

2015. gada marts

artus[®] EBV LC PCR Kit rokasgrāmata

Σ 24 (kataloga Nr. 4501063)

Σ 96 (kataloga Nr. 4501065)

Kvantitatīvā analīze in vitro diagnostikā

Izmantošanai darbā ar *LightCycler*[®] instrumentu

1. versija

CE

IVD

REF

4501063, 4501065

HB

1046892LV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R2

MAT

1046892LV



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ir tādu inovatīvu paraugu un analīžu tehnoloģiju vadošais piegādātājs, kuras nodrošina jebkādu bioloģisko paraugu satura izolēšanu un noteikšanu. Mūsu mūsdienīgie augstas kvalitātes produkti un pakalpojumi garantē sekmīgu parauga apstrādi un rezultāta ieguvu.

QIAGEN nosaka tālāk norādīto procesu standartus.

- DNS, RNS un olbaltumvielu izdalīšana
- Nukleīnskābju un olbaltumvielu analīzes
- microRNS izpēte un RNSi
- Paraugu un analīžu tehnoloģiju automatizācija

Mūsu mērķis ir nodrošināt iespēju iegūt izcilus rezultātus un sasniegumus. Lai iegūtu sīkāku informāciju, apmeklējiet vietni www.qiagen.com.

Saturs

1. Saturs	4
2. Uzglabāšana	4
3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces	5
4. Vispārējie piesardzības pasākumi	5
5. Informācija par patogēniem	5
6. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas princips	6
7. Produkta apraksts	6
8. Protokols	7
8.1. DNS izolēšana	7
8.2. <i>Iekšējās kontroles materiāls</i>	10
8.3. Kvantitatīvā noteikšana	11
8.4. PCR sagatavošana	12
8.5. <i>LightCycler</i> instrumentu programmēšana	16
9. Datu analīze	19
10. Problēmu novēršana	21
11. Specifikācija	22
11.1. Analītiskais jutīgums	22
11.2. Specifiskums	23
11.3. Precizitāte	24
11.4. Atkārtojamība	26
11.5. Diagnostiskā izvērtēšana	26
12. Produkta izmantošanas ierobežojumi	26
13. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	26
14. Kvalitātes kontrole	27
15. Atsauces	27
16. Simbolu skaidrojums	27

artus EBV LC PCR Kit

Izmantošanai darbā ar *LightCycler* instrumentu.

1. Saturs

	Marķējums un saturs	Art. Nr. 4501063 24 reakcijas	Art. Nr. 4501065 96 reakcijas
Zilā krāsā	<i>EBV LC Master</i>	2 x 12 izpildes	8 x 12 izpildes
Sarkanā krāsā	<i>EBV LC/RG/TM QS 1^α</i> 5 x 10 ⁴ kopijas/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Sarkanā krāsā	<i>EBV LC/RG/TM QS 2^α</i> 5 x 10 ³ kopijas/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Sarkanā krāsā	<i>EBV LC/RG/TM QS 3^α</i> 5 x 10 ² kopijas/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Sarkanā krāsā	<i>EBV LC/RG/TM QS 4^α</i> 5 x 10 ¹ kopijas/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Zaļā krāsā	<i>EBV LC IC^α</i>	1 x 1 000 μl	2 x 1 000 μl
Baltā krāsā	<i>Ūdens (PCR kategorija)</i>	1 x 1 000 μl	1 x 1 000 μl

^αQS (*Quantitation Standard*) = Kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāls

IC (*Internal Control*) = Iekšējās kontroles materiāls

2. Uzglabāšana

artus EBV LC PCR Kit komponenti ir jāuzglabā no -30°C līdz -15°C temperatūrā, un tie ir stabili līdz uz etiķetes norādītajam derīguma termiņam. Nav ieteicama atkārtota atkausēšana un sasaldēšana (> 2 x), jo tas var samazināt jutīgumu. Ja reaģentus ir paredzēts izmantot tikai neregulāri, tie jāsasaldē alikvotās daļās. Nedrīkst uzglabāt +4°C temperatūrā ilgāk nekā piecas stundas.

3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces

- Vienreizlietojamie cimdi bez pūdera
- DNS izolēšanas komplekts (skatīt sadaļu 8.1. DNS izolēšana)
- Pipetes (pielāgojamas)
- Sterili pipešu uzgaļi ar filtriem
- Maisītājs
- Galda centrifūga ar rotoru 2 ml reakcijas stobriņu ievietošanai
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kat. Nr. 2 158 850) faila *Crosstalk Color Compensation* instalēšanai.
- *LightCycler* Capillaries (20 µl)
- *LightCycler* Cooling Block
- *LightCycler* instruments
- *LightCycler* Capping Tool

4. Vispārējie piesardzības pasākumi

Lietotājam vienmēr jāpievērš uzmanību tālāk norādītajiem nosacījumiem.

- Izmantojiet sterilus pipešu uzgaļus ar filtriem.
- Uzglabājiet un izdaliet pozitīvu materiālu (paraugu materiālus, kontroles materiālus un amplikonus) atsevišķi no visiem citiem reaģentiem un pievienojiet to reakcijas maisījumam telpiski atdalītā vietā.
- Pirms testa sākšanas rūpīgi atkausējiet visus komponentus istabas temperatūrā.
- Kad komponenti ir atkausēti, sajauciet un īsu brīdi centrifugējiet tos.
- Strādājiet ātri uz ledus vai izmantojiet *LightCycler* Cooling Block.

5. Informācija par patogēniem

Epšteina-Barras vīrusa (EBV) pārnese notiek orālā ceļā, galvenokārt ar siekalām. EBV infekcija parasti ir asimptomātiska, it īpaši, ja inficēšanās ir notikusi bērnībā. Akūtas infekcijas klīniska pazīme ir infekciozā mononukleoze, ko pavada drudzis, nogurums un angīna, kā arī limfmezglu un liesas iekaisums. Dažiem pacientiem šie simptomi hroniski atkārtojas. EBV infekcijas smagas formas tiek novērotas pacientiem ar imūndeficītu un T šūnu bojājumiem.

6. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas princips

Patogēna diagnoze ar polimerāzes ķēdes reakciju (polymerase chain reaction, PCR) tiek noteikta pēc patogēna genoma specifiskā apgabala amplifikācijas. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijā (PCR) amplificētais produkts tiek noteikts, izmantojot fluorescējošas krāsvielas. Tās parasti tiek saistītas ar oligonukleotīdu zondēm, kuras specifiski saistās ar amplificēto produktu. Fluorescences intensitātes uzraudzīšana reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas laikā ļauj identificēt un kvantitatīvi noteikt uzkrāto produktu bez atkārtotas reakcijas stobriņu atvēršanas pēc PCR izpildes (Mackay, 2004).

7. Produkta apraksts

Komplekts *artus* EBV LC PCR Kit ietver lietošanai sagatavotu sistēmu EBV DNS noteikšanai, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (polymerase chain reaction, PCR) *LightCycler* instrumentā. *EBV LC Master* ietver reaģentus un enzīmus EBV genoma 97 bp apgabala specifiskai amplifikācijai un specifiskā amplikona tiešai noteikšanai *LightCycler* instrumenta fluorimetra kanālā F2. Turklāt *artus* EBV LC PCR Kit ietver otru heterologu amplifikācijas sistēmu iespējamās PCR inhibīcijas noteikšanai. To fluorimetra kanālā F3 nosaka kā *iekšējās kontroles materiālu (Internal Control, IC)*. Analītiskā EBV PCR noteikšanas robeža (skatīt sadaļu 11.1. Analītiskais jutīgums) netiek samazināta. Komplektācijā ir iekļauti ārēji pozitīvas kontroles materiāli (*EBV LC/RG/TM QS 1–4*), kuri ļauj noteikt patogēnu slodzi. Sīkāku informāciju skatiet sadaļā 8.3. Kvantitatīvā noteikšana.

Uzmanību! Temperatūras profils EBV noteikšanai, izmantojot *artus* EBV LC PCR Kit, atbilst *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit un *artus* CMV LC PCR Kit profilam. Tāpēc PCR testu šajās *artus* sistēmās var veikt un analizēt vienā atsevišķā izpildē. Ņemiet vērā ieteikumus par PCR analīzi, kas sniegti sadaļā 8.3. Kvantitatīvā noteikšana un 9. Datu analīze.

8. Protokols

8.1. DNS izolēšana

Ir pieejami vairāku ražotāju DNS izolēšanas komplekti. DNS izolēšanas procedūrai paredzēto paraugu skaits ir atkarīgs no izmantotā protokola. Veiciet DNS izolēšanu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Ieteicams izmantot tālāk norādītos izolēšanas komplektus.

Parauga materiāls	Nukleīnskābju izolēšanas komplekts	Kataloga numurs	Ražotājs	Nesējvides RNS
Serums, plazma, CSF	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Nav iekļauts
	QIAamp UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	Iekļauts
Asins šūnas	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	Nav iekļauts
Plazma	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	Iekļauts

*Jālieto kopā ar BioRobot® EZ1 DSP Workstation (kat. Nr. 9001360) un EZ1 DSP Virus Card (kat. Nr. 9017707).

Svarīga piezīme par QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit un QIAamp DNA Mini Kit izmantošanu.

- **Nesējvides RNS** izmantošana ir būtisks ekstrahēšanas efektivitātes un līdz ar to arī DNS/RNS iegūšanas nosacījums. Ja izvēlētais izolēšanas komplekts neietver nesējvides RNS, ņemiet vērā, ka nukleīnskābju ekstrahēšanai no ķermeņa šķidrumiem, kas nesatur šūnas, un materiāliem ar zemu DNS/RNS saturu (piemēram, CSF) ir īpaši ieteicams pievienot nesējvidi (RNAHomopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. Nr. 27-4110-01). Šādos gadījumos veiciet tālāk norādītās darbības.
 - a) Resuspendējiet liofilizētu nesējvides RNS, izmantojot ekstrahēšanas komplekta eluēšanas buferšķīdumu (piemēram, QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit AE buferšķīdumu) (nedrīkst izmantot līzes buferšķīdumu), un sagatavojiet atšķaidījumu ar koncentrāciju 1 µg/µl. Sadaliet šo nesējvides RNS šķīdumu vairākās alikvotās daļās atbilstoši vajadzībām un uzglabājiet tās –20°C temperatūrā. RNS alikvotās daļas nav ieteicams vairākas reizes atkausēt (> 2 reizes).
 - b) Izmantojiet 1 µg nesējvides RNS uz 100 µl līzes buferšķīduma. Piemēram, ja ekstrahēšanas protokolā ir norādīts izmantot 200 µl līzes buferšķīduma, pievienojiet 2 µl nesējvides RNS (1 µg/µl) tieši līzes buferšķīdumam. Pirms katras ekstrahēšanas procedūras sākšanas jāgatavo svaigs līzes buferšķīduma un RNS nesējvides (un attiecīgajā situācijā *iekšējās kontroles materiāla*, skatīt sadaļu 8.2. *iekšējās kontroles materiāls*) maisījums saskaņā ar tālāk norādīto pipetēšanas shēmu.

Paraugu skaits	1	12
Līzes buferšķīdums	piemēram, 200 µl	piemēram, 2400 µl
Nesējvides RNS (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Kopējais tilpums	202 µl	2424 µl
Tilpums vienā ekstrahēšanas procedūrā	200 µl	katrā 200 µl

c) Izmantojiet tikko sagatavotu līzes buferšķīduma un RNS nesējvides maisījumu, ko tūlītēji izmantot ekstrahēšanas procedūrā. Maisījumu nevar uzglabāt.

- **Nesējvides RNS** izmantošana ir būtisks ekstrahēšanas efektivitātes un līdz ar to arī DNS/RNS iegūšanas nosacījums. Lai paaugstinātu komplektā QIAamp UltraSens Virus Kit iekļautās nesējvides RNS stabilitāti, mēs iesakām izpildīt tālāk norādīto procedūru, kas atšķiras no ekstrahēšanas komplekta lietotāja rokasgrāmatā aprakstītās procedūras.

- Pirms pirmās ekstrahēšanas komplekta izmantošanas resuspendējiet liofilizētu nesējvides RNS komplektā iekļautajā 310 µl eluēšanas buferšķīdumā (galīgā koncentrācija 1 µg/µl, nedrīkst izmantot līzes buferšķīdumu). Sadaliet šo nesējvides RNS šķīdumu vairākās alikvotās daļās atbilstoši vajadzībām un uzglabājiet tās –20°C temperatūrā. RNS alikvotās daļas nav ieteicams vairākas reizes atkausēt (> 2 reizes).
- Pirms katras ekstrahēšanas procedūras sākšanas jā sagatavo svaigs līzes buferšķīduma un RNS nesējvides (un attiecīgajā situācijā *iekšējās kontroles materiāla*, skatīt sadaļu 8.2. *Iekšējās kontroles materiāls*) maisījums saskaņā ar tālāk norādīto pipetēšanas shēmu.

Paraugu skaits	1	12
Lysis Buffer AC	800 µl	9600 µl
Nesējvides RNS (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Kopējais tilpums	805,6 µl	9667,2 µl
Tilpums vienā ekstrahēšanas procedūrā	800 µl	katrā 800 µl

c) Izmantojiet tikko sagatavotu līzes buferšķīduma un RNS nesējvides maisījumu, ko tūlītēji izmantot ekstrahēšanas procedūrā. Maisījumu nevar uzglabāt.

- Lai iegūtu augstāko *artus* EBV LC PCR Kit jutīgumu, ir ieteicams DNS eluēt 50 µl eluēšanas buferšķīdumā.
- Komplekta QIAamp UltraSens Virus Kit izmantošana pieļauj parauga koncentrāciju. Ja tiek izmantots cits parauga materiāls, as nav serums vai plazma, pievienojiet paraugam vismaz 50% (tilpumkoncentrācija) negatīvas cilvēka plazmas.
- Asins paraugu ņemšanas stobriņi ar **antikoagulantiem** var radīt PCR inhibīciju. Taču, izmantojot iepriekš norādītos izolēšanas komplektus, šie inhibitori tiek likvidēti. Nav ieteicams izmantot heparinizētas asinis.
- Ja tiek izmantoti protokoli, kuros iekļauti etanolu saturoši skalošanas buferšķīdumi, pirms eluēšanas veiciet papildu centrifugēšanas darbību (trīs minūtes, 13 000 apgr./min.), lai atdalītu atlikušo etanolu. Tādējādi tiek novērsta iespējamā PCR inhibīcija.
- Komplektu *artus* EBV LC PCR Kit nedrīkst izmantot ar **fenolu** saturošām izolēšanas metodēm.

Svarīga piezīme par EZ1 DSP Virus Kit lietošanu.

- **Nesējvides RNS** izmantošana ir būtisks ekstrahēšanas efektivitātes un līdz ar to arī DNS/RNS iegūšanas nosacījums. Pievienojiet katrā ekstrahēšanas procedūrā attiecīgo nesējvides RNS daudzumu saskaņā ar norādījumiem EZ1 DSP Virus Kit rokasgrāmatā (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*).

Svarīgi! Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit *iekšējās kontroles materiālu* var izmantot tieši izolēšanas procedūrā (skatīt sadaļu 8.2. *Iekšējās kontroles materiāls*).

8.2. Iekšējās kontroles materiāls

Iekšējās kontroles materiāls (EBV LC IC) ir iekļauts komplektācijā. **To izmantojot, lietotājs var gan kontrolēt DNS izolēšanas procedūru, gan pārbaudīt iespējamo PCR inhibīciju (skatīt 1. att.).** Izmantojot komplektu **EZ1 DSP Virus Kit** ekstrahēšanai, *iekšējās kontroles materiāls* ir jāpievieno saskaņā ar norādījumiem **EZ1 DSP Virus Kit** rokasgrāmatā (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*). Izmantojot komplektu **QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit** vai **QIAamp DNA Mini Kit**, pievienojiet *iekšējās kontroles materiālu* izolēšanas šķīdumam attiecībā 0,1 µl uz 1 µl eluēšanas tilpumu. Piemēram, izmantojot komplektu QIAamp DNA Mini Kit, DNS eluēšana notiek 50 µl AE buferšķīdumā. Tāpēc sākotnēji ir jāpievieno 5 µl *iekšējās kontroles materiāla*. Izmantotais *iekšējās kontroles materiāla* daudzums ir atkarīgs **tikai** no eluēšanas tilpuma. *Iekšējās kontroles materiāls* un nesējvides RNS (skatīt sadaļu 8.1. DNS izolēšana) ir jāpievieno tikai

- līzes buferšķīduma un parauga materiāla maisījumam vai
- tieši līzes buferšķīdumam.

Iekšējās kontroles materiālu parauga materiālam nedrīkst pievienot tieši. Pievienojot to līzes buferšķīdumam, ņemiet vērā, ka *iekšējās kontroles materiāla* un līzes buferšķīduma/nesējvides RNS maisījums ir jā sagatavo svaigs, un tas ir jāizmanto nekavējoties (maisījuma uzglabāšana istabas temperatūrā vai ledusskapī tikai dažas stundas var izraisīt *iekšējās kontroles materiāla* darbības kļūmi un var samazināt ekstrahēšanas efektivitāti). *Iekšējās kontroles materiālu* un nesējvides RNS nedrīkst pievienot parauga materiālam tieši.

Iekšējās kontroles materiālu var arī izmantot, lai īpaši pārbaudītu iespējamo **PCR inhibīciju (skatīt 2. att.)**. Šajā gadījumā pievienojiet 0,5 µl *iekšējās kontroles materiāla* uz vienu reakciju tieši 15 µl *EBV LC Master*. Katrā PCR reakcijā izmantojiet 15 µl *Master* maisījumā, kas sagatavots, kā aprakstīts iepriekš,* un pievienojiet 5 µl izdalītā parauga. Ja tiek sagatavota PCR izpilde vairākiem paraugiem, palieliniet *EBV LC Master* un *iekšējās kontroles materiāla* tilpumu atbilstoši paraugu skaitam (skatīt sadaļu 8.4. PCR sagatavošana).

artus EBV LC PCR Kits un *artus CMV LC PCR Kits* satur vienādu *iekšējās kontroles materiāla (IC)* daudzumu. *artus HSV-1/2 LC PCR Kits* un *artus VZV LC PCR Kits* arī satur vienādu *iekšējās kontroles materiāla* daudzumu.

* Sagatavojot PCR testu, tilpuma pieaugums *iekšējās kontroles materiāla* pievienošanas dēļ netiek ņemts vērā. Noteikšanas sistēmas jutīgums netiek ietekmēts.

8.3. Kvantitatīvā noteikšana

Komplektācijā iekļautie *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāli* (EBV LC/RG/TM QS 1–4) tiek uzskatīti par iepriekš izdalītiem paraugiem, un tiek izmantots vienāds to tilpums (5 µl). Lai *LightCycler* instrumentā varētu ģenerēt standarta līkni, jāizmanto visi četri *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāli*, un tie jādefinē ekrānā *Sample Loading Screen* (ekrāns Paraugu ievietošana) (skatīt *LightCycler* lietotāja rokasgrāmatas (*LightCycler Operator's Manual*) versijas 3.5. nodaļu B, 2.4. Parauga datu ievade). Saskaņā ar iepriekš sniegtajiem norādījumiem ģenerēto standarta līkni var izmantot arī nākamajām izpildēm ar nosacījumu, ka pašreizējā izpildē tiek izmantots vismaz viens **vienas** konkrētās koncentrācijas standarta materiāls. Šajā nolūkā ir jāimportē iepriekš ģenerētā standarta līkne (skatīt *LightCycler* operatora rokasgrāmatas (*LightCycler Operator's Manual*) versijas 3.5. nodaļu B, 4.2.5. Kvantitatīvā noteikšana, izmantojot papildu standarta līkni). Tomēr šīs kvantitatīvās noteikšanas metodes izmantošana var radīt rezultātu novirzes, kuras rada izmaiņas starp dažādām PCR izpildēm.

Ja PCR izpildē ir integrēta vairāk nekā viena *artus* sistēma herpes vīrusa noteikšanai, analizējiet šo atšķirīgo sistēmu datus, atsevišķi izmantojot attiecīgos kvantitatīvās noteikšanas standarta materiālus.

Uzmanību! *Kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāli* tiek definēti ar mērvienību kopijas/µl. Lai pārveidotu vērtības, kas noteiktas, izmantojot standarta līkni, kā parauga materiāla kopijas/ml, ir jāizmanto tālāk norādītais vienādojums.

$$\text{Rezultāts (kopijas/ml)} = \frac{\text{Rezultāts (kopijas/µl)} \times \text{Eluēšanas tilpums (µl)}}{\text{Pauga tilpums (ml)}}$$

Nemiet vērā, ka saskaņā ar vispārējiem noteikumiem iepriekš norādītajā vienādojumā ir jāievada sākotnējā parauga tilpuma vērtība. Tas ir jāņem vērā, ja parauga tilpums tiek mainīts pirms nukleīnskābju ekstrahēšanas (piemēram, tilpuma samazināšanās centrifugēšanas dēļ vai tilpuma paaugstināšana izolēšanai nepieciešamā tilpuma pārplānošanas dēļ).

Svarīgi! Norādījumi par *artus* sistēmu kvalitatīvo analīzi *LightCycler* instrumentā ir pieejami vietnē

www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Tehniska piezīmes par kvantitatīvo noteikšanu *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 vai *LightCycler* 2.0 instrumentā).

8.4. PCR sagatavošana

Pārbaudiet, vai Cooling Block un kapilāru adapteri (*LightCycler* instrumenta piederumi) ir iepriekš atdzesēti līdz +4°C. Ievietojiet vēlamo *LightCycler* kapilāru skaitu Cooling Block adapteros. Nodrošini, lai PCR izpildē ir iekļauts vismaz viens *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāls* un viens negatīvas kontroles materiāls (*PCR kategorijas ūdens*). Lai ģenerētu standarta līkni, katrā PCR izpildē izmantojiet visus komplektācijā iekļautos *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiālus* (*EBV LC/RG/TM QS 1–4*). Pirms katras izmantošanas visi reaģenti ir jāatkausē līdz galam, jā sajauc (vairākkārt ievielkot un izvadot ar pipeti vai ātri saskalojot) un īsu brīdi jācentrifugē.

Ja vēlaties izmantot *iekšējās kontroles materiālu DNS izolēšanas procedūras kontrolei vai iespējamās PCR inhibīcijas pārbaudei*, tas jau ir pievienots izolēšanas šķīdumam (skatīt sadaļu 8.2. *Iekšējās kontroles materiāls*). Šādā gadījumā izmantojiet tālāk norādīto pipetēšanas shēmu (shematisko pārskatu skatīt 1. att.).

	Paraugu skaits	1	12
1. Master maisījuma sagatavošana	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Kopējais tilpums	15 µl	180 µl
2. PCR testa sagatavošana	Master maisījums	15 µl	15 µl no katra
	Paraugšs	5 µl	5 µl no katra
	Kopējais tilpums	20 µl	20 µl no katra

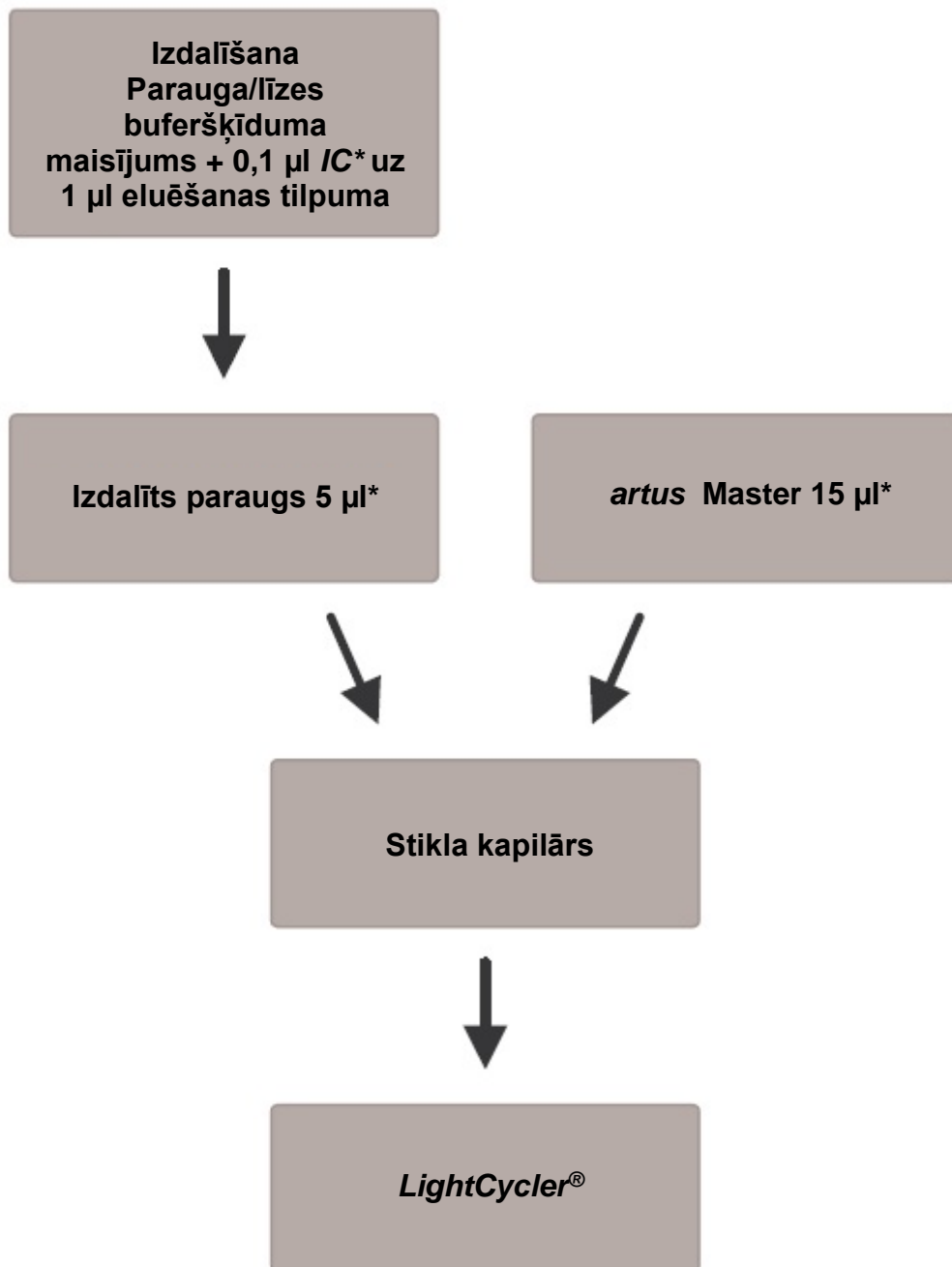
Ja vēlaties *iekšējās kontroles materiālu* izmantot **tikai, lai pārbaudītu PCR inhibīciju**, tas ir jāpievieno tieši materiālam *EBV LC Master*. Šādā gadījumā izmantojiet tālāk norādīto pipetēšanas shēmu (shematisko pārskatu skatīt 2. att.).

	Paraugu skaits	1	12
1. Master maisījuma sagatavošana	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Kopējais tilpums	15,5 µl*	186 µl*
2. PCR testa sagatavošana	Master maisījums	15 µl*	15 µl no katra*
	Paraugs	5 µl	5 µl no katra
	Kopējais tilpums	20 µl	20 µl no katra

Pipetējiet Master maisījuma 15 µl katra kapilāra plastmasas tvertnē. Pēc tam pievienojiet eluētā parauga DNS 5 µl. Līdz ar to kā pozitīvs kontroles materiāls ir jāizmanto 5 µl vismaz viena *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāla (EBV LC/RG/TM QS 1–4)* un kā negatīvs kontroles materiāls 5 µl ūdens (PCR kategorijas *ūdens*). Noslēdziet kapilārus. Lai pārnestu maisījumu no kapilāru plastmasas tvertnes kapilārā, centrifugējiet adapterus ar kapilāriem galda centrifūgā desmit sekundes ar maksimālo ātrumu 400 x *g* (2 000 apgr./min.).

* Sagatavojot PCR testu, tilpuma pieaugums iekšējās kontroles materiāla pievienošanas dēļ netiek ņemts vērā. Noteikšanas sistēmas jutīgums netiek ietekmēts.

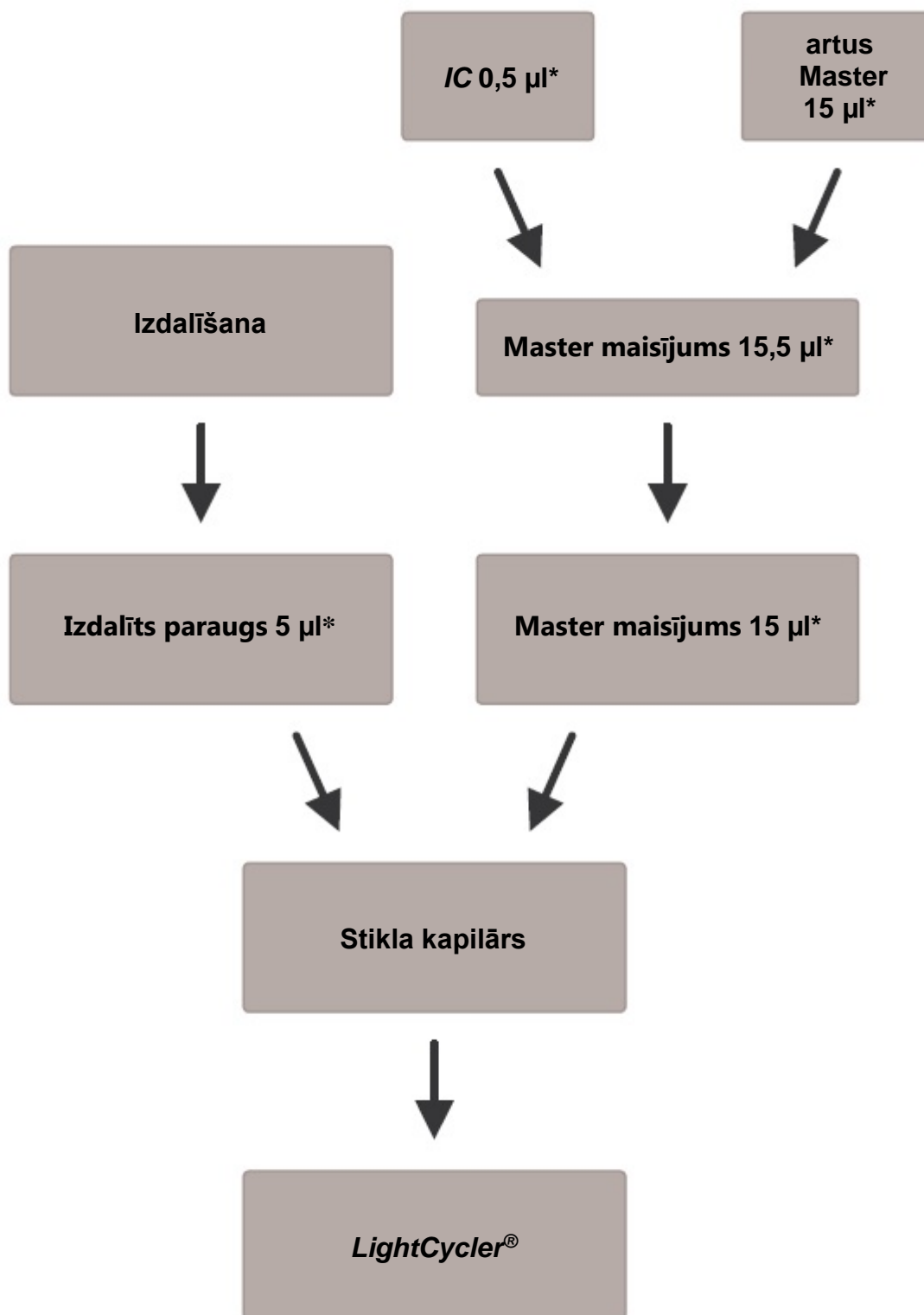
Iekšējās kontroles materiāla pievienošana izdalīšanas procedūrā



1. att. Izdalīšanas procedūras un PCR inhibīcijas kontroles shematiska darbplūsma.

*Nodrošīniet, lai šķīdumi ir līdz galam atkausēti, labi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

lekšējās kontroles materiāla pievienošana artus Master



2. att. PCR inhibīcijas kontroles shematiska darbplūsma.

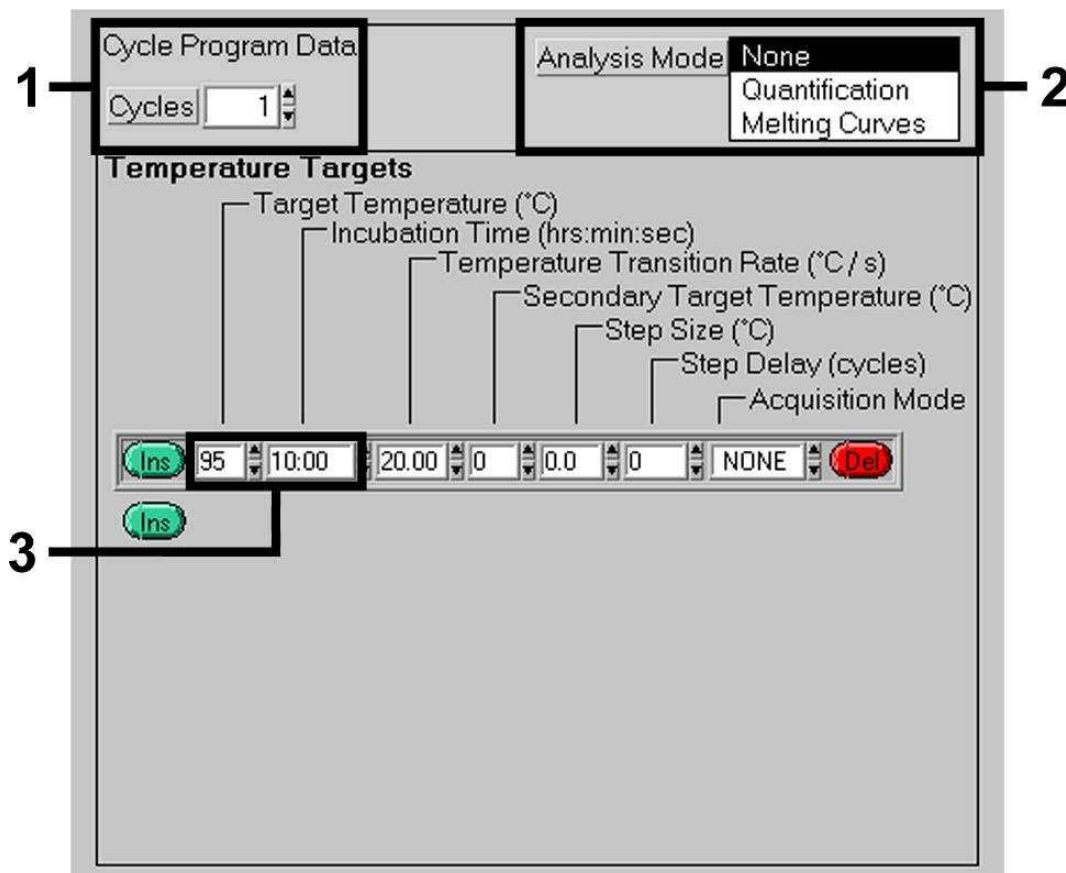
*Nodrošīniet, lai šķīdumi ir līdz galam atkausēti, labi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

8.5. *LightCycler* instrumentu programmēšana

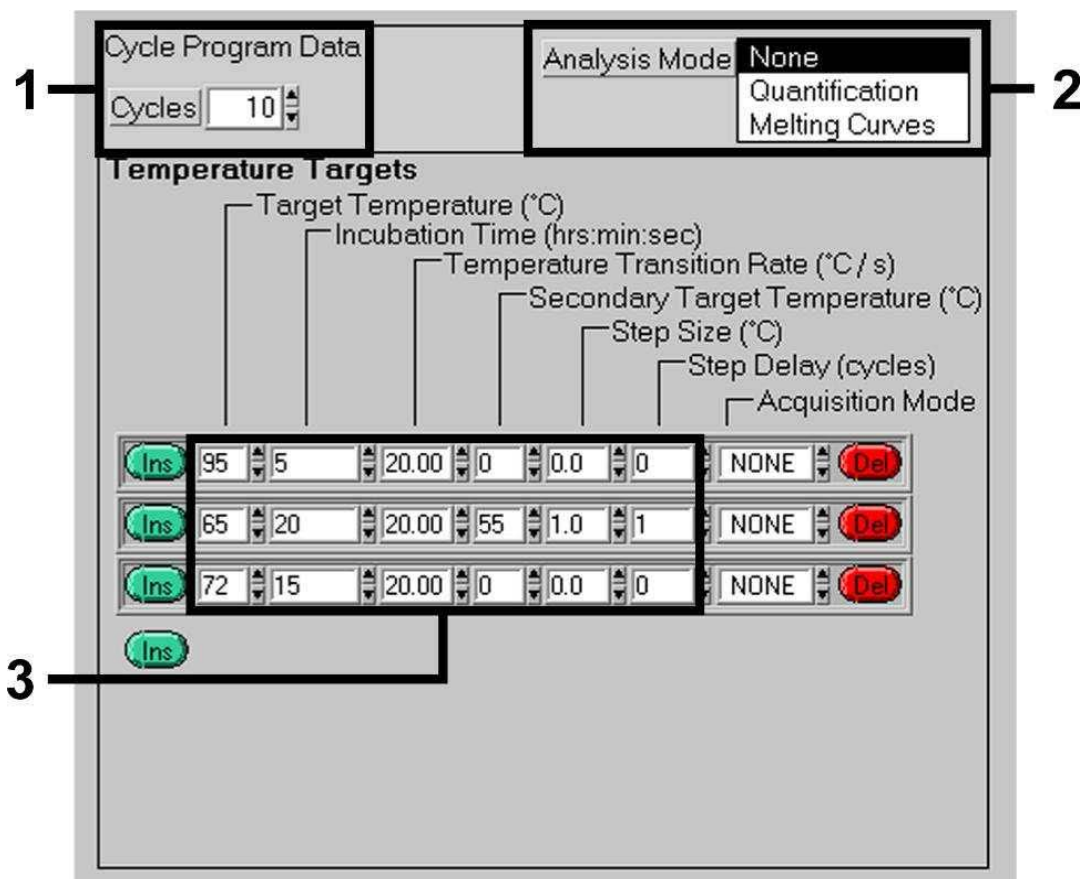
Lai noteiktu EBV DNS, izveidojiet *LightCycler* instrumentā temperatūras profilu, izpildot tālāk norādītās piecas darbības (skatīt 3.–7. att.).

- A. 3. att. Sākotnējā karstās sākšanas enzīma aktivizēšana.
- B. 4. att. Saskares darbība.
- C. 5. att. DNS amplifikācija.
- D. 6. att. Kušanas līkne (izvēles).
- E. 7. att. Dzesēšana.

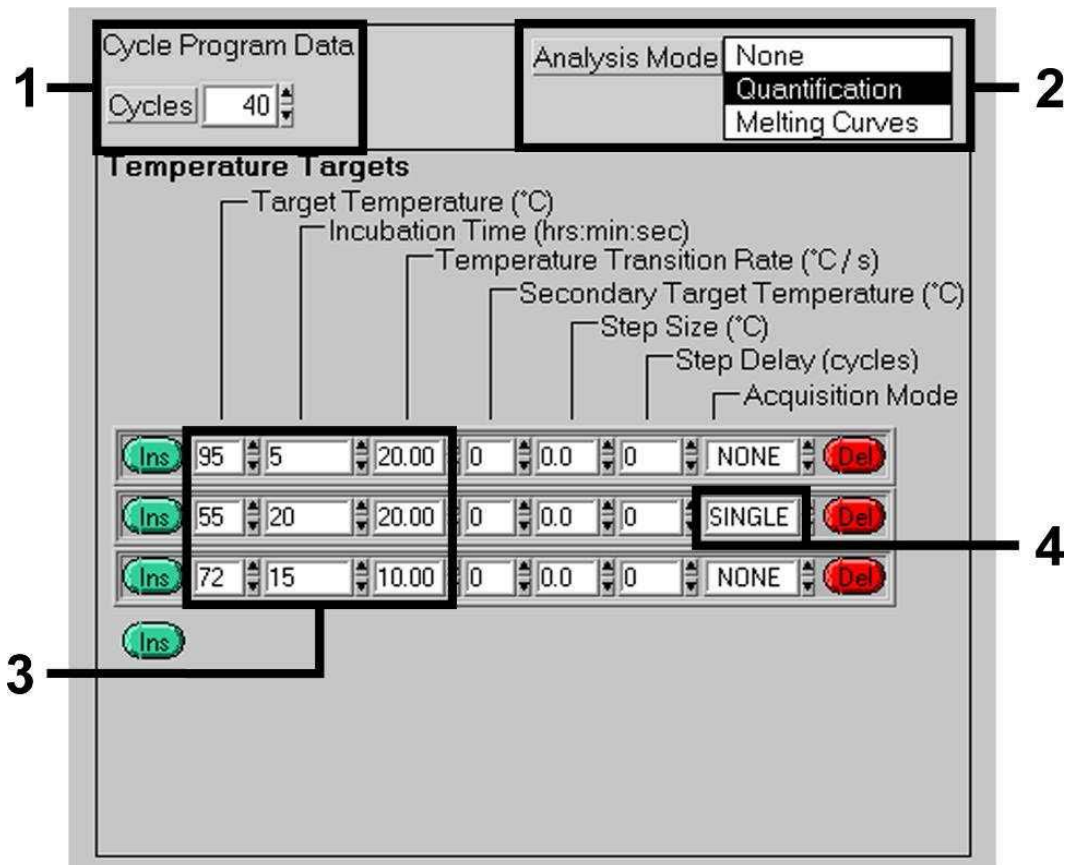
Pievērsiet īpašu uzmanību vienuma *Analysis Mode* (Analīzes režīms), *Cycle Program Data* (Cikla programmas dati) un *Temperature Targets* (Temperatūras mērķa vērtības) iestatījumiem. Attēlos šie iestatījumi ir redzami melnā treknraksta rāmī. Papildu informāciju par *LightCycler* instrumenta programmēšanu skatiet *LightCycler* operatora rokasgrāmatā (*LightCycler Operator's Manual*). D darbība PCR programmā ir **izvēles** darbība, un tā ir jāveic tikai, lai, izmantojot *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, atšķirtu HSV 1 un 2.



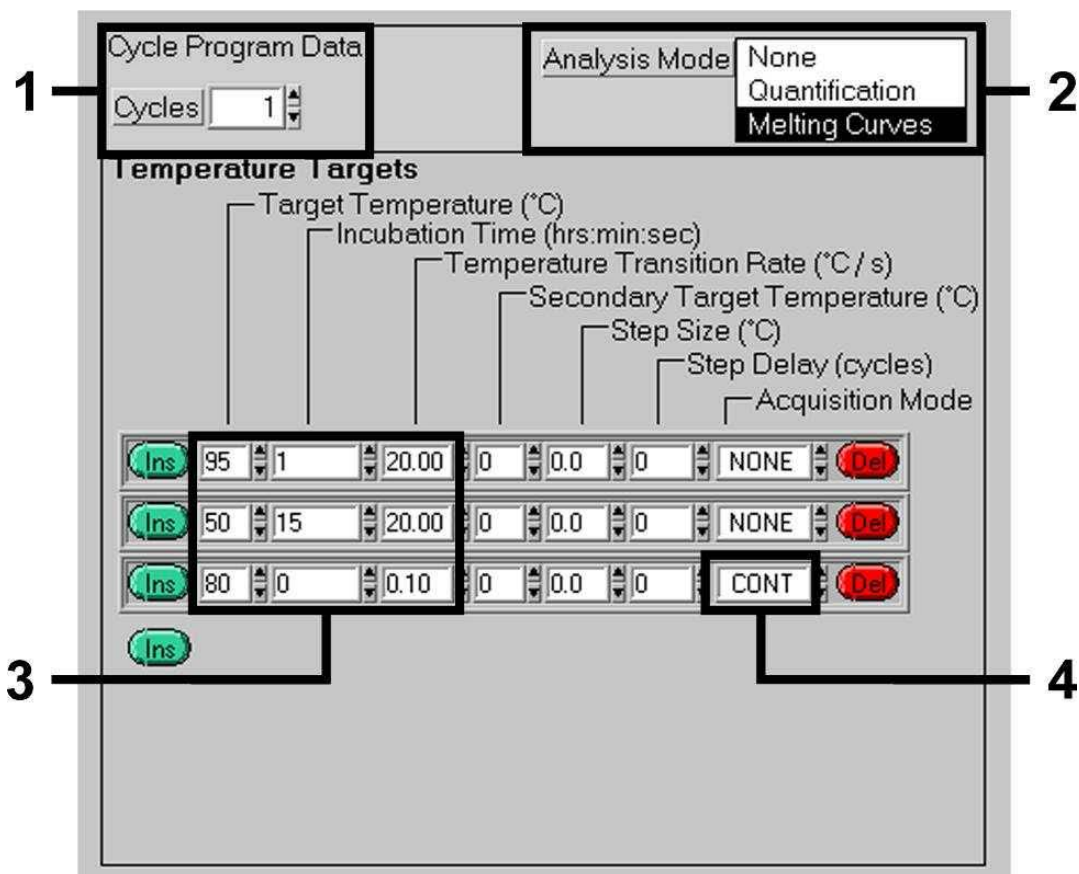
3. att. Sākotnējā karstās sākšanas enzīma aktivizēšana.



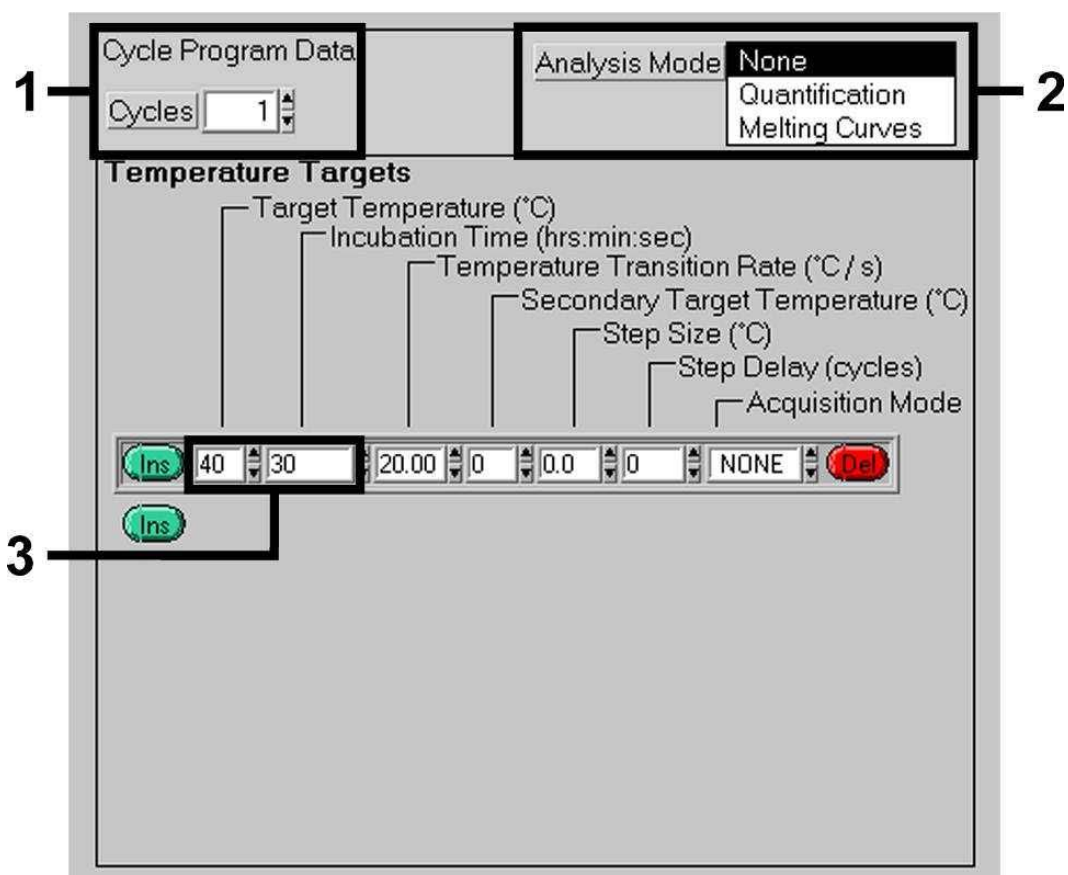
4. att. Saskaņotā darbība.



5. att. DNS amplifikācija.



6. att. Kušanas līkne.



7. att. Dzesēšana.

9. Datu analīze

Vairāku krāsu analīzē starp fluorimetra kanāliem rodas interferences.

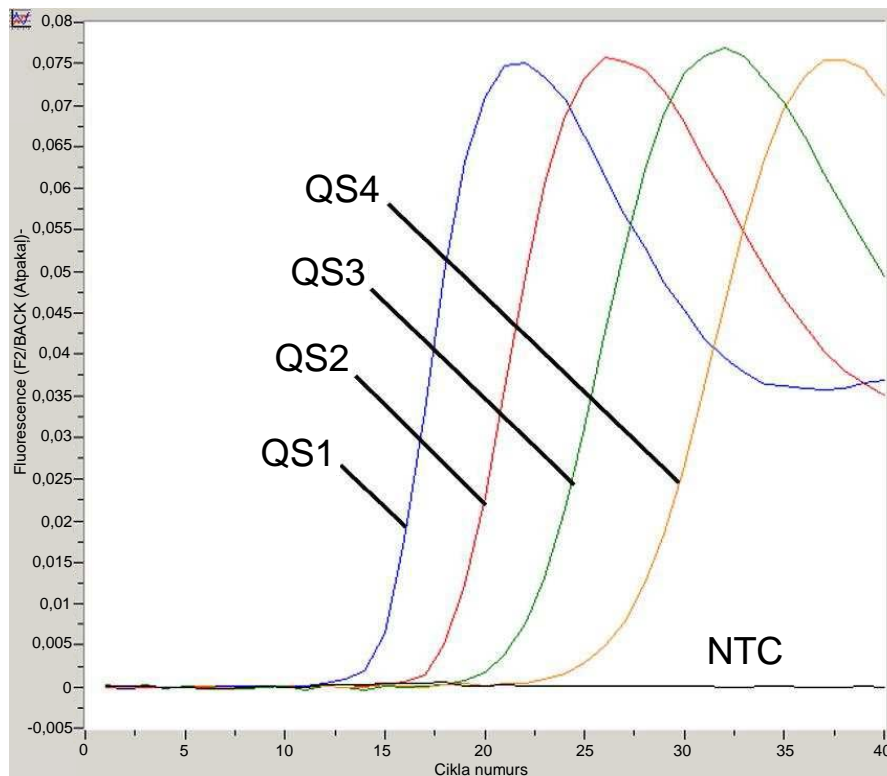
LightCycler instrumenta programmatūra ietver failu ar nosaukumu *Color Compensation File*, kas nodrošina šo interferenču kompensāciju. Aktivizējot failu *Choose CCC File* (Izvēlēties CCC failu) vai pogu *Select CC Data* (Atlasīt CC datus), atveriet šo failu pirms vai pēc PCR vai tās laikā. Ja fails *Color Compensation File* nav instalēts, ģenerējiet failu, ievērojot norādījumus *LightCycler* operatora rokasgrāmatā (*LightCycler Operator's Manual*). Kad fails *Color Compensation File* ir aktivizēts, fluorimetra kanālā F1, F2 un F3 parādās atsevišķi signāli. Lai analizētu PCR rezultātus, kas iegūti ar *artus EBV LC PCR Kit*, atlasiet attiecīgi fluorescences displeja opciju F2/Back (Atpakaļ)-F1 analītiskā EBV PCR un F3/Back (Atpakaļ)-F1 *iekšējās kontroles materiāla* PCR. Lai veiktu kvantitatīvās noteikšanas izpildes datu analīzi, ievērojiet norādījumus, kas sniegti sadaļā 8.3. Kvantitatīvā noteikšana un **dokumentā “Tehniskās piezīmes par kvantitatīvo noteikšanu, izmantojot *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 vai *LightCycler* 2.0 instrumentu” vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.**

Ja PCR izpildē ir integrēta vairāk nekā viena *artus* sistēma herpes vīrusa noteikšanai, analizējiet šo atšķirīgo sistēmu datus, atsevišķi izmantojot attiecīgos kvantitatīvās noteikšanas standarta materiālus. Atlasiet attiecīgi analīzei nepieciešamās rotora pozīcijas.

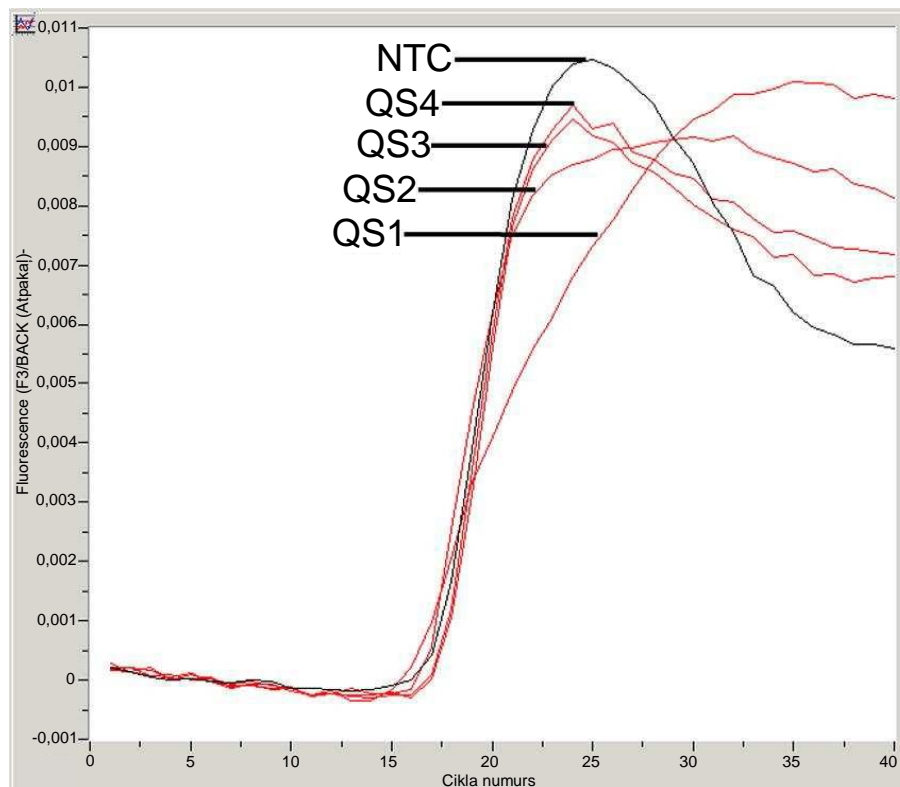
Iespējami ir tālāk norādītie rezultāti.

1. Fluorimetra kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1 ir noteikts signāls.
Analīzes rezultāts ir pozitīvs: paraugs satur EBV DNS.
Šādā gadījumā signāla noteikšana F3/Back (Atpakaļ)-F1 kanālā nav būtiska, jo augstas sākotnējās EBV DNS koncentrācijas vērtības (pozitīvs signāls F2/Back (Atpakaļ)-F1 kanālā) var radīt samazinātu *iekšējās kontroles materiāla* fluorescences signālu F3/Back (Atpakaļ)-F1 kanālā vai tā trūkumu (konkurence).
2. Fluorimetra kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1 nav noteikts neviens signāls.
Vienlaicīgi *iekšējās kontroles materiāla* signāls parādās F3/Back (Atpakaļ)-F1 kanālā.
Paragā EBV DNS nav noteikts. To var uzskatīt par negatīvu.
Ja EBV PCR rezultāts ir negatīvs, noteiktais *iekšējās kontroles materiāla* signāls izslēdz PCR inhibīcijas iespēju.
3. F2/Back (Atpakaļ)-F1 vai F3/Back (Atpakaļ)-F1 kanālā nav noteikts neviens signāls.
Diagnozi nevar noteikt.
Informācija par kļūdu avotiem un to risinājumiem ir pieejama arī sadaļā 10. Problēmu novēršana.

Pozitīvas un negatīvas PCR reakcijas piemēri ir sniegti 8. un 9. att.



8. att. *Kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāla noteikšana (EBV LC/RG/TM QS 1–4) fluorimetra kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1. NTC (non template control): nav matricas kontroles (negatīva kontrole).*



9. att. *Iekšējās kontroles materiāla (IC) noteikšanas fluorimetra kanālā F3/Back (Atpakaļ)-F1 ar vienlaicīgu kvantitatīvās noteikšanas standarta materiālu amplifikāciju (EBV LC/RG/TM QS 1–4). NTC (non-template control): nav matricas kontroles (negatīva kontrole).*

10. Problēmu novēršana

Fluorimetra kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1 nav signāla ar pozitīvas kontroles materiāliem (EBV LC/RG/TM QS 1–4):

- PCR datu analīzei atlasītais fluorimetra kanāls neatbilst protokolam.
 - ➔ Datu analīzei atlasiet fluorimetra kanālu F2/Back (Atpakaļ)-F1 analītiskā EBV PCR un fluorimetra kanālu F3/Back (Atpakaļ)-F1/ *iekšējās kontroles materiāla* PCR.
- Nepareizi programmēts *LightCycler* instrumenta temperatūras profils.
 - ➔ Salīdziniet temperatūras profilu ar protokolu (skatīt sadaļu 8.5. *LightCycler* instrumenta programmēšana).
- Nepareiza PCR reakcijas konfigurācija.
 - ➔ Pārbaudiet veiktās darbības, izmantojot pipetēšanas shēmu (skatīt sadaļu 8.4. PCR sagatavošana), un, ja nepieciešams, atkārtojiet PCR.
- Viena vai vairāku komplekta komponentu uzglabāšanas apstākļi neatbilda 2. sadaļā. “Uzglabāšana” sniegtajiem norādījumiem vai ir beidzies *artus* EBV LC PCR Kit derīguma termiņš.
 - ➔ Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas apstākļus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Vājš *iekšējās kontroles materiāla* signāls fluorimetra kanālā F3/Back (Atpakaļ)-F1 vai tā trūkst un vienlaicīgi trūkst signāla kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1.

- PCR veikšanas apstākļi neatbilst protokolam.
 - ➔ Pārbaudiet PCR veikšanas apstākļus (skatīt iepriekš) un, ja nepieciešams, atkārtojiet PCR, izmantojot labotos iestatījumus.
- Ir radusies PCR inhibīcija.
 - ➔ Pārbaudiet, vai ir izmantota ieteiktā izolēšanas metode (skatīt sadaļu 8.1. DNS izolēšana), un rūpīgi ievērojiet ražotāja norādījumus.
 - ➔ Pārbaudiet, vai DNS izolēšanas laikā pirms eluēšanas ir veikta ieteiktā papildu centrifugēšanas darbība, lai atdalītu atlikušo etanolu (skatīt sadaļu 8.1. DNS izolēšana).
- Ekstrahēšanas laikā DNS ir zaudēts.
 - ➔ Ja ekstrahēšanas procedūrā ir pievienots *iekšējās kontroles materiāls*, *iekšējās kontroles materiāla* signāla trūkums var norādīt uz DNS zudumu ekstrahēšanas laikā. Pārbaudiet, vai ir izmantota ieteiktā izolēšanas metode (skatīt sadaļu 8.1. DNS izolēšana), un rūpīgi ievērojiet ražotāja norādījumus.

- Viena vai vairāku komplekta komponentu uzglabāšanas apstākļi neatbilda 2. sadaļā. “Uzglabāšana” sniegtajiem norādījumiem vai ir beidzies *artus* EBV LC PCR Kit derīguma termiņš.
 - ➔ Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas apstākļus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Analītiskās PCR fluorimetra kanālā F2/Back (Atpakaļ)-F1 negatīvās kontroles materiālu signāli.

- PCR sagatavošanas laikā ir radusies kontaminācija.
 - ➔ Atkārtojiet PCR, atkārtojumos izmantojot jaunus reaģentus.
 - ➔ Ja iespējams, noslēdziet PCR stobriņus uzreiz pēc testējamā parauga pievienošanas.
 - ➔ Obligāti pipetējiet pozitīvās kontroles materiālus pēdējos.
 - ➔ Nodrošiniet, lai regulāri tiek veikta darba vietas un instrumentus dekontaminēšana.
- Ekstrahēšanas laikā ir radusies kontaminācija.
 - ➔ Atkārtojiet testējamā parauga ekstrahēšanas un PCR procedūru, izmantojot jaunus reaģentus.
 - ➔ Nodrošiniet, lai regulāri tiek veikta darba vietas un instrumentus dekontaminēšana.

Ja jums ir papildu jautājumi vai ja ir radušās problēmas, sazinieties ar vietējo tehniskā atbalsta dienestu.

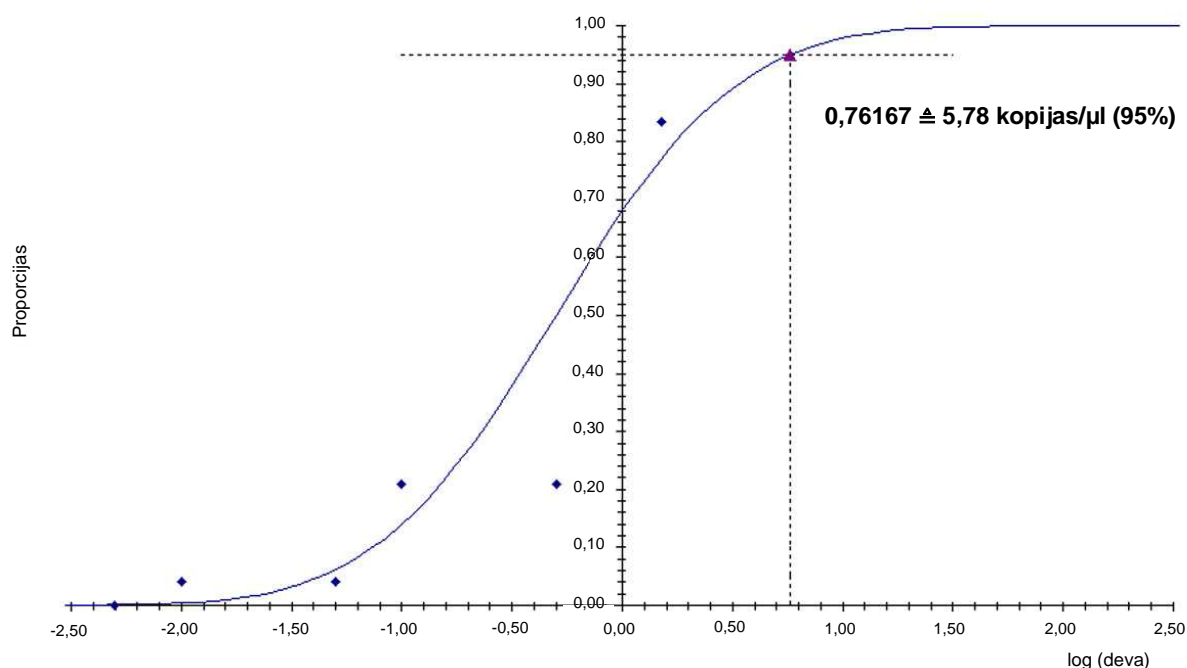
11. Specifikācija

11.1. Analītiskais jutīgums

Lai noteiktu komplekta *artus* EBV LC PCR Kit analītisko jutīgumu, tika sagatavota atšķaidīšanas sērija no 50 līdz nomināli 0,005 EBV kopiju ekvivalenti*/ μ l un analizēta, izmantojot komplektu *artus* EBV LC PCR Kit. Testēšana tika veikta trīs dažādās dienās, izmantojot astoņus atkārtojumus. Rezultāti tika noteikti pēc probita analīzes. Probita analīzes grafiskais attēlojums ir redzams 10. att. Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit analītiskās noteikšanas robeža ir 5,78 kopijas/ μ l ($p = 0,05$). Tas nozīmē, ka pastāv 95% varbūtība, ka tiks noteiktas 5,78 kopijas/ μ l.

* Standarta materiāls ir klonēts PCR produkts, kura koncentrācija ir noteikta ar absorbcijas un fluorescences spektroskopiju.

Probita analīze: Epšteina-Barras vīruss (*LightCycler*)



10. att. Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit analītiskais jutīgums.

11.2. Specifiskums

Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit specifiskumu vispirms un galvenokārt nodrošina praimeru un zonžu izvēle, kā arī precīzu reakcijas apstākļu ievērošana. Tika pārbaudīts, vai praimeriem un zondēm nav iespējama homologiju attiecībā uz visām gēnu bankā publicētajām sekvencēm, izmantojot sekvenču salīdzināšanas analīzi. Tādējādi tiek nodrošināta visu attiecīgo genotipu noteikšana.

Turklāt specifiskums tika apstiprināts ar sešiem dažādiem EBV negatīviem seruma paraugiem. Tie neģenerēja nevienu signālu ar EBV specifiskiem praimeriem un zondēm, kas ir iekļauti *EBV LC Master* komplektācijā.

Lai noteiktu *artus* EBV LC PCR Kit specifiskumu, nākamajā tabulā (skatīt 1. tab.) norādītā kontroles grupa tika testēta krusteniskās reaktivitātes noteikšanai. Neviens no testētajiem patogēniem nebija reaģējošs.

1. tabula. Komplekta specifiskuma testēšana ar potenciāliem krusteniskās reaktivitātes patogēniem

Kontroles grupa	EBV (F2/Back (Atpakaļ)- F1)	Iekšējās kontroles materiāls (F3/Back (Atpakaļ)-F1)
Cilvēka herpes vīruss 1 (Herpes simplex vīruss 1)	–	+
Cilvēka herpes vīruss 2 (Herpes simplex vīruss 2)	–	+
Cilvēka herpes vīruss 3 (Varicella zoster vīruss)	–	+
Cilvēka herpes vīruss 5 (citomegalovīrus)	–	+
Cilvēka T šūnu leukēmijas vīruss 1	–	+
Cilvēka T šūnu leukēmijas vīruss 2	–	+

11.3. Precizitāte

Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit precizitātes dati ļauj noteikt testa kopējo mainīgumu. Kopējo mainīgumu veido **starptestu mainīgums** (vienas koncentrācijas paraugu vairāku rezultātu mainīgums vienā eksperimentā), **iekšējais testa mainīgums** (dažādu operatoru vienā laboratorijā vienāda tipa dažādos instrumentos ģenerētu vairāku testu rezultātu mainīgums) un **iekšējais sērijas mainīgums** (testa vairāku rezultātu mainīgums, izmantojot vairākas sērijas). Iegūtos datus izmantoja, lai noteiktu konkrētu patogēnu un *iekšējās kontroles materiāla* PCR standartnovirzes, mainīguma un novirzes koeficienta vērtības.

Komplekta *artus* EBV LC PCR Kit precizitātes dati tika apkopoti, izmantojot zemākās koncentrācijas *kvantitatīvās noteikšanas standarta materiālu* (QS 4; 50 kopijas/μl). Testēšanu veica, izmantojot astoņus atkārtojumus. Precizitātes dati tika aprēķināti, izmantojot amplifikācijas līknes Ct vērtības (Ct: robežvērtības cikls, skatīt 2. tab.). Papildus tika noteikti kopiju/μl kvantitatīvo rezultātu precizitātes dati, izmantojot Ct vērtības (skatīt 3. tab.). Ņemot vērā šos rezultātus, visu konkrēto paraugu ar norādīto koncentrāciju vispārējā statistisko datu starpība *iekšējās kontroles materiāla* 1,02% (Ct) noteikšanai ir 1,17% (Ct) vai 14,54% (konc.). Šīs vērtības ir atkarīgas no noteikto mainīgo lielumu visu atsevišķo vērtību kopuma.

2. tabula. Precizitātes dati saskaņā ar Ct vērtībām

	Standartnovirze	Variācija	Variācijas koeficients [%]
Starptestu mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Starptestu mainīgums <i>lekšējās kontroles materiāls</i>	0,04	0,00	0,28
lekšējais testa mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
lekšējais testa mainīgums <i>lekšējās kontroles materiāls</i>	0,11	0,01	0,72
lekšējais sērijas mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
lekšējais sērijas mainīgums <i>lekšējās kontroles materiāls</i>	0,19	0,03	1,23
Kopējais mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,71
Kopējais mainīgums <i>lekšējās kontroles materiāls</i>	0,15	0,02	1,02

3. tabula. Precizitātes dati saskaņā ar kvantitatīvajiem rezultātiem (kopijās/μl)

	Standartnovirze	Variācija	Variācijas koeficients [%]
Starptestu mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Iekšējais testa mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Iekšējais sērijas mainīgums EBV LC/RG/TM QS	4 1,33	1,77	13,19
Kopējais mainīgums <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

11.4. Atkārtojamība

Atkārtojamības dati ļauj regulāri novērtēt *artus* EBV LC PCR Kit veiktspēju, kā arī salīdzināt tā efektivitāti ar citiem produktiem. Šie dati tiek iegūti, piedaloties izveidotajās kvalifikācijas programmās.

11.5. Diagnostiskā izvērtēšana

Pašreiz notiek vairāki izvērtēšanas pētījumi ar komplektu *artus* EBV LC PCR Kit.

12. Produkta izmantošanas ierobežojumi

- Visus reaģentus jāizmanto tikai *in vitro* diagnostikā.
- Produktu drīkst lietot tikai *in vitro* diagnostikas procedūru veikšanā īpaši apmācīta persona, kas saņēmusi attiecīgus norādījumus.
- Lai nodrošinātu optimālus PCR rezultātus, precīzi jāievēro lietotāja rokasgrāmatā sniegtie norādījumi.
- Pievērsiet uzmanību derīguma termiņiem, kas norādīti uz kastītes un visu komponentu etiķetēm. Komponentus, kam beidzies derīguma termiņš, izmantot nedrīkst.

13. Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Ar komplektu *artus* EBV LC PCR Kit saistīto drošības informāciju skatiet attiecīgajā drošības datu lapā (safety data sheet, SDS). SDS ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas tiešsaistē vietnē www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitātes kontrole

Saskaņā ar standarta ISO 9001 un ISO 13485 sertifikācijas QIAGEN kopējās kvalitātes vadības sistēmu katra komplekta *artus* EBV LC PCR Kit partija ir pārbaudīta, salīdzinot ar iepriekš noteiktiem parametriem, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti.

15. Atsauces

16. Simbolu skaidrojums



Izlietot līdz



Sērijas kods



Ražotājs



Kataloga numurs



Materiāla numurs



Rokasgrāmata



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs (GTIN)



<N>

Saturs ir pietiekams <N> testiem



Temperatūras ierobežojums

QS

Kvantitatīvās noteikšanas standarta materiāls

IC

Iekšējās kontroles materiāls

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

artus EBV LC PCR Kit

Preču zīmes un paziņojumi

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group).

Nedrīkst uzskatīt, ka šajā dokumentā minētos reģistrētos nosaukumus, preču zīmes u.c. neaizsargā likums, pat ja pretējais nav īpaši norādīts.

Komplekts *artus* EBV LC PCR Kit, darbstacija BioRobot EZ1 Workstation un komplekts EZ1 DSP Virus Kit un karte Card ar CE marķējumu atbilst Eiropas Direktīvas 98/79/EK par medicīnas ierīcēm, ko lieto *in vitro* diagnostikā, prasībām. Visās valstīs nav pieejami.

QIAamp komplektus ir paredzēti tikai vispārīgas nozīmes izmantošanai laboratorijās. Neviena prasība vai pārstāvība neparedz informācijas diagnozes noteikšanai, profilaksei vai slimības ārstēšanai sniegšanu.

artus PCR komplektu pircējs saņem ierobežotu licenci to lietošanai polimerāzes ķēdes reakcijas (polymerase chain reaction, PCR) procesos cilvēku un dzīvnieku izcelsmes paraugu *in vitro* diagnostikā kopā ar termoprocesoru, kura izmantošana PCR procesa automatizētājā izpildē ir iekļauta licences avansa maksājumā, kas veikts vai nu ar maksājumu Applied Biosystems, vai arī produkta, t. i., apstiprināta termoprocesora, iegādes brīdī. Uz PCR procesu attiecas ASV patenti Nr. 5,219,727 un 5,322,770, un 5,210,015, un 5,176,995, un 6,040,166, un 6,197,563, un 5,994,056, un 6,171,785, un 5,487,972, un 5,804,375, un 5,407,800, un 5,310,652, un 5,994,056 ārzemju līdzvērtīgi patenti, kas pieder F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

