

artus[®] HSV-1/2 RG PCR Kit

Manuál



24 (katalogové čís. 4500263)



96 (katalogové čís. 4500265)

Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvalitativní stanovení

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q



REF

4500263, 4500265

HB

1060171CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2

MAT

1060171CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií pro přípravu vzorků a jejich rozborů, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí úspěšný výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:


- purifikaci DNA, RNA a proteinů
- rozbor nukleových kyselin a proteinů
- microRNA výzkum a RNAi
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozborů

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a průlomů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Obsah soupravy	4
Symboly	4
Skladování	5
Zamýšlený účel použití	5
Zvláštní pokyny pro použití produktu	5
Technická podpora	6
Kontrola kvality	6
Bezpečnostní informace	6
Úvod	7
Princip	7
Informace o původci	7
Charakteristika výkonu	7
Potřebné vybavení a reagentie nedodávané se soupravou	14
Důležitá upozornění	15
Všeobecná preventivní opatření	15
Izolace DNA	15
Interní kontrola	15
Protokol:	
■ PCR a analýza dat	16
Řešení problémů	25
Literatura	27
Informace o objednání	28

Obsah soupravy

artus HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalogové čís.		4500263	4500265
Počet reakcí		24	96
Modrá	HSV-1/2 RG Master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Žlutá	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Červená	HSV-1 RG PC [†] (100 kopií/µl)	200 µl	200 µl
Hnědá	HSV-2 RG PC [†] (100 kopií/µl)	200 µl	200 µl
Zelená	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 µl	2 x 1000 µ
Bílá	Water (PCR grade)	1000 µl	1000 µl
	Manuál 	1	1

* Roztok hořčíku.

† Pozitivní kontrola.

‡ Interní kontrola.

Symboly



<N>

Obsahuje reagentie pro <N> testů



Použitelné do



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



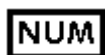
Číslo materiálu



Komponenty



Obsahuje



Počet



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní rozmezí



Výrobce



Přečtěte si informace uvedené v manuálu



Důležité upozornění

Skladování

Komponenty sady *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit se skladují při -15 °C až -30 °C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (>2 x), snižuje se tím senzitivita testu. Při nepravidelném používání by se měly reagentie zmrazit v alikvotech. Skladování při teplotě 2–8°C by nemělo překročit dobu pěti hodin.

Zamýšlený účel použití

artus HSV-1/2 RG PCR Kit je test založený na polymerázové řetězové reakci v reálném čase (PCR) pro průkaz a rozlišení DNA herpes simplex viru 1 a 2 na přístrojích Rotor-Gene Q po plně automatizované purifikaci vzorků likvoru od HSV infikovaných osob pomocí soupravy EZ1[®] DSP Virus Kit.



Souprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit se nesmí používat ve spojení s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

artus HSV-1/2 RG PCR Kit je určen k prognóze nemoci ve spojení s klinickou prezentací a jinými laboratorními ukazateli.

Zvláštní pokyny pro použití produktu

Všechny reagentie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro (EN375).

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

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

Technická podpora

Společnost QIAGEN se pyšní kvalitou a dostupností technické podpory. V našich odděleních technické podpory pracují zkušení vědci s rozsáhlými praktickými a teoretickými zkušenostmi s technologiemi pro přípravu vzorků a jejich rozborů a s použitím QIAGEN® produktů. Máte-li dotazy nebo potíže s *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit nebo jiným produktem QIAGEN, neváhejte nás kontaktovat.

Zákazníci firmy QIAGEN jsou hlavním zdrojem informací pro pokročilé a specializované použití našich produktů. Tyto informace jsou velmi užitečné pro ostatní vědce i výzkumníky u společnosti QIAGEN. Proto bychom Vás rádi vyzvali k tomu, abyste nás kontaktovali, pokud máte připomínky k výkonu produktu nebo návrhy pro nové aplikace a techniky.

Pro technickou podporu a více informací navštivte náš technický servis na www.qiagen.com/Support, zavolejte nebo kontaktujte Vašeho místního distributora (viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

Kontrola kvality

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

Varování a bezpečnostní opatření

Při práci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, prohlédnout a vytisknout SDS ke každé QIAGEN® soupravě nebo komponentě.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Úvod

artus HSV-1/2 RG PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz HSV-1 a HSV-2 DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na přístrojích Rotor-Gene Q. HSV-1/2 RG Master obsahuje reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci 154 bp dlouhého úseku genomů HSV-1 a HSV-2 a také pro bezprostřední detekci specifického amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green (zdroj 470 nm, detektor 510 nm) a Cycling Orange (zdroj 585 nm, detektor 610 nm) přístroje Rotor-Gene Q.

Kromě toho obsahuje *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow (zdroj 530 nm, detektor 555 nm) přístroje Rotor-Gene Q. Limit detekce analytické HSV-1/2 RG PCR přitom není negativně ovlivněn (viz "Analytická senzitivita", strana 7). Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC).

Princip

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat testovací zkumavky.*

Informace o původci

Herpes simplex virus (HSV) se nachází v tekutině puchýřku, ve slinách a vaginálním sekretu. Přenáší se přímým kontaktem s postiženými místy, pohlavním stykem a perinatálně. U velké části onemocnění vyvolaných HSV dominuje tvorba puchýřků na kůži a sliznicích (ústa a genitálie). Infekce HSV se může vyskytovat jako primární infekce, která u více než 90 % případů probíhá asymptomaticky nebo jako recidiva (sekundární). Primární infekce HSV-1 může m.j. vést k gingivostomatitidě, ekzema herpeticum, keratokonjunktivitidě a encefalitidě. Primární infekce HSV-2 se vyskytuje především jako vulvovaginitida, meningitida a jako generalizovaný herpes novorozenců. Primární symptomy sekundární infekce je především tvorba puchýřků v nazolabiální a genitální oblasti. Recidivy keratokonjunktivitidy a meningitidy se klasifikují jako více nebezpečné.

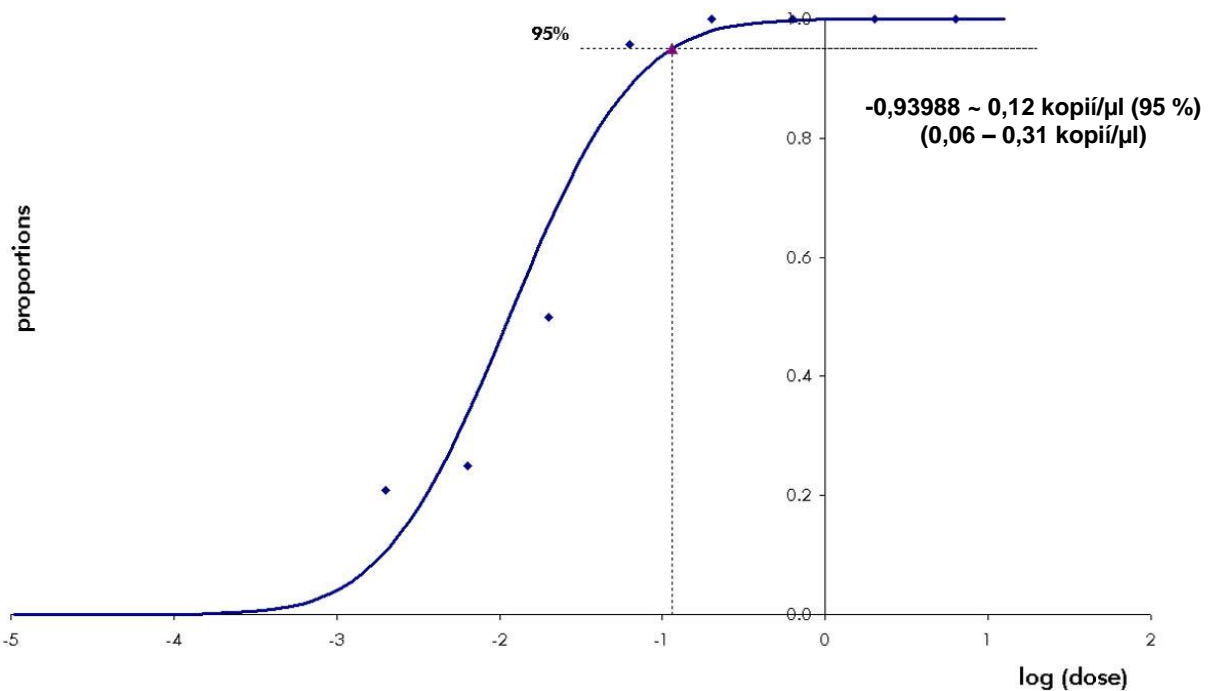
Charakteristika výkonu

Analytická senzitivita

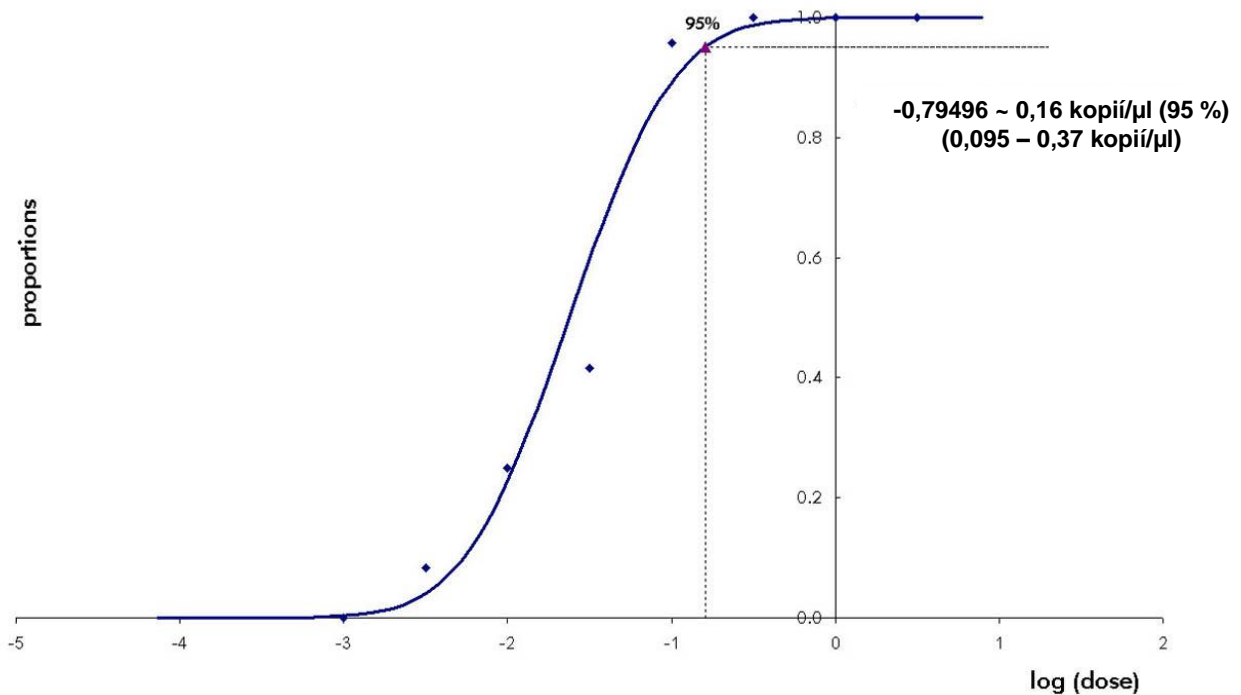
Pro zjištění analytické senzitivity *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit byla vytvořena řada ředění standardů od 10 do 0,001 kopií/μl. Tyto řady byly následně analyzovány za použití *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit na přístroji Rotor-Gene Q/6000. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly

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

zjištěny probitovou analýzou. Analytický limit detekce soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q/6000 leží pro HSV-1 u 0,12 kopií/μl ($p = 0,05$) a pro HSV-2 u 0,16 kopií/μl ($p=0,05$). To znamená, že bude s 95 % pravděpodobností detekováno 0,12 kopií/μl HSV-1 DNA nebo 0,16 kopií/μl HSV-2 DNA. Grafické vyhodnocení probitové analýzy pro HSV-1 je zobrazeno na obrázku 1, diagram probitové analýzy pro HSV-2 na obrázku 2.



Obrázek 1. Probitová analýza: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Analytická senzitivita pro HSV-1 soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit za užití přístroje Rotor-Gene Q/6000.



Obrázek 2. Probitová analýza: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Analytická senzitivita pro HSV-2 soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit za užití přístroje Rotor-Gene Q/6000.

Specificita

Specificita *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Detekovatelnost všech relevantních genotypů byla zajištěna jak pomocí alignmentu databáze, tak pomocí PCR na přístroji Rotor-Gene s kmeny uvedenými v tabulce 1.

Validace specificity byla dále provedena na 30 různých HSV-1 a HSV-2 negativních vzorcích likvoru, které spolu s HSV-1 a HSV-2 specifickými primery a sondami obsaženými v HSV-1/2 RG Master negenerovaly žádný signál.

Potenciální křížová reaktivita soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 2. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1. Testování specifity relevantních genotypů

Virus	Kmen	Zdroj	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Interní kontrola (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	-	+
HSV-1	KOS	INSTAND [†]	+	-	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD [‡]	+	-	+
HSV-2	HG- 2	NCPV [§]	-	+	+
HSV-2	G	ATCC*	-	+	+
HSV-2	MS	QCMD [‡]	-	+	+

* ATCC American Type Culture Collection.

[†] INSTAND Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories.

[‡] QCMD Quality Control for Molecular Diagnostics.

[§] NCPV National Collection of Pathogenic Viruses.

Tabulka 2. Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců

Kontrolní skupina	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Interní kontrola (Cycling Yellow)
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	–	–	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteina a Barrové)	–	–	+
Lidský herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	–	–	+
Lidský herpesvirus 6A	–	–	+
Lidský herpesvirus 6B	–	–	+
Lidský herpesvirus 7	–	–	+
Lidský herpesvirus 8 (herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem)	–	–	+
Virus hepatitidy A	–	–	+
Virus hepatitidy B	–	–	+
Virus hepatitidy C	–	–	+
Virus lidské imunodeficiency (HIV)	–	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	–	+
Enterovirus	–	–	+
Parvovirus B19	–	–	+
Západonilský virus	–	–	+

Přesnost

Údaje o přesnosti soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit byly získány za užití přístrojů Rotor-Gene a umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z Intra-Assay variability (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z Inter-Assay variability (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených

různými osobami v jedné laboratoři) a z Inter-Batch variability (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Získaná data byla použita k vypočítání standardní odchylky, variance a koeficientu variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR interní kontroly.

Údaje o přesnosti soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit byly stanoveny za užití HSV-1 a HSV-2 DNA o koncentraci 10 kopií/μl. Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě C_T hodnot amplifikačních křivek (C_T: threshold cycle, viz tabulka 3 a 4). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 1,82 % (C_T) pro HSV-1 resp. 0,67 % (C_T) pro HSV-2, a 1,24 % (C_T) resp. 1,58 % (C_T) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 3. Údaje o přesnosti pro HSV-1 na základě C_T hodnot

	C_T hodnota	Standardní odchylka	Koeficient variace (%)
Intra-Assay variabilita: HSV-1 10 kopií/μl	30,46	0,25	0,81
Intra-Assay variabilita: Interní kontrola	25,29	0,08	0,3
Inter-Assay variabilita: HSV-1 10 kopií/μl	29,69	0,69	2,05
Inter-Assay variabilita: Interní kontrola	24,97	0,31	1,25
Inter-Batch variabilita: HSV-1 10 kopií/μl	29,95	0,40	1,35
Inter-Batch variabilita: Interní kontrola	24,90	0,30	1,20
Celková variabilita: HSV-1 10 kopií/μl	29,91	0,55	1,82
Celková variabilita: Interní kontrola	24,99	0,31	1,24

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

	C _T hodnota	Standardní odchylka	Koeficient variace (%)
Intra-Assay variabilita: HSV-2 10 kopií/μl	29,85	0,15	0,50
Intra-Assay variabilita: Interní kontrola	25,17	0,39	1,55
Inter-Assay variabilita: HSV-2 10 kopií/μl	29,92	0,15	0,49
Inter-Assay variabilita: Interní kontrola	25,11	0,41	1,63
Inter-Batch variabilita: HSV-2 10 kopií/μl	29,80	0,23	0,79
Inter-Batch variabilita: Interní kontrola	24,89	0,33	1,32
Celková variabilita: HSV-2 10 kopií/μl	29,88	0,20	0,67
Celková variabilita: Interní kontrola	25,07	0,40	1,58

Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Za účelem získání velmi nízkých titrů viru HSV-1 a HSV-2 bylo 30 negativních vzorků likvoru smíšeno s 0,36 kopiemi/μl elučního objemu HSV-1 resp. s 0,48 kopiemi/μl elučního objemu HSV-2 DNA (třínásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po izolaci pomocí EZ1 DSP Virus Kit byly tyto vzorky analyzovány pomocí *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Všechny 30 vzorků bylo správně prokázáno jako slabě pozitivní na každý typ HSV, z čehož vyplývá četnost chyb 0%. Robustnost interní kontroly byla přezkoušena izolací a analýzou 30 HSV-1 a HSV-2 negativních vzorků likvoru. Inhibice nebyly pozorovány, z čehož vyplývá celková četnost chyb 0%. Robustnost soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit činí tedy ≥ 99 %.

Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účasti v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

Potřebné vybavení a reagensie nedodávané se soupravou

Při práci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

- DNA-izolační souprava (viz “Izolace DNA“, strana 15)
- Pipety (nastavitelné)*
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer*
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 2 ml zkumavky
- Přístroj Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene*[†] s fluorescenčními kanály Cycling Green, Cycling Orange a Cycling Yellow
- Rotor-Gene Q software verze 1.7.94 a vyšší (Rotor-Gene 6000 software verze 1.7.65 a vyšší)
- Stripy se zkumavkami a víčky, 0,1 ml, pro použití s 72 jamkovým rotorem (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- Alternativně: 0,2 ml PCR zkumavky, pro použití s 36 jamkovým rotorem (kat. čís. 981005 nebo 981008)
- Chladicí blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. čís. 9018901 nebo Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. čís. 9018905)

* Ujistěte se, že jsou přístroje pravidelně kontrolovány, udržovány a kalibrovány podle údajů výrobce.

[†] Souprava *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit se nesmí používat ve spojení s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

Důležitá upozornění

Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte a izolujte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) na jiném místě než ostatní reagentie a přidávejte je do reakce v prostorově oddělené místnosti.
- Všechny komponenty před počátkem rozboru úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25°C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaným náběrem pipetou a vypuštěním pipety nebo krátkým vortexem) a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle a udržujte PCR reagentie na ledu nebo v chladicím bloku (72/96-well loading block).

Izolace DNA

Souprava EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. čís. 62724*) je validována pro purifikaci virové DNA z lidského likvoru pro použití se soupravou *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Provedte purifikaci virové DNA podle instrukcí v *EZ1 DSP Virus Kit Manuálu*.

- ⓘ *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit není vhodný pro izolace na bázi fenolu.
- ⓘ Užití nosiče RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA. Přidejte tedy prosím ke každé izolaci potřebné množství nosiče RNA podle pokynů v *EZ1 DSP Virus Kit Manuálu*.
- ⓘ Interní kontrolu soupravy *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit lze vložit přímo do izolace (viz "Interní kontrola", strana 15).

Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává interní kontrola (HSV-1/2 RG IC). Máte tak možnost kontrolovat jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR. Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci interní kontrolu v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže například používáte EZ1 DSP Virus Kit a eluujete DNA v 60 µl elučního pufru (AVE), vložte 6 µl interní kontroly.

- ⓘ Interní kontrolu a nosič RNA nepipetujte přímo do vzorku.

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi HSV-1/2 RG Master a HSV-1/2 RG Mg-Sol, jak je popsáno u kroku 2b (strana 16).

* EZ1 DSP Virus Kit je dostupný také jako CE-IVD-certifikovaná souprava EASY*artus*[®] HSV-1/2 RG PCR Kit, která je kombinovaná s *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit (viz strana 28 pro informace o objednání).

Protokol: PCR a analýza dat



Důležité pokyny před začátkem

- Před začátkem procedury si přečtěte “Důležitá upozornění”, strana 15.
- Před začátkem protokolu se dobře seznámete s přístrojem Rotor-Gene Q. Prostudujte si uživatelský manuál přístroje.
- Dbejte na to, aby byly v každém běhu PCR zahrnuty pozitivní kontroly a jedna negativní kontrola (Water, PCR grade).

Další pokyny před začátkem

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8°C.
- Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit, musí být dobře promíchány (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Provedení

1. Umístěte požadovaný počet PCR zkumavek do adaptérů chladicího bloku.
 2. Chcete-li interní kontrolou kontrolovat jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Jestliže chcete interní kontrolu použít výhradně ke kontrole PCR inhibice, postupujte podle kroku 2b. Použijte interní kontrolu podle kroku 2b pro všechny pozitivní a negativní kontroly.
- 2a. Interní kontrola byla již přidána k izolaci (viz “Interní kontrola”, strana 15). V tomto případě připravte Master Mix podle tabulky 5.

Reakční směs obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 5. Příprava Master Mixu (interní kontrola použitá ke sledování izolace DNA a kontrole inhibicí PCR)

Počet vzorků	1	12
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
Celkový objem	30 µl	360 µl

- 2b. Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi HSV-1/2 RG Master a HSV-1/2 RG Mg-Sol. V tomto případě připravte Master Mix podle tabulky 6.

Reakční směs obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

Tabulka 6. Příprava Master Mixu (interní kontrola použita výhradně ke kontrole inhibice PCR)

Počet vzorků	1	12
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
Celkový objem	32 µl*	384 µl*

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním interní kontroly je při přípravě PCR reakce opomínáno. Senzitivita není omezena.

- Pipetujte do každé PCR zkumavky 30 µl Master Mixu. Následně přidejte 20 µl eluátu z izolace DNA (viz tabulka 7) a dobře promíchejte opakovaným náběrem a vypuštěním pipety. Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 20 µl HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC a jako negativní kontrolu 20 µl vody (Water, PCR grade).**

Tabulka 7. Příprava PCR reakce

Počet vzorků	1	12
Master Mix	30µl	po 30 µl
Vzorek	20µl	po 20 µl
Celkový objem	50 µl	po 50 µl

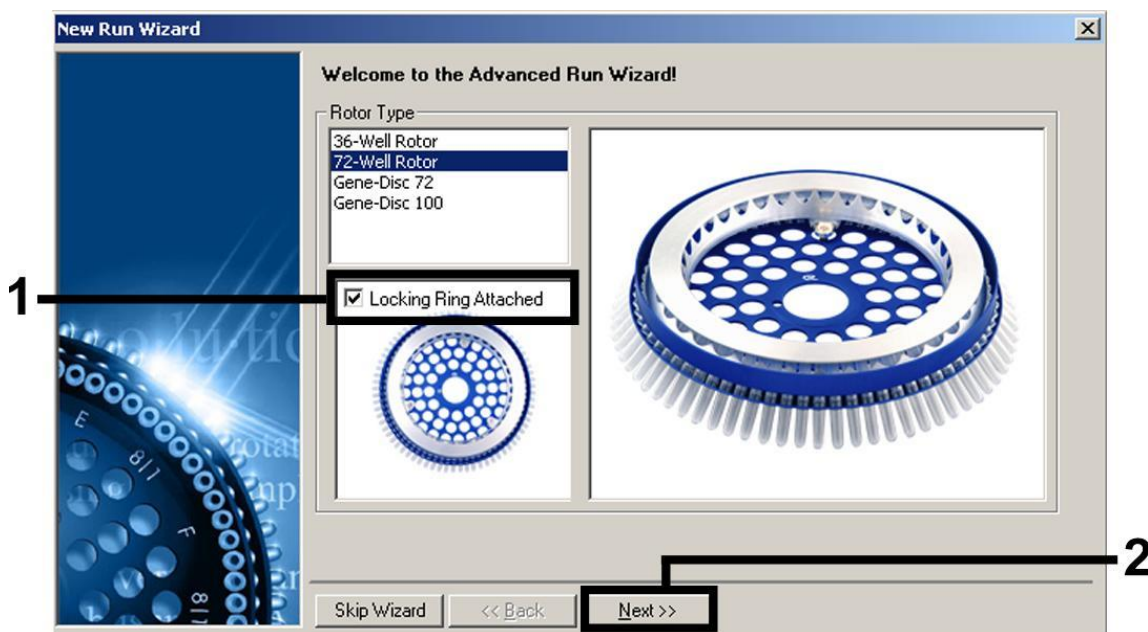
- Uzavřete PCR zkumavky. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen Locking Ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.**
- Pro detekci HSV-1 DNA nebo HSV-2 DNA vytvořte teplotní profil podle následujících kroků.**

Nastavení obecných parametrů PCR	Obrázky 3, 4, 5
Počáteční aktivace Hot Start enzymu	Obrázek 6
Amplifikace DNA	Obrázek 7
Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů	Obrázek 8
Start běhu	Obrázek 9

Veškeré údaje se vztahují na software Rotor-Gene Q verzi 1.7.94 a vyšší a Rotor-Gene 6000 verzi 1.7.65 a vyšší. Podrobnosti k programování přístroje Rotor-Gene si prostudujte v uživatelském manuálu přístroje. Na obrázcích jsou

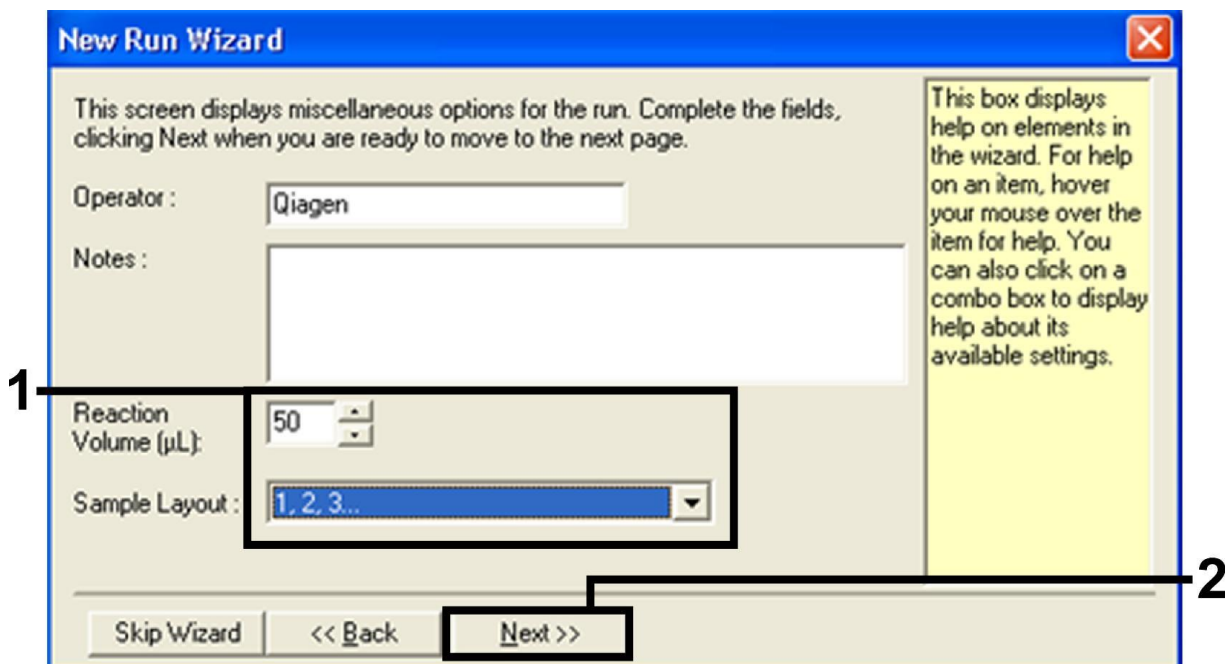
tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Ilustrace jsou uvedeny pro Rotor-Gene Q.

6. Nejdříve otevřete okno “New Run Wizard” ve verzi “Advanced” (obrázek 3). Zaškrtněte rámeček “Locking Ring Attached” a klikněte na “Next”.



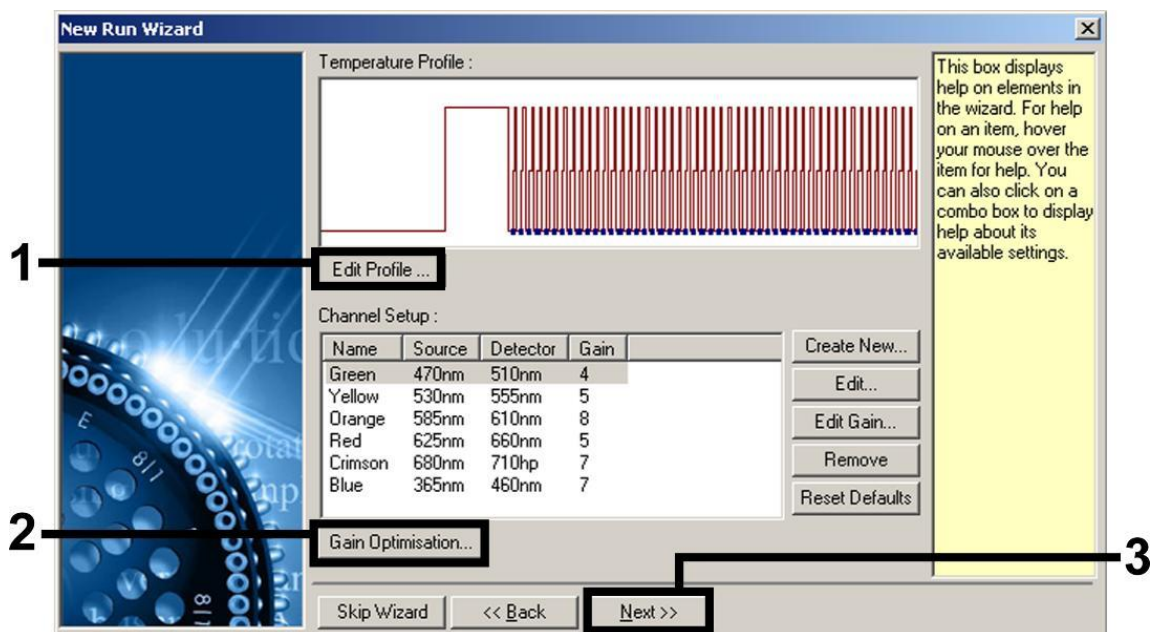
Obrázek 3. Menu “New Run Wizard”.

7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na “Next” (obrázek 4).

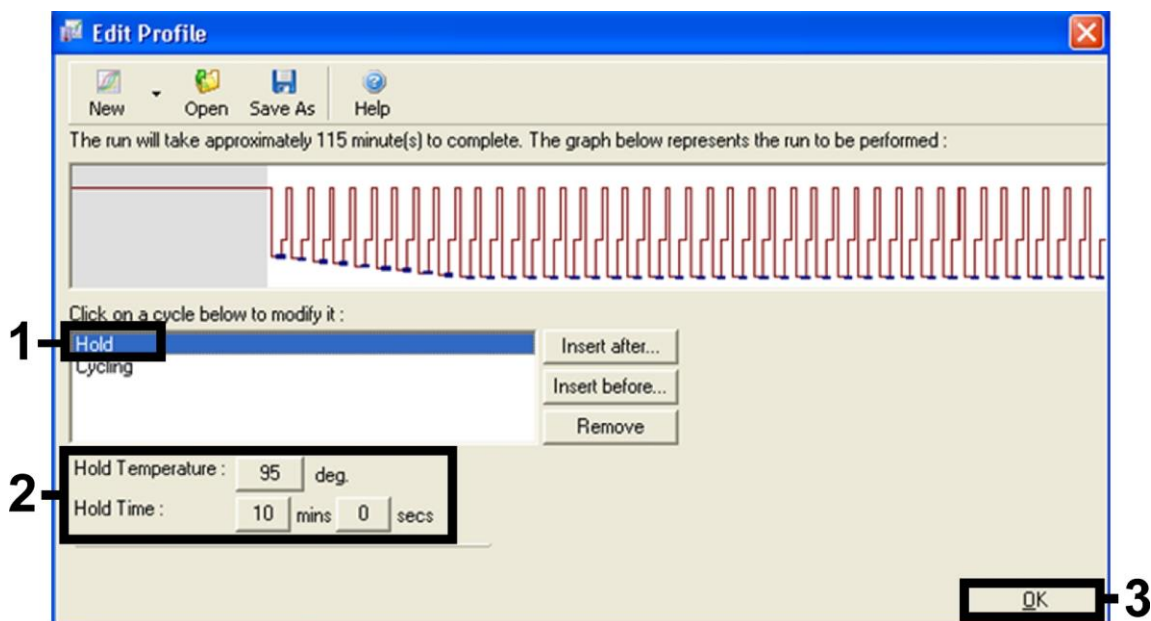


Obrázek 4. Nastavení obecných parametrů PCR.

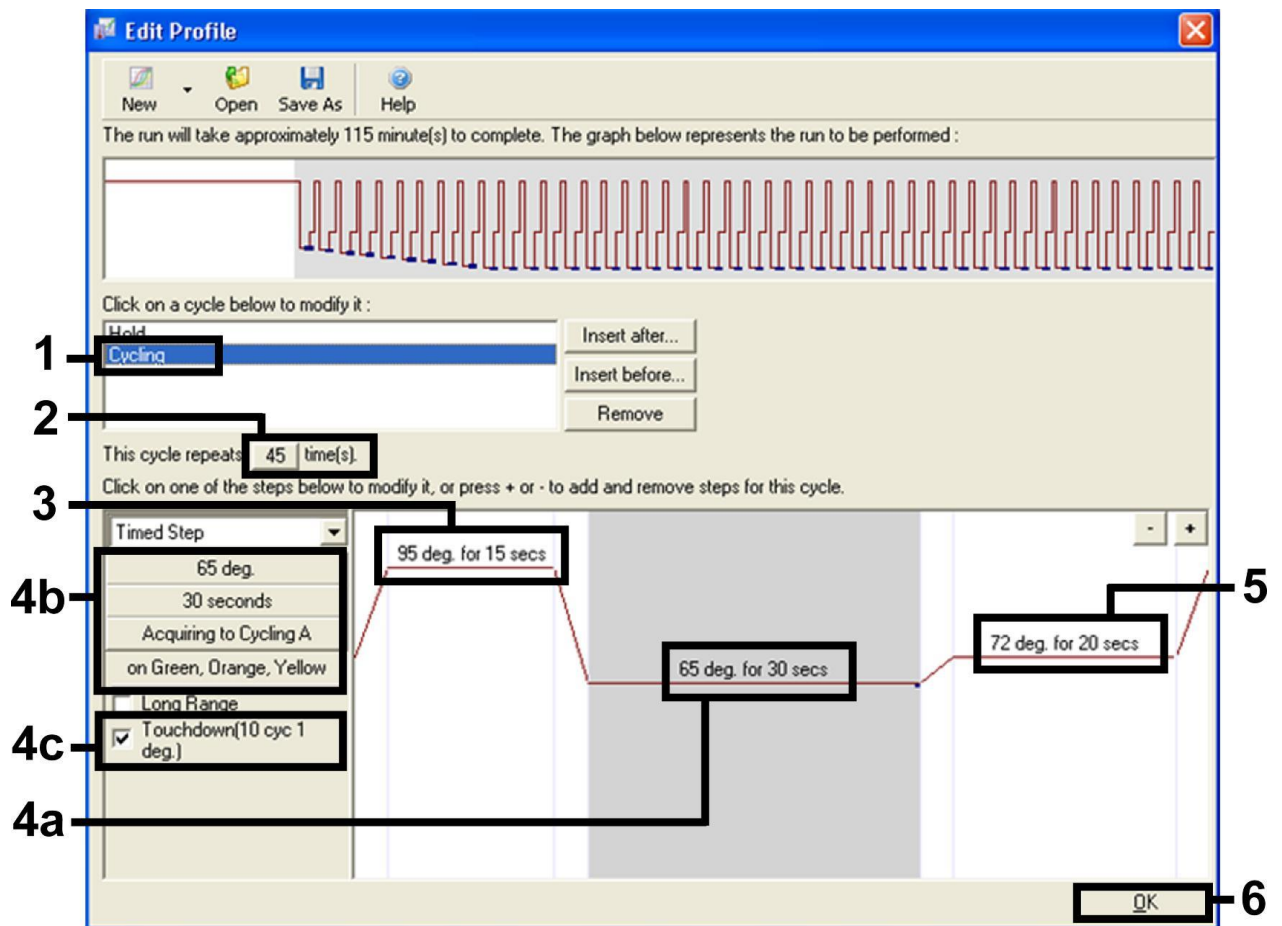
8. Klikněte na tlačítko “Edit Profile” v dalším okně “New Run Wizard” (obrázek 5) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 6–7.



Obrázek 5. Úprava profilu.

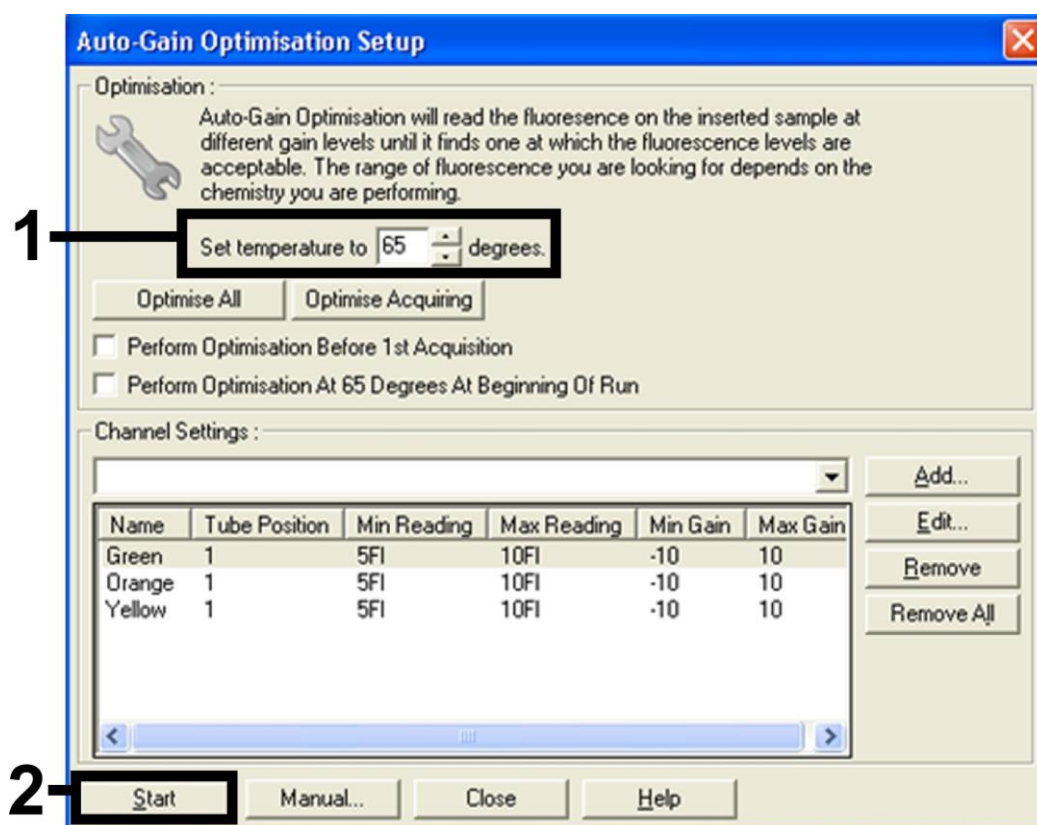


Obrázek 6. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



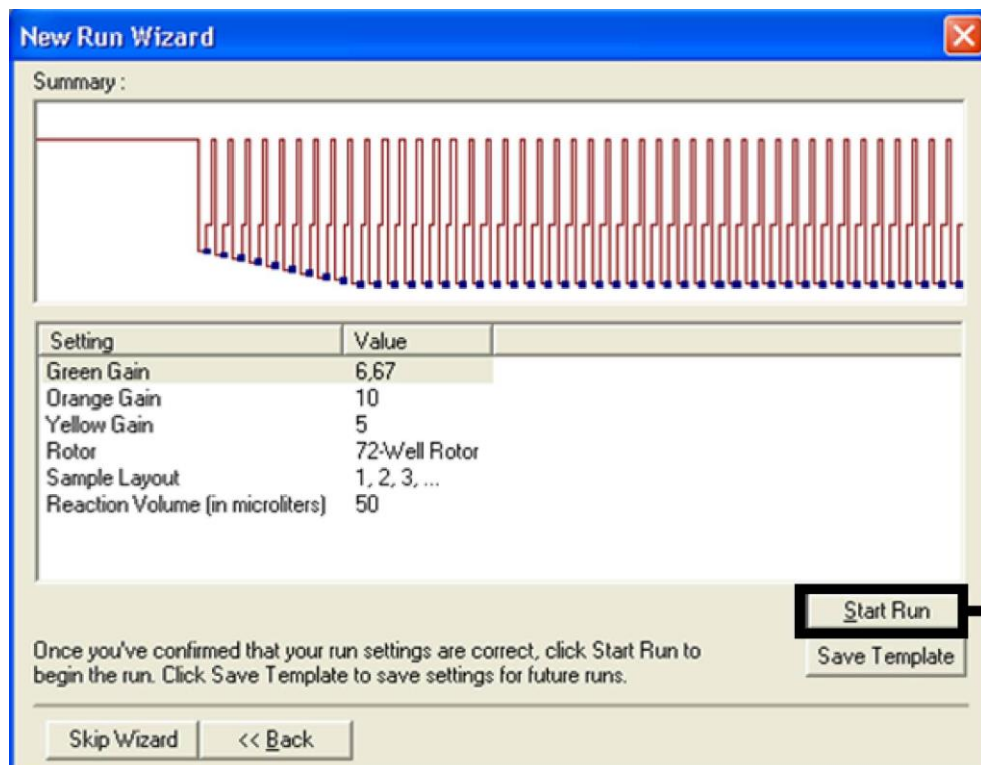
Obrázek 7. Amplifikace DNA. Ujistěte se, že byla u kroku „Annealing“ aktivována funkce „Touchdown“ pro 10 cyklů.

9. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity v PCR zkumavkách. Klikněte na “Gain Optimisation” v okně menu “New Run Wizard” (viz krok 2) pro otevření okna “Auto-Gain Optimisation Setup” (viz obrázek 8). Nastavte kalibrační teplotu na 65, aby odpovídala reasociační (annealing) teplotě amplifikačního programu (obrázek 7, krok 4b). Ujistěte se, že jsou u “Auto-Gain Optimisation” zvoleny všechny tři kanály (Green, Orange a Yellow). (Kanály naleznete v rozevíracím menu pod “Channel Settings” a následným kliknutím na “Add”.) Klikněte na “Start” pro spuštění optimalizace výsledků. Poté, co byla kalibrace výsledků dokončena, klikněte na “Close” v okně “Auto-Gain Optimisation Setup”.



Obrázek 8. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.

10. Hodnoty “Gain“ zjištěné kalibrací kanálu se automaticky uloží a jsou uvedeny v posledním okně menu programování (obrázek 9). Stiskněte “Start Run”.



Obrázek 9. Start běhu.

11. Po dokončení běhu vyhodnoťte data. Může dojít k následujícím výsledkům (11a, 11b, 11c, 11d, 11e a 11f).

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou uvedeny na obrázcích 10, 11 a 12.

- 11a. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green je detekován signál. Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje HSV-1 DNA.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Yellow podružná, protože vysoké výchozí koncentrace HSV-1 DNA (pozitivní signál v kanálu Cycling Green) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Yellow (kompetice).

- 11b. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu Cycling Yellow (signál interní kontroly). Ve vzorku není prokazatelná žádná HSV-1 DNA. Lze jej proto považovat za negativní.

Při negativní HSV-1 PCR vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost PCR inhibice.

- 11c. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange je detekován signál. Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje HSV-2 DNA.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Yellow podružná, protože vysoké výchozí koncentrace HSV-2 DNA (pozitivní signál v kanálu Cycling Orange) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Yellow (kompetice).

**11d. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu Cycling Yellow (signál interní kontroly).
Ve vzorku není prokazatelná žádná HSV-2 DNA. Lze jej proto považovat za HSV-2 negativní.**

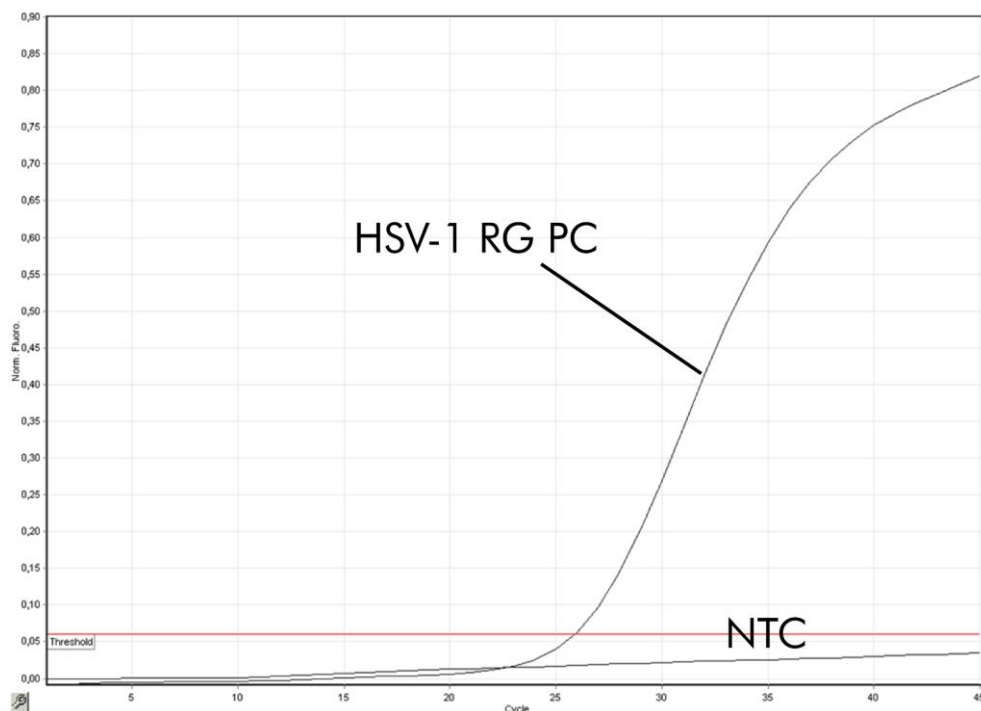
Při negativní HSV-2 PCR vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost PCR inhibice.

**11e. Signál je detekován v kanálech Cycling Green a Cycling Orange.
Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje HSV-1 DNA i HSV-2 DNA.**

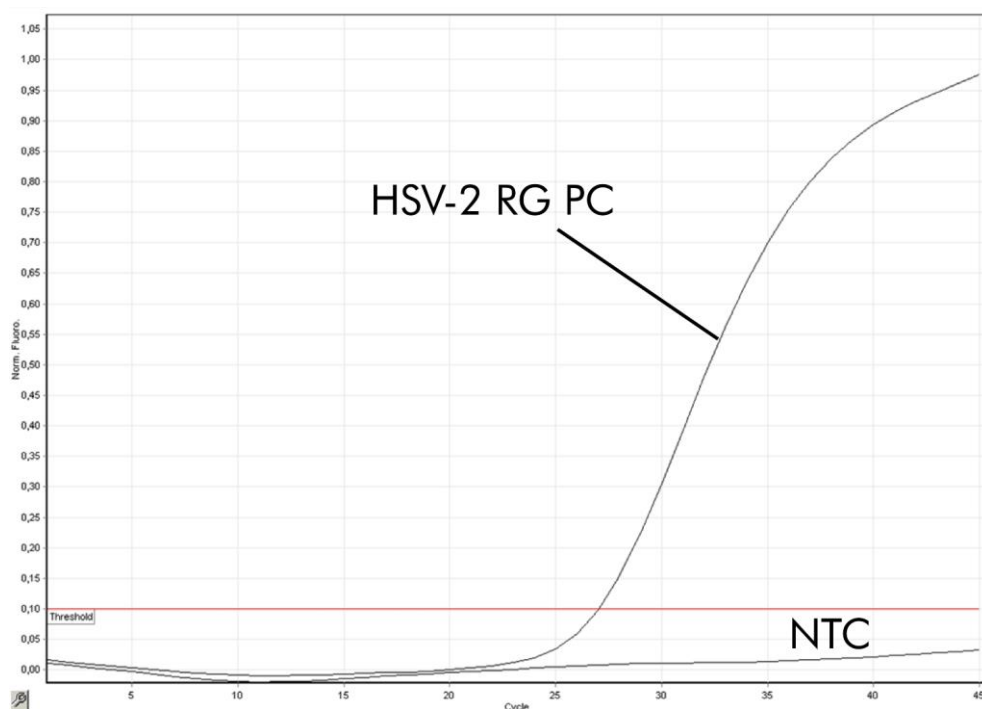
V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Yellow podružná, protože vysoké výchozí koncentrace HSV-1 DNA a HSV-2 DNA (pozitivní signál v kanálech Cycling Green a Cycling Orange) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Yellow (kompetice).

**11f. Signál není detekován ani v kanálu Cycling Green, ani v kanálu Cycling Orange, ani v kanálu Cycling Yellow.
Není možné učinit závěr.**

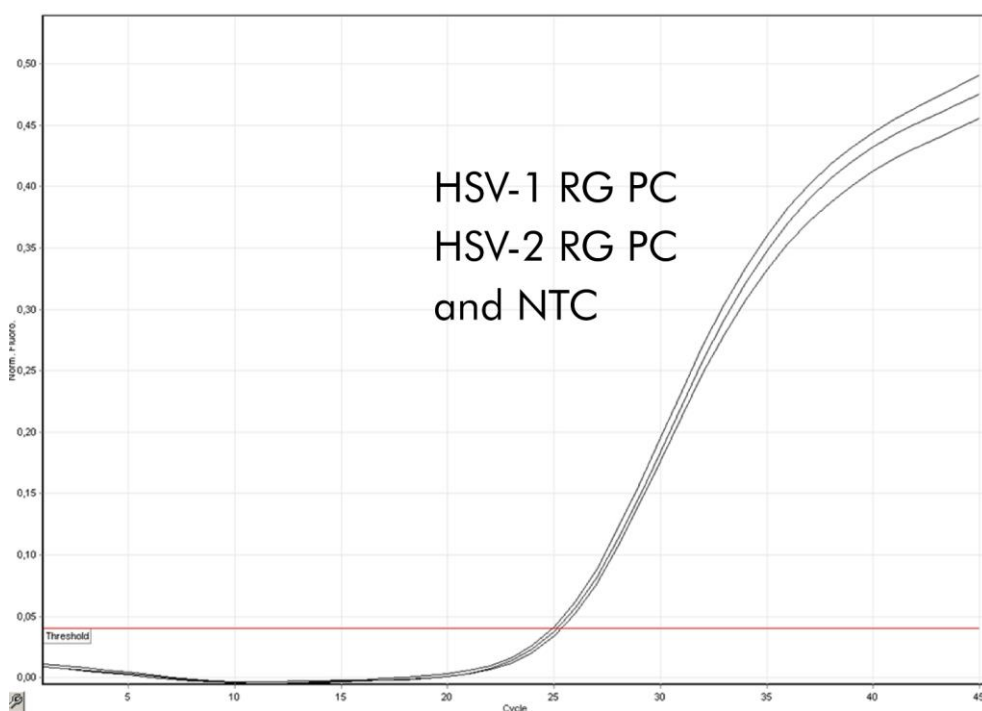
Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole “Řešení problémů“, strana 25.



Obrázek 10. Průkaz pozitivní kontroly HSV-1 (HSV-1 RG PC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obrázek 11. Průkaz pozitivní kontroly HSV-2 (HSV-2 RG PC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange. NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).








Obrázek 12. Průkaz interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow při současné amplifikaci pozitivních kontrol (HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC). NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

Řešení problémů



V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší Technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z naší Technické podpory vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v tomto manuálu i obecně k molekulárně biologickým aplikacím (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy




Žádný signál při pozitivních kontrolách (HSV-1 RG PC a HSV-2 RG PC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling Orange

- | | |
|---|--|
| a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu PCR dat neodpovídá protokolu |  K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling Green a Cycling Orange pro analytickou HSV-1/2 PCR a fluorescenční kanál Cycling Yellow pro PCR interní kontroly. |
| b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene |  Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz "Protokol: PCR a analýza dat", strana 16). |
| c) Chybné nastavení PCR reakce |  Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem ("Protokol: PCR a analýza dat", strana 16) a popř. PCR zopakujte. |
| d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole "Skladování" (strana 5) |  Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |
| e) Doba použitelnosti soupravy <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit vypršela |  Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu. |







Slabý nebo chybějící signál interní kontroly negativního vzorku likvoru podrobeného izolaci soupravou EZ1 DSP Virus Kit ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green nebo Cycling Orange

- | | |
|--|---|
| a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu |  Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením. |
| b) Došlo k inhibici PCR |  Ujistěte se, že používáte námi doporučenou metodu izolace a držte se přesně předpisů výrobce. |

Komentáře a návrhy

- c) Během izolace došlo k úbytku DNA  Byla-li k izolaci přidána interní kontrola, může nepřítomnost signálu interní kontroly znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že používáte námi doporučenou metodu izolace (viz "Izolace DNA", strana 15) a držte se přesně předpisů výrobce.
- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole "Skladování" (strana 5)  Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Doba použitelnosti soupravy *artus HSV-1/2 RG PCR Kit* vypršela  Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály při negativních kontrolách ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling Orange analytické PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci  Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
-  Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
-  Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.
-  Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- b) Během izolace došlo ke kontaminaci  Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
-  Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu etc.

Úplný seznam literatury naleznete v databance "QIAGEN Reference Database" na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte Technický servis QIAGEN popř. Vašeho místního distributora.

Informace o objednání

Produkt	Obsah	Katalogové čís.
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, roztok hořčičku, 2 pozitivní kontroly, interní kontrola, voda (PCR grade)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, roztok hořčičku, 2 pozitivní kontroly, interní kontrola, voda (PCR grade)	4500265
EZ1 DSP Virus Kit — pro purifikaci virových nukleových kyselin ze vzorků lidského likvoru pro účely diagnostiky in vitro		
EZ1 DSP Virus Kit	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin: předplněné zásobníky s reagensy, jednorázové držáky na špičky, jednorázové špičky s filtrem, zkumavky na vzorky, eluční zkumavky, pufry, nosič RNA	62724
EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit — pro plně integrovanou, automatizovanou a CE-IVD-konformní purifikaci vzorků a průkaz původce		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 24 rozborů: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	Pro 48 příprav virových nukleových kyselin a 48 rozborů: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024
Rotor-Gene Q a příslušenství		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Real-time PCR cyklér a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt - HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus HRM kanál, notebook počítač, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis	Na požádání
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro manuální nastavení reakce pomocí jednokanálové pipety za užití 72 x 0,1 ml zkumavek	9018901

Produkt	Obsah	Katalogové čís.
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro manuální nastavení reakce ve standardním 8 x 12 seskupení za užití 96 x 0,2 ml zkumavek	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů se 4 zkumavkami a víčky pro 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů se 4 zkumavkami a víčky pro 10 000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tenkostěnných zkumavek pro 1000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostěnných zkumavek pro 10 000 reakcí	981008

Informace o aktuálních licenčních podmínkách a specifických licencích k produktům získáte v odpovídajícím manuálu ke QIAGEN produktu. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Koupe tohoto produktu opravňuje kupce k jeho užití v rámci humánní in vitro diagnostiky. Není poskytnut žádný obecný patent nebo licence jiná než toto specifické právo užití vycházející z koupe.

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

artus HSV-1/2 RG PCR Kit a EZ1 DSP Virus Kit jsou diagnostické soupravy označené značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkt není dostupný ve všech zemích.

Licenční ujednání

Použitím produktu vyjadřuje kupec nebo uživatel soupravy artus HSV-1/2 RG PCR Kit souhlas s následujícími podmínkami:

1. artus HSV-1/2 RG PCR Kit smí být používán výhradně v souladu s *Manuálem artus HSV-1/2 RG PCR Kit* a pouze s komponenty obsaženými v soupravě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent kitu s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v Manuálu HSV-1/2 RG PCR Kit a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tento kit a jeho komponenty jsou licencovány pro jedno použití a nesmí být znovu použity, obnoveny či znovu prodány.
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupec a uživatel kitu souhlasí s tím, že nepodnikne nebo nikomu neumožní podniknout kroky, které by mohly vést nebo usnadnit zakázané skutky uvedené výše. QIAGEN může zákazy tohoto Licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích soudních poplatků, inkl. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tento kit a/nebo jeho komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

© 2010-2014 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 0616

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)

