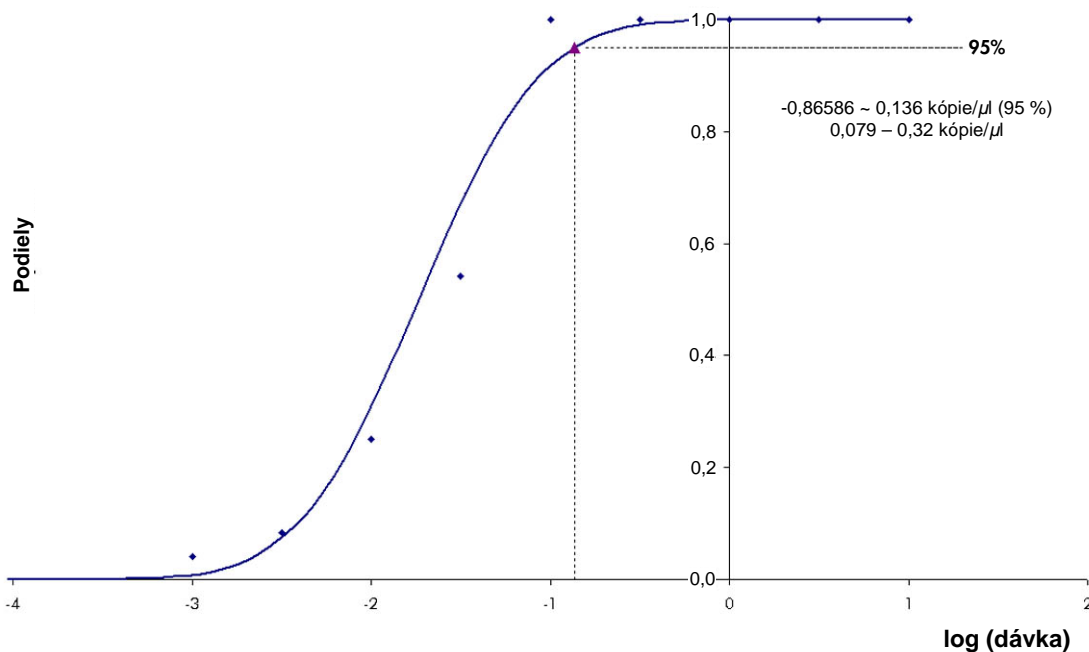
Pozornosť by sa mala venovať dátumu expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Aj keď je to zriedkavé, môže dôjsť v prípade mutácií vo vysoko zakonzervovaných častiach vírusového genómu, ktorý pokrývajú priméry súpravy a/alebo sonda k stanoveniu malého množstva alebo k zlyhaniu detegovania prítomnosti vírusu. Validita a účinnosť dizajnu testu sa v pravidelných intervaloch revidujú.

Charakteristiky účinnosti

Analytická senzitivita

Na určenie analytickej senzitivity súpravy *artus* VZV RG PCR Kit sa pripravili série riadenia genómovej DNA VZV z 10 na 0,001 kópie/ μ l a analyzovali sa na prístroji Rotor-Gene 6000 v kombinácii so súpravou *artus* VZV RG PCR Kit. Testovanie sa uskutočnilo počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Grafická ilustrácia analýzy probit pre na prístroji Rotor-Gene 6000 je zobrazená v Obrázok 10. Analytický detekčný limit súpravy *artus* VZV RG PCR Kit v kombinácii s nástrojom Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 je 0,136 kópie/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 0,136 kópie/ μ l.



Obrázok 10. Probit analýza: VZV (Rotor-Gene 6000). Analytická senzitivita súpravy *artus* VZV RG PCR Kit na prístroji Rotor-Gene 6000.

Špecifická

Špecifická súpravy *artus* VZV RG PCR Kit sa zabezpečí predovšetkým výberom primérov a sond, ako aj výberom prísnych podmienok reakcie. U primérov a sond sa skontrolovali prípadné homológie pre všetky sekvencie uvedené v génovej banke pomocou sekvenčnej porovnávacej analýzy. Tak sa zabezpečila detekovateľnosť všetkých relevantných genotypov.

Okrem toho sa špecifická overila pomocou 30 rôznych VZV negatívnych vzoriek MMM. Nedošlo u nich k vygenerovaniu žiadnych signálov s primérami a sondami špecifickými pre VZV, ktoré sú zahrnuté v VZV RG Master.

Potenciálna krížová reaktivita súpravy *artus* VZV RG PCR Kit sa testovala pomocou kontrolnej skupiny uvedenej v Tabuľka 4. Žiadny z testovaných patogénov nebol reaktívny.

Tabuľka 4. Testovanie špecificity súpravy s potenciálne krížovo reaktívnymi patogénmi

Kontrolná skupina	VZV (Cycling Green)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange)
Ľudský herpetický vírus 1 (vírus herpes simplex 1)	–	+
Ľudský herpetický vírus 2 (vírus herpes simplex 2)	–	+
Ľudský herpetický vírus 4 (vírus Eppstein-Barrovej)	–	+
Ľudský herpetický vírus 5 (cytomegalovírus)	–	+
Ľudský herpetický vírus 6A	–	+
Ľudský herpetický vírus 6B	–	+
Ľudský herpetický vírus 7	–	+
Ľudský herpetický vírus 8 (herpetický vírus spojený s Kaposiho sarkómom)	–	+
Vírus hepatitídy A	–	+
Vírus hepatitídy B	–	+
Vírus hepatitídy C	–	+
Vírus ľudskej imunodeficiencie (Human Immunodeficiency Virus – HIV)	–	+
Lymfotropný vírus T-buniek ľudí 1	–	+
Lymfotropný vírus T-buniek ľudí 2	–	+
Enterovírus	–	+
Parvovírus B19	–	+
Západonílsky vírus	–	+

Presnosť

Údaje o presnosti súpravy *artus* VZV RG PCR Kit sa zbierali pomocou prístrojov Rotor-Gene a umožňujú určenie celkového rozptylu testu. Celkový rozptyl sa skladá z rozptylu v rámci testu (rozptyl niekoľkých výsledkov vzoriek s rovnakou koncentráciou v rámci jedného experimentu), rozptylu medzi testami (rozptyl viacerých výsledkov testu, ktoré vygenerovali rôzni operátori v jednom laboratóriu na rôznych prístrojoch rovnakého typu) a rozptylu medzi dávkami (rozptyl viacerých výsledkov testu pomocou rôznych dávok). Získané údaje sa použili na určenie štandardnej odchýlky, rozptylu a koeficientu rozptylu pre konkrétny patogén a interný kontrolný roztok PCR.

Údaje o presnosti súpravy *artus* VZV RG PCR sa zozbierali pomocou kvantitatívnej normy najnižšej koncentrácie (QS 4; 10 kópií/μl). Testovanie sa uskutočnilo s 8 kópiami. Údaje o presnosti sa vypočítali na základe hodnôt C_T amplifikačných kriviek (C_T : prahový cyklus, pozri Tabuľka 5, strana 23). Okrem toho sa údaje o presnosti pre kvantitatívne výsledky v kópií/μl určili pomocou príslušných hodnôt C_T (pozri Tabuľka 6, strana 23). Na základe týchto výsledkov je celkové štatistické rozšírenie danej vzorky s uvedenou koncentráciou na zistenie interného kontrolného roztoku 0,45% (C_T) alebo 8,32% (koncentrácia) a 2,81% (C_T). Tieto hodnoty sú založené na súhrne všetkých jednotlivých hodnôt stanovených rozptylov.

Robustnosť

Overenie robustnosti umožňuje stanovenie celkovej miery zlyhania súpravy *artus* VZV RG PCR Kit. Do 30 negatívnych VZV vzoriek MMM sa pridalo 0,4 kópie/μl objemu eluátu DNA VZV (približne trojnásobná koncentrácia analytickej hranice senzitivity). Po extrakcii pomocou súpravy EZ1[®] DSP Virus Kit (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 8) sa tieto vzorky analyzovali pomocou súpravy *artus* VZV RG PCR Kit. Pre všetkých 30 vzoriek bola miera zlyhania 0 %. Okrem toho sa pomocou purifikácie a analýzy 30 negatívnych VZV vzoriek MMM vyhodnotila masívnosť interného kontrolného roztoku. Celková miera zlyhania bola 0 %. Inhibície neboli spozorované. Robustnosť súpravy *artus* VZV RG PCR Kit je ≥ 99 %.

Reprodukovateľnosť

Údaje o reprodukovateľnosti umožňujú pravidelné zhodnotenie účinnosti súpravy *artus* VZV RG PCR Kit, ako aj porovnanie efektívnosti s ostatnými výrobkami. Tieto údaje boli získané počas účasti v uznávaných odborných programoch.

Tabuľka 5. Údaje o presnosti na základe hodnôt C_T

	Štandardná odchýlka	Rozptyl	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Rozptyl v rámci testu: Interný kontrolný roztok	0,04	0,002	0,17
Rozptyl medzi testami: VZV QS 4	0,15	0,02	0,5
Rozptyl medzi testami: Interný kontrolný roztok	0,39	0,15	1,63
Rozptyl medzi dávkami: VZV QS 4	0,1	0,01	0,34
Rozptyl medzi dávkami: Interný kontrolný roztok	0,66	0,43	2,65
Celkový rozptyl: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Celkový rozptyl: Interný kontrolný roztok	0,68	0,47	2,81

Tabuľka 6. Údaje o presnosti na základe kvantitatívnych výsledkov (v kópiách/μl)

	Štandardná odchýlka	Rozptyl	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: VZV QS 4	0,5	0,25	5,46
Rozptyl medzi testami: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Rozptyl medzi dávkami: VZVQS 4	0,75	0,56	7,67
Celkový rozptyl: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Referenčná literatúra

Spoločnosť QIAGEN vedie rozsiahlu aktuálnu on-line databázu vedeckých publikácií využívajúcich produkty QIAGEN. Komplexné možnosti vyhľadávania umožnia nájsť potrebné články, a to buď jednoduchým vyhľadávaním podľa kľúčových slov, alebo zadaním aplikácie, oblasti výskumu, názvu atď.

Úplný zoznam referenčnej literatúry nájdete v on-line Referenčnej databáze QIAGEN na stránke www.qiagen.com/RefDB/search.asp, prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Symboly

	Obsahuje reagenty postačujúce pre <N> testov
	Použite do
	Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro
	Katalógové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca
	Prečítajte si návod na použitie

Kontaktné informácie

Technickú pomoc a ďalšie informácie získate v centre technickej podpory na adrese www.qiagen.com/Support alebo kontaktujte niektoré z oddelení technickej podpory spoločnosti QIAGEN (pozrite zadnú stranu alebo navštívte lokalitu www.qiagen.com).

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	Pre 24 reakcií: Zmes master, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, roztok magnézia, voda (stupeň PCR)	4502263
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (96)	Pre 96 reakcií: Zmes master, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, roztok magnézia, voda (stupeň PCR)	4502265
Súpravy EASY<i>artus</i> VZV RG PCR Kits – na integrovanú automatizovanú purifikáciu vzorky v úplnom súlade s CE-IVD a detekciu patogénov		
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 1	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 24 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 1 x súprava <i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	EA10223
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 2	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín a 48 testov: 1 x súprava EZ1 DSP Virus Kit, 2 x súprava <i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	EA10224
Súprava EZ1 DSP Virus Kit – na automatickú súčasnú purifikáciu virálnej DNA a RNA z 1 – 14 vzoriek ľudskej plazmy, séra alebo MMM		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Na prípravu 48 virálnych nukleových kyselín: Vopred naplnené reagenčné kazety, jednorazové držiaky špičiek, jednorazové filtračné špičky, skúmavky na vzorky, elučné skúmavky, pufre, nosná RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx a príslušenstvo		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002022

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a vysokorozlišovací analyzátor kriviek topenia s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a vysokorozlišovací analyzátor kriviek topenia s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR prístroj so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR cyklovač so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002043
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie s jednokanálovou pipetou do skúmaviek 72 x 0,1 ml	9018901

Produkt	Obsah	Kat. č.
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie v štandardnom teste 8 x 12 pomocou skúmaviek 96 x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 pásov so 4 skúmavkami a uzávermi na 1000 reakcií	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 pásov so 4 skúmavkami a uzávermi na 10 000 reakcií	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostenných skúmaviek na 10 000 reakcií	981008

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com, alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Táto strana je zámerne prázdna

Nákup tohto výrobku umožňuje kupujúcemu používať výrobok na vykonávanie diagnostických krokov pre ľudskú in vitro diagnostiku. Týmto nie je priznaný žiadny všeobecný patent alebo iné oprávnenie žiadneho druhu ako toto konkrétne právo na používanie vyplývajúce z nákupu.

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

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy *artus* VZV RG PCR Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *artus* VZV RG PCR Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *artus* VZV RG PCR Kit a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke k súprave *artus* VZV RG PCR Kit a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na www.qiagen.com.

© 2009 – 2014 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

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)

