

Wrzesień 2017

Karta zastosowań QIAAsymphony[®] RGQ

Zestaw *artus*[®] EBV QS-RGQ
(rodzaj próbki: osocze)

IVD



REF

4501363PL Zestaw *artus* EBV QS-RGQ, wersja 1.



Przed wykonaniem testu sprawdzić, czy na stronie www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx są dostępne nowe wersje dokumentacji w postaci elektronicznej.

Informacje ogólne

Zestaw	Zestaw <i>artus</i> EBV QS-RGQ, wersja 1 (nr kat. 4501363)
Zwalidowany materiał próbki	Ludzkie osocze pobrane na EDTA
Oczyszczanie wstępne	Zestaw QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi (nr kat. 937055)
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Zestaw parametrów oznaczenia	artus_EBV_plasma1000_V5 MA_artus_EBV_plasma1000_V5*
Domyślny zestaw kontroli oznaczenia	Cellfree1000_V7_DSP_artus_EBV
Objętość elucji	60 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa
Objętość Master mix	30 µl
Objętość matrycy	20 µl
Liczba reakcji	6–24
Czas trwania cyklu na module AS	Dla 6 reakcji: około 9 minut Dla 72 reakcji: około 35 minut

* Protokół dla cyklu z wieloma oznaczeniami zestawem *artus* CMV QS-RGQ do załadowania CMV RG IC do procesu oczyszczania oraz konfiguracji oznaczenia.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Zestaw do oczyszczania

- Zestaw QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi (nr kat. 937055)

Adaptory do QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Statyw do mikropróbówek do elucji QS) (Cooling Adapter (Adapter chłodzący), EMT, wersja 2, Qsym, nr kat. 9020730)

- Ramka do transferu
- Tube Insert 3B (Wkład do probówki 3B) (Insert (Wkład), 2,0 ml, wersja 2, samplecarr. (24), Qsym, nr kat. 9242083)

Materiały eksploatacyjne do QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (Kartridże do przygotowywania próbek, 8 miejsc) (nr kat. 997002)
- 8-Rod Covers (Zamknięcia 8-sztyftowe) (nr kat. 997004)
- Filter-Tips (Końcówki z filtrem), 1500 µl (nr kat. 997024)
- Filter-Tips (Końcówki z filtrem), 200 µl (nr kat. 990332)
- Elution Microtubes CL (Mikroprobówki do elucji CL) (nr kat. 19588)
- Tip disposal bags (Worki na zużyte końcówki) (nr kat. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H (Mikroprobówki 2,0 ml typu H) lub Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroprobówki 2,0 ml typu I) (Sarstedt®, nr kat. 72.693 i 72.694, www.sarstedt.com) do użytku z próbkami oraz kontrolami wewnętrznymi

Adaptory i uchwyty do odczynników dla QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Uchwyt do odczynników 1 QS) (Cooling Adapter (Adapter chłodzący), Reagent Holder 1 (Uchwyt do odczynników 1), Qsym), nr kat. 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (Pasek probówek RG 72 QS) (Cooling Adapter (Adapter chłodzący), RG Strip Tubes 72 (Pasek probówek RG 72), Qsym), nr kat. 9018092)

Materiały eksploatacyjne do QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps (Pasek probówek i zamknięcia), 0,1 ml (nr kat. 981103)
- Tubes, conical (Probówki stożkowe), 2 ml, Qsym AS (nr kat. 997102) lub Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroprobówki 2,0 ml typu I) (Sarstedt, nr kat. 72.694.005)
- Inna możliwość: Tubes, conical (Probówki stożkowe), 5 ml, Qsym AS (nr kat. 997104) lub Tubes with flat base from PP (Probówki o płaskim dnie z polipropylenu) (Sarstedt, nr kat. 60.558.001)
- Filter-Tips (Końcówki z filtrem), 1500 µl (nr kat. 997024)
- Filter-Tips (Końcówki z filtrem), 200 µl (nr kat. 990332)
- Filter-Tips (Końcówki z filtrem), 50 µl (nr kat. 997120)
- Tip disposal bags (Worki na zużyte końcówki) (nr kat. 9013395)

Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie

Pobieranie próbek	Próbka krwi 5–10 ml krwi pobranej do EDTA Wymieszać, obracając 8x do góry dnem — nie wstrząsać! Nie należy używać próbek heparynizowanej ludzkiej krwi.
Przechowywanie próbek	Rozdzielenie: Wirować przez 20 minut, 800–1600 x g w ciągu 24 godzin od pobrania. Przenieść wyizolowane osocze do sterylnej próbki wykonanej z polipropylenu. Rutynowe mrożenie próbek lub przechowywanie ich przez długi czas może zmniejszyć czułość testu.
Transport próbek	Transport chroniący przed stłuczeniem Dostawa w ciągu 24 godzin Przesyłka pocztą zgodnie z przepisami dotyczącymi transportu materiałów zakaźnych* Podczas transportu próbki powinny być schłodzone (od 2 do 8°C)
Substancje zakłócające	Heparyna (≥ 10 IU/ml) wpływa na reakcję PCR. Nie używać próbek pobranych do probówek z heparyną wykorzystywaną jako antykoagulant lub próbek pobranych od pacjentów leczonych heparyną.
Przygotowanie próbki	Unikać tworzenia się piany w próbkach lub na ich powierzchni Próbki należy doprowadzić do temperatury pokojowej (15–25°C) przed rozpoczęciem wykonywania procedury.

* Międzynarodowe Zrzeszenie Przewoźników Powietrznych (International Air Transport Association, IATA). Przepisy dotyczące transportu materiałów niebezpiecznych w międzynarodowym transporcie lotniczym (Dangerous Goods Regulations).

Procedura

Przygotowanie nośnika RNA oraz dodawanie wewnętrznej kontroli do próbek

Stosowanie zestawu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi wraz z zestawem *artus* EBV QS-RGQ wymaga wprowadzenia kontroli wewnętrznej (EBV RG IC) do procedury oczyszczania, aby monitorować wydajność przygotowania próbek i dalszy przebieg oznaczenia.

W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdy podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno EBV, jak i CMV, upewnić się, że podczas procesu oczyszczania używany jest CMV RG IC z zestawu *artus* CMV QS-RGQ. Należy użyć kontroli CMV RG IC z tej samej serii zarówno do przygotowania próbek, jak i ustawienia oznaczenia dla kontroli PCR. Nie należy używać kontroli CMV RG IC o innym numerze serii.

Kontrole wewnętrzne należy dodać wraz z mieszaniną nośnik RNA (CARRIER)–bufor AVE (AVE). Całkowita objętość mieszaniny kontrola wewnętrzna–nośnik RNA (CARRIER)–bufor AVE (AVE) wynosi 120 µl.

W tabeli przedstawione jest dodanie kontroli wewnętrznej do izolacji w stosunku 0,1 µl na 1 µl objętości elucji. Zaleca się przygotowanie świeżych mieszanin tuż przed każdym oznaczeniem. Zamiennie można użyć narzędzia „IC Calculator” (Kalkulator IC) w panelu zarządzania QIASymphony.

Składnik	Objętość (µl) (probówki Sarstedt)*	Objętość (µl) (probówki Corning)†
Wyjściowy roztwór nośnika RNA (CARRIER)	5	5
Kontrola wewnętrzna‡	9	9
Bufor AVE	106	106
Objętość końcowa na próbkę (wyłączając objętość martwą)	120	120
Całkowita objętość dla n próbek	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* Micro tubes 2.0 ml Type H (Mikroprobówki 2,0 ml typu H) i Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroprobówki 2,0 ml typu I), Sarstedt nr kat. 72.693 i 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Probówki polistyrenowe z okrągłym dnem 14 ml, 17 x 100 mm) (Corning® Inc., nr kat. 352051; poprzednim dostawcą tych probówek była firma Becton Dickinson, nowym dostawcą jest firma Corning Inc.).

‡ Obliczenie ilości kontroli wewnętrznej jest oparte na początkowych objętościach elucji (90 µl). Dodatkowa objętość nieużyteczna zależy od typu użytej probówki dla próbki.

§ Wymagane jest użycie objętości mieszaniny wewnętrznej odpowiadającej 3 dodatkowym próbkom (tj. 360 µl). Nie dopełniać powyżej objętości całkowitej 1,92 ml (odpowiadającej maksymalnej liczbie 13 próbek). Objętości te są charakterystyczne dla Micro tubes 2.0 ml Type H (Mikroprobówki 2,0 ml typu H) i Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroprobówki 2,0 ml typu I), Sarstedt nr kat. 72.693 i 72.694).

¶ Wymagane jest użycie objętości mieszaniny wewnętrznej odpowiadającej 5 dodatkowym próbkom (tj. 600 µl). Nie dopełniać powyżej objętości całkowitej 13,92 ml (odpowiadającej maksymalnej liczbie 111 próbek). Objętości te są charakterystyczne dla Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Probówki polistyrenowe z okrągłym dnem 14 ml, 17 x 100 mm) (Corning Inc., nr kat. 352051; poprzednim dostawcą tych probówek była firma Becton Dickinson, nowym dostawcą jest firma Corning Inc.).

Konfiguracja QIASymphony SP

Szuflada „Waste” (Odpady)

Uchwyt na pojemnik 1–4	Opróżnić pudełka
Uchwyt na worek na odpady	Worek na odpady
Uchwyt na butlę na odpady płynne	Opróżnić i zainstalować butlę na odpady płynne

Szuflada „Eluate” (Eluat)

Statyw do elucji	Mikropróbki do elucji CL na statyw do próbek do elucji QS oraz ramka do transferu Użyć otworu 1, pozycji chłodzenia
Objętość elucji*	Wstępnie zdefiniowana objętość elucji: 60 µl Początkowa objętość elucji: 90 µl

* Objętość elucji jest wybrana wstępnie dla danego protokołu. Jest to minimalna dostępna objętość eluatu w końcowej próbce elucji. Początkowa objętość roztworu elucji jest wymagana do zapewnienia właściwej objętości eluatu, równej wstępnie zdefiniowanej wartości.

Szuflada „Reagents and Consumables” (Odczynniki i materiały eksploatacyjne)

Pozycja RC 1 i 2	Załadować 1 kartridż na odczynniki (RC) na maksymalnie 48 próbek lub 2 nowe kartridże na odczynniki (RC) na maksymalnie 96 próbek.
Uchwyt statywu na końcówki pozycje 1–18	Załadować wystarczającą liczbę statywów z jednorazowymi końcówkami z filtrem, 200 µl i 1500 µl (patrz „Wymagane elementy plastikowe dla 1–4 pakietów próbek”, strona 7)
Uchwyt na pojemnik pozycja 1–4	Załadować pojemniki zawierające kartridże do przygotowania próbek i zamknięcia 8-szyftowe (patrz „Wymagane elementy plastikowe dla 1–4 pakietów próbek”, strona 7)

Szuflada „Sample” (Próbka)

Typ próbki	Ludzkie osocze pobrane na EDTA
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Probówki z próbkami	Micro tubes 2.0 ml Type H (Mikroprobówki 2,0 ml typu H) lub Micro tubes 2.0 ml Type I (Mikroprobówki 2,0 ml typu I), (Sarstedt nr kat. 72.693 i 72.694)
Wkład	Tube Insert 3B (Wkład do probówki 3B) (nr kat. 9242083)

Wymagane elementy plastikowe dla 1–4 pakietów próbek

Składnik	Jeden pakiet, 24 próbki*	Dwa pakiety, 48 próbek*	Trzy pakiety, 72 próbki*	Cztery pakiety, 96 próbek*
Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl ^{†‡}	28	52	76	100
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl ^{†‡}	113	206	309	402
Kartridże do przygotowania próbek [§]	21	42	54	72
Zamknięcia 8-szyftowe [¶]	3	6	9	12

* Użycie więcej niż jednej probówki kontroli wewnętrznej na pakiet oraz przeprowadzenie więcej niż jednego skanu inwentaryzującego wymaga dodatkowych jednorazowych końcówek do filtrów.

[†] Na statywie znajdują się 32 końcówki z filtrem.

[‡] Liczba wymaganych końcówek z filtrem obejmuje końcówki dla 1 skanu inwentaryzującego na kartridż do odczytników.

[§] W pojemniku znajduje się 28 kartridży do przygotowania próbek.

[¶] W pojemniku znajduje się dwanaście zamknięć 8-szyftowych.

Konfiguracja QIASymphony AS

Materiały eksploatacyjne

Podczas konfiguracji właściwa pozycja każdego materiału eksploatacyjnego w module QIASymphony AS jest wskazywana na ekranie dotykowym urządzenia.

Rodzaj materiału eksploatacyjnego	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym	Do użytku z adapterem/uchwytem do odczynników
Pasek probówek i wieczka, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	Pasek probówek RG 72 QS
Probówki stożkowe, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Uchwyt do odczynników 1 QS
Probówki stożkowe, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Uchwyt do odczynników 1 QS

* Oznacza element laboratoryjny, który można schłodzić za pomocą adaptera chłodzącego z kodem kreskowym.

† Dla odczynników wchodzących w skład master mix, master mix przygotowanego w systemie, standardów oznaczenia i kontroli oznaczenia.

‡ Zamiennie można użyć probówek Sarstedt opisanych w „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 2.

§ Przyrostek „(m)” widoczny na ekranie dotykowym oznacza, że obliczenia dotyczące poziomu płynu dla stosowanej probówki zoptymalizowano pod kątem odczynników tworzących menisk wklęsły.

Adaptory i uchwyty do odczynników

Statyw/uchwyt do odczynników	Nazwa	Wymagana liczba [¶]
Uchwyty do odczynników	Uchwyt do odczynników 1 QS	1
Statywy na próbki	Pasek probówek RG 72 QS	1

[¶] Ilość obliczona dla cyklu oznaczeń z 72 reakcjami.

Końcówki z filtrem

Załadować statywy na końcówki, zaczynając od otworów 1, 2 i 3 w szufladzie „Eluate and Reagents” (Eluat i odczynniki). W dalszej kolejności załadować statywy do otworów 7, 8 i 9 w szufladzie „Assays” (Oznaczenia).

Rodzaj materiału eksploatacyjnego	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym	Minimalna liczba dla 24 reakcji	Minimalna liczba dla 72 reakcji
Końcówki z filtrem, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	5
Końcówki z filtrem, 200 µl (1024)	200 µl	9	8
Końcówki z filtrem, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Worki na zużyte końcówki	–	1	1

Reakcja PCR w urządzeniu Rotor-Gene Q*

Szczegółowe informacje dotyczące protokołu znajdują się w arkuszu protokołu *Settings to run artus QS-RGQ Kits* (Ustawienia cykli dla zestawów artus QS-RGQ) specyficznym dla oprogramowania na stronie www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx.

Szczegółowe ustawienia dla zestawu artus EBV QS-RGQ

Szczegółowe ustawienia oprogramowania Rotor-Gene® w wersji 2.1 lub nowszej są przedstawione poniżej.

Objętość reakcji (µl)	50
Wstępna denaturacja	Temperatura wstępnej denaturacji (Hold Temperature): 95 stopni Czas trwania wstępnej denaturacji (Hold Time): 10 minut
Cykle	45 razy 95 stopni przez 15 sekund 65 stopni przez 30 sekund (Uzyskać na kanale zielonym, żółtym i włączyć funkcję „touch-down” dla 10 cykli) 72 stopni przez 20 sekund
Konfiguracja optymalizacji automatycznego wzmocnienia	65 stopni (Próbki: kanał zielony; IC: kanał żółty)

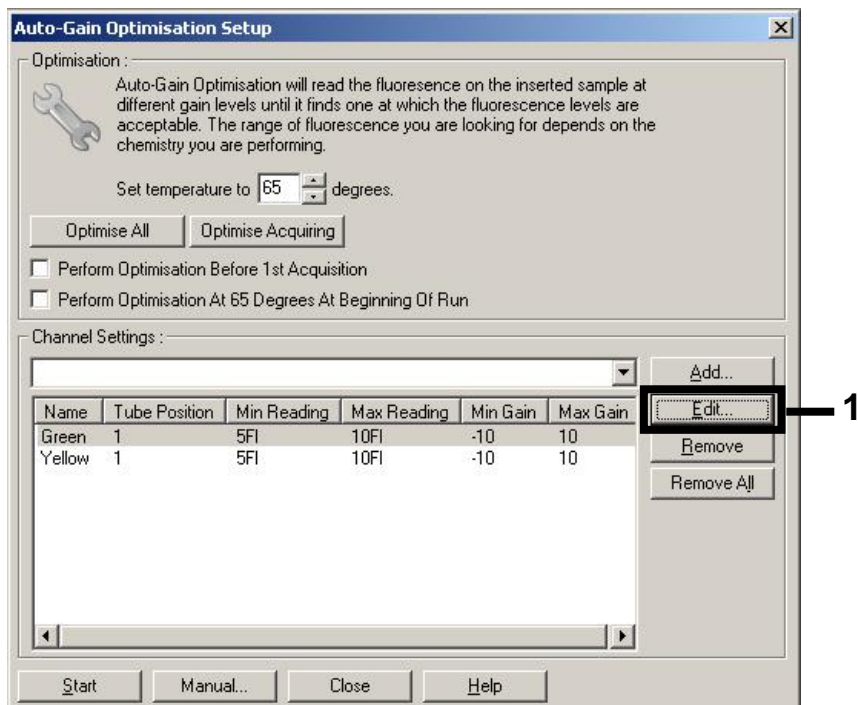
Cykl z wieloma oznaczeniami

Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie intensywności fluorescencji zawartości próbek PCR. Kliknąć opcję **Gain Optimisation** (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym **New Run Wizard** (Asystent nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe **Auto-Gain Optimisation Setup** (Konfiguracja optymalizacji automatycznego wzmocnienia) (patrz krok 6 i rysunek 7 w arkuszu protokołu *Settings to run artus QS-RGQ Kits* (Ustawienia cykli dla zestawów artus QS-RGQ)).

* Jeśli dotyczy, urządzenie Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowane w styczniu 2010 roku lub później. Datę produkcji można odczytać z numeru seryjnego umieszczonego na tylnej części urządzenia. Numer seryjny jest zapisany w formacie „mmrrnnn”, gdzie „mm” określa miesiąc produkcji w cyfrach, „rr” określa dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” określa unikalny identyfikator urządzenia.

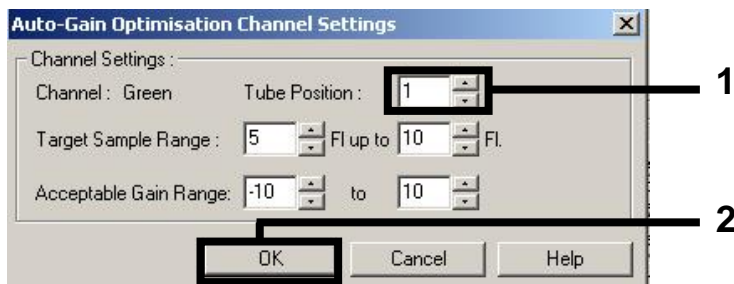
W przypadku cyklu pojedynczego oznaczenia ustawić temperaturę kalibracji na **65**, aby odpowiadała temperaturze przyłączania starterów z programu amplifikacji. W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdzie podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno CMV i EBV, ręcznie dostosować intensywność kanałów fluorescencyjnych.

1. Kliknąć opcję **Edit** (Edytuj) (Rys. 1), aby edytować ustawienia kanałów fluorescencyjnych.



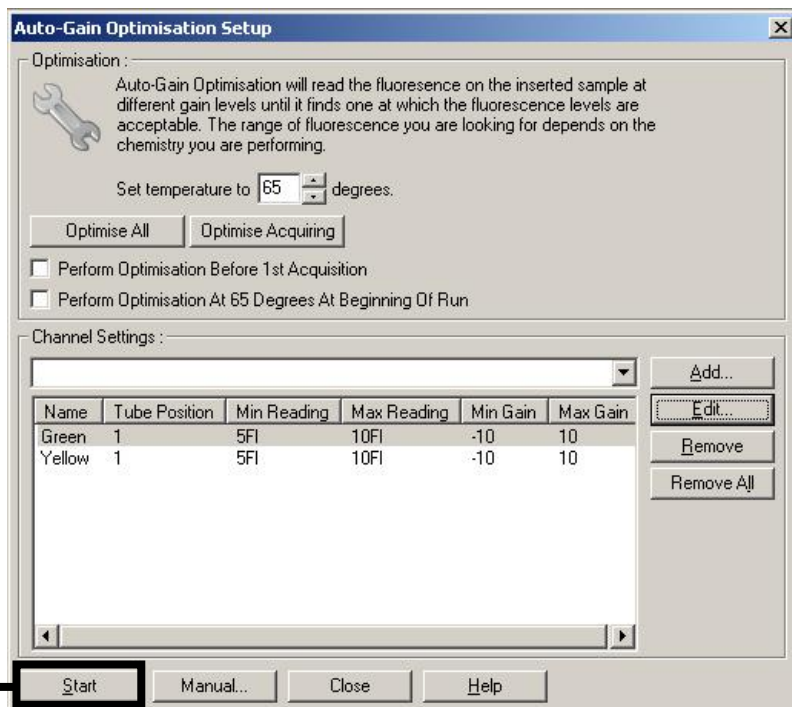
Rysunek 1. Ręczne dostosowywanie intensywności kanału fluorescencyjnego. Dostosować intensywność dla każdego kanału fluorescencyjnego przy różnych pozycjach próbek dla różnych oznaczeń (CMV i EBV).

2. Określić pozycję próbki dla pierwszego oznaczenia *artus* (np. EBV). Określić pozycję próbki dla wszystkich kanałów fluorescencyjnych i kliknąć przycisk **OK** (Rys. 2)



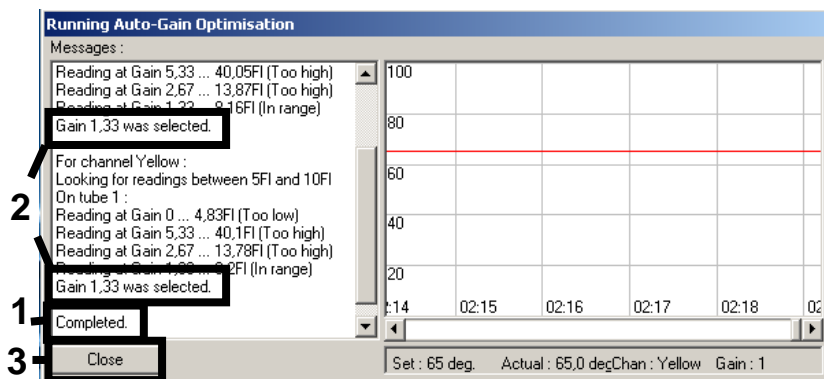
Rysunek 2. Ustawianie pozycji próbki.

3. Kliknąć przycisk **Start**, aby rozpocząć optymalizację wzmocnienia dla pierwszego oznaczenia *artus* (Rys. 3)



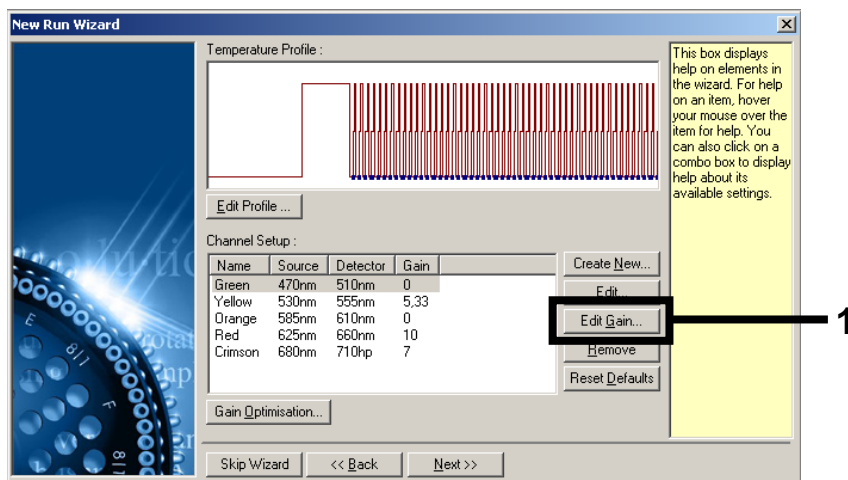
Rysunek 3. Rozpoczęcie optymalizacji wzmocnienia.

4. Zostanie otwarte okno **Running Auto-Gain Optimisation** (Optymalizacja automatycznego wzmocnienia w toku). Odczekać do momentu pojawienia się komunikatu **Completed** (Ukończono) w tym oknie (Rys. 4). Spisać wybrane wartości wzmocnienia dla obu kanałów, a następnie kliknąć przycisk **Close** (Zamknij) (Rys. 4)



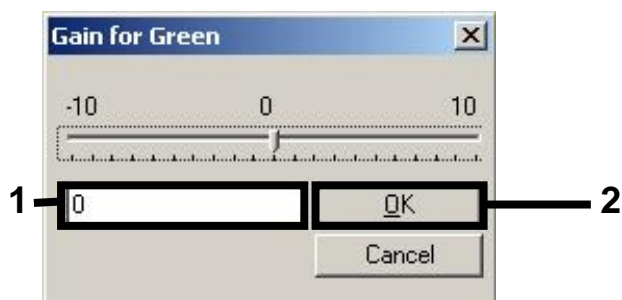
Rysunek 4. Zakończono optymalizację wzmocnienia. Zanotować wartości wzmocnienia (w tym przypadku 1,33 dla obu kanałów fluorescencyjnych).

5. Powtórzyć kroki 1–4 dla pozycji próbki dla drugiego oznaczenia *artus* (np. CMV).
6. Kliknąć opcję **Edit Gain** (Edytuj wzmacnienie), aby ręcznie edytować wartości wzmacnienia (Rys. 5).



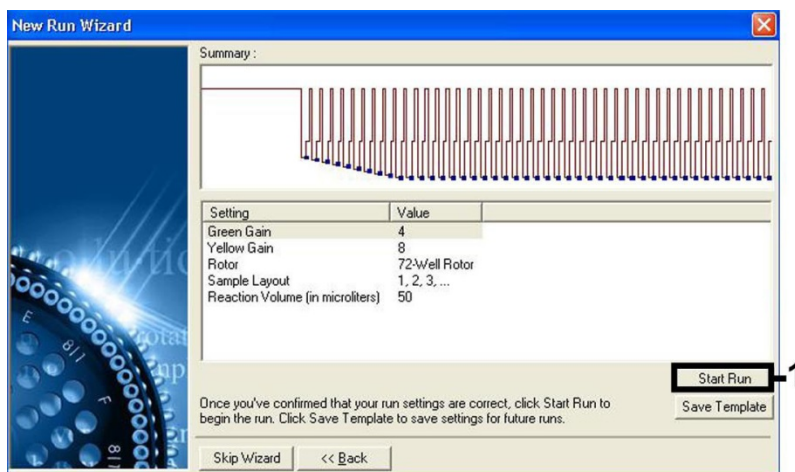
Rysunek 5. Ręczne edytowanie wartości wzmacnienia.

7. Wybrać najmniejszą wartość wzmacnienia dla kanału zielonego zanotowaną w kroku 4, a następnie wprowadzić tę wartość ręcznie w oknie **Gain for Green** (Wzmacnienie dla kanału zielonego) (Rys. 6). Wybrać najmniejszą wartość wzmacnienia dla kanału żółtego zanotowaną w kroku 4, a następnie wprowadzić tę wartość ręcznie w oknie **Gain for Yellow** (Wzmacnienie dla kanału żółtego) (Rys. 6).



Rysunek 6. Ręczne wprowadzanie najniższych wartości wzmacnienia.

8. Wartości wzmacnienia określone podczas kalibracji kanału (lub ręcznie przypisane) są zapisywane automatycznie oraz wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania (Rys. 7) Kliknąć przycisk **Start Run** (Rozpocznij oznaczenie).



Rysunek 7. Rozpoczynanie oznaczenia.

Interpretacja wyników

W niniejszej sekcji opisana została interpretacja wyników uzyskanych z urządzenia Rotor-Gene Q. Aby dokonać analizy pełnego przebiegu procesu od załadowania próbki do uzyskania wyniku, przejrzeć również informacje dotyczące statusu próbki z plików wyników QIASymphony SP/AS. Należy używać wyłącznie próbek z zatwierdzonym statusem.

Zestawu *artus* EBV QS-RGQ można użyć do wykonania oznaczenia na urządzeniu Rotor-Gene Q przy użyciu ręcznej analizy oprogramowaniem Rotor-Gene Q w wersji 2.1 lub wyższej. W kolejnych sekcjach opisana została interpretacja wyników przy pomocy oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.1 lub wyższej.

Detekcja sygnału i wniosek — osocze

Sygnal w kanale zielonym	Sygnal w kanale żółtym	Wynik ilościowy (kopie/ml)	Interpretacja
Tak	Tak	<157	Ważny wynik: Wykryto DNA wirusa EBV, <157 kopii/ml. Nie można ustalić ilości, gdyż wynik ilościowy znajduje się pod granicą oznaczalności. Nie można zagwarantować odtwarzalności pozytywnego wyniku.
Tak	Tak	≥157 i <631	Ważny wynik: Wykryto DNA wirusa EBV, <631 kopii/ml. Nie można ustalić ilości, gdyż wynik ilościowy znajduje się poza zakresem liniowym oznaczenia.
Tak	Tak/Nie**	≥631 i ≤1 x 10 ⁷	Ważny wynik: Wykryto DNA wirusa EBV znajdujące się w próbce w obliczonym stężeniu. Wynik ilościowy znajduje się w zakresie liniowym oznaczenia.
Tak	Tak/Nie**	>1 x 10 ⁷	Ważny wynik: Wykryto DNA wirusa EBV, >1 x 10 ⁷ kopii/ml. Nie można ustalić ilości, gdyż wynik ilościowy znajduje się powyżej zakresu liniowego oznaczenia.*
Nie	Tak	–	Ważny wynik: Nie wykryto DNA wirusa EBV.†
Nie	Nie	–	Nieważny wynik: Wynik jest niejednoznaczny.‡

* Jeśli konieczne jest oznaczenie ilościowe, rozcieńczyć próbkę osoczem pozbawionym wirusa EBV i powtórzyć oznaczenie. Pomnożyć wynik ilościowy otrzymany z ponownie oznaczonej próbki przez współczynnik rozcieńczenia.

† Jeśli wartość C_T dla kontroli wewnętrznej próbki negatywnej przekracza o ponad 3 cykle wartość C_T dla kontroli wewnętrznej próbki kontroli negatywnej w oznaczeniu (C_T Próbka IC – C_T IC NTC >3), wówczas taką próbkę należy traktować jako nieważną. Wynik jest niejednoznaczny.

‡ Informacje dotyczące przyczyn oraz eliminowania błędów można odnaleźć w sekcji „Troubleshooting Guide” (Poradnik eliminowania problemów) w instrukcji *EBV QS-RGQ Kit Handbook* (Zestaw artus EBV QS-RGQ — Instrukcja obsługi).

** W takim przypadku detekcja sygnału z kanału żółtego nie ma znaczenia, ponieważ wysokie wyjściowe stężenie DNA wirusa EBV (pozytywny sygnał w kanale zielonym) może prowadzić do obniżenia sygnału fluorescencyjnego lub jego braku dla kontroli wewnętrznej w kanale żółtym (w mechanizmie kompetycyjnym).

Konfiguracja wartości progowej dla analizy PCR

Doboru optymalnych ustawień wartości progowej dla danej kombinacji urządzenia Rotor-Gene Q i zestawu *artus* QS-RGQ należy dokonać empirycznie, sprawdzając każdą kombinację oddzielnie, ponieważ jest to wartość względna, zależna od całościowego przebiegu pracy diagnostycznej. Na początku, dla pierwszego cyklu PCR, wartość progową można ustawić na domyślnym poziomie 0,04. Jednakże wartość tę należy dokładnie dostosować poprzez porównawczą analizę kolejnych cykli. Wartość progową należy ustawić ręcznie tuż powyżej wartości sygnału tła kontroli negatywnych i negatywnych próbek. Średnia wartość progowa wyznaczona podczas takich eksperymentów najprawdopodobniej będzie odpowiednia dla większości przyszłych oznaczeń. Jednakże pomimo tego, użytkownik powinien regularnie sprawdzać tę wyznaczoną wartość. Wartość progowa zwykle mieści się w przedziale 0,03–0,05 i należy ją zaokrąglić do co najwyżej trzech miejsc po przecinku.

Oznaczenie ilościowe

Standardy do oznaczeń ilościowych (EBV QS 1–4) z zestawu *artus* EBV QS-RGQ traktuje się jak wcześniej oczyszczone próbki. Stosuje się również tę samą objętość (20 µl). Do wyznaczenia krzywej wzorcowej w urządzeniach Rotor-Gene Q należy wykorzystać wszystkie 4 standardy ilościowe i zdefiniować je w oknie dialogowym **Edit Samples** (Edytuj próbki) w urządzeniu Rotor-Gene Q jako standardy o określonych stężeniach (patrz instrukcja obsługi urządzenia).

Uwaga: Standardy ilościowe są zdefiniowane jako kopie/µl w eluacie. Aby zamienić wartości wyznaczone z krzywej wzorcowej na kopie/ml materiału próbki, należy skorzystać z poniższego wzoru.

$$\text{Wynik w materiale próbki (kopie/ml)} = \frac{\text{Wynik w eluacie (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{Początkowa objętość elucji (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Objętość próbki (ml)}}$$

Zasadą jest wstawienie początkowej objętości próbki do powyższego wzoru. Należy tak postąpić, jeśli przed izolacją kwasu nukleinowego zmianie uległa objętość próbki (np. zmniejszyła się w wyniku odwirowania lub zwiększyła się przez dodanie objętości wymaganej do izolacji).

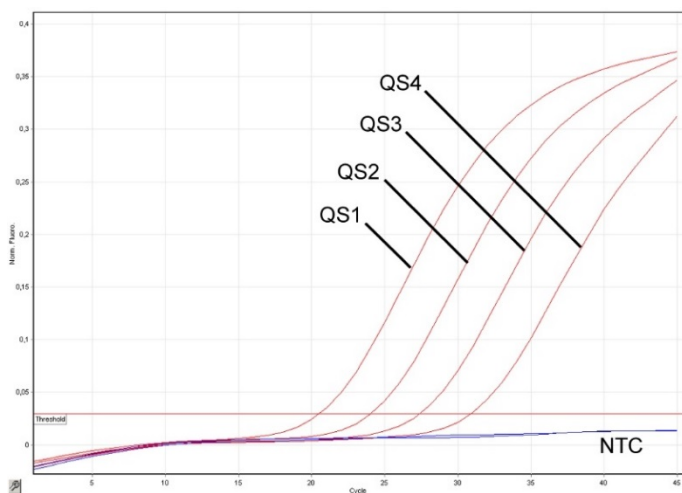
W przypadku cyklu z wieloma oznaczeniami, gdy podczas jednej reakcji PCR oznacza się zarówno CMV i EBV, sprawdzić, czy próbki są analizowane oddzielnie na obecność CMV i EBV z odpowiednimi standardami do oznaczeń ilościowych.

* Obliczenie opiera się na początkowych objętościach elucji (90 µl).

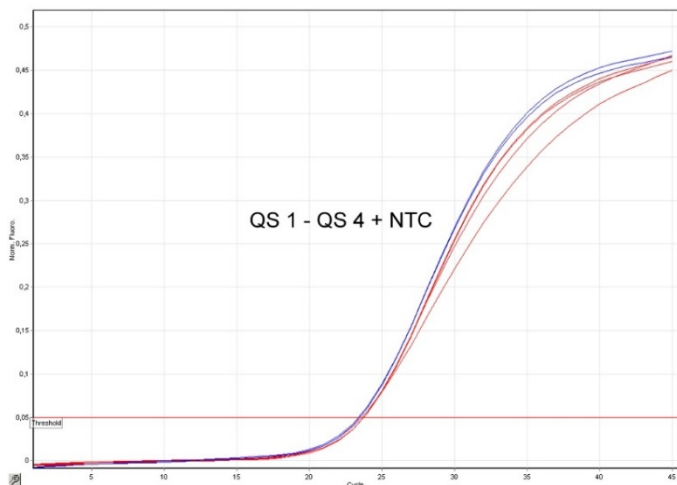
Współczynnik konwersji

1 kopia/ml odpowiada 0,142 IU/ml w przypadku detekcji DNA wirusa EBV pochodzącego z ludzkiego osocza pobranego na EDTA za pomocą urządzenia Rotor-Gene Q. Ten współczynnik konwersji ma zastosowanie, gdy przestrzegany jest zwalidowany protokół, określony w niniejszym arkuszu zastosowań. Współczynnik konwersji jest wartością przybliżoną, opartą na średnim współczynniku w obrębie dynamicznego zakresu oznaczenia.

Należy również uwzględnić pozytywne i negatywne reakcje PCR



Detekcja standardów do oznaczeń ilościowych (EBV QS 1-4) w zielonym kanale fluorescencyjnym. NTC: Brak matrycy kontrolnej (kontrola negatywna).



Detekcja kontroli wewnętrznej (IC) w żółtym kanale fluorescencyjnym z równoczesną amplifikacją standardów do oznaczeń ilościowych (EBV QS 1-4). NTC: Brak matrycy kontrolnej (kontrola negatywna).

Historia zmian dokumentu

Wrzesień 2017 Dodano informację dotyczącą współczynnika konwersji (kopie na IU/ml). Usunięto przypis stanowiący, że w jednym cyklu AS można skonfigurować do 216 oznaczeń. Zmieniono wymagane materiały, tak aby były uwzględnione tylko materiały wymagane do konfiguracji zintegrowanego cyklu maksymalnie 72 reakcji na QS-SP/AS. Dodano bardziej szczegółowe informacje dotyczące użycia materiałów do cyklu z wieloma oznaczeniami z EBV (użycie CMV IC). Dodano informacje dotyczące użycia oprogramowania QIASymphony Management Console do przygotowania carrierRNA (nośnik RNA) i IC w sekcji „Procedura”. Zmieniono producenta sprzętu laboratoryjnego z firmy BD na firmę Corning. Doprecyzowano ustawienia cyklu RGQ (użycie funkcji „touch-down”, akwizycji). Dodano informacje dotyczące interpretacji wyników, aby uwzględnić przypadki „pozytywny pod względem patogenu i negatywny dla IC”. Usunięto instrukcje dotyczące użycia Rotor-Gene AssayManager. Zmieniono granice wyników ilościowych w celu dostosowania ich do zaktualizowanego zakresu liniowego wartości. Doprecyzowano różnicę między stężeniem eluatu i próbki w obliczeniu ilościowym. Dostosowano wykaz oczyszczania wstępnego. Zaktualizowano wersję protokołu QIASymphony: zwiększono numer wersji „Assay Parameter Set” (Zestaw parametrów oznaczenia) z V4 na V5 i „Default Assay Control Set” (Domyślny zestaw kontroli oznaczenia) z V6 na V7.

Aktualne informacje licencyjne oraz wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson i Company); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG i Co.). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa. 09/2017 HB-0357-S02-002
© 2012–2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

Składanie zamówień www.qiagen.com/shop | Pomoc techniczna support.qiagen.com | Strona WWW www.qiagen.com