

Komplekti *artus*[®] VZV LC PCR Kit

käsiraamat

 24 (kataloogi nr 4502063)

 96 (kataloogi nr 4502065)

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Ette nähtud kasutamiseks koos seadmega *LightCycler*[®]
1.1/1.2/1.5 ja *LightCycler* 2.0

Jaanuar 2015 – Versioon 1



IVD

REF

4502063, 4502065

HB

1046899



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSAMAA

R3

MAT

1046899



Sample & Assay Technologies

Komplekt *artus*[®] VZV LC PCR Kit

Kaubamärgid ja õigused loobumised

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

Seadus kaitseb käesolevas dokumendis kasutatud registreeritud nimetusi, kaubamärke jne, ka juhul, kui need ei ole kaubamärkidena tähistatud.

Komplekt *artus* VZV LC PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation ning EZ1 DSP Virus Kit ja Card on Euroopa *in vitro* diagnostika meditsiiniseadmete direktiivi 98/79/EÜ kohaselt CE-vastavusmärgisega diagnostikaseadmed. Need ei pruugi olla kättesaadavad kõigis riikides.

QIAamp[®] Kiti komplektid on mõeldud laboratoorseks kasutamiseks. Ühtegi väidet või kirjeldust, mis annaks teavet haiguse diagnoosi, ennetamise või ravi kohta, ei ole kavatsatud esitada.

artus PCR Kiti komplektide ostuga kaasneb piiratud litsents nende kasutamiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) protsessi läbiviimiseks inimese ja veterinaardiagnostikas *in vitro* diagnostikas koos termotsükleriga, mille kasutamine automatiseeritud PCR-i protsessi läbiviimisel kaetakse ettemakstava litsentsitasuga makse näol Applied Biosystemsile või ostu käigus, st autoriseeritud termotsükleriga. PCR-i protsess on patendiõigustega kaitstud välisriikide analoogidega USA patentidele nr 5 219 727, 5 322 770, 5 210 015, 5 176 995, 6 040 166, 6 197 563, 5 994 056, 6 171 785, 5 487 972, 5 804 375, 5 407 800, 5 310 652 ja 5 994 056, mille omanik on F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007–2014 QIAGEN, kõik õigused kaitstud.

Sisukord

1. Komplekti sisu	5
2. Säilitamine	5
3. Vajalikud lisamaterjalid ja -seadmed	5
4. Üldised ettevaatusabinõud	6
5. Patogeeni kirjeldus	6
6. Reaalaja PCR-i põhimõte	7
7. Tootekirjeldus	7
8. Protokoll	8
8.1 DNA eraldamine	8
8.2 Sisemine kontroll	11
8.3 Kvantifitseerimine	12
8.4 PCR-analüüsi ettevalmistamine	13
8.5 <i>LightCycleri</i> seadmete programmeerimine	18
8.5.1 <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i> seadme programmeerimine	18
8.5.2 <i>LightCycler 2.0</i> seadme programmeerimine	21
9. Andmeanalüüs	23
9.1 PCR-i andmete analüüs <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i> seadmel	23
9.2 PCR-i andmete analüüs <i>LightCycler 2.0</i> seadmel	26
10. Tõrkeotsing	29
11. Tehnilised andmed	31
11.1 Analüütiline tundlikkus	31
11.2 Spetsiifilisus	32
11.3 Täpsus	33
11.4 Robustsus	34

11.5 Taastatavus.....	35
11.6 Diagnostiline hindamine	35
12. Toote kasutuspiirangud	35
13. Ohutusteave	35
14. Kvaliteedikontroll	36
15. Viited	36
16. Sümbolite seletus	37

Komplekt *artus*[®] VZV LC PCR Kit

Kasutamiseks koos seadmega *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0*.

1. Komplekti sisu

	Märgistus ja pakendi sisu	Art nr 4502063 24 reaktsiooni	Art nr 4502065 96 reaktsiooni
Sinine	VZV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Punane	VZV LC/TM QS 1 st 1 x 10 ⁴ koopiat/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Punane	VZV LC/TM QS 2 st 1 x 10 ³ koopiat/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Punane	VZV LC/TM QS 3 st 1 x 10 ² koopiat/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Punane	VZV LC/TM QS 4 st 1 x 10 ¹ koopiat/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Roheline	VZV LC IC st	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Valge	Water (PCR grade) (PCR-i kvaliteediga vesi)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

QS = Kvantitatiivne standard

IC = Sisemine kontroll

2. Säilitamine

Säilitage *artus* VZV LC PCR Kiti komponente –15 °C kuni –30 °C juures, need säilitavad stabiilsuse kuni etiketil näidatud aegumiskuupäevani. Vältige korduvat sulatamist ja külmutamist (> 2 x), sest reagendi tundlikkus võib väheneda. Kui reagente kasutatakse vaid aeg-ajalt, külmutage alikvootidena. Reagente võib +4 °C kraadi juures hoida maksimaalselt viis tundi.

3. Vajalikud lisamaterjalid ja -seadmed

- Ühekordselt kasutatavad pulbrivabad kindad
- DNA eraldamise komplekt (vt **8.1 DNA eraldamine**)
- Pipetid (reguleeritavad)
- Steriilsed filtritega pipetiotsikud

- Keerissegur
- Lauatsentrifuug koos rootoriga 2 ml reaktsioonikatsutite jaoks
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kataloogi nr 2 158 850) faili *Crosstalk Color Compensation* installimiseks seadmele *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0*.
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (Kataloogi nr 03 624 854 001) *LightCycler 2.0* seadmele
- *LightCycleri* kapillaarid (20 µl)
- *LightCycler Cooling Block* (jahutusplokk)
- *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (tarkvara versioon 3.5) või *LightCycler 2.0* (tarkvara versioon 4.0) seade
- *LightCycler Capping Tool* (korkimisvahend)

4. Üldised ettevaatusabinõud

Kasutaja peab alati pöörama tähelepanu järgmisele.

- Kasutage filtritega pipetiotsikuid
- Säilitage ja ekstraheerige positiivne materjal (proovid, kontrollid ja amplikonid) kõigist teistest reagentidest eraldi ja lisage nad reaktsioonisegule eraldi ruumiosas (eelistatavalt eraldi ruumis).
- Sulutage kõik komponendid täielikult toatemperatuuril enne analüüsi alustamist.
- Segage ülessulanud komponente ja tsentrifuugige lühidalt.
- Töötage kiirelt kasutades jääd või *LightCycleri* jahutusplokki.

5. Patogeeni kirjeldus

Varicella zosteri viirus (VZV) kandub inimeselt inimesele piisknakkuse või otsese kontakti kaudu. VZV nakkus põhjustab kerget palavikku ja mõjutab üldist tervises seisundit mõõdukal määral. Haigusele on iseloomulik polümorfne nahalööve vermete, villide ja kärnadega, millega kaasneb tugev sügelus (tuulerõuged). Raskekujulisi VZV infektsioone on tihti täheldatud immuunpuudulikkusega patsientidel, kellel võib nakkus põhjustada ohtlikke tüsistusi, nagu kopsupõletik ja entsefaliit. Pärast ägedat infektsiooni püsivad

patogeeni sensorsetes spinaalganglionites ja kraniaalnärvide ganglionites. Nõrgenenud immuunsuse korral võib toimuda haiguse ägenemine (nt huuleherpes, vöötohatis).

6. Reaalaja PCR-i põhimõte

Patogeeni kindlaksmääramine polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil põhineb patogeeni genoomi spetsiifiliste piirkondade amplifitseerimisel. Reaalaja PCR-iga tuvastatakse amplifitseeritud produkt fluorestsentsvärvide abil. Need on harilikult seotud oligonukleotiidsondidele, mis seonduvad spetsiifiliselt amplifitseeritud produktile. Fluorestsentsi intensiivsuse jälgimine PCR-i tööseria jooksul (s.o reaalajas) võimaldab akumulereuvat produkti tuvastada ja kvantifitseerida, ilma et peaks reaktsioonikatsuteid pärast PCR-i uuesti avama (Mackay, 2004).

7. Tootekirjeldus

Komplekt *artus* VZV LC PCR Kit kujutab endast kasutusvalmis süsteemi VZV DNA tuvastamiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil, mille läbiviimiseks kasutatakse *LightCycleri* seadet. *HSV LC Master* sisaldab reagente ja ensüüme VZV genoomi 82 ap pikkuse piirkonna spetsiifiliseks amplifitseerimiseks ja spetsiifilise amplikoni otseseks tuvastamiseks seadmete *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0* abil. Lisaks sisaldab komplekt *artus* VZV LC PCR Kit täiendavat heteroloogset amplifikatsioonisüsteemi võimaliku PCR-i pärssumise kindlakstegemiseks.

PCR-i produkt	Fluorestsentsi mõõtmise kanalite valik	
	Seade <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	Seade <i>LightCycler</i> [®] 2.0
VZV	F1/F2	530/640
VZV IC	F3/Back-F1	705/Back 530

Analüütilise VZV PCR-i avastamispiir (vt **11.1 Analüütiline tundlikkus**) ei vähene sisemise kontrolli (IC) amplifitseerimise ja tuvastamise tõttu. Komplekti kuuluvad välised positiivsed kontrollid (*VZV LC/TM QS 1–4*) võimaldavad tuvastada patogeeni nakkusastet. Täpsema teabe saamiseks lugege peatükki **8.3 Kvantifitseerimine**.

Tähelepanu! Komplekti *artus VZV LC PCR Kit* abil VZV tuvastamise temperatuuriprofiil vastab komplekside *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, *artus EBV LC PCR Kit* ja *artus CMV LC PCR Kit* profiilidele. Seetõttu võib neid *artus*-süsteemi PCR-uuringuid läbi viia ja analüüsida samas tööseerias. Järgige peatükkides **8.3 Kvantifitseerimine** ja 9 antud PCR-analüüsi kohta käivaid soovitusi. **Andmeanalüüs**.

8. Protokoll

8.1 DNA eraldamine

DNA eraldamise komplekte pakuvad erinevad tootjad. DNA eraldamise protseduuriks vajaliku proovi suurus sõltub kasutatavast meetodist. Palun eraldage DNA proovist komplekti tootja juhistel kohaselt. Soovitame järgmisi nukleiinhappe eraldamise komplekte.

Proovimaterjal	Nukleiinhappe eraldamise komplekt	Kataloogi number	Tootja	Kandur-RNA
Seerum, plasma, CSF, vatitikud	QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	kuulub komplekti
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	ei kuulu komplekti
CSF	EZ1 DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	kuulub komplekti

*Kasutamiseks kombineeritult tööjaamaga BioRobot EZ1 DSP Workstation (kataloogi nr 9001360) ja viiruskaardiga EZ1 DSP Virus Card (kataloogi nr 9017707).

Tähtis märkus komplektide QIAamp UltraSens Virus Kit ja QIAamp DNA Mini Kit kasutajatele.

- Ekstraktsiooni tõhusus ja seega ka saadava DNA/RNA hulk sõltub suurel määral **kandur-RNA** kasutamisest. Kui valitud nukleiinhappe eraldamise komplekt ei sisalda kandur-RNA-d, soovitame nukleiinhapete eraldamiseks rakuvabadest kehavedelikest ja väikese DNA/RNA sisaldusega materjalist (nt CSF) lisada kandurit (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kataloogi nr 27-4110-01). Toimige järgmiselt.

a) Resuspendeerige lüofiliseeritud kandur-RNA ekstraktsioonikomplekti elueerimispuhvris (nt AE puhver komplektist QIAamp DNA Mini Kit) (ärge kasutage lüüsipuhvrit) ja valmistage lahus kontsentratsiooniga 1 µg/µl. Jagage see kandur-RNA lahus nii mitmeks alikvoodiks, kui vajalikuks peate, ja säilitage alikvoote –20 C juures. Vältige kandur-RNA alikvootide korduvat ülessulatamist (> 2 x).

b) Kasutage 1 µg kandur-RNA-d 100 µl lüüsipuhvri kohta. Näiteks kui ekstraktsiooniprotokollis on ette nähtud 200 µl lüüsipuhvrit, lisage 2 µl kandur-RNA-d (1 µg/µl) otse lüüsipuhvrisse. Enne iga ekstraktsiooniprotsessi alustamist tuleb värskelt ette valmistada lüüsipuhvri ja kandur-RNA (ja sisemise kontrolli, kui on asjakohane, vt **8.2 Sisemine kontroll**) segu järgneva pipeteerimiskeemi kohaselt.

Proovide arv	1	12
Lüüsipuhver	nt 200 µl	nt 2400 µl
Kandur-RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Kogumaht	202 µl	2424 µl
Maht ekstraktsiooni kohta	200 µl	nt 200 µl

- c) Ekstraktsiooniks kasutage värskelt valmistatud lüüsipuhvri ja kandur-RNA segu viivitamata. Segu ei säili.
- Ekstraktsiooni tõhusus ja seega ka saadava DNA/RNA hulk sõltub suurel määral **kandur-RNA** kasutamisest. Komplektiga QIAamp UltraSens Virus Kit kaasas oleva kandur-RNA stabiilsuse suurendamiseks soovitame järgmist protseduuri, mis erineb ekstraktsioonikomplekti kasutusjuhendis välja toodust:

- a. Resuspendeerige lüofiliseeritud kandur-RNA enne esimest ekstraktsioonikomplekti kasutuskorda 310 µl komplekti kuuluvas elueerimispuhvril (lõppkontsentratsioon 1 µg/µl, ärge kasutage lüüsihuhvrit). Jagage see kandur-RNA lahus nii mitmeks alikvoodiks, kui vajalikuks peate, ja säilitage alikvoote –20 °C juures. Vältige kandur-RNA alikvootide korduvat ülessulatamist (> 2 x).
- b. Enne iga ekstraktsiooniprotsessi alustamist tuleb värskelt ette valmistada lüüsihuhvri ja kandur-RNA (ja sisemise kontrolli, kui on asjakohane, vt **8.2 Sisemine kontroll**) segu järgneva pipeteerimiskeemi kohaselt.

Proovide arv	1	12
Lüüsihuhver AC	800 µl	9600 µl
Kandur-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Kogumaht	805,6 µl	9667,2 µl
Maht ekstraktsiooni kohta	800 µl	800 µl iga

- c. Ekstraktsiooniks kasutage värskelt valmistatud lüüsihuhvri ja kandur-RNA segu viivitamata. Segu ei säili.
- Suurima tundlikkuse saavutamiseks komplektiga *artus* VZV LC PCR Kit soovitate elueerida DNA 50 µl elueerimispuhvril.
 - Komplektiga **QIAamp UltraSens Virus Kit** on võimalik proovi kontsentratsiooni suurendada. Kui te kasutate proovimaterjalina midagi muud kui seerum või plasma, lisage proovile vähemalt 50% (v/v) patogeeni suhtes negatiivset inimese plasmat.
 - Eraldamisprotokollide puhul, kus on ette nähtud **etanool**isisaldusega pesupuhvrite kasutamine, tuleb võimalike etanoolijääkide eemaldamiseks proovi enne elueerimist lisaks veel üks kord tsentrifuugida (kolm minutit, 13 000 rpm). Sellega välditakse võimalikku PCR-i pärsumist.
 - Ärge kasutage komplekti *artus* VZV LC PCR Kit koos **fenoolipõhiste** eraldamiseetoditega.

Tähtis märkus komplekti **EZ1 DSP Virus Kit** kasutajatele.

- Ekstraktsiooni tõhusus ja seega ka saadava DNA/RNA hulk sõltub suurel määral **kandur-RNA** kasutamisest. Lisage sobiv kogus kandur-RNA-d

igale ekstraktsioonile, järgides komplekti *EZ1 DSP Virus Kit* käsiraamatu juhiseid.

Tähtis! Komplekti *artus VZV LC PCR Kit* sisemist kontrolli võib kasutada vahetult eraldamise protseduuris (vt **8.2 Sisemine kontroll**).

8.2 Sisemine kontroll

Komplekti kuulub sisemine kontroll (*VZV LC IC*). See võimaldab kasutajal **kontrollida nii DNA eraldamise protseduuri kui ka võimalikku PCR-i pärssumist** (vt joonis 1). Kasutades ekstraktsiooniks komplekti **EZ1 DSP Virus Kit**, tuleb sisemine kontroll lisada, järgides *EZ1 DSP Virus Kiti* käsiraamatu juhiseid. Kasutades komplekti **QIAamp UltraSens Virus Kit** või **QIAamp DNA Mini Kit**, lisage sisemine kontroll eraldamisreaktsioonile vahekorras 0,1 µl/1 µl elueerimislahuse kohta. Näiteks komplekti *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN) kasutades elueeritakse DNA 50 µl AE puhvris. Seega tuleb algselt lisada 5 µl sisemist kontrolli. Sisemise kontrolli kogus sõltub **üksnes** elueerimislahuse mahust. Sisemise kontrolli ja kandur-RNA (vt **8.1. DNA eraldamine**) võib lisada üksnes

- lüüsipuhvri ja proovimaterjali segule või
- otse lüüsipuhvrile.

Sisemist kontrolli ei tohi lisada otse proovimaterjalile. Lüüsipuhvrile lisamisel pidage silmas, et sisemise kontrolli ja lüüsipuhvri / kandur-RNA segu tuleb valmistada värskest ja kasutada kohe (isegi vaid mõned tunnid toatemperatuuril või külmikus hoidmist võib viia sisemise kontrolli ebaõnnestumiseni ja vähendada ekstraktsiooni tõhusust). Sisemist kontrolli ja kandur-RNA-d **ei tohi** lisada otse proovimaterjalile.

Sisemist kontrolli võib vajaduse korral kasutada ka **võimaliku PCR-i pärssumise kontrollimiseks** (vt joonis 2). Selleks lisage sisemist kontrolli 0,5 µl reaktsiooni kohta otse 15 µl reagentidele *VZV LC Master*. Iga PCR-i reaktsiooni kohta kasutage 15 µl põhisegu (*master mix*), mis on valmistatud

eespool kirjeldatud viisil^{*}, ja lisage 5 µl puhastatud proovi. Kui te valmistate ette mitme proovi samaaegset PCR-analüüsi, suurendage *VZV LC Masteri* ja sisemise kontrolli mahtu proovide arvu järgi (vt **8.4 PCR-analüüsi ettevalmistamine**).

Komplektid *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* ja *artus VZV LC PCR Kit* sisaldavad identset sisemist kontrolli (IC). Ka komplektid *artus EBV LC PCR Kit* ja *artus CMV LC PCR Kit* sisaldavad identset sisemist kontrolli.

8.3 Kvantifitseerimine

Lisatud kvantitatiivseid standardeid (*VZV LC/TM QS 1–4*) käsitletakse samal moel ja samas mahus (5 µl) kui varem puhastatud proove. Standardkõvera loomiseks *LightCycleri* seadmel kasutage kõiki nelja kvantitatiivset standardit järgmiselt.

Seade *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Defineerige *VZV LC/TM QS 1–4 Sample Loading Screenil* (Proovi laadimise vaade) standarditena, sisestage ettenähtud kontsentratsioonid (vt *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry).

Seade *LightCycler 2.0*

Standardite defineerimiseks aktiveerige funktsioon *Analysis Type* (Analüüsitüüp) akna *Samples* (Proovid) menüüs ja valige *Absolute Quantification* (Absoluutne kvantifitseerimine). Nüüd saate te defineerida *VZV LC/TM QS 1–4* kui standardid ja sisestada igal standardile vastavad kontsentratsioonid (vt *LightCycler Operator's Manual*, Version 4.0, Chapter B, 2.2. Proovi teabe sisestamine). Veenduge, et funktsioon *Enable Controls* (Aktiveeri kontrollid) **ei ole** aktiveeritud. Vastasel juhul on analüüsiseadete valimine andmeanalüüsiks piiratud (see **9.2 PCR-i tulemuste andmeanalüüs seadmega LightCycler 2.0**).

^{*} Sisemise kontrolli lisamisest tingitud reaktsioonisegu mahu suurenemine ei ole PCR-analüüsi ettevalmistamisel tähtis. Tuvastussüsteemi tundlikkus sellest ei vähene.

Sel viisil loodud standardkõverat võib kasutada järgnevate tööseeriade juures eeldusel, et tööseerias kasutatakse vähemalt **ühte** antud kontsentratsiooniga standardit. Selleks tuleb importida enne loodud standardkõverat (vt *LightCycler Operator's Manual*, versioon 3.5, ptk B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve või versioon 4.0, ptk 4.2.2 Saving a Standard Curve). See kvantifitseerimismeetod võib aga erinevate PCR-i tööseeriade varieeruvuse tõttu põhjustada hälbeid tulemustes.

Kui te integreerisite PCR-i tööseeriasse enam kui ühe Herpes artusesüsteemi, tuleb neid erinevaid süsteeme analüüsida eraldi, kasutades vastavaid kvantitatiivseid standardeid.

Tähelepanu! Kvantitatiivsed standardid on defineeritud suhtarvuna koopiat/μl. Standardkõvera abil määratud väärtuste konverteerimiseks nii, et neid saaks esitada suhtarvuna koopiat/ml proovimaterjali kohta, sobib järgmine valem.

$$\text{Tulemus (koopiat/ml)} = \frac{\text{Tulemus (koopiat/}\mu\text{l)} \times \text{elueerimislahuse maht (}\mu\text{l)}}{\text{Proovi maht (ml)}}$$

Arvestage, et ülaltoodud valemisse tuleb põhimõtteliselt sisestada algne proovi maht. Seda tuleb silmas pidada, kui proovi mahtu on muudetud enne nukleiinhappe ekstraheerimist (nt mahtu on tseentrifuugimise teel vähendatud või eraldamiseks vajamineva mahu saavutamiseks on proovi mahtu suurendatud).

Tähtis! *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0* seadme artus-süsteemide kvantitatiivse analüüsi juhend on saadaval veebilehel www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Tehniline märkus kvantifitseerimise kohta seadmel *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0*).

8.4 PCR-analüüsi ettevalmistamine

Veenduge, et jahutusplokk ja kapillaaride adapterid (*LightCycleri* seadme tarvikud) on eeljahutatud +4 °C kraadini. Asetage soovitud arv *LightCycleri* kapillaare jahutusploki adapteritesse. Veenduge, et iga PCR-i tööseeria kohta

on kaasatud vähemalt üks kvantitatiivne standard ja üks negatiivne kontroll (*Water, PCR grade*). Standardkõvera loomiseks kasutage igas PCR-i tööseerias kõiki kvantitatiivseid standardeid (*VZV LC/TM QS 1–4*). Enne iga kasutamist tuleb kõik reagentid täielikult üles sulatada, segada (korduva üles-alla pipeteerimise või kiire keeristamise teel) ja lühiajaliselt tsentrifuugida.

Kui te soovite kasutada sisemist kontrolli, et jälgida DNA eraldamise protseduuri ja kontrollida võimalikku PCR-i pärssumist, siis tuleb see lisada juba eraldamisel (vt **8.2 Sisemine kontroll**). Sellisel juhul järgige alltoodud pipeteerimisskeemi (ülevaatliliku skeemi vt joonisel 1).

	Proovide arv	1	12
1. Põhisegu (<i>master mix</i>) ettevalmistamine	<i>VZV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>VZV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Kogumaht	15 µl	180 µl
2. PCR-analüüsi ettevalmistamine	Põhisegu (<i>master mix</i>)	15 µl	15 µl iga
	Proov	5 µl	5 µl iga
	Kogumaht	20 µl	20 µl iga

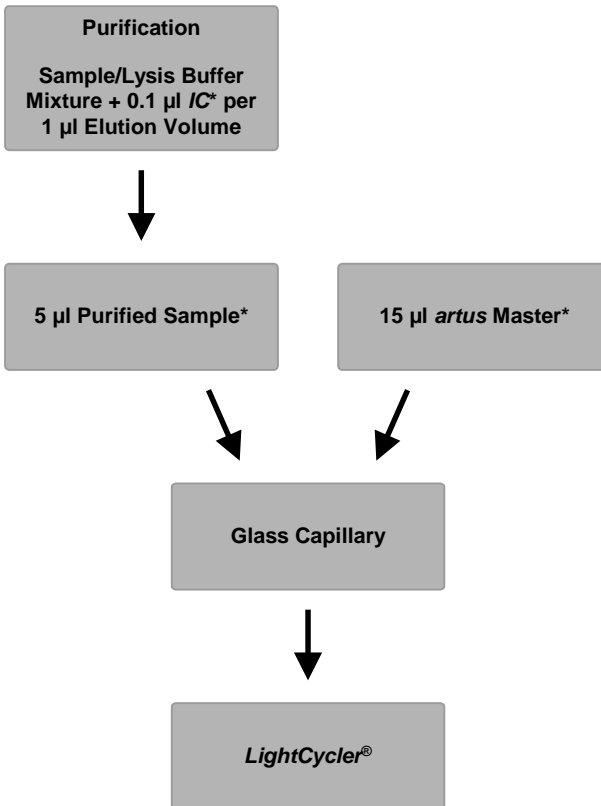
Kui te soovite kasutada sisemist kontrolli **üksnes selleks, et kontrollida võimalikku PCR-i pärssumist**, siis tuleb see lisada otse reagentidele *VZV LC Master*. Sellisel juhul järgige alltoodud pipeteerimisskeemi (ülevaatliliku skeemi vt joonisel 2).

	Proovide arv	1	12
1. Põhisegu (<i>master mix</i>) ettevalmistamine	<i>VZV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>VZV LC IC</i>	0.5 µl	6 µl
	Kogumaht	15.5 µl*	186 µl
2. PCR-analüüsi ettevalmistamine	Põhisegu (<i>master mix</i>)	15 µl	15 µl iga
	Proov	5 µl	5 µl iga
	Kogumaht	20 µl	20 µl iga

* The volume increase caused by adding the *Internal Control* is neglected when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

Pipeteerige 15 µl põhisegu iga kapillaari plastit reservuaari. Seejärel lisage 5 µl elueeritud proovi DNA-d. Kasutage positiivse kontrollina vastavalt 5 µl vähemalt ühte kvantitatiivset standardit (*VZV LC/TM QS 1–4*) ja negatiivse kontrollina 5 µl PCR-i kvaliteediga vett (*Water, PCR grade*). Sulgege kapillaarid. Segu liikumiseks plastreservuaarist kapillaari tsentrifuugige kapillaare sisaldavaid adaptereid lauatsentrifuugis kümme sekundit kiirusel maksimaalselt 400 x g (2000 rpm).

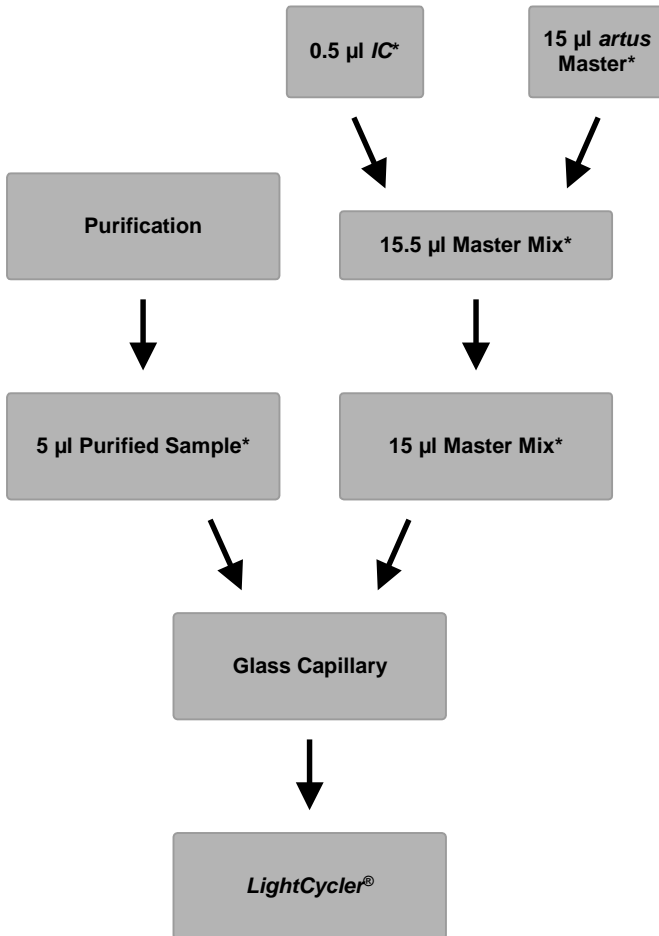
Sisemise kontrolli lisamine puhastamisprotseduuris.



Joonis 1. Töövo skeem puhastamisprotseduuri ja PCR-i pärssumise kontrolliks.

*Veenduge, et kõik lahused on täielikult üles sulanud, hoolikalt segatud ja lühiajaliselt tsentrifuugitud.

Sisemise kontrolli lisamine *artus* Masterile



Joonis 2. Töövoo skeem PCR-i pärssumise kontrolliks.

*Veenduge, et kõik lahused on täielikult üles sulanud, hoolikalt segatud ja lühiajaliselt tsentrifuugitud.

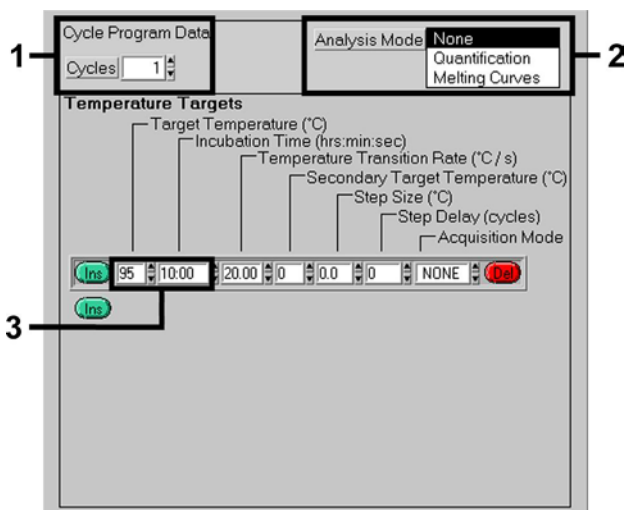
8.5 *LightCycleri* seadmete programmeerimine

8.5.1 *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme programmeerimine

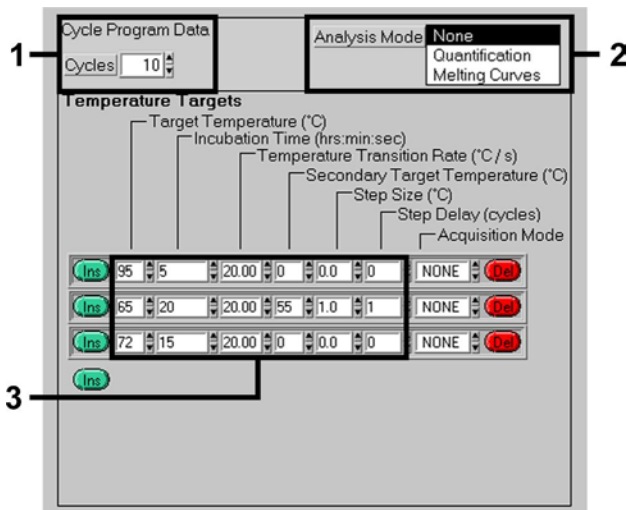
VZV DNA tuvastamiseks looge oma *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadmel temperatuuriprofiil järgneva viie punkti kohaselt (vt joonised 3–7).

- | | |
|--|----------|
| A. Hot-starti ensüümi algne aktiveerimine, | joonis 3 |
| B. Touchdowni etapp, | joonis 4 |
| C. DNA amplifitseerimine, | joonis 5 |
| D. Sulamisköver (valikuline), | joonis 6 |
| E. Jahutamine, | joonis 7 |

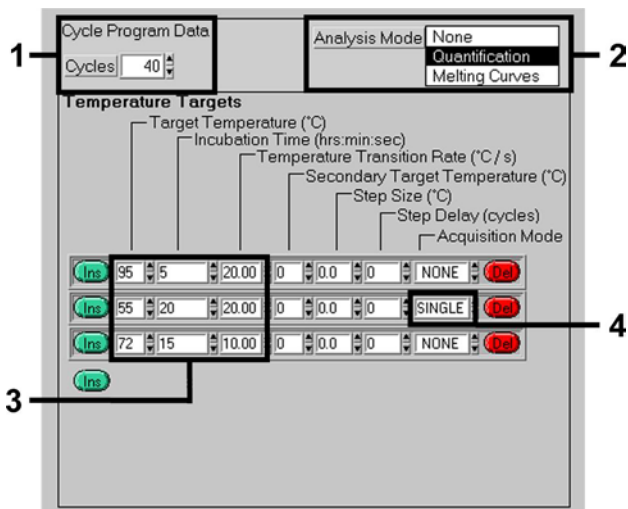
Pöörake erilist tähelepanu seadetele *Analysis Mode* (Analüüsirežiim), *Cycle Program Data* (Tsükli programmi andmed) ja *Temperature Targets* (Temperatuuri sihtmärgid). Need seaded on joonisel ümbritsetud jämeda musta joonega. Lisateavet *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme programmeerimise kohta leiате seadme kasutusjuhendist *LightCycler Operator's Manual*. Etapp D. PCR-i programmis on **valikuline** ja vajalik üksnes komplekti *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* kasutajatele HSV-1 ja HSV-2 eristamiseks.



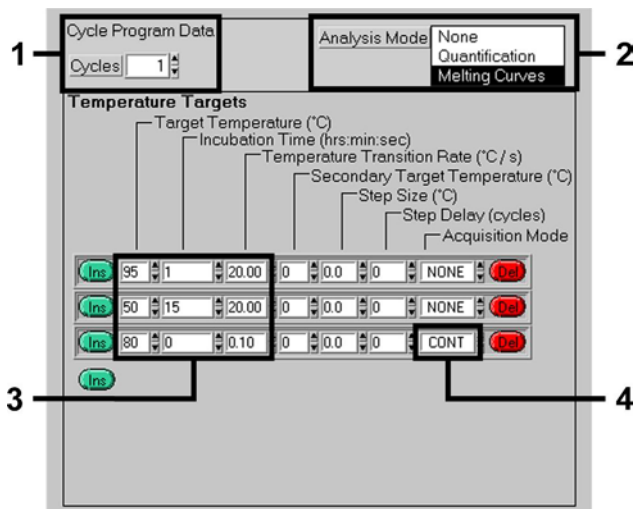
Joonis 3. Hot-starti ensüümi algne aktiveerimine.



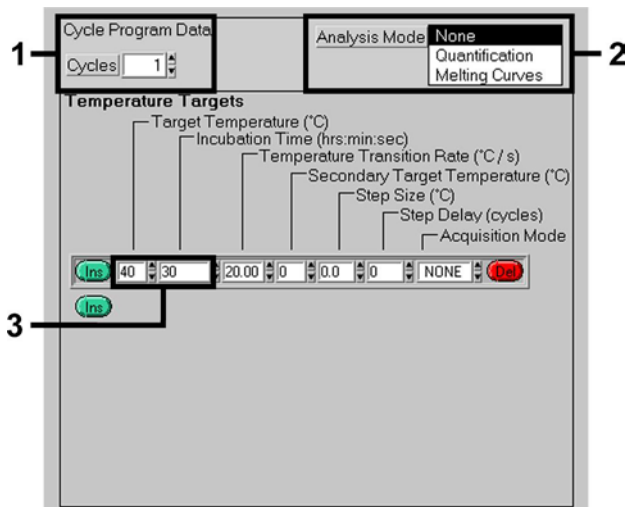
Joonis 4. Touchdown etapp.



Joonis 5. DNA amplifitseerimine.



Joonis 6. Sulamisköver.



Joonis 7. Jahutamine.

8.5.2 *LightCycler 2.0* seadme programmeerimine

PCR-analüüsi programmeerimiseks *LightCycler 2.0* seadmega aktiveerige peamenüüs valik *New (Uus)* ja valige *LightCycler Experiment*.

Järgnevalt looge VZV DNA tuvastamiseks oma *LightCycler 2.0* seadmel temperatuuriprofiil järgneva viie punkti kohaselt (vt tabel 1).

- A. Hot-starti ensüümi algne aktiveerimine
- B. Touchdowni etapp
- C. DNA amplifitseerimine
- D. Sulamisköver (**valikuline**)
- E. Jahutamine

Etapp D. PCR-i programmis on **valikuline** ja vajalik üksnes komplekti *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* kasutajatele HSV-1 ja HSV-2 eristamiseks.

Sisestage kõigepealt käesoleva PCR-i jaoks ettevalmistatud kapillaaride arv (*Max. Seek Pos.*, vt joonis 8).

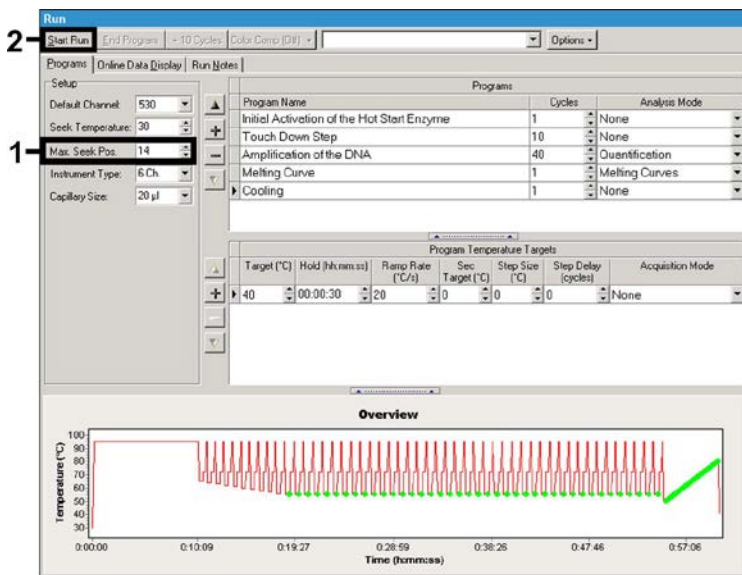
Tabel 1. Temperatuuriprofiili loomine.

Programm	Target [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Sec Target	Step Size [°C]	Step Delay [cycles]	Acq. Mode	Cycles	Analysis Mode
Aktiveeri- mine	95	00:10:00	20	0	0	0	None	1	None
Touch down	95	00:00:05	20	0	0	0	None	10	None
	65	00:00:20	20	55	1	1	None		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None		
DNA ampli- fikatsioon	95	00:00:05	20	0	0	0	None	40	Quanti- fication
	55	00:00:20	20	0	0	0	Single		
	72	00:00:15	20	0	0	0	None		
Sulamis- köver	95	00:00:01	20	0	0	0	None	1	Melting Curve
	50	00:00:15	20	0	0	0	None		
	80	00:00:00	0,1	0	0	0	Cont.		
Jahutamine	40	00:00:30	20	0	0	0	None	1	None

Proovi andmete sisestamiseks valige *Samples* (Proovid).

- Sisestage *Capillary View* (Kapillaari vaade) aknas esiteks planeeritud PCR-i preparatsioonide koguarv käesolevas tööseerias (*Sample Count*).

- Klõpsates *Sample Name* (Proovi nimi), saate määrata proovidele tähistused.
- Klõpsates *Selected Channels* (Vali kanalid), saate valida fluorestsentskanalid 530 analüütilise VZV PCR-i ja 705 sisemise kontrolli PCR-i tulemuste tuvastamiseks.
- Standardite defineerimiseks ja vastavate kontsentratsioonide määramiseks aktiveerige funktsioon *Analysis Type* (Analüüsitüüp) ja valige *Absolute Quantification* (Absoluutne kvantifitseerimine) (vt **8.3 Kvantifitseerimine**).
- Veenduge, et funktsioon *Enable Controls* (Aktiveeri kontrollid) **ei ole** aktiveeritud. Vastasel juhul on analüüsiseadete valimine andmeanalüüsiks piiratud (režiim *Fit Points* ei ole kasutatav, vt **9.2 PCR-i andmete analüüs LightCycler 2.0 seadmega**). *Target name* (Sihtmärgi nimi) alt saate ära määrata, millised sihtmärkjärjestused on vaja tuvastada (VZV või sisemine kontroll) valitud fluorestsentskanalites 530 ja 705. Tulba *Target name* (Sihtmärgi nimi) täitmise hõlbustamiseks võib kasutada funktsiooni *Auto Copy... Target name* defineerimine aitab küll saada paremat ülevaadet, kuid see ei ole andmeanalüüsiks otseselt vajalik.
- Standardkõvera loomiseks andmeanalüüsi tarvis peavad olema defineeritud kvantitatiivsed standardid koos vastavate kontsentratsioonidega. Seetõttu valige funktsiooni *Sample Type* (Proovi tüüp) alt *Standard* ja sisestage funktsiooni *Concentration* alt igale standardile vastav kontsentratsioon.
- Programmeeritud temperatuuriprofiili saab salvestada arvuti kõvakettale, nii et seda saab hiljem kasutada uute tööseeriade tarvis. Selleks aktiveerige funktsioon *Save As...* (Salvesta kui...) menüü *File* alt, pärast mida ilmub uus aken. Valige menüü *Templates and Macros* (Mallid ja makrod) alt alammenüü *Run Templates* (Tööseeria mallid) ja salvestage andmed sobiva nimetuse all.
- PCR-i tööseeria alustamiseks liikuge väljale *Run* (Tööseeria) ja aktiveerige funktsioon *Start Run* (Käivita tööseeria) (vt joonis 8). PCR-i programm käivitub pärast andmete salvestamise sihtkoha sisestamist



Joonis 8. PCR tööseeria käivitamine.

9. Andmeanalüüs

9.1 PCR-i andmete analüüs *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadmel

LightCycler 1.1/1.2/1.5 seadme abil kogutud PCR-i andmete analüüsiks soovime kasutada *LightCycleri* tarkvaraversiooni 3.5.

Mitmevärvilise analüüsi korral tekib fluorimeetris kanalite vaheline interferents. *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme tarkvara sisaldab nende interferentside kompenseerimiseks faili *Color Compensation File* (Värvuse kompenseerimise fail). Avage see fail enne PCR-i, selle ajal või lõpus, klõpsates nupul *Choose CCC File* (Vali CCC fail) või *Select CC Data* (Vali CC andmed). Kui *Color Compensation File* ei ole installitud, looge see fail kasutusjuhendi *LightCycler Operator's Manual* juhiste. Pärast faili *Color Compensation File* aktiveerimist ilmuvad fluorimeetri kanalites F1, F2 ja F3 eraldi signaalid. Komplekti *artus VZV LC PCR Kit* abil saadud PCR-i tulemuste analüüsiks valige ekraanil

vastavalt analüütilise VZV PCR-i jaoks F1/F2 ja sisemise kontrolli PCR-i jaoks F3/Back-F1. Kvantitatiivsete tööseeriade analüüsimiseks järgige juhiseid, mis on välja toodud peatükis **8.3 Kvantifitseerimine**, ja **tehnilises märkuses *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0* seadme kvantifitseerimise kohta** veebilehel www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Kui te integreerisite PCR-i tööseeriasse enam kui ühe Herpes *artus*süsteemi, tuleb neid erinevaid süsteeme analüüsida eraldi, kasutades vastavaid kvantitatiivseid standardeid. Valige analüüsiks vastavad rootoripositsioonid.

Võimalikud tulemused

1. Signaal fluorimeetri kanalis F1/F2.

Analüüsi tulemus on positiivne: proov sisaldab VZV DNA-d.

Sellisel juhul pole signaali tuvastamine F3/Back-F1 kanalis vajalik, sest VZV DNA algsed suured kontsentratsioonid (positiivne signaal F1/F2 kanalis) võivad põhjustada sisemise kontrolli fluorestsentsignaali vähenemist või kadu F3/Back-F1 kanalis (konkurents).

2. Fluorimeetri kanalis F1/F2 ei tuvastata signaali. Samas on tuvastatav sisemise kontrolli signaal F3/Back-F1 kanalis.

VZV DNA ei ole proovis tuvastatav. Tulemust võib lugeda negatiivseks.

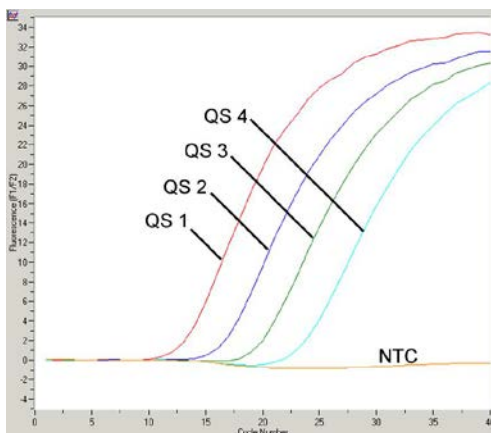
Negatiivse VZV PCR-i puhul välistab tuvastatud sisemise kontrolli signaal PCR-i pärssumise.

3. F1/F2 ega F3/Back-F1 kanalis ei ole signaal tuvastatav.

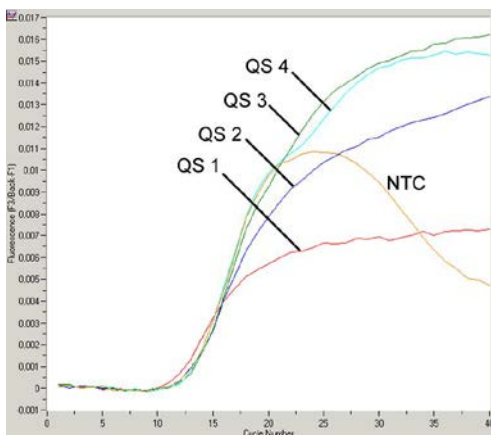
Diagnoosi ei ole võimalik määrata.

Teavet võimalike vigade allikate ja lahenduste kohta võib leida peatükis **10. Tõrkeotsing**.

Vt näiteid positiivsete ja negatiivsete PCR-i reaktsioonide kohta jooniselt 9 ja jooniselt 10.



Joonis 9. Kvantitatiivsete standardite (VZV LC/TM QS 1–4) tuvastamine *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme fluorimeetri kanalis F1/F2. NTC: *nontemplate control* (negatiivne kontroll).



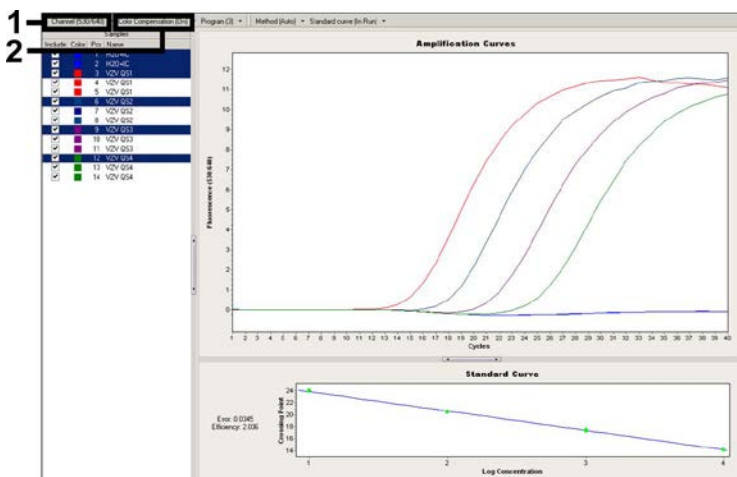
Joonis 10. Sisemise kontrolli (IC) tuvastamine *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme fluorimeetri kanalis F3/Back-F1 ja samaaegne kvantitatiivsete standardite (VZV LC/TM QS 1–4) amplifitseerimine. NTC: *nontemplate control* (negatiivne kontroll). Piiratud värvikompensatsioonist tingituna tungivad sisemise kontrolli signaalid F3 kanalis esile, kattes F1 kanali positiivsed signaalid. Sellisel juhul ei ole kõrgepositiivsete proovimaterjalide või kontrollide sisemise kontrolli signaalide (F3) analüüs võimalik.

9.2 PCR-i andmete analüüs *LightCycler 2.0* seadmel

LightCycler 2.0 seadme abil kogutud PCR-i andmete analüüsiks soovitame kasutada *LightCycleri* tarkvara versiooni 4.0. Pidage kinni kasutusjuhendis *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual Version 4.0*. antud juhistest.

PCR-i andmete analüüsiks tegutsege järgmiselt (vt joonis 11).

- Aktiveerige funktsioon *Analysis* (Analüüs) menüüribal ja valige *Absolute Quantification* (Absoluutne kvantifikatsioon). Põhimõtteliselt peab kõiki *artus LC PCR Kiti* komplektiga loodud amplifitseerimisandmeid analüüsima selle funktsiooni abil.
- *LightCycleri* seadme tarkvara 4.0 sisaldab faili *Color Compensation File* (Värvuse kompenseerimise fail), mis kompenseerib mitmevärvianalüüsis fluorestsentskanalite vahelisi interferentse. Avage see fail PCR-i ajal või selle lõpus, klõpsates nupule *Color Comp (On/Off)* (Värvuse komp. sees/väljas) ja seejärel *Select Color Compensation* (Vali värvuse kompenseerimine) (vt joonis 11). Kui *Color Compensation File* ei ole installitud, looge see fail vastavalt kasutusjuhendi *LightCycler Operator's Manual* instruksioonidele.
- Pärast faili *Color Compensation File* aktiveerimist ilmuvad fluorimeetri kanalites eraldi signaalid. Komplekti *artus VZV LC PCR Kit* abil saadud PCR-i tulemuste analüüsiks valige ekraanil vastavalt analüütilise VZV PCR-i jaoks 530/640 ja sisemise kontrolli PCR-i jaoks 705/Back 530.



Joonis 11. Faili *Color Compensation File* aktiveerimine ja fluorestsentskanalite valik.

Kvantitatiivsete tööseriate analüüsimiseks järgige juhiseid, mis on välja toodud peatükis **8.3 Kvantifitseerimine**, ja tehnilises märkuses **LightCycler 1.1/1.2/1.5** või **LightCycler 2.0** seadme kvantifitseerimise kohta veebilehel www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Kui analüüs on seadistatud, on võimalikud järgnevad tulemused.

1. Signaal fluorestsentskanalis 530/640.

Analüüsi tulemus on positiivne: proov sisaldab VZV DNA-d.

Sellisel juhul pole signaali tuvastamine 705/Back 530 kanalis vajalik, sest VZV DNA algused suured kontsentratsioonid (positiivne signaal 530/640 kanalis) võivad põhjustada sisemise kontrolli fluorestsentssignaali vähenemist või kadu 705/Back 530 kanalis (konkurents).

2. Signaal fluorestsentskanalis 530/640 puudub. Samas on tuvastatav sisemise kontrolli signaal 705/Back 530 kanalis.

VZV DNA ei ole proovis tuvastatav. Tulemust võib lugeda negatiivseks.

Negatiivse VZV PCR-i puhul välistab tuvastatud sisemise kontrolli signaal PCR-i pärssumise.

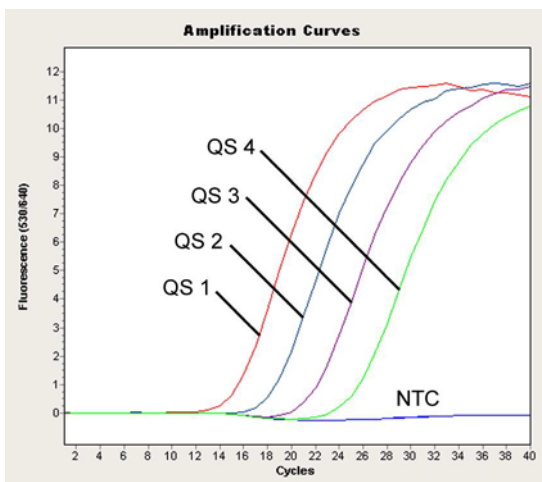
- 530/640 ega 705/Back 530 kanalid ei ole signaalituvastatavad.

Diagnoosi ei ole võimalik määrata.

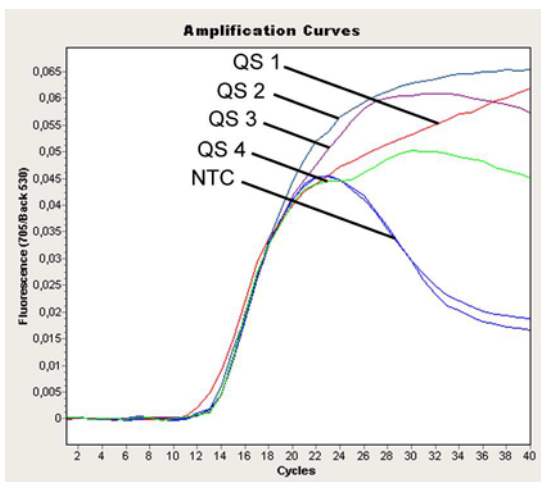
Teavet võimalike vigade allikate ja lahenduste kohta võib leida peatükis

10. Tõrkeotsing.

Vt näiteid positiivsete ja negatiivsete PCR-i reaktsioonide kohta jooniselt 12 ja jooniselt 13.



Joonis 12. Kvantitatiivsete standardite (VZV LC/TM QS 1–4) tuvastamine LightCycler 2,0 seadme fluorimeetri kanalid 530/640. NTC: nontemplate control (negatiivne kontroll).



Joonis 13. Sisemise kontrolli (IC) tuvastamine *LightCycler 2.0* seadme fluorimeetri kanalis 705/Back 530 ja samaaegne kvantitatiivsete standardite (*VZV LC/TM QS 1–4*) amplifitseerimine. NTC: *nontemplate control* (negatiivne kontroll).

10. Tõrkeotsing

Positiivsete kontrollide (*VZV LC/TM QS 1–4*) signaal fluorestsentskanalis F1/F2 või 530/640 puudub:

- PCR-i andmeanalüüsiks valitud fluorestsentskanal ei vasta protokollile.
 - Andmeanalüüsi tegemisel valige analüütilise VZV PCR-i jaoks fluorestsentskanal F1/F2 või 530/640 ja sisemise kontrolli PCR-i jaoks F3/Back-F1 või 705/Back 530.
- *LightCycler 1.1/1.2/1.5* või *LightCycler 2.0* seadme temperatuuriprofiili ebakorrekne programmeerimine.
 - Võrrelge temperatuuriprofiili protokolliga (vt **8.5 LightCycleri seadme programmeerimine**).
- PCR-i ebakorrekne konfiguratsioon.
 - Kontrollige punkthaaval üle oma töövoog, kas kõik vastab pipeteerimisskeemile (vt **8.4 PCR-i ettevalmistamine**) ja vajaduse korral korrake PCR-i.

- Komplekti ühe või enama komponendi säilitamistingimused ei vasta peatükis **2 Säilitamine** antud juhistele või on komplekt *artus VZV LC PCR Kit* aegunud.
 - Kontrollige säilitamistingimusi ja reagentide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ja kasutage vajaduse korral uut komplekti.

Sisemise kontrolli signaal fluorimeetri kanalis F3/Back-F1 või 705/Back 530 on nõrk või puudub ja samas puudub signaal kanalis F1/F2 või 530/640:

- PCR-i tingimused ei vasta protokollile.
 - Kontrollige PCR-i tingimusi (vt eestpoolt) ja vajaduse korral korrake PCR-i parandatud seadetega.
- PCR oli pärssunud.
 - Veenduge, et te kasutate soovitatud eraldamismeetodit (vt **8.1 DNA eraldamine**) ja järgige täpselt tootjapoolseid juhiseid.
 - Veenduge, et DNA eraldamise käigus tsentrifuugisite proovi enne elueerimist veel üks kord, et eemaldada võimalikud etanoolijäägid (nagu on soovitatud peatükis **8.1 DNA eraldamine**).
- DNA kadu ekstraktsiooni käigus.
 - Kui ekstraktsioonisegule on lisatud sisemine kontroll, viitab sisemise kontrolli signaali puudumine DNA kaole ekstraheerimise käigus. Veenduge, et te kasutate soovitatud eraldamismeetodit (vt **8.1 DNA eraldamine**) ja järgige täpselt tootjapoolseid juhiseid.
- Komplekti ühe või enama komponendi säilitamistingimused ei vasta peatükis **2 Säilitamine** antud juhistele või on komplekt *artus VZV LC PCR Kit* aegunud.
 - Kontrollige säilitamistingimusi ja reagentide aegumistähtaega (vt komplekti etiketti) ja kasutage vajaduse korral uut komplekti.

Negatiivsete kontrollide signaalid analüütilise PCR-i fluorestsentskanalis F1/F2 või 530/640.

- PCR-i ettevalmistamine käigus toimus saastumine.
 - Korrake PCR-i uute reagentidega, paralleelproovidega.

- Võimaluse korral sulgege PCR-i katsutid vahetult pärast analüüsitava proovi lisamist.
- Pipeteerige positiivsed kontrollid alati viimasena.
- Veenduge, et tööruume ja seadmeid puhastatakse saastusest korrapäraste ajavahemike tagant.
- Ekstraktsiooni käigus toimus saastumine.
 - Korrake analüüsitava proovi ekstraktsiooni ja PCR-i kasutades uusi reagente.
 - Veenduge, et tööruume ja seadmeid puhastatakse saastusest korrapäraste ajavahemike tagant.

Kui teil on lisaküsimusi või esineb probleeme, võtke ühendust meie tehnilise toega.

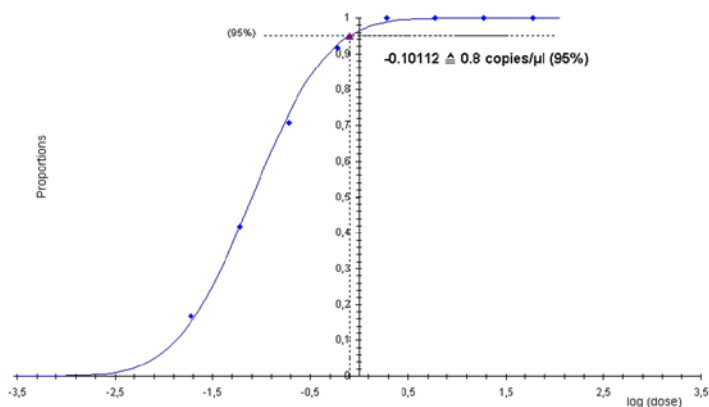
11. Tehnilised andmed

11.1 Analüütiline tundlikkus

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit analüütilise tundlikkuse kindlakstegemiseks valmistati ette standardlahuste seeria vahemikus 60 kuni nominaalne 0,019 VZV koopiat ekvivalenti/μl ning tehti analüüs *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadmel komplekti *artus* VZV LC PCR Kit. Katse viidi läbi kolmel erineval päeval kaheksa paralleelprooviga. Tulemused määrati kindlaks probitanalüüsi abil. Probitanalüüsi on kujutatud joonisel 14. Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit analüütiline avastamispiir kombineerituna *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadmega on järjepidevalt 0,8 koopiat/μl ($p = 0,05$). See tähendab, et 0,8 koopiat/μl tuvastatakse 95 %-lise tõenäosusega.

* Standardiks on kloneeritud PCR-i produkt, mille kontsentratsioon on kindlaks määratud neeldumis- ja fluorestsentspektroskoopia abil.

Probitanalüüs: *Varicella zoster*i viirus (*LightCycler 1.1/1.2/1.5*)



Joonis 14. Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit analüütiline tundlikkus *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadmel.

11.2 Spetsiifilisus

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit spetsiifilisus on tagatud eelkõige praimerite ja sondide valikuga ning rangete reaktsioonitingimuste valikuga. Praimereid ja sonde analüüsiti, võrreldes nende järjestusi geenipankades avaldatud järjestustega, et kontrollida võimalike homologiate olemasolu. Seega on tagatud kõikide tähtsate tüvede tuvastamine.

Lisaks valideeriti spetsiifilisus 30 erineva VZV suhtes negatiivse tserebrospinaalvedeliku proovi abil. Nende puhul ei tuvastatud VZV LC *Masterisse* kuuluvate VZV spetsiifiliste praimerite ja sondide kasutamisel ühtegi signaali.

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit spetsiifilisuse kindlakstegemiseks kontrolliti järgnevas tabelis (vt tabel 2) loetletud kontrollrühma ristreaktiivsuse suhtes. Ükski testitud patogeenidest polnud reaktiivne.

Tabel 2. Komplekti spetsiifilisuse kontroll potentsiaalselt ristreaktiivsete patogeenide suhtes.

Kontrollrühm	VZV (F1/F2 või 530/640)	Sisemine kontroll (F3/Back-F1 või 705/Back 530)
Inimese herpesviirus - 1 (lihtherpesviirus 1)	–	+
Inimese herpesviirus - 2 (lihtherpesviirus 2)	–	+
Inimese herpesviirus 4 (Epsteini-Barri viirus)	–	+
Inimese herpesviirus 5 (tsütomegaloviirus)	–	+
Inimese herpesviirus 6A	–	+
Inimese herpesviirus 6B	–	+
Inimese herpesviirus 7	–	+
Inimese herpesviirus 8 (Kaposi sarkoomiga seostatud herpesviirus)	–	+

11.3 Täpsus

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit täpsust iseloomustavad andmed koguti *LightCycler 1.1/1.2/1.5* seadme abil ja need võimaldavad määrata kindlaks analüüsi kogudispersiooni. Kogudispersioon sisaldab **analüüsisisest varieeruvust** (sama kontsentratsiooniga proovide mitme tulemuse varieeruvust sama eksperimendi käigus), **analüüsidevahelist varieeruvust** (erinevate operaatorite poolt erinevatel sama tüüpi seadmetel samas laboratooriumis läbi viidud analüüsi mitme tulemuse varieeruvus) ja **partiidevahelist varieeruvust** (analüüsi mitme tulemuse varieeruvus kasutades erinevaid partisiidid). Saadud andmeid kasutati spetsiifilise patogeeni ja sisemise kontrolli PCR-i standardhälbe, dispersiooni ja variatsioonikoefitsiendi kindlaksmääramiseks.

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit täpsust iseloomustavad andmed on kogutud, kasutades väikseima kontsentratsiooniga kvantitatiivset standardit (QS 4; 10 koopiat/µl). Katse viidi läbi kaheksa paralleelprooviga. Täpsust iseloomustavate andmete arvutamine põhines amplifikatsioonikõverate Ct-väärtustel (Ct: lävetsükkel, vt tabel 3). Veel määrati kvantitatiivsete tulemuste täpsust iseloomustavad andmed suhtarvuna koopiat/µl, kasutades vastavaid Ct-väärtusi (vt tabel 4) Neil tulemustel põhinevana on iga antud proovi üldine statistiline hajuvus eelmainitud kontsentratsioonil 0,88 % (Ct) või 11,40 %

(konts.), sisemise kontrolli tuvastamiseks 1,26 % (Ct). Need väärtused põhinevad kõikide üksikväärtuste kindlaksmääratud varieeruvuste summal.

Tabel 3. Ct-väärtustel põhinevad täpsust iseloomustavad andmed.

	Standardhälve	Dispersioon	Variatsioonikordaja [%]
Analüüsisisene varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Analüüsisisene varieeruvus: Sisemine kontroll	0,04	0,00	0,33
Analüüsidevaheline varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	0,17	0,03	0,75
Analüüsidevaheline varieeruvus: Sisemine kontroll	0,09	0,01	0,69
Partiidevaheline varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,89
Partiidevaheline varieeruvus: Sisemine kontroll	0,15	0,02	1,16
Koguvareeruvus: VZV LC/TM QS 4	0,21	0,04	0,88
Koguvareeruvus: Sisemine kontroll	0,16	0,03	1,26

Tabel 4. Kvantitatiivsetel tulemustel põhinevad täpsust iseloomustavad andmed (koopiat/ μ l).

	Standardhälve	Dispersioon	Variatsioonikordaja [%]
Analüüsisisene varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	1,33	1,77	13,19
Analüüsidevaheline varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	0,97	0,94	9,66
Partiidevaheline varieeruvus: VZV LC/TM QS 4	1,29	1,67	12,83
Koguvareeruvus: VZV LC/TM QS 4	1,15	1,32	11,40

11.4 Robustsus

Robustsuse kontroll võimaldab kindlaks määrata komplekti *artus* VZV LC PCR Kit kogu tõrkemäära. 30 VZV suhtes negatiivset tserebrospinaalvedeliku proovi tembiti elueerimislahusega, mis sisaldas VZV kontroll-DNA-d, mahus

2,1 koopiat/ μ l (kolmekordne analüütilise tundlikkuspiiri kontsentratsioon). Pärast ekstraheerimist komplektiga QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN; vt **8.1 DNA eraldamine**) analüüsiti neid proove komplekti *artus* VZV LC PCR Kit abil. Kõikide VZV proovide tõrkemäär oli 0%. Lisaks hinnati 30 VZV suhtes negatiivse tserebrospinaalvedeliku proovi puhastamise ja analüüsi teel sisemise kontrolli robustsust. Kogu tõrkemäär oli 0%. Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit robustsus on seega $\geq 99\%$.

11.5 Taastatavus

Taasteandmed võimaldavad pidevalt hinnata komplekti *artus* VZV LC PCR Kit tulemuslikkust ja selle tõhusust võrreldes teiste toodetega. Need andmed on saadud kindlates pädevusprogrammides osalemisel.

11.6 Diagnostiline hindamine

Komplektiga *artus* VZV LC PCR Kit viiakse käesoleval ajal läbi hindamisuuringute seeriat.

12. Toote kasutuspiirangud

- Kõiki reagente võib kasutada üksnes *in vitro* diagnostikaks.
- Toodet võib käsitseda üksnes spetsiaalselt *in vitro* diagnostika protseduuride osas väljaõppe saanud (EN375) personal.
- Optimaalsete PCR-i tulemuste saavutamiseks on tähtis kasutamishendis välja toodud juhiste range järgimine.
- Tähelepanu tuleb pöörata kõigi komponentide karpidele ja etikettidele trükitud aegumistähtsadele. Ärge kasutage kõlblikkusaja ületanud komponente.

13. Ohutusteave

Komplekti *artus* VZV LC PCR Kit ohutusteave on saadaval vastaval ohutuskaardil (SDS), mille leiate mugava ja kompaktses PDF-formaadis faili kujul veebilehelt www.qiagen.com/safety.

14. Kvaliteedikontroll

QIAGEN-i ISO 9001 ja ISO 13485 sertifikaadiga kvaliteedihalduse süsteemi kohaselt on iga komplekti *artus* VZV LC PCR Kit partiid testitud eelnevalt määratud nõuete kohaselt, et tagada toote ühtlane kvaliteet.

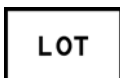
15. Viited

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

16. Sümbolite seletus



Kõlblikusaeg



Partii number



Tootja



Kataloogi number



Materjali number



Käsiraamat



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



<N>

Sisaldab piisavalt <N> testi jaoks



Globaalne kaubaartikli number



Temperatuuri piirväärtused



Kvantitatiivne standard

Sisemine kontroll

See lehekülg on tahtlikult tühjaks jäetud.

See lehekülg on tahtlikult tühjaks jäetud.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgia ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brasiilia ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Kanada ■ techservice-ca@qiagen.com

Hiiina ■ techservice-cn@qiagen.com

Taani ■ techservice-nordic@qiagen.com

Soome ■ techservice-nordic@qiagen.com

Prantsusmaa ■ techservice-fr@qiagen.com

Saksamaa ■ techservice-de@qiagen.com

Hongkong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Iirimaa ■ techservice-uk@qiagen.com

Itaalia ■ techservice-it@qiagen.com

Jaapan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luksemburg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mehhiko ■ techservice-mx@qiagen.com

Madalmaad ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norra ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapur ■ techservice-sg@qiagen.com

Rootsi ■ techservice-nordic@qiagen.com

Šveits ■ techservice-ch@qiagen.com

Ühendkuningriik ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

