

# LightCycler® VZV Qual Kit

## Uživatelská příručka

04 846 788 001

Pro diagnostiku *In Vitro*

Tento výrobek využívá technologii Scorpion licencovanou společností DxS pro diagnostické použití in vitro u člověka.



affigene





---

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvodní informace o LightCycler® VZV Qual Kit</b> .....	5
<b>2</b>	<b>Požadavky na vzorky a kontrolní materiál</b> .....	6
2.1	Požadavky na vzorek .....	6
2.2	Kontrola kvality .....	6
<b>3</b>	<b>Potřebný materiál</b> .....	8
3.1	Složení reagenční soupravy .....	8
3.2	Potřebný materiál, který není součástí soupravy .....	9
<b>4</b>	<b>Upozornění a bezpečnostní zásady</b> .....	11
<b>5</b>	<b>Pracovní postup</b> .....	14
<b>6</b>	<b>Přístroj LightCycler® 2.0</b> .....	16
6.1	Úvodní informace o přístroji LightCycler® 2.0 .....	16
6.2	Příprava přístroje LightCycler® 2.0 .....	17
6.2.1	Dříve než začnete .....	17
6.2.2	Spuštění analýzy s LightCycler® 2.0 .....	18
6.3	Analýza dat v softwaru LightCycler® verze 4.05 nebo vyšší. ....	19
6.3.1	Dříve než začnete .....	19
6.3.2	Interpretace výsledků .....	19
<b>7</b>	<b>Charakteristiky stanovení LightCycler® VZV Qual Kit</b> .....	21
<b>8</b>	<b>VZV nemoc a diagnosa</b> .....	23
<b>9</b>	<b>Definice parametrů real-time PCR</b> .....	24
	<b>Odkazy</b> .....	25



# 1 Úvodní informace o LightCycler® VZV Qual Kit

## Co je LightCycler® VZV Qual Kit?

LightCycler® VZV Qual Kit je test pro diagnostiku *in vitro*, který využívá real-time PCR amplifikaci nukleových kyselin pro detekci DNA Virus Varicella zoster sp. (VZV) v lidských klinických vzorcích.

## Co je součástí této soupravy?

LightCycler® VZV Qual Kit zahrnuje všechny potřebné reagenty pro úplnou analýzu pro VZV od zesílení po analýzu výsledků.

## Tato uživatelská příručka

Tato uživatelská příručka popisuje postup amplifikace, detekce a analýzy.

**Reference:** Informace o přípravě vzorku naleznete ve zvláštní příloze pro High Pure Viral Nucleic Acid Kit, která je dodávána s touto sadou.

## Popis postupu testu

Tato tabulka popisuje různé fáze postupu testování.

Fáze	Popis
Příprava vzorku	Klinické vzorky musí být připraveny pomocí sady High Pure Viral Nucleic Acid Kit. <b>Poznámka:</b> Musí se použít uživatelská příručka "Zvláštní příloha pro High Pure Viral Nucleic Acid Kit" dodaný pro tuto sadu.
Příprava amplifikace	Amplifikace se provádí podle pokynů v této uživatelské příručce.
Amplifikace/detekce a analýza výsledků	Vzorky mohou být zesíleny, detekovány a analyzovány na přístroji LightCycler® 2.0. <b>Reference:</b> Podrobný popis v části věnované přístroji LightCycler® 2.0.

## Určení soupravy

LightCycler® VZV Qual Kit je určen pro sledování DNA viru VZV ve vzorcích lidské cerebrospinální tekutiny (CSF) nebo vezikulárního materiálu (výtěry ve fyziologickém roztoku) za využití High Pure Viral Nucleic Acid Kit, přístroje LightCycler® 2.0 a této sady v souladu s pracovním postupem. Je to test pro diagnostiku *in vitro*, který využívá zesílení PCR nukleových kyselin pro detekci DNA viru VZV.

**Není určeno pro vyšetření krve.** LightCycler® VZV Qual Kit není určen pro vyšetření krve nebo krevních produktů na přítomnost Virus Varicella zoster.

**Pro profesionální použití** LightCycler® VZV Qual Kit je určen pouze pro použití odborně způsobilými nebo řádně vyškolenými pracovníky.

---

## 2 Požadavky na vzorky a kontrolní materiál

### 2.1 Požadavky na vzorek

---

**Požadavky na vzorek pacienta** LightCycler® VZV Qual Kit je určen pro použití se vzorky lidských vezikulárních výtěrů a CSF.

---

**Doporučená média pro výtěry** Pro výtěry jsou doporučeny zkumavky jiná přenosová média na bázi fyziologického roztoku.

---

**Interní kontrola při přípravě vzorku** Interní kontrola je vždy zahrnuta během přípravy vzorku.  
**Reference:** Zvláštní příloha pro uživatelskou příručku pro High Pure Viral Nucleic Acid Kit obsažený v této sadě LightCycler® VZV Qual Kit.

---

**Skladování eluentů** Eluenty mohou být uchovávány při +2 až +8 °C až tři dny před analýzou nebo při -15 až -25 °C až tři týdny před analýzou.

---

### 2.2 Kontrola kvality

---

**Interní kontrola u produktu Light-Cycler® VZV Qual Kit** Interní kontrola je do klinických vzorků zavedena během přípravy vzorku. Interní kontrola je amplifikována ve stejné reakční zkumavce jako vzorek. Pokud není naměřen žádný signál u interní kontroly a žádný signál u klinického vzorku, musí být celý postup zopakován, aby byly získány spolehlivé výsledky.

---

**Kontrola slepým vzorkem (NTC)** Kontrola slepým vzorkem (NTC) je součástí postupu a provádí se paralelně s klinickými vzorky.

NTC je spojena s interní kontrolou zaváděnou během přípravy vzorku. Reakce NTC musí vést k signálu pro interní kontrolu. Pokud je zjištěn signál pro cílovou látku, je celé stanovení neplatné a musí být zopakováno s čerstvě připravenými vzorky a NTC.

**Poznámka:** NTC musí být zařazena při každé analýze LightCycler® VZV Qual Kit.

---

**Pozitivní kontrola** Pozitivní kontrola (PC) LightCycler® VZV se používá pro určení treshold u sledovaného signálu a kontrolu platnosti analýzy.

---

---

**Poznámka:** LightCycler® VZV PC musí být zařazena při každé analýze LightCycler® VZV Qual Kit.

---

**Selektivní amplifikace  
UDG**

Selektivní amplifikace (prevence vzájemné kontaminace) cílové nukleové kyseliny z klinických vzorků se dosahuje použitím uracil-DNA-glykosylázy (UDG) a přívodem deoxyuridin trifosfátu (dUTP) místo deoxythymidin trifosfátu (dTTP) v master mixu <sup>[1]</sup>. UDG rozpoznává a katalyzuje destrukci DNA vláken obsahující dUTP, nikoli však DNA s obsahem dTTP. To vede k potlačení schopnosti amplifikace kontaminujících amplikonů náchylných k destrukci UDG před amplifikací cílové DNA.

V inkubačním kroku před termálním cyklem jsou DNA řetězce zlomeny na pozici dUTP, čímž je zajištěno, že jsou všechny kontaminující amplikony potlačeny a nebudou zesíleny. Během denaturačního kroku je UDG deaktivována při vysoké teplotě, a nemůže tedy zničit cílové amplikony.

---

**Volitelně: pozitivní  
virový materiál**

Celý proces od přípravy vzorku po získání výsledku je možné kontrolovat pomocí virového materiálu VZV (kompletní viry) z QCMD panelů ([www.qcmd.org](http://www.qcmd.org))

---

## 3 Potřebný materiál

### 3.1 Složení reagenční soupravy

#### Obsah a uspořádání soupravy

Sada obsahuje reagenty pro analýzu maximálně 72 klinických vzorků. Součástí jsou všechny reagenty pro zesilování a detekci, včetně kontrolních látek. Optimální rozsah stanovení pro tuto sadu je 12 klinických vzorků nebo násobek 12. Sada může být proto použita až na šest samostatných stanovení. Každý reagent je proto dodáván v šesti samostatných zkumavkách, které jsou rozděleny na tři kontrolní a tři detekční sady.

**Reference:** 5 Pracovní postup

#### Obsah produktu LightCycler® VZV Control Set (kontrolní sada)

Tato tabulka uvádí obsah každé sady LightCycler® VZV Control Set (kontrolní sada) a celkový počet zkumavek v kompletní soupravě LightCycler® VZV Qual Kit.

**Table 3.1** Obsah produktu LightCycler® VZV Control Set (kontrolní sada)

Položka	Popis	Objem zkumavky	Počet zkumavek/kontrolní sada	Celkový počet zkumavek v soupravě LightCycler® VZV Qual Kit
LightCycler® VZV PC	VZV DNA fragment v pufrčním roztoku.	10 µl	2	6
LightCycler® DNA NTC	Pufrční roztok neobsahující sekvence VZV sp.	200 µl	2	6
LightCycler® DNA IC	Tlumič roztok obsahující neinfekční syntetickou DNA s IC sekvencemi.	78 µl	2	6

#### Obsah produktu LightCycler® VZV Detection Set (kontrolní sada)

Tato tabulka uvádí obsah každé sady LightCycler® VZV Detection Set (kontrolní sada) a celkový počet zkumavek v kompletní soupravě LightCycler® VZV Qual Kit.

**Table 3.2** Obsah produktu LightCycler® VZV Detection Set (kontrolní sada)

Položka	Popis	Objem zkumavky	Počet zkumavek/dekční sada	Celkový počet zkumavek v soupravě LightCycler® VZV Qual Kit
LightCycler® VZV MMx	Tlumicí roztok obsahující nukleotidy, primery/sondu, UDG a DNA polymerázu.	80 µl	2	6
LightCycler® Mg 18	Roztok obsahující chlorid hořečnatý, BSA, trihalozu a Tween 20.	80 µl	2	6
Směšovací zkumavka	Prázdná zkumavka pro přípravu pracovní matice. <b>Poznámka:</b> Mohou se použít i jiné podobné zkumavky.	N/A	2	6

**Podmínky skladování** Dodané reagenty je možné před použitím skladovat při teplotě -15 až -25 °C. Alternativně mohou být všechny reagenty s výjimkou LightCycler® VZV MMx a LightCycler® Mg 18 skladovány při teplotě +2 až +8 °C.

**Poznámka:** LightCycler® VZV MMx a LightCycler® Mg 18 se musí před použitím skladovat při teplotě -15 až -25 °C.

## 3.2 Potřebný materiál, který není součástí soupravy

**Položky, které nejsou obsaženy v této soupravě** Následující položky nejsou součástí soupravy, ale jsou nutné pro provedení analýzy:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit. (kat. č. 11 858 874 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

**Poznámka:** Požadované značení CE musí platit v celém postupu. Sada se musí používat společně se zvláštními přílohami pro LightCycler® VZV Qual Kit.

- Přístroj LightCycler® 2.0 (kat. č. 03 531 414 201; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) s výrobním číslem 1415001 a vyšším se softwarem verze 4.05 (build 415) nebo vyšší.

**Poznámka:** Přístroje s nižším výrobním číslem by měly být nejprve schváleny pro použití s IVD se speciální aktualizací. Kontaktujte svou místní zákaznickou podporu, potřebujete-li informace o postupu aktualizace.

- 
- LightCycler® VZV Qual Kit Macro CD-ROM verze 2.0 (kat. č. 04 847 130 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).
  - LC Carousel Centrifuge 2.0 (kat. č. 03 709 582 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).
  - Spotřební materiál pro přístroj LightCycler® 2.0 LightCycler® Kapiláry (20 µl) (kat. č. 11 909 339 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).
  - LW Color Compensation Kit (kat. č. 04 847 148 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).
  - LW Color Compensation Kit Macro CD-ROM (kat. č. 04 847 121 001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).
  - Mikropipety s aerosolovou přepážkou, zalepenou špičkou nebo systémem aktivního vypuzování (200 and 50 µl).
  - Jednorázové ochranné rukavice (bez pudru)
-

---

## 4 Upozornění a bezpečnostní zásady

---

- Všeobecná laboratorní praxe**
- Nepipetujte ústy.
  - V laboratoři nejezte, nepijte a nekuřte.
  - Noste jednorázové rukavice, laboratorní plášť a ochranu očí, když zacházíte se vzorky a reagenty.
  - Po skončení práce se vzorky a reagenty si důkladně umyjte ruce.
- 
- Zacházení s materiálem**
- Nemíchejte reagenty z různých šarží.
  - Nepoužívejte sadu po datu expirace.
  - Nepoužívejte otevřené nebo poškozené lahvičky s reagenty.
- 
- Postup práce v laboratoři**
- Postup práce v laboratoři musí být prováděn jednosměrným způsobem počínaje v prostoru pro přípravu reagentů přes prostor přípravy vzorků až po prostor amplifikace a detekce.
- Činnosti před amplifikací musí být zahájeny přípravou reagentů a pokračovat přípravou vzorků.
  - Činnosti spojené s přípravou reagentů a vzorků musí být prováděny v samostatném, odděleném prostoru.
  - Materiál a vybavení musí být vyhrazeny pro každou činnost a nesmí být použity pro jiné činnosti nebo přesouvány mezi prostory.
  - Ve všech prostorách se musí používat rukavice, které musí být vyměněny před opuštěním tohoto prostoru.
  - Vybavení a materiál použité pro přípravu reagentů se nesmí používat pro činnosti spojené s přípravou vzorků nebo pro pipetování nebo zpracování amplifikace DNA nebo jiného zdroje DNA.
  - Materiál a vybavení pro amplifikaci a detekci musí trvale zůstat v prostoru amplifikace a detekce.
- 
- Infekční vzorky a kontaminující materiál**
- Se vzorky by mělo být nakládáno jako s infekčním materiálem, a proto by se měly používat bezpečné laboratorní postupy, např. postupy popsané v Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories <sup>[3]</sup> a v dokumentu NCCLS M29-T <sup>[2]</sup>.

- 
- Důkladně vyčistěte a vydesinfikujte všechny pracovní povrchy pomocí 10% bělicího prostředku. Veškeré vybavení nebo materiál, které přišly do kontaktu s klinickými vzorky, sterilizujte před vyhozením v autoklávu.
  - Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentů při odebírání alikvotních podílů z lahvíček s reagenty. Doporučuje se používat sterilní jednorázové pipety a pipetovací špičky.
  - Všechny nepoužité reagenty a odpad musí být zneškodněny v souladu s platnými státními předpisy.

---

**Bezpečnostní zásady pro používání přístroje LightCycler®**

- Dodržujte všechny obecné bezpečnostní zásady, které platí pro elektrické přístroje.
- Nikdy se nedotýkejte spínačů nebo napájecí šňůry vlhkými rukama.
- Neotvírejte kryt přístroje.
- Nikdy nečistěte přístroj, aniž byste jej vypnuli hlavním spínačem a odpojili napájecí šňůru ze zásuvky.
- Během provozu neotvírejte termální komoru.
- Víko komory a karusel se vzorky jsou během pracovního cyklu přístroje horké.

**Poznámka:** Údržbu a opravu tohoto přístroje by měli provádět pouze způsobilí servisní pracovníci.

---

**Elektrická bezpečnost přístroje LightCycler®**

- Přístroj LightCycler® 2.0 je navržen se stupněm ochrany I (IEC).
- Pokud je síťová šňůra popraskaná, zkroucená, ohořelá nebo jinak poškozená, musí být ihned vyměněna za ekvivalentní součást od Roche Diagnostics.

---

**Všeobecné zásady pro údržbu přístroje LightCycler®**

Chcete-li se informovat o možnostech servisního kontraktu, kontaktujte místní tým technické podpory společnosti Roche Diagnostics.

**Reference:** Uživatelská příručka pro přístroj LightCycler® 2.0.

---

**Pokyny pro čištění přístroje LightCycler®**

- Nelijte kapaliny do termální komory.
- Manipulace a likvidace infekčního materiálu by měla být prováděna v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Čistěte kryt přístroje šetrným běžným čisticím prostředkem. Pokud je to zapotřebí, použijte 70% ethanol pro desinfekci krytu přístroje.

- 
- Vyčistěte LightCycler® 2.0 Carousel tak, že odstraníte kapilární úlomky pomocí kartáčů dodávaných s přístrojem.

---

**Preventivní údržba  
přístroje LightCycler®**

Pravidelně kontrolujte prostor okolo přístroje. Proudění vzduchu okolo přístroje nesmí být omezeno.

**Poznámka:** Knihy, papíry ani další materiál nesmí ovlivňovat proudění vzduchu.

---

## 5 Pracovní postup

### Vždy používejte neotevřené zkumavky

Pro zabránění kontaminace vždy používejte neotevřené zkumavky. Dodržujte popsany pracovní postup. Všechny reagenty zbylé v otevřených zkumavkách musí být zneškodněny.

### Nejprve připravte hlavní pracovní mastermix.

Hlavní pracovní mastermix musí být připraven před přípravou vzorku, pokud je celý proces proveden v jeden den. Je to důležité pro minimalizaci rizika kontaminace.

Pouze pokud jsou vzorky připraveny den před amplifikací nebo ještě dříve, je přípustné opačné pořadí.

**Reference týkající se přípravy vzorků:** Příprava vzorků musí být prováděna podle zvláštní přílohy pro High Pure Viral Nucleic Acid Kit v tomto LightCycler® VZV Qual Kit.

**Reference:** 4 Upozornění a bezpečnostní zásady

### Před použitím reagenty rozmrazte

Použijte vhodný počet zkumavek pro každé stanovení. Bezprostředně před použitím musí být všechny reagenty zcela rozmrazeny (přibližně 20 minut při pokojové teplotě) a promíchány na vortexu.

**Poznámka:** Spotřebujte do 30 minut po rozmrazení a promíchání na vortexu.

### Jak připravit hlavní pracovní mastermix.

Při přípravě hlavního pracovního mastermixu postupujte podle bodů 1 - 3 níže:

- 1 Krátce odstředte zkumavky s LightCycler® VZV MMx a LightCycler® Mg 18.
- 2 Odpipetujte LightCycler® VZV MMx a LightCycler® Mg 18 do dodané směšovací zkumavky podle tabulky níže.
- 3 Připravte hlavní pracovní matici promícháním na vortexu (5 sekund) následovaným krátkým odstředěním.

**Poznámka: Promíchání na vortexu je kriticky důležité pro výsledek stanovení.**

Hlavní pracovní matice je stabilní při teplotě +2 až +8 °C po dobu 2 hodin.

V tabulce je uvedeno, kolik každého reagentu je zapotřebí pro různý počet klinických vzorků pro jeden přístroj LightCycler® 2.0 včetně kontrolních látek.

**Table 5.1** Jak připravit hlavní pracovní mastermix pro různý počet klinických vzorků.

Počet klinických vzorků	Objem LightCycler® VZV MMx	Počet potřebných zkumavek pro LightCycler® VZV MMx	Objem LightCycler® Mg 18	Počet potřebných zkumavek pro LightCycler® Mg 18
1 -12	80 µl	1	80 µl	1

---

Počet klinických vzorků	Objem LightCycler® VZV MMx	Počet potřebných zkumavek pro LightCycler® VZV MMx	Objem LightCycler® Mg 18	Počet potřebných zkumavek pro LightCycler® Mg 18
13 - 24	160 µl	2	160 µl	2

---

**Jak nastavit reakci PCR**

Přidejte 10 µl hlavní pracovní matice do potřebného počtu zkumavek Kapiláry LightCycler® (extrahované vzorky kontrolní látky) umístěných v předem ochlazených adaptérech odstředivky.

---

**Jak přidat vzorek k PCR reakci**

Do vyhrazené zkumavky Kapiláry LightCycler® přidejte 10 µl extrahovaného vzorku, LightCycler® VZV PC nebo extrahovaný LightCycler® DNA NTC.

Uzavřete každou kapiláru zátkou okamžitě po přidání vzorku pomocí LC Capping Tool (kat. č. 03 357 317 001).

Důležité je:

- Buďte opatrní při přidávání vzorků do Kapiláry LightCycler®, abyste předešli křížové kontaminaci mezi vzorky.
  - Zabraňte vniknutí bublin vzduchu do Kapiláry LightCycler®.
- 

**Jak připravit LightCycler® Carousel.**

- 1 Vložte kapiláry obsahující LightCycler® DNA NTC do pozice 1 a kapiláry obsahující LightCycler® VZV PC do pozice 2 v LightCycler® Carousel.
  - 2 Od pozice 3 v LightCycler® Carousel umístějte kapiláry obsahující klinické vzorky.
  - 3 Přeneste míchadélko včetně LightCycler® Carousel do přístroje LC Carousel Centrifuge 2.0.
  - 4 LC Carousel Centrifuge spustíte stiskem tlačítka **Start**
  - 5 Po odstředění přemístěte LightCycler® Carousel do přístroje LightCycler® 2.0
-

---

## 6 Přístroj LightCycler® 2.0

### 6.1 Úvodní informace o přístroji LightCycler® 2.0

---

**Tato kapitola**

Tato kapitola popisuje:

- Postupy potřebné pro provedení analýzy LightCycler® VZV Qual Kit na přístroji LightCycler® 2.0 od (Roche Diagnostics).
  - Analýza a interpretace výsledků pomocí softwaru LightCycler® verze 4.05 nebo vyšší.
- 

**Verze softwaru**

Všechny specifikace se vztahují k softwaru LightCycler® verze 4.05 nebo vyšší.

---

**Podrobné informace o programování**

**Reference:** Pro podrobné informace o programování viz návod k obsluze pro LightCycler® 2.0 (verze softwaru 4.05 nebo vyšší).

---

---

## 6.2 Příprava přístroje LightCycler® 2.0

### 6.2.1 Dříve než začnete

---

**Všechny kroky je nutné dodržet** Všechny kroky je nutné dodržet, aby bylo zajištěno správné provedení testu na přístroji LightCycler® 2.0.

**Reference:** 5. Pracovní tok

---

**Jak se přihlásit k Exor Database (DB)** Informace o přihlášení do tohoto softwaru viz návod k obsluze přístroje LightCycler® 2.0, verze softwaru 4.05 nebo vyšší, pro diagnostiku *in vitro* (část A).

**Poznámka:** Je důležité se přihlásit k Exor Database (DB) s auditovou zkouškou před spuštěním makra.

**Poznámka:** Pokud jste přihlášení v režimu auditové zkoušky k Exor DB, je ve stavovém řádku softwaru zobrazeno slovo **Traceable**.

---

**Musí být provedena kompenzace barev** Při prvním spuštění LightCycler® VZV Qual Kit je nutné vytvořit barevný kompenzační objekt pomocí LW Color Compensation Kit (kat. č. 04 847 148 001).

**Poznámka:** Nový barevný kompenzační objekt vytvářejte každých šest měsíců.

**Reference:** Uživatelská příručka pro LW Color Compensation Kit.

---

**Jak instalovat makro** Pro informace o instalaci makra viz návod k obsluze pro přístroj LightCycler® 2.0, verze softwaru 4.05 pro diagnostiku *in vitro* (část A).

Makro obsahuje specifické informace pro danou soupravu. Proto je nutné instalovat správné makro. Pouze v případě, že je nainstalována správná (odpovídající) verze makra, je systém připraven k vyhodnocení analýzy. Během přípravy analýzy je uživatel informován, pokud není nainstalována správná verze makra.

**Poznámka:** Je důležité, aby bylo nainstalováno správné makro LightCycler® VZV Qual Kit (kat. č. 04 847 130 001).

**Poznámka:** Makro obsahuje všechna nastavení potřebná pro provedení analýzy pomocí LightCycler® VZV Qual Kit.

---

**Makro pro LightCycler® VZV Qual Kit neupravujte** Makro pro LightCycler® VZV Qual Kit nesmí uživatelé měnit, s výjimkou změny počtu a názvu vzorků.

Pokud dojde ke změně makra, zobrazí se ve zprávě následující řádka: **User developed or modified test method.**

**Poznámka:** Pokud je makro upraveno, je analýza neplatná a musí být zopakována.

---

**Reference:** Uživatelská příručka pro přístroj LightCycler® 2.0.

## 6.2.2 Spuštění analýzy s LightCycler® 2.0

**Jak umístit Light-Cycler® Carousel do přístroje**

Vložte LightCycler® Carousel včetně kapilár do přístroje LightCycler® 2.0.

**Jak spustit makro**

Tato tabulka vysvětluje postup spuštění makra.

**Table 6.1** Jak spustit makro.

Krok	Činnost
1	Spuště makro stisknutím tlačítka <b>Roche Macro</b> na přední straně a zadejte katalogové číslo soupravy. <b>Poznámka:</b> Katalogové číslo může být zadáno buď ručně (viz například první strana této uživatelské příručky), nebo načtením čárového kódu.
2	Vyberte správné makro klepnutím na nejnovější verzi v poli <b>Select Macro</b> . <b>Poznámka:</b> Spustí se průvodce, který vám pomůže se spuštěním makra.

**Jak definovat kontrolní vzorky v makru.**

**Poznámka:** Pozice kontrolních položek (PC a NTC) je v makru již definována. Názvy a pozice nesmí být měněny.

**Jak definovat klinické vzorky v makru.**

Tato tabulka popisuje postup definování klinických vzorků v makru.

**Table 6.2** Jak definovat klinické vzorky v makru.

Krok	Činnost
1	Zadejte počet vzorků a kontrolních položek v části <b>sample count</b> .
2	Zadejte názvy vzorků na obrazovce <b>Capillary view</b> .
3	Zadejte číslo šarže soupravy do pole na obrazovce <b>Capillary view</b> ručně nebo pomocí čárového kódu.

**Jak spustit analýzu**

Analýzu spustíte klepnutím na tlačítko **Start run** v průvodci.

## 6.3 Analýza dat v softwaru LightCycler® verze 4.05 nebo vyšší.

### 6.3.1 Dříve než začnete

**Úvod k této části** V této části je popsáno, jak se generují výsledky pomocí makra LightCycler® VZV Qual Kit a jak tyto výsledky interpretovat.

**Všechny kroky je nutné dodržet** Všechny kroky je nutné dodržet, aby byla zajištěna správná interpretace výsledků.

### 6.3.2 Interpretace výsledků

**Jak vytvořit výslednou zprávu** Výsledná zpráva je vytvářena automaticky makrem LightCycler® VZV Qual Kit po skončení každé analýzy:

**Jak zkontrolovat platnost analýzy** Chcete-li zkontrolovat platnost analýzy, viz část **Results** ve zprávě vytvořené makrem LightCycler® VZV Qual Kit.

V této tabulce je vysvětleno, jak zkontrolovat platnost analýzy.

**Table 6.3** Jak zkontrolovat platnost analýzy

Vzorek	Kritérium	Činnost
LightCycler® DNA NTC	Sloupec Cp pro 530: prázdný nebo > 45 a Sloupec Cp pro 610: <40	LightCycler® DNA NTC je platný. Žádná činnost není zapotřebí <b>Poznámka:</b> Pokud nejsou některá z těchto kritérií splněna, LightCycler® DNA NTC je neplatný a analýza musí být zopakována od přípravy po zesílení.
LightCycler® VZV PC	Sloupec Cp pro 530: 32-35 a Sloupec Cp pro 610: nelze použít	LightCycler® VZV PC je platný. Žádná činnost není zapotřebí <b>Poznámka:</b> Pokud toto kritérium není splněno, LightCycler® VZV PC je neplatný a analýza musí být zopakována od fáze zesílení.

**Jak najít výsledky** Výsledky detekce pro VZV v každém klinickém vzorku lze nalézt v části **Results** sloupec (**Cp**) zprávy vytvořené makrem LightCycler® VZV Qual Kit.

**Jak interpretovat výsledky** Tato tabulka vysvětluje postup interpretace výsledků.

**Table 6.4** Jak interpretovat výsledky

<b>Pokud</b>	<b>Potom</b>
Sloupec Cp pro 530: <45 a Sloupec Cp pro 610: nelze použít	Ve vzorku byl detekován VZV
Sloupec Cp pro 530: prázdný nebo > 45 a Sloupec Cp pro 610: <45	Ve vzorku nebyl detekován VZV.

**Poznámka:** Pro odlišné výsledky viz část: "Jak interpretovat odchylné výsledky".

### Jak interpretovat odchylné výsledky

Tato tabulka vysvětluje, jak interpretovat odchylné výsledky ve zprávě vytvořené makrem LightCycler® VZV Qual Kit.

**Table 6.5** Jak interpretovat odchylné výsledky

<b>Pokud</b>	<b>Potom</b>	<b>Činnost</b>
Sloupec Cp pro 530: prázdný nebo > 45 a Sloupec Cp pro 610: prázdný nebo > 45	Klinický vzorek neobsahuje cí DNA pro VZV nebo interní kontrola.	Výsledek klinického vzorku je neplatný. Opakujte přípravu vzorku a zopakujte analýzu vzorku.

---

# 7 Charakteristiky stanovení LightCycler® VZV Qual Kit

---

<b>Příprava vzorku a přístroje pro studie charakteristik stanovení</b>	Pro všechny studie výkonnostních charakteristik popsané níže byl použit High Pure Viral Nucleic Acid Kit Studie byly prováděny na přístroji LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics).
<b>Mez detekce (LOD)</b>	Mez detekce (LOD) je definována jako titrační úroveň, při které je pozitivně určeno 95 % všech vzorků obsahujících VZV.
<b>LOD ve fyziologickém roztoku</b>	LOD ve fyziologickém roztoku byla určena analýzou kmen 9/84 ve zředěném roztoku vzorku VZV. Vzorek byl pětinásobně zředěn ve fyziologickém roztoku. Každý zředěný roztok byl připraven 24krát pomocí soupravy High Pure Viral Nucleic Acid Kit. Pro výpočet koncentrace LOD byla použita analýza Probit. LOD byla určena ve 200 µl fyziologického roztoku na hodnotu 384 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 275 - 791 kopie/ml).
<b>LOD v CSF</b>	LOD v CSF byla určena analýzou kmen 9/84 ve zředěném roztoku vzorku VZV. Vzorek byl pětinásobně zředěn v roztoku s chováním a vlastnostmi připomínající lidskou CSF. Každý zředěný roztok byl připraven 24krát pomocí soupravy High Pure Viral Nucleic Acid Kit. Pro výpočet koncentrace LOD byla použita analýza Probit. LOD byla určena ve 200 µl CSF na hodnotu 157 kopií/ml (95% interval spolehlivosti: 110 - 303 kopií/ml).
<b>Analytická specifita</b>	<b>Exkluzivita:</b> Exkluzivita pro LightCycler® VZV Qual Kit byla posouzena analýzou <i>in vitro</i> relevantních patogenů. Nebyla zjištěna křížová reaktivita pro: HHV-6; HHV-7; HHV-8; HSV-1; HSV-2; HPV16; Adenovirus typ 2; CMV; HBV; EBV; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i> a <i>S.epidermidis</i> .
<b>Klinická specifita</b>	Klinická specifita pro LightCycler® VZV Qual Kit byla určena analýzou 40 různých vzorků výtěru. Žádný vzorek nebyl pozitivní na VZV. Klinická specifita testu byla tedy 100 %.
<b>Robustnost</b>	Robustnost byla určena posouzením celkové míry selhání produktu LightCycler® VZV Qual Kit. Vzorky byly zředěny ve fyziologickém roztoku na 1050 kopií/ml (přibližně trojnásobek LOD koncentrace ve fyziologickém roztoku) a analyzovány se třemi šaržemi produktu LightCycler® VZV Qual Kit.

---

U 99 vzorků ze 100 byl výsledek pozitivní pro VZV DNA i pro interní kontrolu. To znamená, že robustnost pro LightCycler® VZV Qual Kit je  $\geq 99$  %.

---

---

## 8 VZV nemoc a diagnosa

---

**Virus varicella zoster** Virus varicella zoster (VZV) patří vzhledem k biologické a strukturní podobnosti do podskupiny  $\alpha$ -herpesvirinae <sup>[4]</sup>.

---

**Nemoci způsobené virem varicella zoster** VZV může způsobit virové komplikace plic, jater a centrálního nervového systému u dětí s narušenou imunitou a VZV retinitidu, akutní renální nekrosu a chronickou progresivní encefalitidu u pacientů s HIV <sup>[5]</sup>, <sup>[6]</sup>. Navíc může být Herpes zoster (pásový opar) zaměněn za HSV, takže jsou pro správnou diagnosu zapotřebí vhodné laboratorní testy <sup>[5]</sup>.

Jako hlavním prostředek léčby závažných infekcí VZV byl používán acyclovir. Možnosti léčby dospělých osob s herpes zoster však byly v poslední době rozšířeny o nové antivirové léky, včetně valacycloviru a famcicloviru <sup>[5]</sup>.

---

**Diagnosa virus varicella zoster** Posouzení VZV zesílením PCR v reálném čase a detekcí virové DNA z biologických vzorků (např. vezikulární výtěry) je spolehlivým nástrojem pro detekci VZV u pacientů s rozvinutou aktivní infekcí VZV nebo s rizikem vzniku této infekce.

PCR se používá v mnoha laboratořích pro posouzení infekce VZV.

---

## 9 Definice parametrů real-time PCR

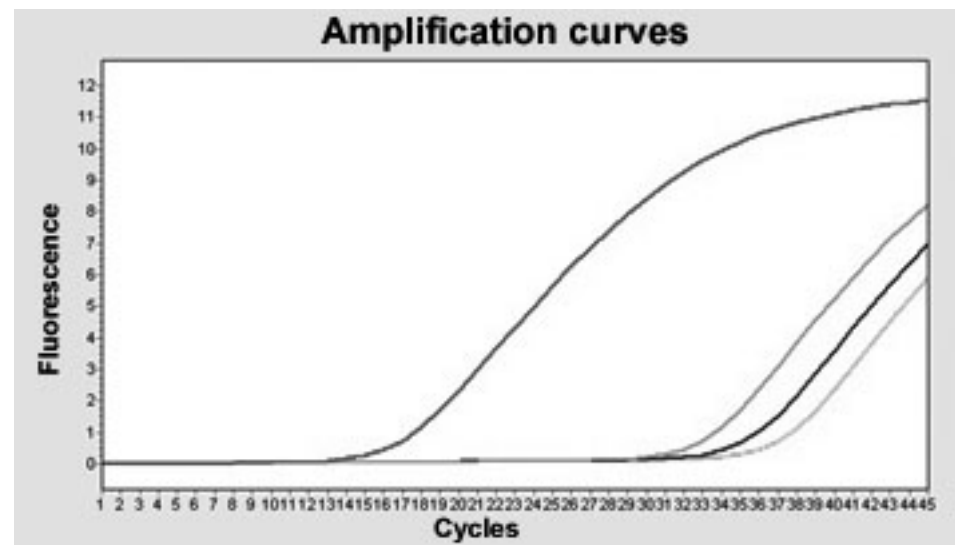
### Real-time PCR

Real-time PCR umožňuje uživateli sledovat amplifikaci v každém cyklu. To je umožněno pomocí fluorescenčně označené sondy specifické pro cílový subjekt. Real-time PCR zaručuje přesnou analýzu cílového subjektu měřením akumulované fluorescence v logaritmické fázi amplifikace nukleové kyseliny.

### Příklad stanovení real-time PCR

Následující obrázek uvádí příklad stanovení real-time PCR.

**Obrázek 9.1** Příklad stanovení real-time PCR



---

## Odkazy

- [1] Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93(1):125-128.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids and tissue. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T Villanova, PA:NCCLS, 1989.
- [3] Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 1993. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. (eds.). HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
- [4] Roizman B. 1996. Herpesviridae, p. 2211-30d. In Fields BN, Knipe DN, and Howley PM (eds.), *Field Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia Pa.
- [5] Cohen, J. I., P. A. Brunell, S. E. Straus, and P. R. Krause. 1999. Recent advances in varicella-zoster virus infection. *Ann. Intern. Med.* 130:922-932.
- [6] Whitley R. 1995. Varicella zoster virus, p. 1345-1351. In B. J. D. Mandell GL (ed.), *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York, NY.

### **Poznámka pro kupujícího**

Zakoupením tohoto produktu získává kupující právo použít jej pro zesílení sekvence nukleové kyseliny a pro detekci sekvence nukleové kyseliny pro in vitro diagnostiku u člověka. Žádné patentové nebo licenční právo jakéhokoli typu jiné než specifikované právo použití není zakoupením udělováno.

### **Obchodní známky**

ROCHE, LIGHTCYCLER a HIGH PURE jsou ochranné známky společnosti Roche.

### **Informace o výrobcí**

Cepheid AB  
Röntgenvägen 5  
SE-171 54 Solna  
ŠVÉDSKO

### **Distribuce:**

Roche Diagnostics GmbH  
Roche Molecular Diagnostics  
68298 Mannheim  
NĚMECKO

### **Kontaktní informace**

Kontaktujte prosím své místní zastoupení Roche  
[www.roche-diagnostics.com](http://www.roche-diagnostics.com)