

# artus<sup>®</sup> HSV-1/2 TM PCR Kit

## Manuál



24 (Katalogové čís. 4500163)



96 (Katalogové čís. 4500165)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení Pro

použití s

ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 a 7900HT Sequence Detection Systems

Verze 1



4500163, 4500165



1046890CS

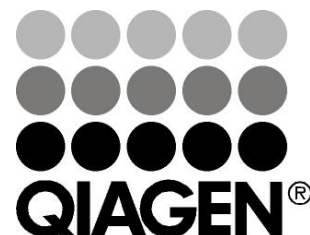


QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2

**MAT**

1046890CS



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

### **QIAGEN určuje standardy:**

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Obsah

<b>1. Obsah.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Skladování.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Další potřebné vybavení .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Všeobecná preventivní opatření.....</b>	<b>7</b>
<b>5. Informace o původcích.....</b>	<b>7</b>
<b>6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase.....</b>	<b>7</b>
<b>7. Popis produktu .....</b>	<b>8</b>
<b>8. Protokol.....</b>	<b>8</b>
8.1 Izolace DNA.....	8
8.2 Interní kontrola .....	11
8.3 Kvantifikace.....	12
8.4 Příprava PCR .....	13
8.5 Programování <i>ABI PRISM SDS</i> .....	18
<b>9. Vyhodnocení .....</b>	<b>32</b>
<b>10. Řešení problémů.....</b>	<b>38</b>
<b>11. Specifikace.....</b>	<b>40</b>
11.1 Analytická senzitivita .....	40
11.2 Specificita.....	42
11.3 Přesnost .....	43
11.4 Robustnost.....	46
11.5 Reprodukovatelnost.....	46
11.6 Diagnostické hodnocení .....	46

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu .....	46
13. Varování a bezpečnostní opatření .....	47
14. Kontrola kvality.....	47
15. Literatura .....	47
16. Vysvětlení symbolů.....	48

## artus<sup>®</sup> HSV-1/2 TM PCR Kit

Pro použití s ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 a 7900HT Sequence Detection Systems.

**Upozornění:** artus HSV-1/2 TM PCR Kit nelze použít ve spojení s GeneAmp<sup>®</sup> 5700 SDS, ABI PRISM 7700, ani s 384 formátem destiček systému ABI PRISM 7900HT SDS.

### 1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4500163 24 reakcí	Kat. čís. 4500165 96 reakcí
<b>Modrá</b>	HSV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Žlutá</b>	HSV TM Mg-Sol <sup>†</sup>	1 x 1 200 $\mu$ l	1 x 1 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 1 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/ $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 2 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 3 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV1 LC/RG/TM QS 4 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 1 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 2 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 3 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Červená</b>	HSV2 LC/RG/TM QS 4 <sup>‡</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop / $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l	1 x 200 $\mu$ l
<b>Zelená</b>	HSV TM IC <sup>†</sup>	1 x 1 000 $\mu$ l	2 x 1 000 $\mu$ l
<b>Bílá</b>	Water (PCR grade)	1 x 1 000 $\mu$ l	1 x 1 000 $\mu$ l

<sup>‡</sup> QS = Kvantifikační standard  
<sup>†</sup> IC = Interní kontrola  
Mg-Sol = Roztok hořčíku

## 2. Skladování

Komponenty *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* se skladují při  $-30^{\circ}\text{C}$  až  $-15^{\circ}\text{C}$  a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení ( $> 2 \times$ ), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagentie alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě  $+4^{\circ}\text{C}$ , skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

## 3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- DNA-izolační souprava (viz **8.1 Izolace DNA**)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- Centrifuga s rotorem pro mikrotitrační destičky (volitelné)
- 96-ti jamková reakční destička/zkumavky pro optická měření s odpovídajícími optickými uzavíracími prostředky (viz **8.4 Příprava PCR**)
- 96-ti jamkové dvojdílné předržné rámy k použití optických zkumavek (*96-Well Tray/Retainer Set*, kat. č. 403 081, Applied Biosystems), viz **8.4 Příprava PCR**
- Kompresní podložka pro použití s optickými lepicími foliemi (*Optical Cover Compression Pads*, kat. č. 4 312 639, Applied Biosystems), viz **8.4 Příprava PCR**
- Aplikátor k uzavření reakčních destiček při použití optických lepicích folií (*Adhesive Seal Applicator Kit*, kat. č. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000* nebo *7900HT SDS*

**Upozornění:** Při uvedení přístrojů do provozu je bezpodmínečně nutná jsoucí platná kalibrace barviv (*Pure Spectra Component File*) a pozadí (*Background Component File*).

## 4. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagentie.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte plynule na ledu nebo v chladičím bloku.

## 5. Informace o původcích

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, případně jako recidiva. Mezi primární infekce způsobené zvláště HSV-1 patří gingivostomatitida, ekzema herpeticum, keratokonjunktivitida a encefalitida. HSV-2 se vyskytuje v rámci primární infekce především jako vulvovaginitida, meningitida a jako generalizovaný herpes novorozenců. Při recidivě infekce HSV dochází především k tvorbě puchýřků v nazolabiální a genitální oblasti. Recidivy keratokonjunktivitidy a meningitidy se klasifikují jako více nebezpečné.

## 6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

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 (Mackay, 2004).

## 7. Popis produktu

*artus HSV-1/2 TM PCR Kit* je systém k přímému použití pro průkaz a rozlišení DNA herpes simplex viru 1 a 2 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v *ABI PRISM 7000* a *7900HT Sequence Detection System*. *HSV TM Master* obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 148 bp dlouhého úseku genomu herpes simplex viru. Detekce amplifikátu se provádí měřením fluorescence FAM (HSV-1) a fluorescence NED (HSV-2) v *ABI PRISM SDS*.

Kromě toho obsahuje *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako *Interní kontrola (IC)* měřením fluorescence VIC. Limit detekce analytické HSV PCR (viz 11.1 **Analytická senzitivita**) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*), s jejichž pomocí lze určit množství původce ve vzorku. Prostudujte si prosím oddíl

### 8.3 Kvantifikace.

## 8. Protokol

### 8.1 Izolace DNA

DNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. V závislosti na protokolu zvoleného výrobce použijte dané množství vzorku a proveďte izolaci DNA podle návodu. Doporučujeme následující izolační soupravy:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
sérum, plazma, likvor, výtěry	QIAamp <sup>®</sup> UltraSens <sup>®</sup> Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	obsažen
	QIAamp DNA Mini	51 304	QIAGEN	neobsažen
likvor	EZ1 <sup>®</sup> DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	obsažen

\*Pro použití v kombinaci s BioRobot<sup>®</sup> EZ1 DSP Workstation (Kat. čís. 9001360) a EZ1 DSP Virus Card (Kat. čís. 9017707).



## Důležité pokyny pro použití souprav QIAamp UltraSens Virus Kit a

### QIAamp DNA Mini Kit:

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Pokud použitá izolační souprava neobsahuje žádný nosič RNA, povšimněte si prosím, že je při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin resp. materiálů s malým obsahem DNA/RNA (např. likvor) důrazně doporučeno přidat nosič RNA (RNA homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. čís. 27-4110-01). Prosím postupujte následujícím způsobem:
  - Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační soupravy (např. AE pufr soupravy QIAamp DNA Mini Kit) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zabraňte opakovanému rozmrazení (> 2 x) alikvotu nosiče RNA.
  - Používejte 1  $\mu\text{g}$  nosiče RNA na 100  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru. Je-li extrakčním protokolem stanoveno 200  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru na jeden vzorek, vložte 2  $\mu\text{l}$  nosiče RNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.2 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr	např. 200 $\mu\text{l}$	např. 2 400 $\mu\text{l}$
Nosič RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$
<b>Celkový objem</b>	<b>202 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>2 424 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>Objem pro izolaci</b>	<b>200 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>po 200 <math>\mu\text{l}</math></b>

- Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosiče RNA dodávaného s QIAamp UltraSens Virus Kit, doporučujeme následující postup lišící se od údajů uvedených v příručce izolační soupravy:
  - a. Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA před prvním použitím izolační soupravy v 310  $\mu\text{l}$  elučního pufru obsaženého v soupravě (konečná koncentrace 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , nepoužívejte lyzační pufr). Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zabraňte opakovanému rozmrazení ( $> 2 \times$ ) alikvotu nosiče RNA.
  - b. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.2 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr AC	800 $\mu\text{l}$	9 600 $\mu\text{l}$
Nosič RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	5,6 $\mu\text{l}$	67,2 $\mu\text{l}$
<b>Celkový objem</b>	<b>805,6 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>9 667,2 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>Objem pro izolaci</b>	<b>800 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>po 800 <math>\mu\text{l}</math></b>

- c. Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.
- Použitím **QIAamp UltraSens Virus Kit** lze docílit zkoncentrování vzorku. Pokud se v případě vašeho vzorku nejedná o sérum nebo plazmu, přidejte k vzorku alespoň 50 % (v/v) negativní lidské plazmy.
  - Při izolaci využívající promývací pufr s obsahem **etanolu** bezpodmínečně zajistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
  - *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* není vhodný pro izolace na základě **fenolu**.

#### Důležité upozornění k použití soupravy EZ1 DSP Virus Kit:

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Přidejte tedy prosím ke každé izolaci potřebné množství nosiče RNA a držte se pokynů v *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

**Důležité:** *Interní kontrolu* soupravy *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* lze vložit přímo do izolace (viz **8.2 Interní kontrola**).

## 8.2 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *Interní kontrola (HSV TM IC)*. Máte tak možnost kontrolovat **jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Při použití **EZ1 DSP Virus Kit** musí být *Interní kontrola* vložena podle instrukcí v *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Používáte-li **QIAamp UltraSens Virus Kit** nebo **QIAamp DNA Mini Kit**, přidejte *Interní kontrolu* k izolaci v poměru 0,1  $\mu$ l na 1  $\mu$ l elučního objemu. Jestliže například používáte **QIAamp DNA Mini Kit** a eluujete DNA v 50  $\mu$ l AE pufru, vložte 5  $\mu$ l *Interní kontroly*. Množství vkládané *Interní kontroly* závisí **pouze** na elučním objemu. *Interní kontrola* a nosič RNA (viz **8.1 Izolace DNA**) by měly být přidávány pouze k

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

*Interní kontrola* nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs *Interní kontroly*, lyzačního pufru a nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *Interní kontroly* a ke snížení efektivity izolace). *Interní kontrolu* a nosič RNA **nepipetujte** přímo do vzorku.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 2  $\mu$ l *Interní kontroly* a 10  $\mu$ l *HSV TM Mg-Sol* na jednu testovací směs přímo do 20  $\mu$ l *HSV TM Master*. Pro každou PCR reakci použijte 30  $\mu$ l takto vytvořeného Master Mixu\* a přidejte následně 20  $\mu$ l izolátu. Jestliže připravujete jeden běh pro více vzorků, zvyšte potřebná množství *HSV TM Master*, *HSV TM Mg-Sol* a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **8.4 Příprava PCR**).

## 8.3 Kvantifikace

S Kvantifikačnými standardy (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Standardní křivku v *ABI PRISM Sequence Detection System* vytvoříte tak, že vložíte pro HSV-1 i pro HSV-2 všechny čtyři Kvantifikační standardy dodávané s produktem a definujete je jako standardy při zadání odpovídajících koncentrací (viz **8.5 Programování ABI PRISM SDS**). Import standardních křivek z předchozích běhů není se softwarem *ABI PRISM 7000* a *7900HT SDS* možný.

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

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

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

**Důležité:** Na [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) je k dispozici příručka pro zjednodušení kvantitativního vyhodnocení systémů *artus* na *ABI PRISM 7000 SDS* (**Technical Note for quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS**).

---

\* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

## 8.4 Příprava PCR

Připravte pro plánované reakce potřebný počet zkumavek resp. 96-ti jamkovou reakční destičku. Doporučené prostředky jsou uvedeny v následující tabulce:

Položka	Označení	Katalogové číslo	Výrobce	Přidržené rámy*	Kompresní podložka
96-ti jamková optická reakční destička	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	ne	-
Optické lepicí folie	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	ano
Optické zkumavky	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	ano	-
Optické zkumavky	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ano	-
Optická víčka (plochá)	ABI PRISM Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	-	ne

Při přípravě PCR dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR proveden alespoň jeden Kvantifikační *standard* a jedna negativní kontrola (*Water, PCR grade*). Standardní křivku vytvoříte u každého běhu PCR pomocí všech s produktem dodávaných *Kvantifikačních standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)*. Všechny reagenty se musí před

---

\* Při použití dvojdílných přídržných rámu je nutné zkumavky při vkládání a při vyjímání otevřít. K zamezení tím zapříčiněných kontaminací používejte výhradně dolní díl přídržného rámu.

začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Chcete-li *Interní kontrolou* kontrolovat **jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR**, musí být napřed *Interní kontrola* přidána k izolaci (viz **8.2 Interní kontrola**). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

		Počet vzorků	
		1	12
1. Příprava Master Mixu	HSV TM Master	20 $\mu$ l	240 $\mu$ l
	HSV TM Mg Sol	10 $\mu$ l	120 $\mu$ l
	HSV TM IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
	<b>celkový objem</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>360 <math>\mu</math>l</b>
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	30 $\mu$ l	po 30 $\mu$ l
	vzorek	20 $\mu$ l	po 20 $\mu$ l
	<b>celkový objem</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>po 50 <math>\mu</math>l</b>

Jestliže chcete *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole PCR inhibice**, je třeba ji přidat přímo do *HSV TM Master*. V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

		Počet vzorků	
		1	12
1. Příprava Master Mixu	HSV TM Master	20 $\mu$ l	240 $\mu$ l
	HSV TM Mg Sol	10 $\mu$ l	120 $\mu$ l
	HSV TM IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
	<b>celkový objem</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	30 $\mu$ l*	po 30 $\mu$ l*
	vzorek	20 $\mu$ l	po 20 $\mu$ l
	<b>celkový objem</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>po 50 <math>\mu</math>l</b>

Pipetujte do každé zkumavky nebo do každé potřebné jamky 96-ti jamkové reakční destičky 30  $\mu$ l Master Mixu. Následně přidejte 20  $\mu$ l eluátu z izolace DNA. Dbejte na to, aby byly oba roztoky dobře promíchány opakovaným

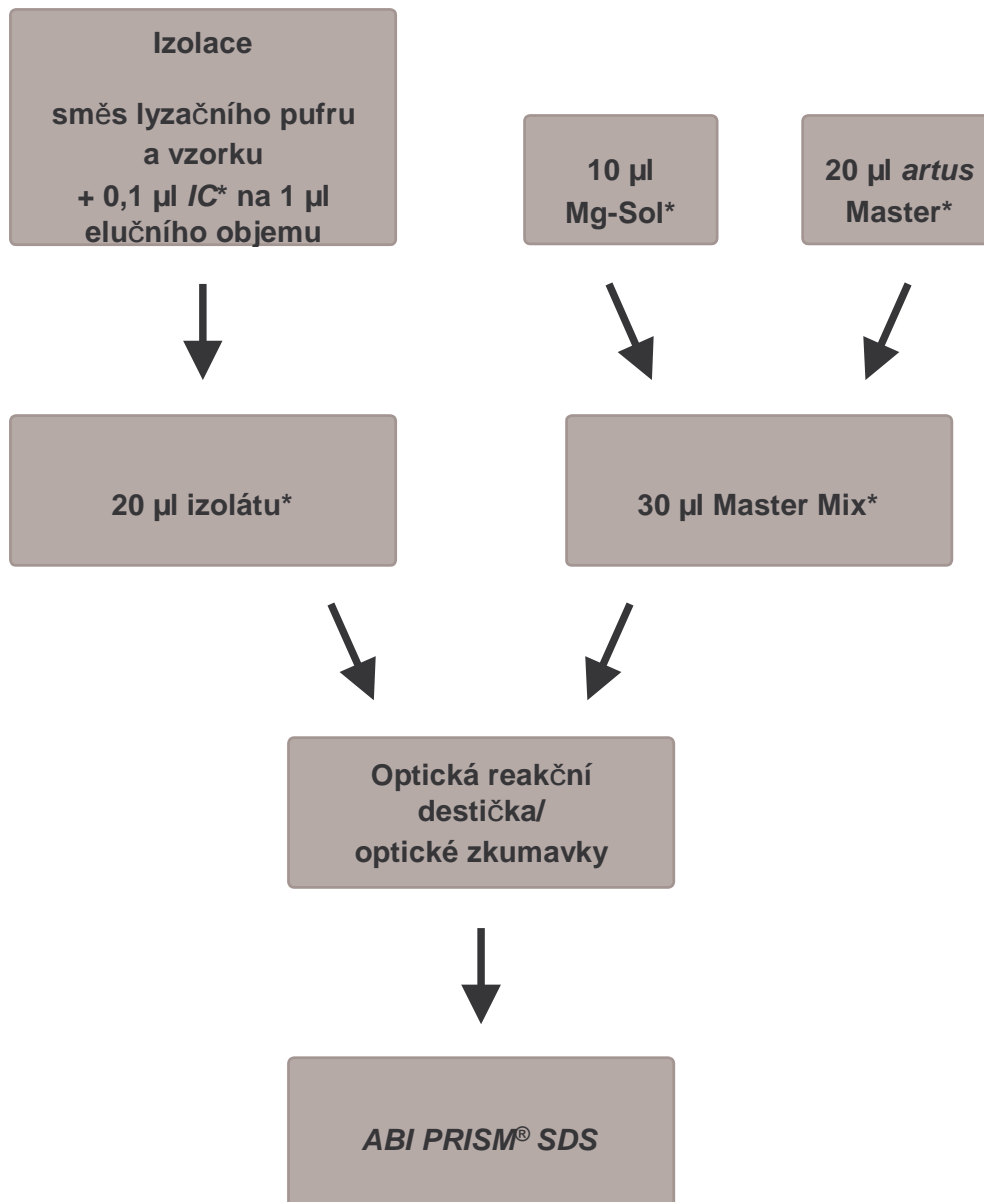
\* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opomínuto. Senzitivita detekčního systému není omezena.

náběrem pipetou a jejím vypuštěním. Uzavřete zkumavky příslušnými víčky. 96-ti jamkovou reakční destičku můžete alternativně uzavřít pomocí optických lepících folií (*Optical Adhesive Covers*). Pro shromáždění vkládaného objemu na dně zkumavek nebo destiček centrifugujte zkumavky (v držáku určeném pro zkumavky PCR) popř. 96-ti jamkovou reakční destičku v centrifuze vybavené rotorem pro mikrotitrační desky po dobu 30 sekund při 1 780 x g (4 000 ot/min). Pokud takovou centrifugu nemáte k dispozici, dbejte při přípravě reakcí PCR na to, aby byly Master Mix a objem vzorku pipetovány na dno zkumavek popř. reakčních jednotek (well). Reakční směsi skladujte při teplotě +4°C, dokud nebude přístroj *ABI PRISM SDS* naprogramován (viz **8.2 Programování *ABI PRISM SDS***) a pak je převed'te do přístroje.

**Upozornění:**

- Při použití optických zkumavek v kombinaci s optickými víčky vkládejte do přístroje (*ABI PRISM 7000* a *7900HT SDS*) vždy přídržný rám (*96- Well Tray/Retainer Set*). Při použití dvojdílného přídržného rámu je nutné zkumavky při vkládání a při vyjímání otevřít. K zamezení tím zapříčiněných kontaminací používejte výhradně dolní díl přídržného rámu.
- Použití 96-ti jamkových optických reakčních destiček v kombinaci s optickými lepícími foliemi vyžaduje vložení kompresní podložky (*Optical Cover Compression Pads*).

## Přidání Interní kontroly k izolaci



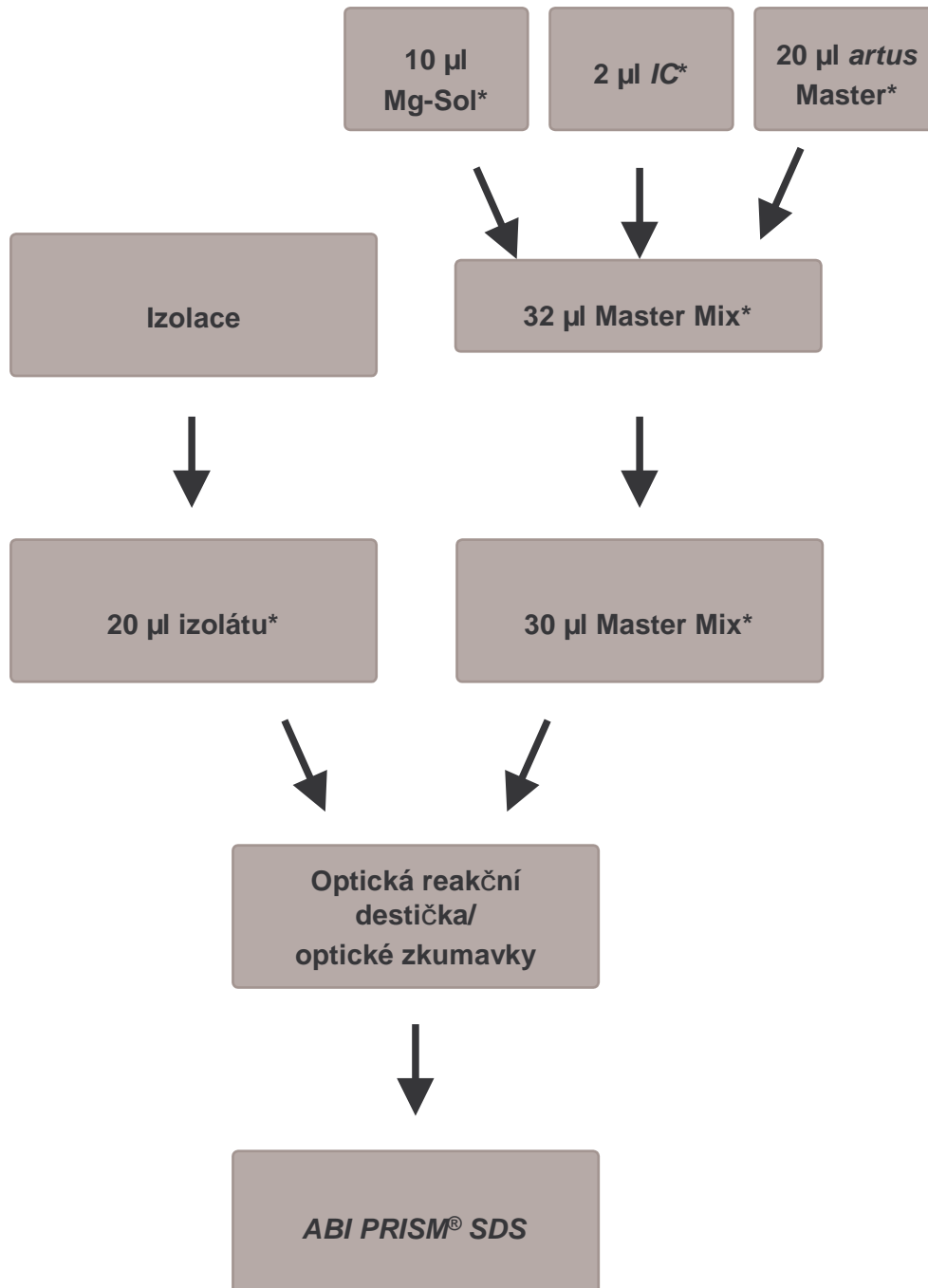
Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a inhibice PCR.

\*

Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.



## Přidání Interní kontroly k artus Master



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu inhibice PCR.

\* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

## 8.5 Programování **ABI PRISM SDS**

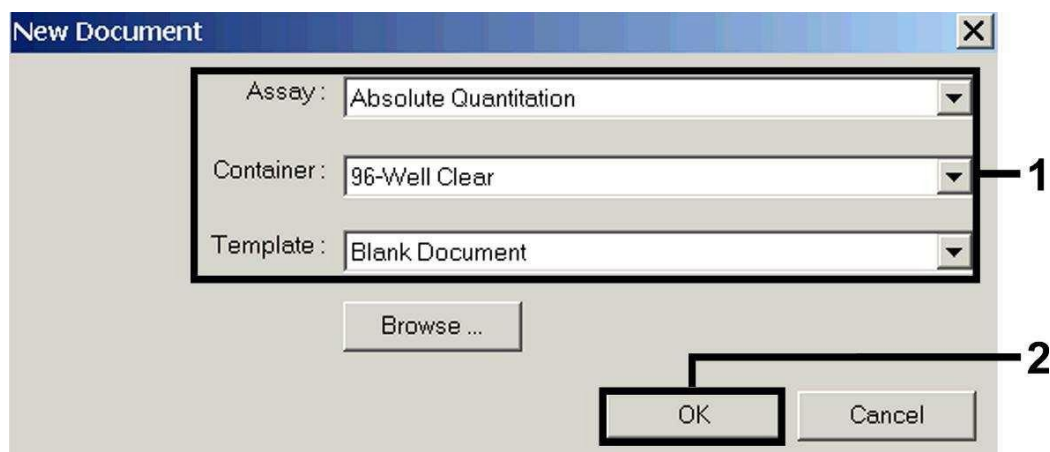
Software *ABI PRISM 7000* a *7900HT Sequence Detection Systems (SDS)* potřebuje před spuštěním běhu PCR dodatečné informace. Postupy při programování přístrojů se od sebe významně odlišují, proto jsou v následujícím textu uvedeny v samostatných kapitolách.

### 8.5.1 Programování **ABI PRISM 7000 SDS**

K detekci HSV DNA vytvořte na přístroji *ABI PRISM 7000 SDS* profil podle následujících šesti pracovních kroků (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Veškeré údaje se vztahují na *ABI PRISM 7000 SDS* software verzi 1.0.1. Podrobnosti o programování *ABI PRISM 7000 SDS* si prosím prostudujte v příručce *ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. Pro lepší přehled jsou potřebná nastavení na obrázcích zvýrazněna černými rámečky.

#### 8.5.1.1 Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR

Na přístroji *ABI PRISM 7000 SDS* vyberte pod *File* položku *New* a nastavte pro nový dokument následující základní nastavení (viz Obr. 3). Dříve uložená šablona (*SDS Template [\*.sdt]*) je k dispozici v seznamu *Template* nebo volbou funkce *Browse* (viz 8.5.1.5 **Uložení běhu PCR**). Svá zadání potvrďte (OK).



Obr. 3: Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR (*New Document*).

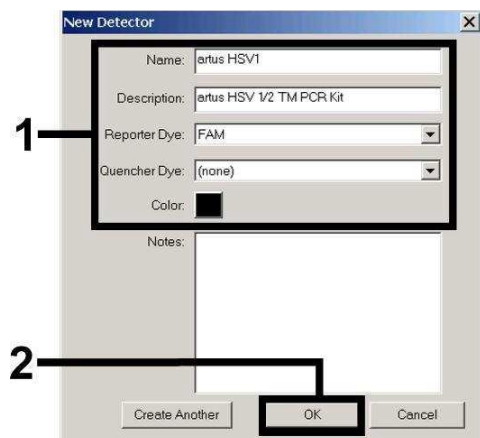


### 8.5.1.2 Vytvoření/volba detektorů

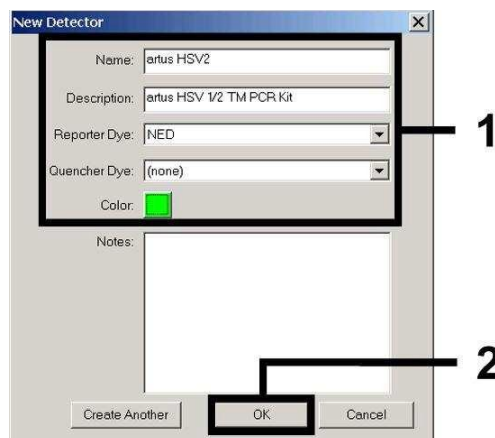
V nabídce *Tools*, v podnabídce *Detector Manager*, přiřaďte dokumentu odpovídající barviva detektoru. K průkazu HSV DNA a *Interní kontroly* pomocí *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* je nutné definovat reporter/quencher uvedené v následující tabulce:

Průkaz	Reporter	Quencher
HSV-1 DNA	FAM	none
HSV-2 DNA	NED	none
<i>Interní kontrola (HSV TMIC)</i>	VIC	none

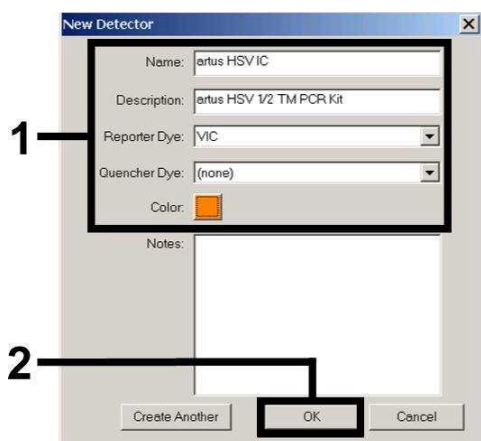
Tyto detektory vytvoříte tak, že vyberete v položce *Detector Manager* vlevo dole lokalizovanou volbu *File* a následně volbu *New*.



Obr. 4: Vytvoření HSV-1 specifického detektoru (*DetectorManager*).

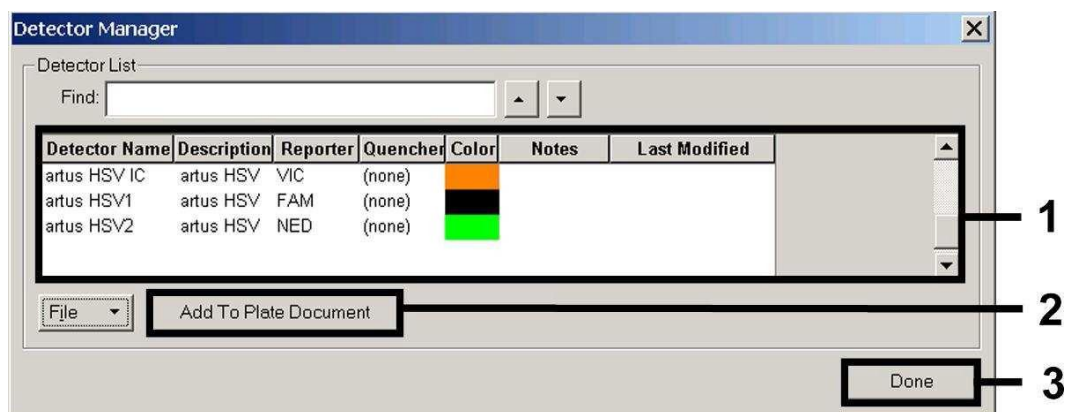


Obr. 5: Vytvoření HSV-2 specifického detektoru (*DetectorManager*).



Obr. 6: Vytvoření detektoru specifického pro Interní kontrolu (Detector Manager) pro HSV-1 a HSV-2.

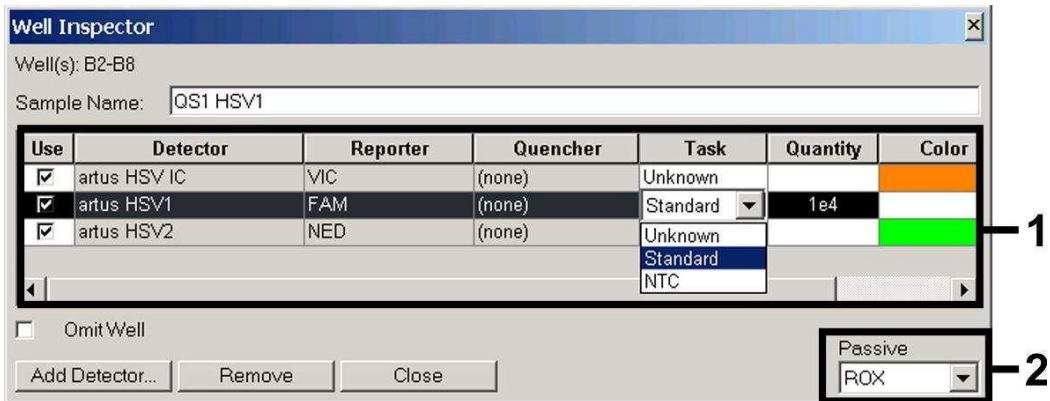
V okně, které se zobrazí, definujte (podle Obr. 4 - Obr. 6) kombinaci reporter/quencher **FAM/none** resp. **NED/none** pro průkaz HSV-1 DNA resp. HSV-2 DNA, pro průkaz *Interní kontroly* zvolte kombinaci **VIC/none**. Potvrzením údajů (OK) se vrátíte zpět do *Detector Manager*. Označte právě vytvořené detektory a každý výběr přeneste klepnutím na volbu *Add to Plate Document* do *Well Inspector* (viz Obr. 7). Zavřete okno (*Done*).



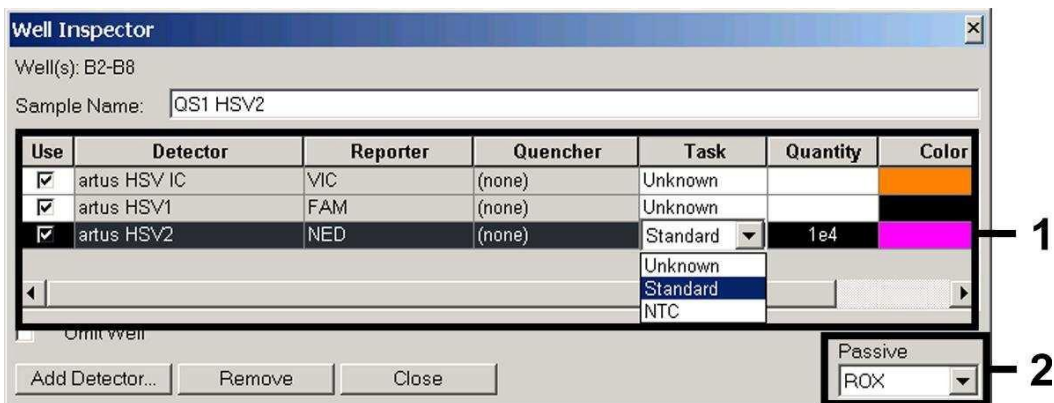
Obr. 7: Výběr detektorů (Detector Manager).

### 8.5.1.3 Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček

Pokud nyní v nabídce *View* otevřete položku *Well Inspector*, naleznete tam Vámi v kapitole 8.5.1.2 zvolené detektory znovu (viz Obr. 8 - Obr. 9).



Obr. 8: Přiřazení potřebných informací (HSV-1) k pozicím destiček (Well Inspector).



Obr. 9: Přiřazení potřebných informací (HSV-2) k pozicím destiček (Well Inspector).

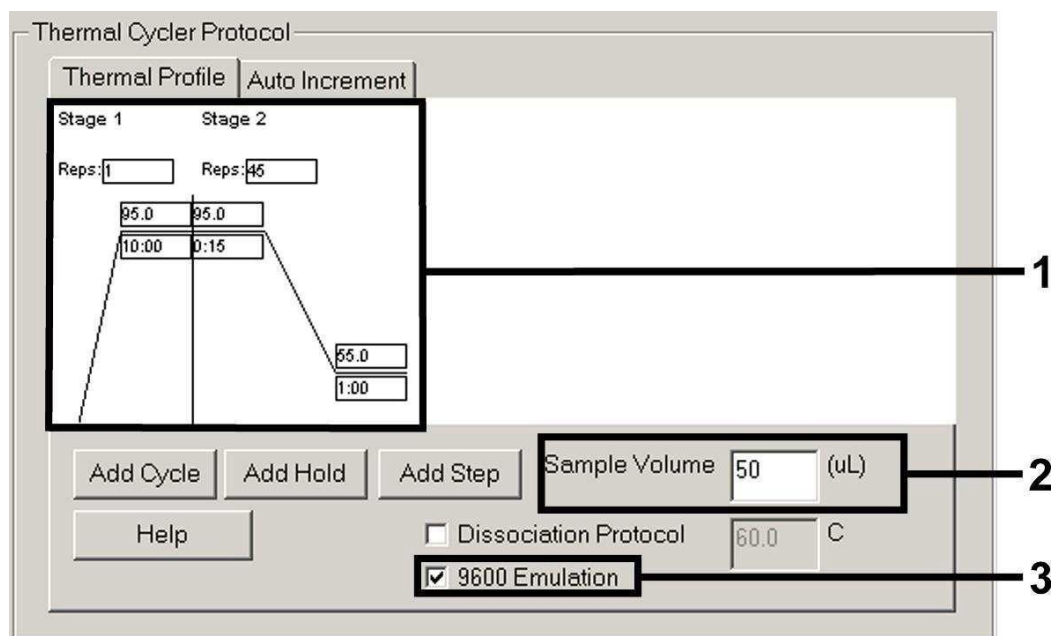
Označte pozice destičky, které jsou obsazené pro průkaz HSV DNA. Aktivujte volbu *Use* u obou detektorů, čímž vybrané detektory přiřadíte k označeným pozicím. Objeví se zatržítka. Pro pojmenování jednotlivých reakčních směsí vyberte odpovídající pozici na destičce a zadejte název do položky *Sample Name*. Přitom pamatujte na to, že směsi se stejným *Sample Name* a stejným přiřazením detektorů bude software považovat za replikáty a zprůměruje je s ohledem na jejich kvantifikované množství původce. Pak vyberte pro každý typ vzorku odpovídající funkci (*Task*) podle následující tabulky:

Typ vzorku	Funkce ( <i>Task</i> )	Koncentrace ( <i>Quantity</i> )	Reporter HSV-1	Reporter HSV-2	Quencher
vzorek	unknown	-	FAM	NED	none
negativní kontrola	NTC	-	FAM	NED	none
standard	standard	siehe 1. <b>Obsah</b>	FAM	NED	none

Standardní křivku vytvořte u každého běhu PCR pomocí všech spolu s produktem dodávaných KvantifikačŇch standardů (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*) a pro každý jednotlivý standard (*Quantity*) uveďte příslušné koncentrace (viz **1. Obsah**). Dbejte na to, že pro běh PCR s *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* musí být **ROX** nastaven jako pasivní reference (*Passive Reference*). Rovnoměrné rozložení barviva ROX na všechny směsi PCR jedné šarže pomocí promíchání *HSV TM Master* zaručuje rozpoznání a přepočítání *tube-to-tube* variací (fluorescenční rozdíly mezi různými směsmi PCR) pomocí *Sequence Detection Software* (normalizace).

### 8.5.1.4 Vytvoření teplotního profilu

K zadání teplotního profilu přepněte software z režimu *Setup* do režimu *Instrument*. Podle Obr. 10 zadejte platný teplotní profil pro detekci HSV DNA. Krok 50°C uložený v předvoleném nastavení odstraníte tak, že jej označíte levým tlačítkem myši, přičemž přidržíte stisknuté tlačítko *Shift*, a následně jej vymažete tlačítkem *Backspace*. Zkontrolujte, zda je objem reakce nastaven na 50  $\mu$ L. Volba *9600 Emulation* by měla být aktivována. Předvolená nastavení *Auto Incrementu* zůstávají nezměněná (*Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).



Obr. 10: Vytvoření teplotního profilu.

### 8.5.1.5 Uložení běhu PCR

Na tomto místě můžete uvedená nastavení (*Setup*) uložit jako masku, abyste je později mohli použít ve změněném nebo nezměněném stavu. Uložíte-li nastavení jako *SDS Template (\*.sdt)* v adresáři *Template Directory* (místní disk [C:]\Program Files\ABI PRISM 7000\Templates, zavedeného Applied Biosystems), můžete tento soubor zvolit přímo z *Template drop-down* seznamu v okně *New Document*. Předlohy uložené v jiných adresářích musí být otevřeny pomocí funkce *Browse*. Před spuštěním běhu PCR dbejte prosím na to, abyste jej znovu uložili jako *SDS Document (\*.sds)*. Tím zajistíte ukládání dat nahromaděných v průběhu PCR.

### 8.5.1.6 Spuštění běhu PCR

Běh PCR spustíte volbou *Start* v položce nabídky *Instrument* nebo polem *Start* v režimu *Instrument*.

## 8.5.2 Programování ABI PRISM 7900HT SDS

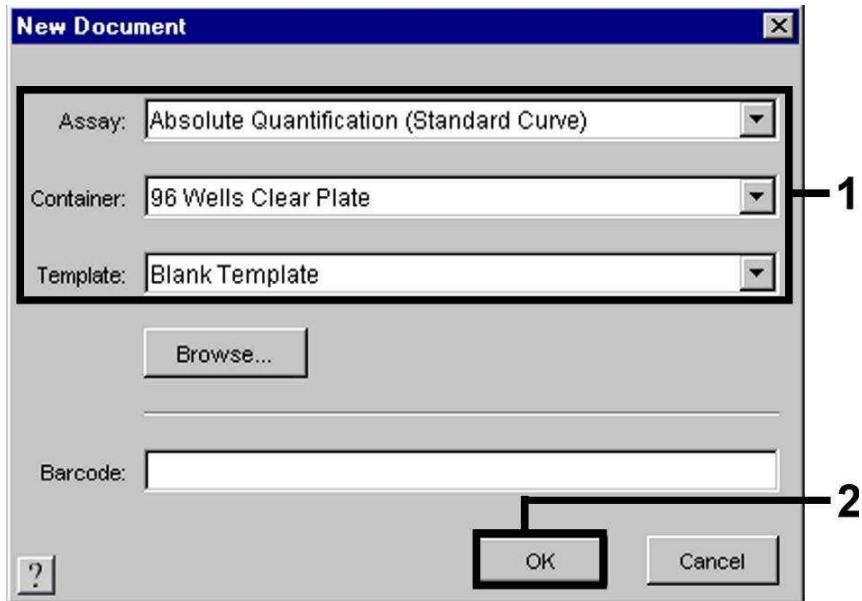
K detekci HSV DNA vytvořte na přístroji *ABI PRISM 7900HT SDS* profil podle následujících šesti pracovních kroků (8.5.2.1 - 8.5.2.6). Veškeré údaje se vztahují na *ABI PRISM 7900HT SDS* software verzi 2.1. Podrobnosti o programování *ABI PRISM 7900HT SDS* si prosím prostudujte v příručce *ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*. Pro lepší přehled jsou potřebná nastavení na obrázcích zvýrazněna černými rámečky.

### 8.5.2.1 Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR

Na přístroji *ABI PRISM 7900HT SDS* vyberte pod *File* položku *New* a nastavte pro nový dokument následující základní nastavení (viz Obr. 11). Dříve uložená šablona (*ABI PRISM<sup>®</sup> SDS Template Document (\*.sdt)*) je k dispozici v seznamu *Template* nebo volbou funkce *Browse* (viz 8.5.2.5 Uložení běhu PCR). Svá zadání potvrďte (OK).

**Upozornění:** *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* nelze použít ve spojení s 384 formátem destiček *ABI PRISM 7900HT SDS*.





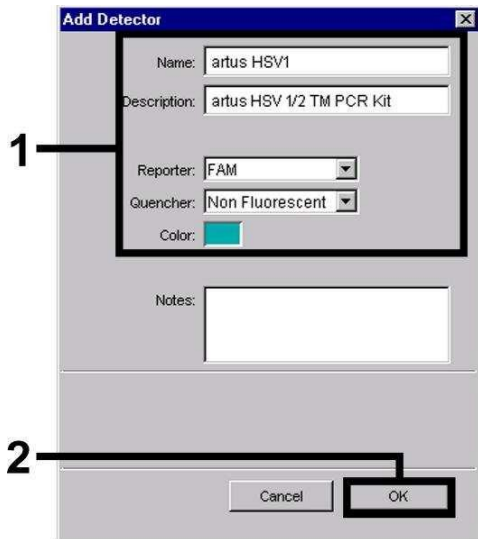
Obr. 11: Předvolená nastavení při vytváření nového běhu PCR (*New Document*).

### 8.5.2.2 Vytvoření/volba detektorů

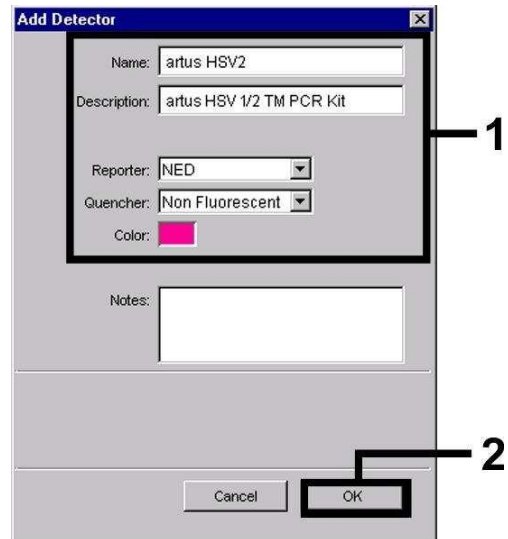
V nabídce *Tools*, v podnabídce *Detector Manager*, (alternativně zvolte režim *Setup/funkci Add Detector*) přiřaďte dokumentu odpovídající barviva detektorů. K průkazu HSV DNA a *Interní kontroly* pomocí *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* je nutné definovat reporter/quencher uvedené v následující tabulce:

Průkaz	Reporter	Quencher
HSV-1 DNA	FAM	Non Fluorescent
HSV-2 DNA	NED	Non Fluorescent
<i>Interní kontrola (HSV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

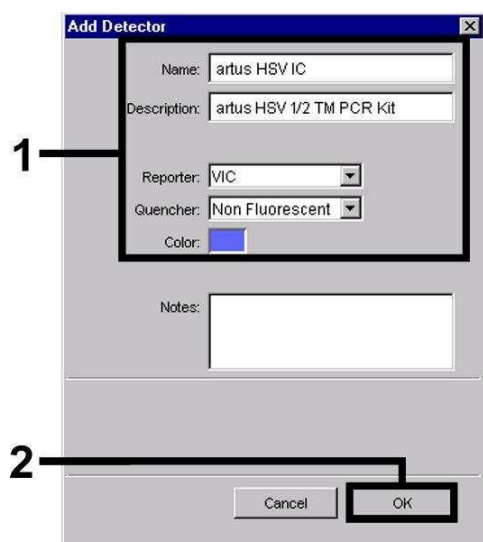
Tyto detektory vytvoříte tak, že vyberete v položce *Detector Manager* vlevo dole lokalizovanou volbu *New*.



Obr. 12: Vytvoření HSV-1 specifického detektoru (*DetectorManager*).

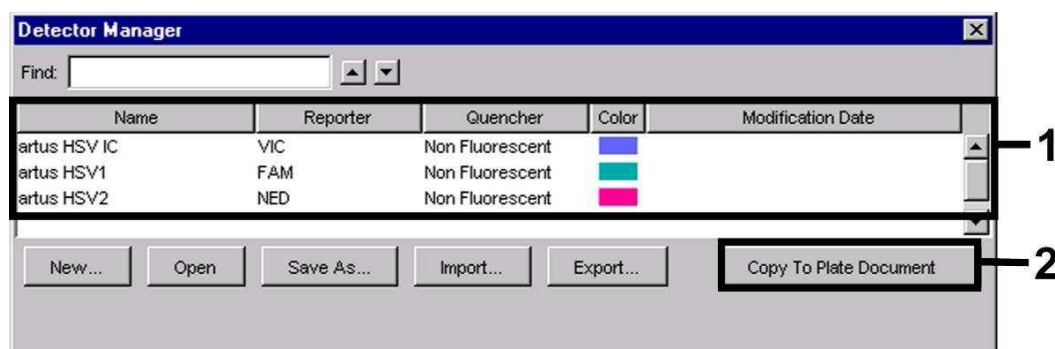


Obr. 13: Vytvoření HSV-2 specifického detektoru (*DetectorManager*).



Obr. 14: Vytvoření detektoru specifického pro Interní kontrolu (Detector Manager) pro HSV-1 a HSV-2.

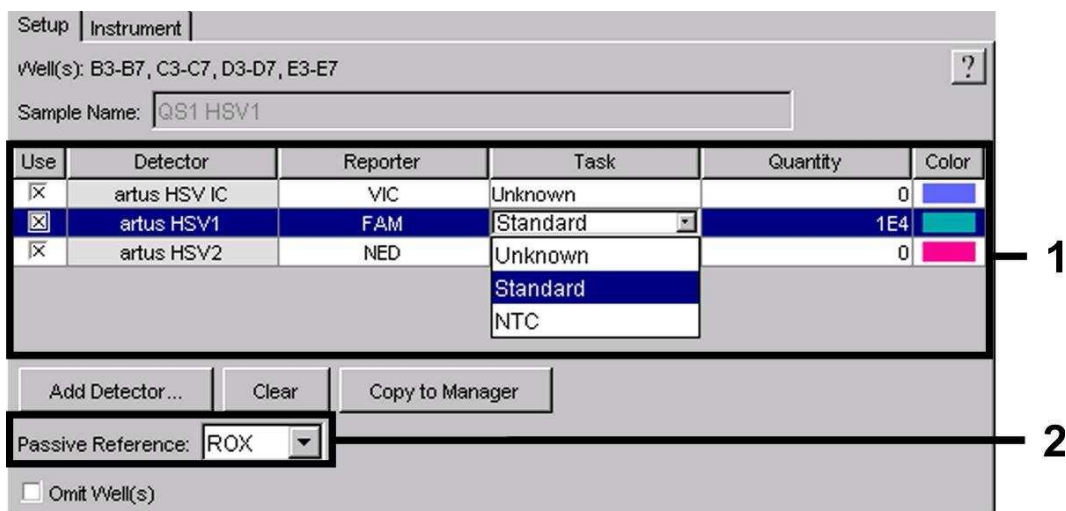
V okně, které se zobrazí, definujte (podle Obr. 12 - Obr. 14) kombinaci reporter/quencher **FAM/Non Fluorescent** resp. **NED/Non Fluorescent** pro průkaz HSV-1 DNA resp. HSV-2 DNA, pro průkaz *Interní kontroly* vyberte kombinaci **VIC/Non Fluorescent**. Potvrzením údajů (OK) se vrátíte zpět do *Detector Manager*. Označte právě vytvořené detektory a každý výběr přeneste klepnutím na volbu *Copy to Plate Document* do režimu *Setup* (viz Obr. 15). Zavřete okno (*Done*).



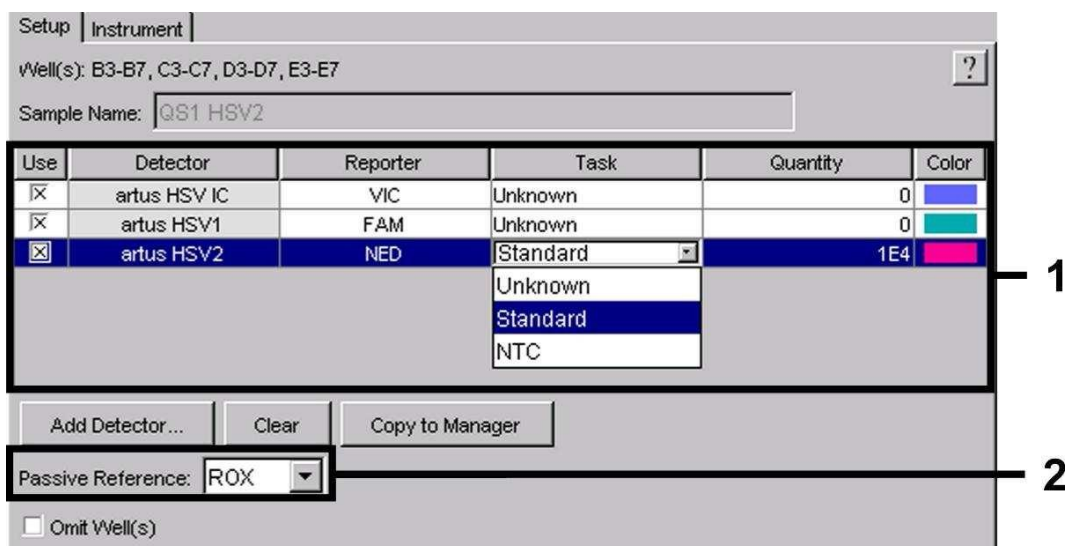
Obr. 15: Výběr detektorů (Detector Manager).

### 8.5.2.3 Přiřazení potřebných informací k pozicím destiček

Vámi v kapitole 8.5.2.2 zvolené detektory naleznete znovu po uzavření *Detector Manager (Done)* seřazené v tabulce v režimu *Setup (Well Inspector)* (viz Obr. 16 - Obr. 17).



Obr. 16: Přiřazení potřebných informací (HSV-1) k pozicím destiček.



Obr. 17: Přiřazení potřebných informací (HSV-2) k pozicím destiček.

Označte pozice destičky, které jsou obsazené pro průkaz HSV DNA. Aktivujte volbu *Use* u obou detektorů, čímž vybrané detektory přiřadíte k označeným pozicím. Objeví se křížek. Pro pojmenování jednotlivých reakčních směsí zvolte odpovídající pozici na destičce a zadejte název do položky *Sample*

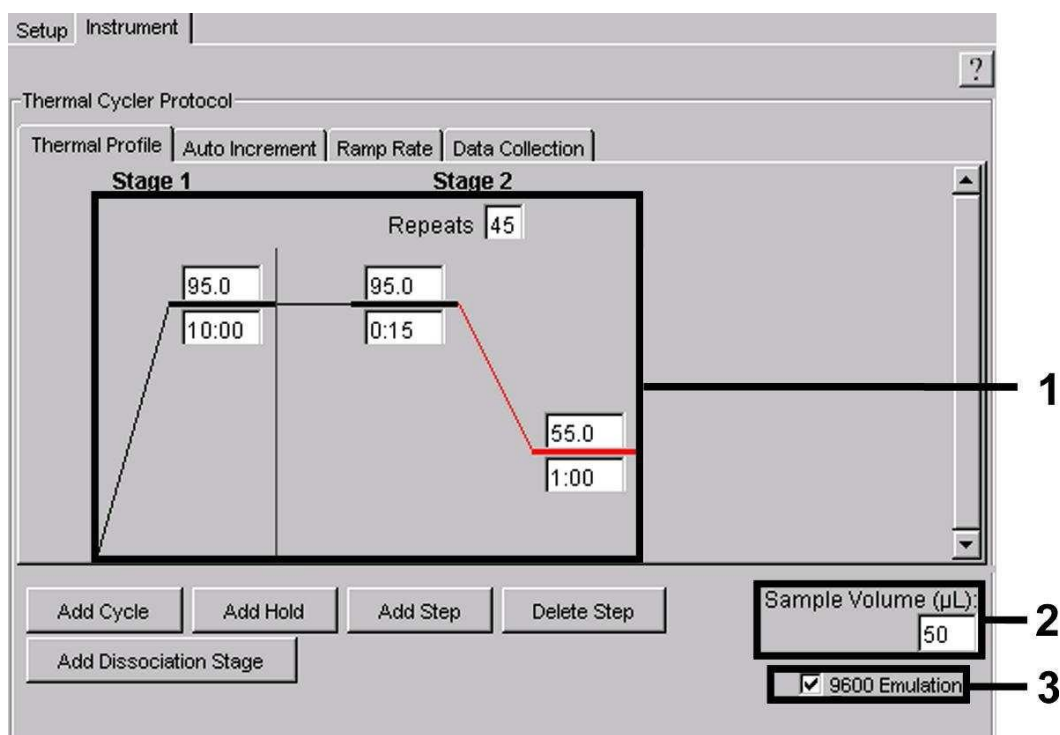
Name. Přitom pamatujte na to, že směsi se stejným *Sample Name* a stejným přiřazením detektorů bude software považovat za replikáty a zprůměruje je s ohledem na jejich kvantifikované množství původce. Pak vyberte pro každý typ vzorku odpovídající funkci (*Task*) podle následující tabulky:

Typ vzorku	Funkce ( <i>Task</i> )	Koncentrace ( <i>Quantity</i> )	Reporter HSV-1	Reporter HSV-2	Quencher
vzorek	Unknown	-	FAM	NED	Non Fluorescent
negativní kontrola	NTC	-	FAM	NED	Non Fluorescent
standard	Standard	viz 1. <b>Obsah</b>	FAM	NED	Non Fluorescent

Standardní křivku vytvořte u každého běhu PCR pomocí všech s produktem dodávaných *Kvantifikačních standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)* a pro každý jednotlivý standard (*Quantity*) uveďte příslušné koncentrace (viz 1. **Obsah**). Dbejte na to, že pro běh PCR s *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* musí být **ROX** nastaven jako pasivní reference (*Passive Reference*). Rovnoměrné rozložení barviva ROX na všechny směsi PCR jedné šarže pomocí promíchání *HSV TM Master* zaručuje rozpoznání a přepočítání *tube-to-tube* variací (fluorescenční rozdíly mezi různými směsmi PCR) pomocí *Sequence Detection Software* (normalizace).

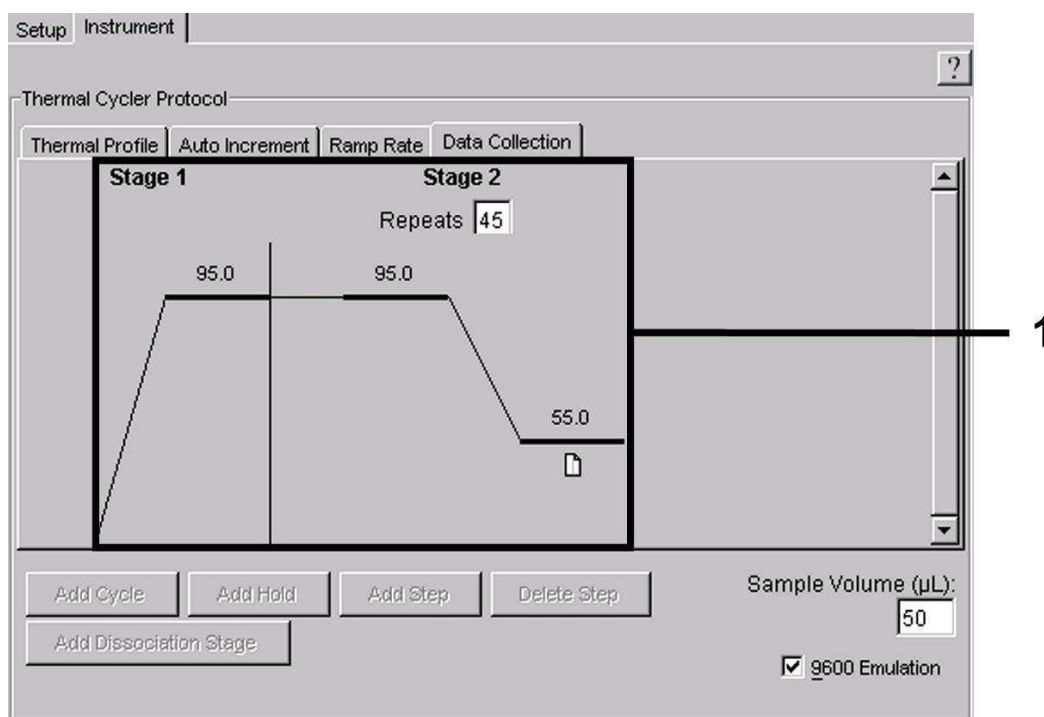
#### 8.5.2.4 Vytvoření teplotního profilu

K zadání teplotního profilu přepněte software z režimu *Setup* do režimu *Instrument*. Podle Obr. 18 zadejte pro detekci HSV DNA platný teplotní profil. Zkontrolujte, zda je objem reakce nastaven na 50 µl. Volba *9600 Emulation* by měla být aktivována, předvolená nastavení času *Ramp* a *Auto Increment* zůstávají nezměněna (*Ramp Time: 0:00, Auto Increment: 0.0°C, 0.0Seconds*).



Obr. 18: Vytvoření teplotního profilu.

Kromě toho se v režimu *Instrument* nachází volba *Data Collection*. Zvolením této volby se dostanete do okna zobrazeného na Obr. 19. Každá *Ramp* a *Plateau* teplota je opatřena jedním symbolem sběru dat (*Data Collection Icon*), který znázorňuje přijetí dat v tomto určitém okamžiku běhu. Odstraňte všechny symboly až na ten ve chvíli kroku *Annealing-Extension* (*Stage2/Step2*), čímž ušetříte zbytečná fluorescenční měření. Tak udržíte celkovou dobu běhu a množství dat co nejnižší.



Obr. 19: Sběr dat (*Data Collection*).

### 8.5.2.5 Uložení běhu PCR

Na tomto místě můžete uvedená nastavení (*Setup*) uložit jako masku, abyste je mohli později použít ve změněném nebo nezměněném stavu. Uložíte-li nastavení jako *ABI PRISM SDS Template Document (\*.sdt)* v adresáři *Template Directory* ([D:]\Program Files\Applied Biosystems\ SDS 2.1\ Templates, zavedeném Applied Biosystems), můžete tento soubor zvolit přímo z *Template* seznamu v okně *New Document*. Předlohy uložené v jiných adresářích musí být otevřeny pomocí funkce *Browse*. Před spuštěním aktuálního běhu PCR dbejte prosím na to, abyste jej znovu uložili jako *ABI PRISM SDS Document (\*.sds)*. Tím zajistíte ukládání dat nahromaděných v průběhu PCR.

### 8.5.2.6 Spuštění běhu PCR

Běh PCR spusťte volbou *Start* v položce nabídky *Instrument*.

## 9. Vyhodnocení

Při uvedení přístroje do provozu je bezpodmínečně nutná jsoucí platná kalibrace barviv (*Pure Spectra Component File*) a pozadí (*Background Component File*). Tyto kalibrační soubory slouží následujícím způsobem pro přesný výpočet výsledků:

Veškeré přístrojem podmíněné rušivé signály, které ovlivňují měření, jsou eliminovány programem *Sequence Detection Software* přístrojů *ABI PRISM Sequence Detection Systems* za pomoci *Background Component File*.

Navíc se u vícebarevných analýz vyskytují mezi emisními spektry jednotlivých fluorescenčních barviv interference. Software *ABI PRISM SDS* kompenzuje tyto interference přepočítáním pomocí spektrálních dat jednotlivých barviv uložených v *Pure Spectra Component File*. Přiřazení fluorescenčních dat shromážděných v průběhu PCR v celém měřitelném spektru k naprogramovaným detektorům provádí software také pomocí souboru *Pure Spectra Component*. Následně se zjištěná fluorescenční data jednotlivých barviv rozdělí pro přepočítání *tube-to-tube* variací (fluorescenční rozdíly mezi různými reakčními směsmi PCR) pomocí signálu pasivní reference (ROX). Tímto způsobem normalizované signály lze vyhodnotit pomocí *Amplification Plot*.

Kalibrační soubory použité při vyhodnocení běhu PCR jsou automaticky zajištěny při ukládání dat. Pokud nejsou instalovány žádné **kalibrační soubory**, vytvořte tyto soubory podle pokynů v *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Pokud do běhu PCR integrujete více než jeden systém *artus*™ PCR (**dbejte na teplotní profil**), analyzujte prosím tyto testovací systémy odděleně. Vzorky s totožným označením (*Sample Name*) a přiřazením detektoru identifikuje *ABI PRISM 7000* a *7900HT SDS Software* automaticky jako replikáty a zprůměruje je s ohledem na kvantifikované množství původce.



Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Je detekován fluorescenční signál FAM pro HSV-1 resp. fluorescenční signál NED pro HSV-2.

**Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje HSV DNA.**

V tomto případě je detekce fluorescenčního signálu VIC (*Interní kontrola*) podružná, protože vysoké výchozí koncentrace HSV DNA (pozitivní fluorescenční signál FAM pro HSV-1 a fluorescenční signál NED pro HSV-2) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* (kompetice).

2. Není detekován ani fluorescenční signál FAM pro HSV-1 ani fluorescenční signál NED pro HSV-2, nýbrž pouze fluorescenční signál VIC (signál *Interní kontroly*).

**Ve vzorku není prokazatelná žádná HSV DNA. Lze jej proto považovat za negativní.**

Při negativní HSV PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

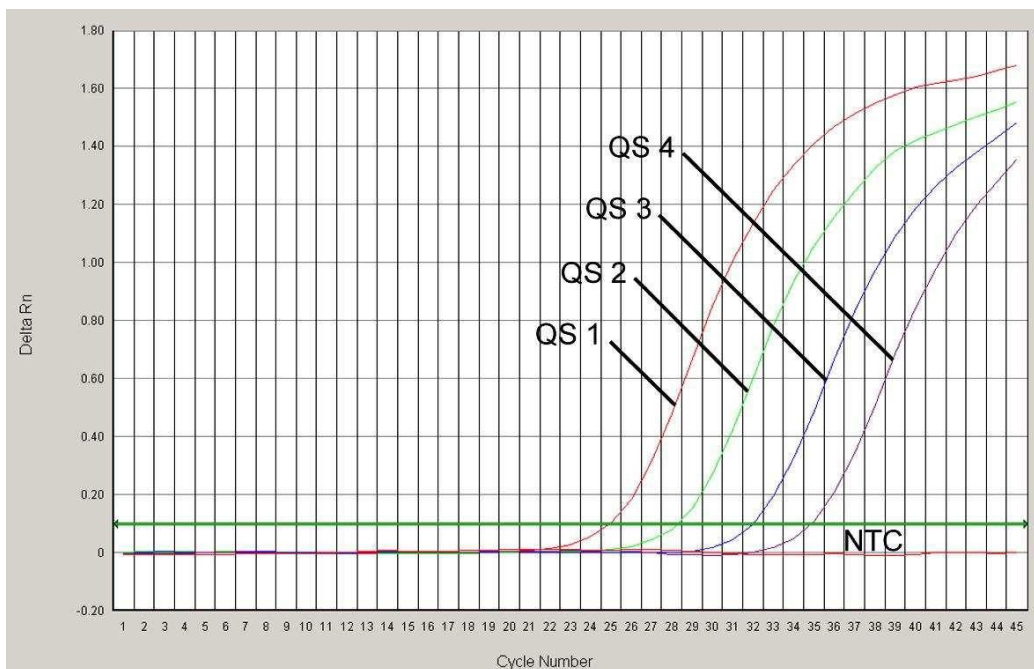
3. Není detekován žádný fluorescenční signál FAM pro HSV-1, fluorescenční signál NED pro HSV-2 nebo fluorescenční signál VIC.

**Není možné učinit diagnostický závěr.**

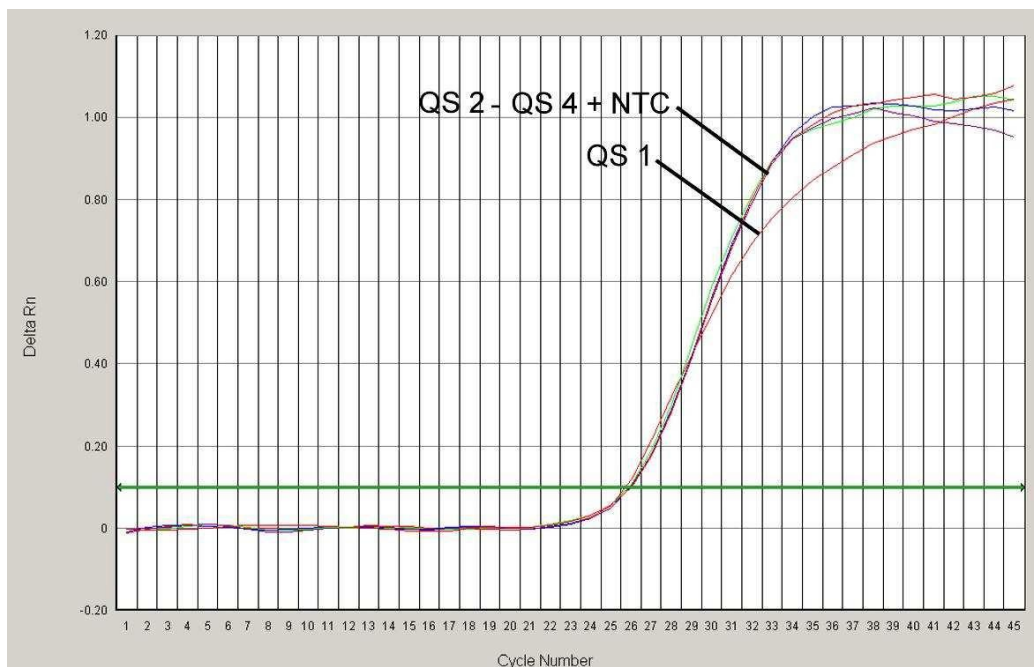
Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole

**10. Řešení problémů.**

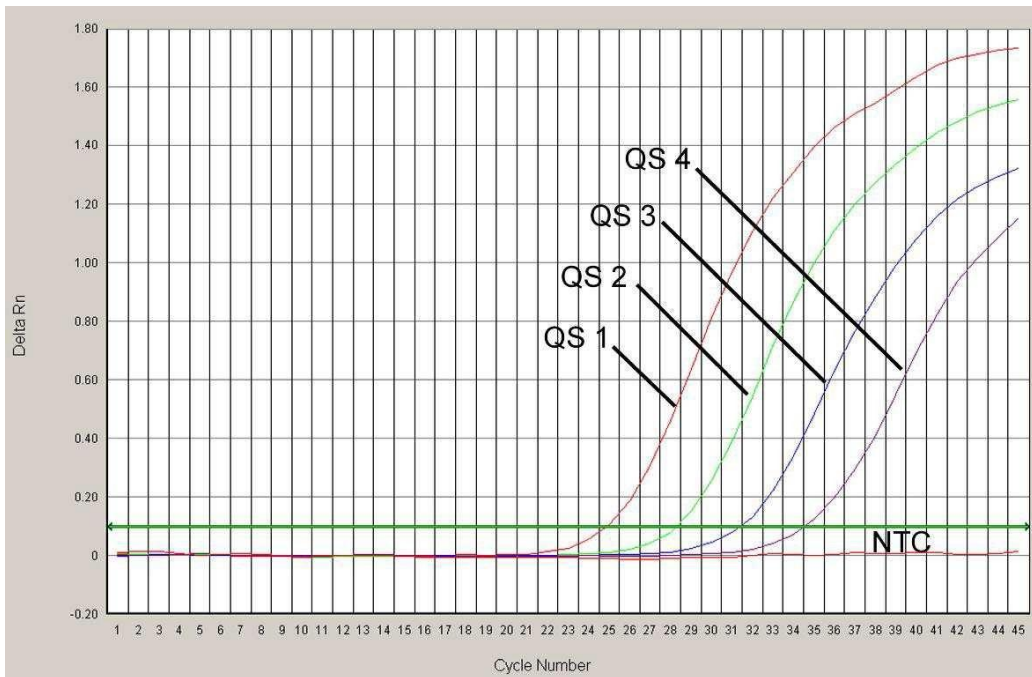
Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích 20 - 23 (*ABI PRISM 7000 SDS*) a 24 - 27 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).



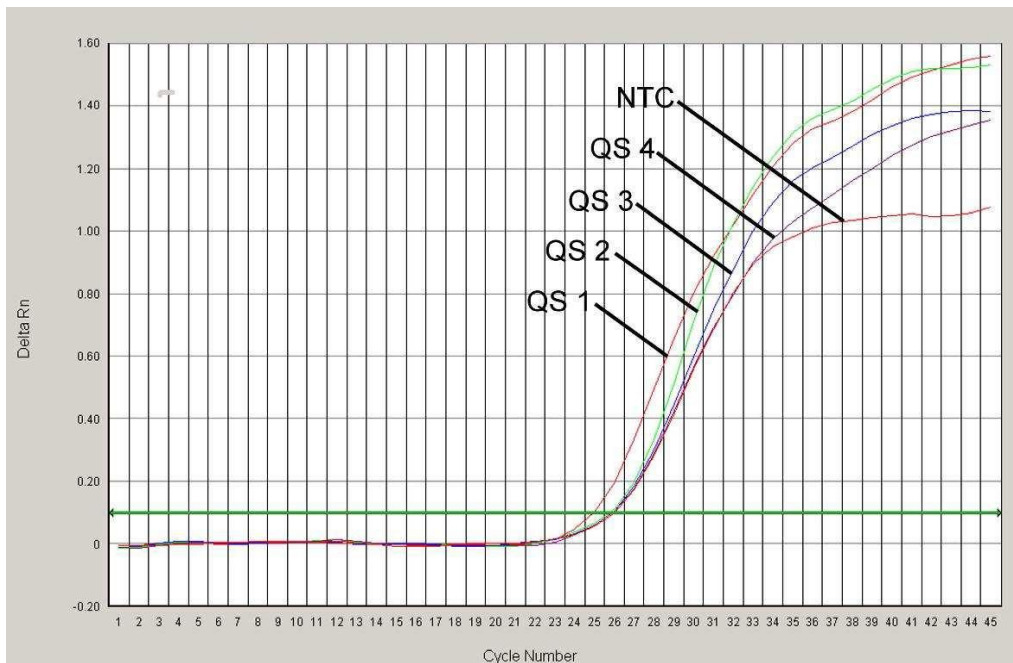
Obr. 20: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4) detekcí fluorescenčního signálu FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: non-template control (negativní kontrola).



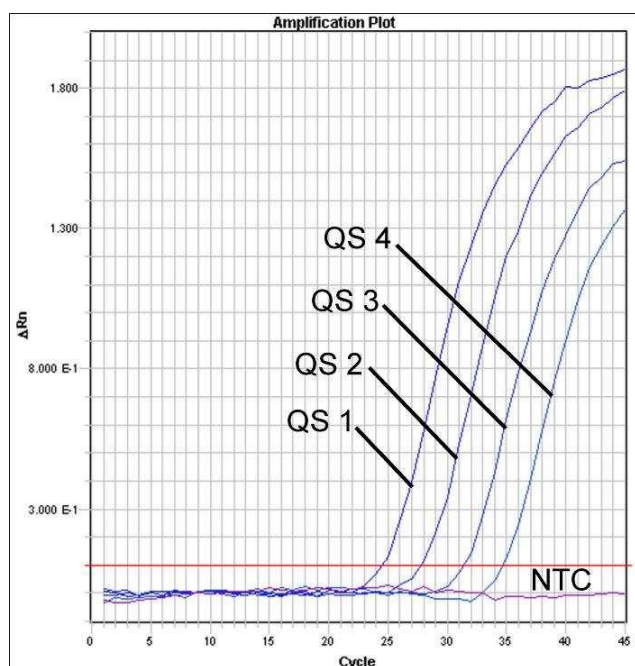
Obr. 21: Průkaz InternÝ kontroly (IC) detekcí fluorescenčního signálu VIC (ABI PRISM 7000 SDS) při současné amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativní kontrola).



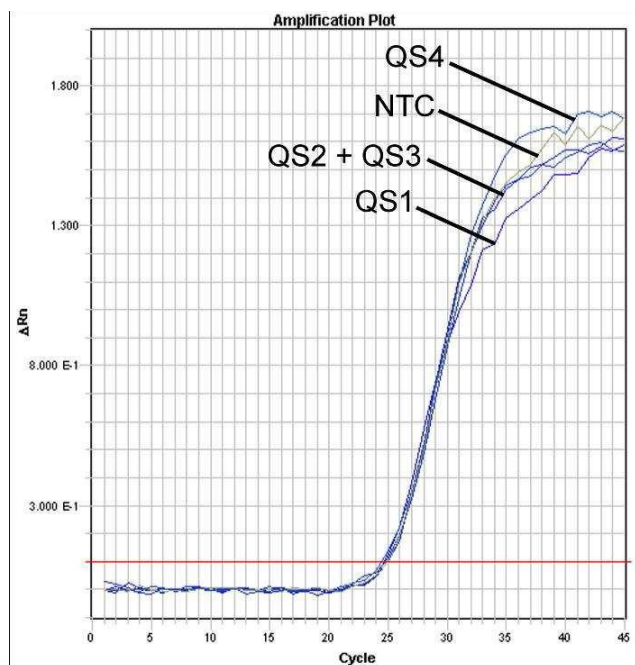
Obr. 22: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) detekci fluorescenčního signálu NED (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: non-template control (negativní kontrola).



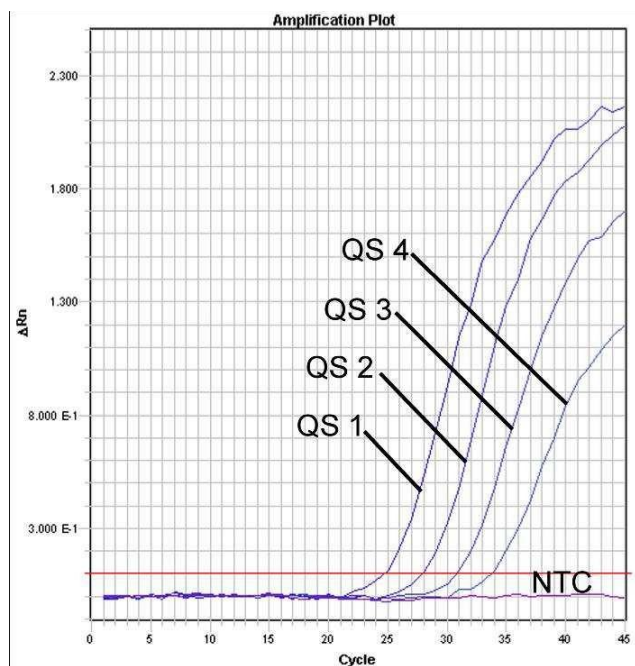
Obr. 23: Průkaz InternÝ kontroly (IC) detekci fluorescenčního signálu VIC (ABI PRISM 7000 SDS) při současné amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativní kontrola).



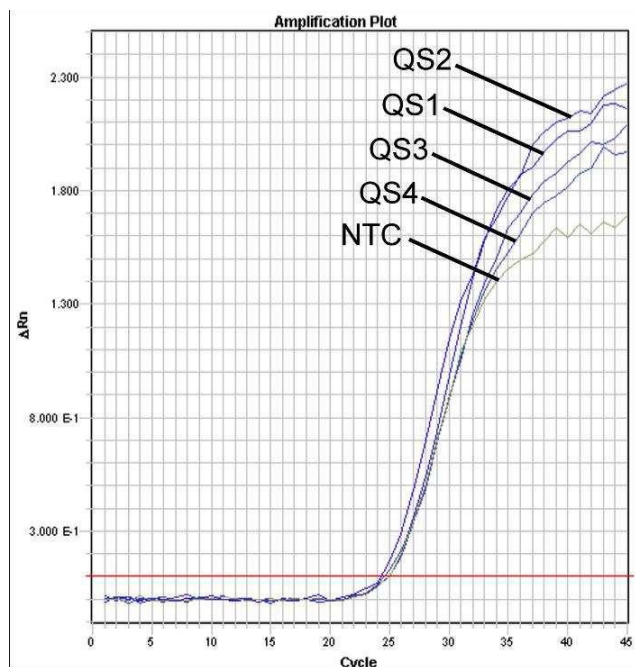
Obr. 24: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4) detekci fluorescenčnÍho signálu FAM (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 25: Průkaz InternÍ kontroly (IC) detekci fluorescenčnÍho signálu VIC (ABI PRISM 7900HT SDS) při současnÉ amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 26: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) detekci fluorescenčnÍho signálu NED (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 27: Průkaz InternÍ kontroly (IC) detekci fluorescenčnÍho signálu VIC (*ABI PRISM 7900HT SDS*) při současnÉ amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativní kontrola).

## 10. Řešení problémů

Žádný fluorescenční signál FAM pro HSV-1 ani fluorescenční signál NED pro HSV-2 při pozitivních kontrolách (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*):

- Volba barviva detektoru při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.
  - ❖ K analýze dat zvolte barvivo detektoru FAM pro HSV-1 a NED pro HSV-2 pro analytickou HSV PCR a barvivo detektoru VIC pro PCR *Interní kontroly*.
- Nastavení uvedená v položce *Options* k vyhodnocení získaných dat (*Extension Phase Data Extraction*) se neshodují s nastaveními *Data Collection* (pro *ABI PRISM 7900HT SDS* viz **8.5.2.4 Vytvoření teplotního profilu**).
  - ❖ Analyzujte běh PCR s opraveným nastavením a zopakujte vyhodnocení (*Analysis*).
- Naprogramování teplotního profilu *ABI PRISM Sequence Detection Systems* je chybné.
  - ❖ Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **8.5 Programování ABI PRISM SDS**).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
  - ❖ Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem (viz **8.4 Příprava PCR**) a popř. PCR zopakujte.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*.
  - ❖ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* (fluorescenční signál VIC) při současné nepřítomnosti fluorescenčního signálu FAM pro HSV-1 a fluorescenčního signálu NED pro HSV-2 specifické HSV PCR:

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
  - ❖ Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.

- PCR byla inhibována.
  - ❖ Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
  - ❖ Přesvědčte se, že byl při izolaci DNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz **8.1 Izolace DNA**).
- Během izolace dochází 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 doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*.
  - ❖ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

### Fluorescenční signál FAM pro HSV-1 a fluorescenční signál NED pro HSV-2 analytické PCR při negativních kontrolách.

- 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.
- Během izolace dochází ke kontaminaci.
  - ❖ Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
  - ❖ Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

# 11. Specifikace

## 11.1 Analytická senzitivita

Pro zjištění analytické senzitivity *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* byla vytvořena řada ředění standardů pro HSV-1 od 25,7 do nominálně 0,008 HSV-ekvivalentů kopie\*/ $\mu\text{l}$  a pro HSV-2 od 35,31 do nominálně 0,012 HSV-ekvivalentů kopie\*/ $\mu\text{l}$ . Tyto řady byly následně analyzovány za použití *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* s *ABI PRISM 7000* a *7900HT Sequence Detection Systems*. Experimenty byly pro každý přístroj provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Jejich grafické vyhodnocení (*ABI PRISM 7900HT SDS*) je zobrazeno na Obr. 28 - Obr. 29.

Limit detekce ( $p = 0,05$ )	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i> (HSV-1)	0,9 kopíí/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i> (HSV-2)	0,5 kopíí/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i> (HSV-1)	1,8 kopíí/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i> (HSV-2)	2,0 kopíí/ $\mu\text{l}$

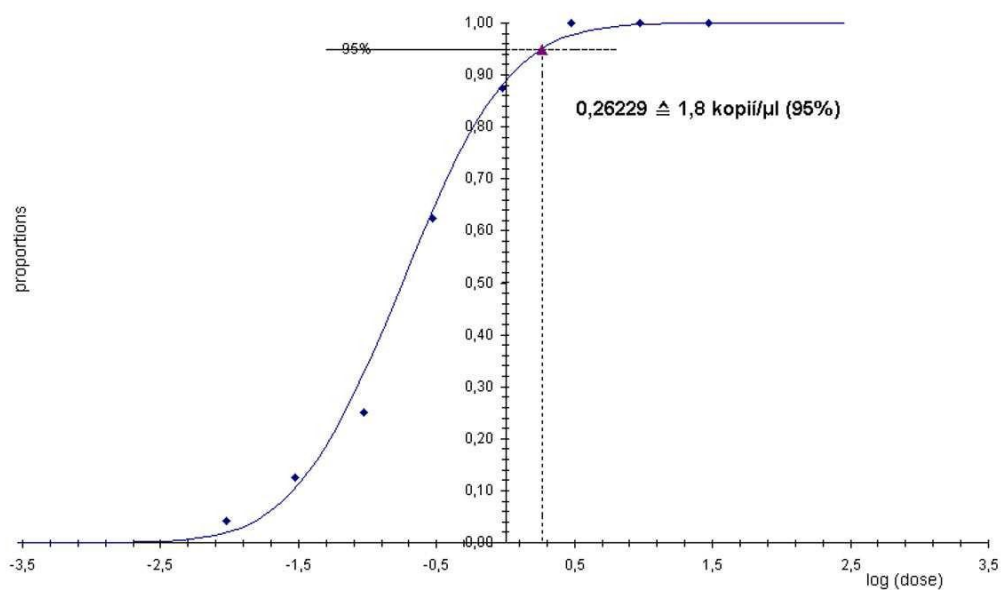
To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 0,9 kopíí/ $\mu\text{l}$  (HSV-1) resp. 0,5 kopíí/ $\mu\text{l}$  (HSV-2, *ABI PRISM 7000 SDS*) a 1,8 kopíí/ $\mu\text{l}$  (HSV-1) resp. 2,0 kopíí/ $\mu\text{l}$  (HSV-2, *ABI PRISM 7900HT SDS*).

---

\* U zde použitého standardu se jedná o klonovaný PCR produkt, jehož koncentrace byla zjištěna spektrální a fluorescenční fotometrií.

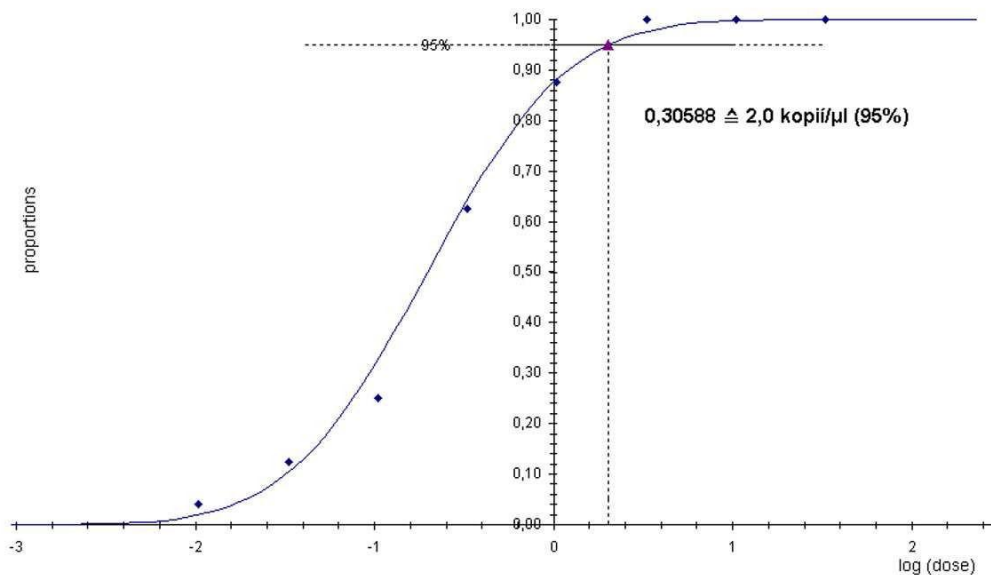


### Probitová analýza: HSV-1 (ABI PRISM 7900HT SDS)



Obr. 28: Analytická senzitivita pro HSV-1 soupravy artus HSV-1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

### Probitová analýza: HSV-2 (ABI PRISM 7900HT SDS)



Obr. 29: Analytická senzitivita pro HSV-2 soupravy artus HSV-1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

## 11.2 Specificita

Specificita *artus* HSV-1/2 TM 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. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech relevantních kmenů.

K určení specificity *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v Tabulce 1 testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1: Testování specificity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců.

Kontrolní skupina	HSV-1/2 (FAM/NED)	Interní kontrola (VIC)
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	-	+
Lidský herpesvirus 4 (virus Epsteinova a Barrové)	-	+
Lidský herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Lidský herpesvirus 6A	-	+
Lidský herpesvirus 6B	-	+
Lidský herpesvirus 7	-	+
Lidský herpesvirus 8	-	+
Virus hepatitidy A	-	+
Virus hepatitidy B	-	+
Virus hepatitidy C	-	+
Virus lidské imunodeficiency	-	+
Lidský virus leukémie T-buněk typu 1 & 2	-	+
Západonilský virus	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

## 11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti pro *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **Intra-Assay variability** (variabilita vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z **Inter-Assay variability** (variabilita způsobená provedením experimentu různými osobami v jedné laboratoři a užitím různých přístrojů stejného typu) a z **Inter-Batch variability** (variabilita způsobená použitím různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontrola*.

Tyto údaje byly pro *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit stanoveny na základě *Kvantifikačního standardu* s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/ $\mu$ l). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: *threshold cycle*, viz Tabulka 2/Tabulka 4) a z toho určených kvantitativních hodnot v kopiích/ $\mu$ l (viz Tabulka 3/Tabulka 5). Celková variabilita libovolného vzorku uvedené koncentrace činí tedy 2,62 % (Ct, HSV-1) a 2,07 % (Ct, HSV-2) resp. 14,02 % (konc., HSV-1) a 14,82 % (konc., HSV-2), pro průkaz *Interní kontrola* 1,84 % (Ct, HSV-1) a 1,92 % (Ct, HSV-2). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti pro HSV1 na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,18	0,03	0,51
Intra-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,24	0,06	0,87
Inter-Assay variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,25	0,06	0,70
Inter-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,37	0,14	1,36
Inter-Batch variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,67
Inter-Batch variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,17	0,03	0,65
Celková variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,92	0,84	2,62
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,49	0,24	1,84

Tabulka 3: Údaje o přesnosti pro HSV1 na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/ $\mu$ l).

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,32	1,75	13,12
Inter-Assay variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,81
Inter-Batch variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,22	1,50	12,14
Celková variabilita: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,42	2,00	14,02

Tabulka 4: Údaje o přesnosti pro HSV2 na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,17	0,03	0,49
Intra-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,10	0,01	0,37
Inter-Assay variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,68
Inter-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,30	0,09	1,10
Inter-Batch variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,24	0,06	0,74
Inter-Batch variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,25	0,06	0,93
Celková variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,70	0,49	2,07
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,52	0,27	1,92

Tabulka 5: Údaje o přesnosti pro HSV2 na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/ $\mu$ l).

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,44	2,06	14,25
Inter-Assay variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,80
Inter-Batch variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,48	2,18	14,62
Celková variabilita: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,50	2,25	14,82

## 11.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb *artus HSV-1/2 TM PCR Kit*. Za tímto účelem bylo 30 HSV negativních vzorků likvoru smíšeno s vždy 5,4 kopiemi/ $\mu\text{l}$  elučního objemu kontrolní HSV-1 DNA (třínásobná koncentrace analytické hranice senzitivity), pomocí QIAamp DNA Mini Kit izolováno (viz 8.1 **Izolace DNA**) a pomocí *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* analyzováno. Stejným způsobem byly provedeny testy pro HSV-2 (30 vzorků likvoru; 6 kopií/ $\mu\text{l}$  kontrolní HSV-2 DNA). četnost chyb pro HSV-1 i HSV-2 činila u všech vzorků 0 %. Robustnost *Interní kontroly* byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 30 negativních vzorků likvoru. Celková četnost chyb činila 0 %. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* činí tedy  $\geq 99$  %.

## 11.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí na mezilaboratorních pokusech.

## 11.6 Diagnostické hodnocení

*artus HSV-1/2 TM PCR Kit* je v současné době evaluován ve více studiích.

## 12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagensie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Prostředek by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponentů. Nepoužívejte reagensie s prošlou trvanlivostí.

## 13. Varování a bezpečnostní opatření

Bezpečnostní informace k soupravě *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit naleznete v odpovídajících bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).











## 14. Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO 9001 a ISO 13485 byla každá šarže *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

## 15. Literatura

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

## 16. Vysvětlení symbolů

	Použijte do
	Číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Číslo materiálu
	Manuál
	Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Obsahuje reagentie pro <N> reakcí
	Teplotní rozmezí
<b>QS</b>	Kvantifikační standard
<b>IC</b>	Interní kontrola
<b>Mg-Sol</b>	Roztok hořčíku



## artus HSV-1/2 TM PCR Kit

### Ochranné známky a vyloučení odpovědnosti

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, MicroAmp®, GeneAmp® (Life Technologies Corporation)

Registrované názvy, ochranné známky etc. použité v tomto manuálu nelze považovat za nechráněné zákonem, ani když nejsou jako takové označeny.

artus HSV-1/2 TM PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation, EZ1 DSP Virus Kit a EZ1 DSP Virus Card jsou diagnostické soupravy a přístroje označené značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkty nejsou dostupné ve všech zemích.

Soupravy QIAamp Kit jsou určeny pro obecné laboratorní použití. Údaje produktu nebo jeho prezentace nejsou určeny k tomu, aby podávaly informace o diagnóze, prevenci nebo léčení nemoci.

Koupi souprav artus PCR Kit zahrnuje limitovanou licenci pro jejich použití v procesu polymerázové řetězové reakce (PCR) v rámci humánní a veterinární in vitro diagnostiky, ve spojení s termocyklemem, jehož použití při automatizovaném provedení PCR je kryto předem splatným licenčním poplatkem, který se odvádí buď platbou společnosti Applied Biosystems nebo koupí autorizovaného termocyklu. Technologie PCR je chráněna národními patentními právy ekvivalentními k USA patentům čí. 5.219.727 a 5.322.770 a 5.210.015 a 5.176.995 a 6.040.166 a 6.197.563 a 5.994.056 a 6.171.785 a 5.487.972 a 5.804.375 a 5.407.800 a 5.310.652 a 5.994.56 ; vlastněno firmou F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

