



Marzec 2015

# Instrukcja Zestawu *artus*<sup>®</sup> EBV TM PCR

 24 (nr kat. 4501163)

 96 (nr kat. 4501165)

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do stosowania z aparatami

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

Wersja 1



**IVD**

**REF**

4501163, 4501165



1046895



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden; GERMANY

R2

**MAT**

1046895PL



Sample & Assay Technologies

## Technologie badań i oznaczeń firmy QIAGEN

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii do badań i oznaczeń, umożliwiających izolację i wykrywanie zawartości dowolnych próbek biologicznych. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie - od próbek po wyniki.

QIAGEN wyznacza standardy w następujących dziedzinach:

- oczyszczanie DNA, RNA i białek
- oznaczanie kwasów nukleinowych i białek
- badania microRNA i RNAi
- automatyka technologii badań i oznaczania próbek

Naszą misją jest umożliwienie użytkownikom osiągnięcia doskonałych i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Spis Treści

<b>1. Zawartość</b>	<b>4</b>
<b>2. Przechowywanie</b>	<b>4</b>
<b>3. Dodatkowe Wymagane Materiały i Urządzenia</b>	<b>5</b>
<b>4. Ogólne Środki Ostrożności</b>	<b>5</b>
<b>5. Informacje o Patogenach</b>	<b>6</b>
<b>6. Zasady Real-Time PCR</b>	<b>6</b>
<b>7. Opis produktu</b>	<b>6</b>
<b>8. Protokół</b>	<b>6</b>
8.1 Izolacja DNA	6
8.2 <i>Kontrola wewnętrzna</i>	9
8.4 Przygotowanie PCR	11
8.5 Programowanie <i>ABI PRISM SDS</i>	16
<b>9. Analiza Danych</b>	<b>29</b>
<b>10. Rozwiązywanie Problemów</b>	<b>33</b>
<b>11. Specyfikacje</b>	<b>35</b>
11.1 Czulość analityczna	35
11.2 Specyficzność	36
11.3 Odtwarzalność	37
11.4 Ocena diagnostyczna	37
<b>12. Ograniczenia Stosowania Produktu</b>	<b>37</b>
<b>13. Ostrzeżenia i Środki Ostrożności</b>	<b>38</b>
<b>14. Kontrola Jakości</b>	<b>38</b>
<b>15. Literatura</b>	<b>38</b>
<b>16. Objasnienie Symboli</b>	<b>38</b>

# Zestaw *artus* EBV TM PCR

Do stosowania z aparatami *ABI PRISM*® 7000, 7700 oraz 7900HT *Sequence Detection Systems*

Uwaga: Zestaw *artus* EBV TM PCR Kit nie może być używany w połączeniu z *GeneAmp*® 5700 SDS ani też 384-dółkowym formatem płytki *ABI PRISM* 7900HT SDS.

## 1. Zawartość

	Oznakowanie i zawartość	Nr art. 4501163 24 reakcje	Nr art. 4501165 96 reakcji
Niebieski	<i>EBV RG/TM Master</i>	2 x 12 reakcji	8 x 12 reakcji
Czerwony	<i>EBV LC/RG/TM QS 1</i> <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>4</sup> kopii/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Czerwony	<i>EBV LC/RG/TM QS 2</i> <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>3</sup> kopii/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Czerwony	<i>EBV LC/RG/TM QS 3</i> <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>2</sup> kopii/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Czerwony	<i>EBV LC/RG/TM QS 4</i> <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>1</sup> kopii/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Zielony	<i>EBV RG/TM IC</i> <sup>α</sup>	1 x 1000 μl	2 x 1000 μl
Biały	<i>Woda (odpowiednia do PCR)</i>	1 x 1000 μl	1 x 1000 μl

<sup>α</sup> QS = *Standard ilościowy*  
IC = *Kontrola wewnętrzna*

## 2. Przechowywanie

Składniki zestawu *artus* EBV TM PCR powinny być przechowywane w temperaturze od -30°C do -15°C i w tym zakresie temperatur są trwałe aż do daty umieszczonej na etykiecie. Powinno się unikać częstego zamrażania i rozmrażania (>2 x), ponieważ może to zmniejszyć czułość. Jeśli zestaw ma być używany nieregularnie, odczynniki powinny być zamrażane w porcjach. W temperaturze +4°C nie powinny być przechowywane dłużej niż pięć godzin.

### 3. Dodatkowe Wymagane Materiały i Urządzenia

- Jednorazowe rękawiczki bezpudrowe
- Zestaw do izolowania DNA (zob. 8.1 Izolacja DNA)
- Pipety (regulowane)
- Sterylne końcówki z filtrem do pipet
- Wytrząsarka (Vortex mixer)
- Wirówka nastołowa z rotorem do probówek o poj. 2 ml
- Wirówka z rotorem do płytek mikrotitracyjnych (opcjonalnie)
- 96-dołkowa płytka / probówki do reakcji do optycznego pomiaru [reakcji] z odpowiednimi zamknięciami optycznymi \* (zob. 8.4 Przygotowanie PCR)
- 96-miejscowy dwuczęściowy statyw do używania z optycznymi probówkami do reakcji (*96-Well Tray/Retainer Set*, nr kat. 403 081), zob. 8.4 Przygotowanie PCR
- Podkładka kompresyjna do używania z optycznymi foliami samoprzylepnymi (*Optical Cover Compression Pads*, nr kat. 4 312 639), zob. 8.4 Aplikator do uszczelnienia płytek reakcyjnych przy użyciu optycznej folii samoprzylepnej (*Adhesive Seal Applicator Kit*, nr kat. 4 333 183)
- *ABI PRISM 7000, 7700 lub 7900HT SDS*

**Uwaga:** Poprawna kalibracja czystych barwników (*Pure Spectra Component File*) oraz tła (*Background Component File*) jest konieczna w momencie włączenia urządzenia.

### 4. Ogólne Środki Ostrożności

- Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę, aby:
- Do pipet używać sterylnych końcówek z filtrem.
- Przechowywać pozytywny materiał (próbki, kontrole i materiał po amplifikacji) oddzielnie od innych odczynników i dodawać go do mieszaniny reakcyjnej w oddzielnym pomieszczeniu.
- Przed rozpoczęciem badania dokładnie rozmrozić wszystkie odczynniki w temperaturze pokojowej.
- Po rozmrożeniu, wymieszać składniki i krótko odwirować.
- Pracować szybko używając lodu lub bloku chłodzącego.

\* Użycie probówek [do reakcji] do analiz optycznych z wypukłymi wieczkami dozwolone jest wyłącznie z *ABI PRISM 7700 SDS* i wymaga wyregulowania czasu ekspozycji (zob. 8.5.2 Programowanie *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.5.2.5 Ważne dodatkowe ustawienia).

## 5. Informacje o Patogenach

Wirus Epstein-Barr (EBV) przenoszony jest drogą oralną, głównie za pośrednictwem zakażonej śliny. Generalnie zakażenie EBV, szczególnie jeśli nastąpiło w dzieciństwie, nie daje objawów. Objawem klinicznym ostrego zakażenia jest mononukleoza zakaźna powiązana z gorączką, zmęczeniem i anginą oraz zapalenie węzłów chłonnych i śledziona. U niektórych pacjentów objawy te pojawiają się ponownie chronicznie. Ciężka postać zakażenia EBV może być obserwowana u pacjentów z niedoborem odporności oraz u osób z wadami komórek T.

## 6. Zasady Real-Time PCR

Wykrywanie patogenu przy pomocy reakcji PCR jest oparte na amplifikacji specyficznego regionu genomu patogenu. W Real-Time PCR produkt amplifikacji jest wykrywany przy pomocy barwników fluorescencyjnych. Są one zazwyczaj przyłączane do sond oligonukleotydowych, które hybrydują specyficznym regionem amplifikowanego produktu. Monitorowanie intensywności fluorescencji podczas reakcji PCR (tj. w czasie rzeczywistym) pozwala na wykrycie patogenu i określenie jego ilości bez konieczności ponownego otwierania próbek po reakcji PCR (Mackay, 2004).

## 7. Opis produktu

Zestaw EBV TM PCR jest gotowym do użycia systemem do wykrywania EBV DNA przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w aparacie *ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT Sequence Detection System. EBV RG/TM Master* zawiera odczynniki i enzymy do specyficznego amplifikacji regionu 97 pb genomu EBV. Amplikon ten jest określany na podstawie fluorescencji barwników FAM w aparacie *ABI PRISM SDS*. Ponadto zestaw *artus EBV TM PCR Kit* zawiera drugi heterologiczny system amplifikacji do identyfikacji ewentualnych inhibitorów reakcji PCR. Jest to wykrywane jako wewnętrzna kontrola (IC) przez pomiar fluorescencji barwnika VIC. Granica detekcji analitycznej PCR dla EBV (zob. 11.1 Czułość analityczna) nie jest zredukowana. Dostarczane zewnętrzne kontrole pozytywne (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*) pozwalają na określenie wiremii. Dalsze informacje zamieszczono w rozdziale 8.3 Oznaczenie ilościowe.

## 8. Protokół

### 8.1 Izolacja DNA

Zestawy do izolowania DNA są oferowane przez różnych producentów. Wielkości próbek do procedury izolowania DNA zależą od stosowanego protokołu. Izolację DNA należy przeprowadzić zgodnie z instrukcjami producenta. Zalecane są następujące zestawy do izolacji:

<b>Materiał próbki</b>	<b>Zestaw do izolowania kwasu nukleinowego</b>	<b>Numer katalogowy</b>	<b>Producent</b>	<b>Nośnikowe RNA</b>
Surowica, osocze, CSF	Zestaw QIAamp® DNA Mini (50)	51 304	QIAGEN	Nie dołączony do zestawu
	Zestaw QIAamp UltraSens® Virus (50)	53 704	QIAGEN	Dołączony do zestawu
Komórki krwi	Zestaw QIAamp DNA Blood Mini (50)	51 104	QIAGEN	Nie dołączony do zestawu
Osocze	Zestaw EZ1® DSP Virus (48)*	62 724	QIAGEN	Dołączony do zestawu

\* Należy stosować w połączeniu ze stacją roboczą BioRobot® EZ1 DSP Workstation (nr. kat. 9001360) i kartą EZ1 DSP Virus Card (nr. kat. 9017707).

Ważna uwaga dotycząca użycia Zestawu QIAamp UltraSens Virus, zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit oraz Zestawu QIAamp DNA Mini:

- Zastosowanie nośnikowego RNA jest krytyczne dla efektywności ekstrakcji i, co za tym idzie, ilości pozyskanego DNA/RNA. Jeśli wybrany zestaw do izolacji nie zawiera nośnikowego RNA, to zalecane jest dodanie nośnika (RNAHomopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, nr kat. 27-4110-01) w celu ekstrakcji kwasu nukleinowego z płynów ustrojowych nie zawierających komórek oraz materiału z niską zawartością DNA/RNA (np. CSF). W takich przypadkach należy postępować w sposób następujący:
  - a) Ponownie zawiesić liofilizowane nośnikowe RNA używając buforu do elucji (nie należy używać buforu do lizy) z zestawu do ekstrakcji (np. Bufor AE z Zestawu QIAamp DNA Mini/QIAamp DNA Blood Mini) i przygotować rozcieńczenie o stężeniu 1 µg/µl. Podzielić roztwór nośnikowego RNA na kilka porcji odpowiednio do potrzeb i przechowywać je w temperaturze –20°C. Unikać powtarzanego rozmrażania (> 2 x) porcji nośnikowego RNA.
  - b) Należy użyć 1 µg nośnikowego RNA na 100 µl buforu do lizy. Na przykład, jeśli protokół ekstrakcji sugeruje 200 µl buforu do lizy, należy dodać 2 µl nośnikowego RNA (1 µg/µl) bezpośrednio do buforu do lizy. Przed rozpoczęciem każdej ekstrakcji powinna zostać przygotowana świeża mieszanina buforu do lizy i nośnikowego RNA (oraz kontrola wewnętrzna *Internal Control*, gdzie ma to zastosowanie, zob. 8.2 *Kontrola wewnętrzna*) według następującego schematu pipetowania:

Liczba próbek	1	12
Bufor do lizy	np. 200 µl	np. 2400 µl
Nośnikowe RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
<b>Całkowita objętość</b>	<b>202 µl</b>	<b>2424 µl</b>
<b>Objętość na ekstrakcję</b>	<b>200 µl</b>	<b>200 µl każda</b>

c) Do ekstrakcji należy użyć natychmiast świeżo przygotowaną mieszaninę buforu do lizy i nośnikowego RNA. Przechowywanie mieszaniny nie jest możliwe.

- Zastosowanie **nośnikowego RNA** jest krytyczne dla efektywności ekstrakcji i, co za tym idzie, ilości pozyskanego DNA / RNA. W celu zwiększenia stabilności nośnikowego RNA dostarczonego w zestawie QIAamp UltraSens Virus Kit zalecamy następującą procedurę odbiegającą od instrukcji zestawu do ekstrakcji:

a) Ponownie zawiesić liofilizowane nośnikowe RNA przed pierwszym użyciem zestawu do ekstrakcji w 310 µl buforu do elucji dostarczonego wraz z zestawem (stężenie końcowe 1 µg/µl, nie używać buforu do lizy). Podzielić roztwór nośnikowego RNA na kilka porcji odpowiednio do potrzeb i przechowywać w temperaturze -20°C. Unikać powtarzanego rozmrażania (> 2 x) porcji nośnikowego RNA.

b) Przed rozpoczęciem każdej ekstrakcji powinna zostać przygotowana świeża mieszanina buforu do lizy i nośnikowego RNA (oraz kontrola wewnętrzna *Internal Control*, tam gdzie ma to zastosowanie, zob. 8.2 *Kontrola wewnętrzna*) według następującego schematu pipetowania:

Liczba próbek	1	12
Bufor do lizy AC	800 µl	9600 µl
Nośnikowe RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
<b>Całkowita objętość</b>	<b>805,6 µl</b>	<b>9667,2 µl</b>
<b>Objętość na ekstrakcję</b>	<b>800 µl</b>	<b>800 µl każda</b>

c) Do ekstrakcji należy natychmiast użyć świeżo przygotowaną mieszaninę buforu do lizy i nośnikowego RNA. Przechowywanie mieszaniny nie jest możliwe.

- Zalecane jest eluowanie DNA w 50 µl buforu do elucji w celu uzyskania największej czułości zestawu *artus EBV TM PCR*.



- Zestaw QIAamp UltraSens Virus umożliwia zagęszczenie próbki. Jeśli używamy innego materiału próbki niż surowica lub osocze, to należy do próbki dodać co najmniej 50 % (v/v) negatywnego ludzkiego osocza.
- Probówki do pobierania krwi pokryte **antykoagulantem** mogą hamować PCR. Jednak inhibitory te zostaną wyeliminowane poprzez użycie wymienionych powyżej zestawów izolujących. Należy unikać używania krwi heparynizowanej.
- W przypadku stosowania protokołów izolacji z buforami płuczającymi zawierającymi **etanol** należy przed elucją przeprowadzić dodatkowy krok wirowania (trzy minuty, 13 000 rpm), aby usunąć pozostały alkohol. To zabezpieczy przed możliwością inhibicji PCR.
- Zestaw *artus* EBV TM PCR Kit nie może być używany w metodach izolacji opartych na **fenolu**.

#### **Ważna uwaga dotycząca użycia zestawu EZ1 DSP Virus:**

- Zastosowanie **nośnikowego RNA** jest krytyczne dla efektywności ekstrakcji i, co za tym idzie, ilości pozyskanego DNA / RNA. Należy dodać odpowiednią ilość nośnikowego RNA do każdej ekstrakcji postępując zgodnie z instrukcjami zawartymi w podręczniku *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

**Ważne:** Kontrola wewnętrzna *Internal Control* Zestawu *artus* EBV TM PCR może być stosowana bezpośrednio w procedurze izolacji (zob. 8.2 *Kontrola wewnętrzna*).

## **8.2 Kontrola wewnętrzna**

Dostarczona jest kontrola wewnętrzna *Internal Control (EBV RG/TM IC)*. Pozwala zarówno na **kontrolę procedury izolacji DNA oraz na sprawdzenie potencjalnej inhibicji reakcji PCR** (zob. rys. 1). W przypadku ekstrakcji z użyciem Zestawu EZ1 DSP Virus należy dodać kontrolę wewnętrzną *Internal Control* zgodnie z instrukcjami zawartymi w podręczniku *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. W przypadku stosowania Zestawu QIAamp UltraSens Virus, Zestawu QIAamp DNA Blood Mini lub Zestawu QIAamp DNA Mini należy dodać kontrolę wewnętrzną *Internal Control* do izolacji w stosunku 0.1 µl na 1 µl objętości elucji. Na przykład, przy użyciu Zestawu QIAamp UltraSens Virus DNA jest eluowane w 50 µl buforu AVE. Dlatego też na wstępie powinno zostać dodane 5 µl kontroli wewnętrznej *Internal Control*. Ilość użytej kontroli wewnętrznej *Internal Control* zależy wyłącznie od objętości elucji. Kontrola wewnętrzna *Internal Control* i nośnikowe RNA (zob. 8.1 Izolacja DNA) powinny zostać dodane tylko

- do mieszaniny buforu lizującego i materiału próbki lub
- bezpośrednio do buforu lizującego.

Kontrola wewnętrzna *Internal Control* nie może być dodana bezpośrednio do próbki materiału. Jeśli zostanie dodana do buforu lizującego, to należy zwrócić

uwagę, żeby mieszanina kontroli wewnętrznej i buforu lizującego - nośnikowego RNA była świeżo przygotowana i natychmiast użyta (przechowywanie mieszaniny w temperaturze pokojowej lub w lodówce nawet tylko przez kilka godzin może prowadzić do niepowodzenia kontroli wewnętrznej *Internal Control* i zmniejszonej efektywności ekstrakcji). Nie należy dodawać kontroli wewnętrznej *Internal Control* i nośnikowego RNA bezpośrednio do materiału próbki.

Opcjonalnie kontrola wewnętrzna *Internal Control* może być wykorzystywana **wyłącznie w celu sprawdzenia możliwej inhibicji PCR** (zob. rys. 2). W przypadku takiego zastosowania należy dodać 2 µl kontroli wewnętrznej *Internal Control* na reakcję bezpośrednio do 30 µl *EBV RG/TM Master*. Do każdej reakcji PCR należy użyć 30 µl Master Mix przygotowanego w opisany wyżej sposób\* i dodać 20 µl oczyszczonej próbki. Jeśli przygotowuje się reakcje PCR dla kilku próbek, należy zwiększyć objętość *EBV RG/TM Master* kontroli wewnętrznej *Internal Control* odpowiednio do ilości [przygotowywanych] próbek (zob. 8.4 Przygotowanie PCR).

### 8.3 Oznaczenie ilościowe

Dołączone standardy ilościowe *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* należy traktować tak jak próbki wcześniej oczyszczone i użyć takiej samej objętości (20 µl). Aby wygenerować krzywą standardową na *ABI PRISM Sequence Detection System*, wszystkie cztery standardy oznaczania ilościowego *Quantitation Standards* powinny zostać użyte i zdefiniowane jako standardy o określonych stężeniach (zob. 8.5 Programowanie *ABI PRISM SDS*). Importowanie krzywych standardowych z poprzednich reakcji jest niemożliwe z użyciem oprogramowania *ABI PRISM 7000, 7700* oraz *7900HT SDS*.

**Uwaga:** Standardy oznaczeń ilościowych *Quantitation Standards* są zdefiniowane jako kopie/µl. Należy użyć następującego równania, aby zamienić wartości wyznaczone z krzywej standardowej na kopie/ml materiału próbki:

Wynik (kopie/ml)	=	$\frac{\text{Wynik (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{Objętość elucji (}\mu\text{l)}}{\text{Objętość próbki (ml)}}$
------------------	---	--

Należy pamiętać i przyjąć jako zasadę, że do powyższego równania powinna zostać wprowadzona początkowa objętość próbki. Musi to być wzięte pod uwagę, jeśli objętość próbki została zmieniona przed ekstrakcją kwasu nukleinowego (na przykład zmniejszenie objętości wskutek odwirowania lub

\* Zwiększenie objętości spowodowane dodaniem kontroli wewnętrznej *Internal Control* nie ma wpływu na reakcję PCR. Czulość detekcji nie ulega osłabieniu.

zwiększenie objętości poprzez uzupełnienie do objętości wymaganej do izolacji).

**Ważne:** Przewodnik do ilościowej analizy systemów *artus* dotyczący *ABI PRISM 7000 SDS* jest dostępny na stronie [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (Noty techniczne dla oznaczania ilościowego na *ABI PRISM 7000 SDS*) (Technical Note for quantitation on the *ABI PRISM 7000 SDS*).

## 8.4 Przygotowanie PCR

Należy przygotować odpowiednią liczbę probówek lub płytek 96-dołkowych dla zaplanowanych reakcji. Zalecane materiały są podane w poniższej tabeli:

Produkt	Opis	Numer katalogowy	Producent	Stojak podtrzymujący*	Podkładka kompresyjna
96-ścio dołkowa płytka optyczna	96-ścio dołkowa płytka optyczna	4 306 737	Applied Biosystems	nie	–
Optyczna folia samo-przylepna	Optyczna folia samo-przylepna	4 311 971	Applied Biosystems	–	tak
Optyczne probówki do reakcji	<i>ABI PRISM</i> probówki optyczne, 8 probówek/pasek	4 316 567	Applied Biosystems	tak	–
Optyczne probówki do reakcji	MicroAmp® probówki optyczne	N8010933	Applied Biosystems	tak	–
Wieczka optyczne (płaskie)	<i>ABI PRISM</i> czapki optyczne, 8 wieczek/pasek	4 323 032	Applied Biosystems	–	nie

**Uwaga:** Użycie probówek [do reakcji] do analiz optycznych z wypukłymi wieczkami dozwolone jest wyłącznie z *ABI PRISM 7700 SDS* i wymaga wyregulowania czasu ekspozycji (zob. 8.5.2 Programowanie *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.5.2.5 Ważne dodatkowe ustawienia).

\* Jeśli używany jest dwuczęściowy stojak podtrzymujący, to konieczne jest otwieranie probówek przed ich wkładaniem i wyjmowaniem ze stojaka. Aby uniknąć zakażenia wskutek tej procedury należy używać tylko niższą część stojaka podtrzymującego.

Podczas przygotowywania reakcji PCR należy upewnić się, że równolegle uruchomiony jest co najmniej jeden standard oznaczenia ilościowego *Quantitation Standard* na reakcję PCR oraz jedna kontrola negatywna (*Woda, o czystości do PCR*). Aby wygenerować krzywą standardową należy użyć wszystkich dostarczonych standardów oznaczania ilościowego *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* dla każdej reakcji PCR. Przed każdym użyciem wszystkie odczynniki muszą zostać całkowicie rozmrożone, zmieszane (przez kilkakrotne pipetowanie lub szybkie worteksowanie) i krótko odwirowane.

Jeśli chcemy użyć kontroli wewnętrznej *Internal Control* do **monitorowania procedury izolacji** DNA i sprawdzenia możliwej inhibicji PCR, to została ona już dodana do izolacji (zob. 8.2 *Kontrola wewnętrzna*). W tym przypadku należy posłużyć się poniższym schematem pipetowania (schemat ogólny podano na rys. 1):

	Ilość próbek	1	12
<b>1. Przygotowanie mieszaniny Master Mix</b>	<i>EBV RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>EBV RG/TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Całkowita objętość</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
<b>2. Przygotowanie PCR</b>	Master Mix	30 µl	30 µl każda
	Próbka	20 µl	20 µl każda
	<b>Całkowita objętość</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl każda</b>

Jeśli chcemy użyć kontrolę wewnętrzną *Internal Control* wyłącznie do sprawdzenia inhibicji PCR, to należy ją dodać bezpośrednio do *EBV RG/TM Master*. W tym przypadku należy posłużyć się poniższym schematem pipetowania (schemat ogólny podano na rys. 2):

	Ilość próbek	1	12
<b>1. Przygotowanie mieszaniny Master Mix</b>	<i>EBV RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>EBV RG/TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Całkowita objętość</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>
<b>2. Przygotowanie PCR</b>	Master Mix	30 µl*	30 µl każda*
	Próbka	20 µl	20 µl każda
	<b>Całkowita objętość</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl każda</b>

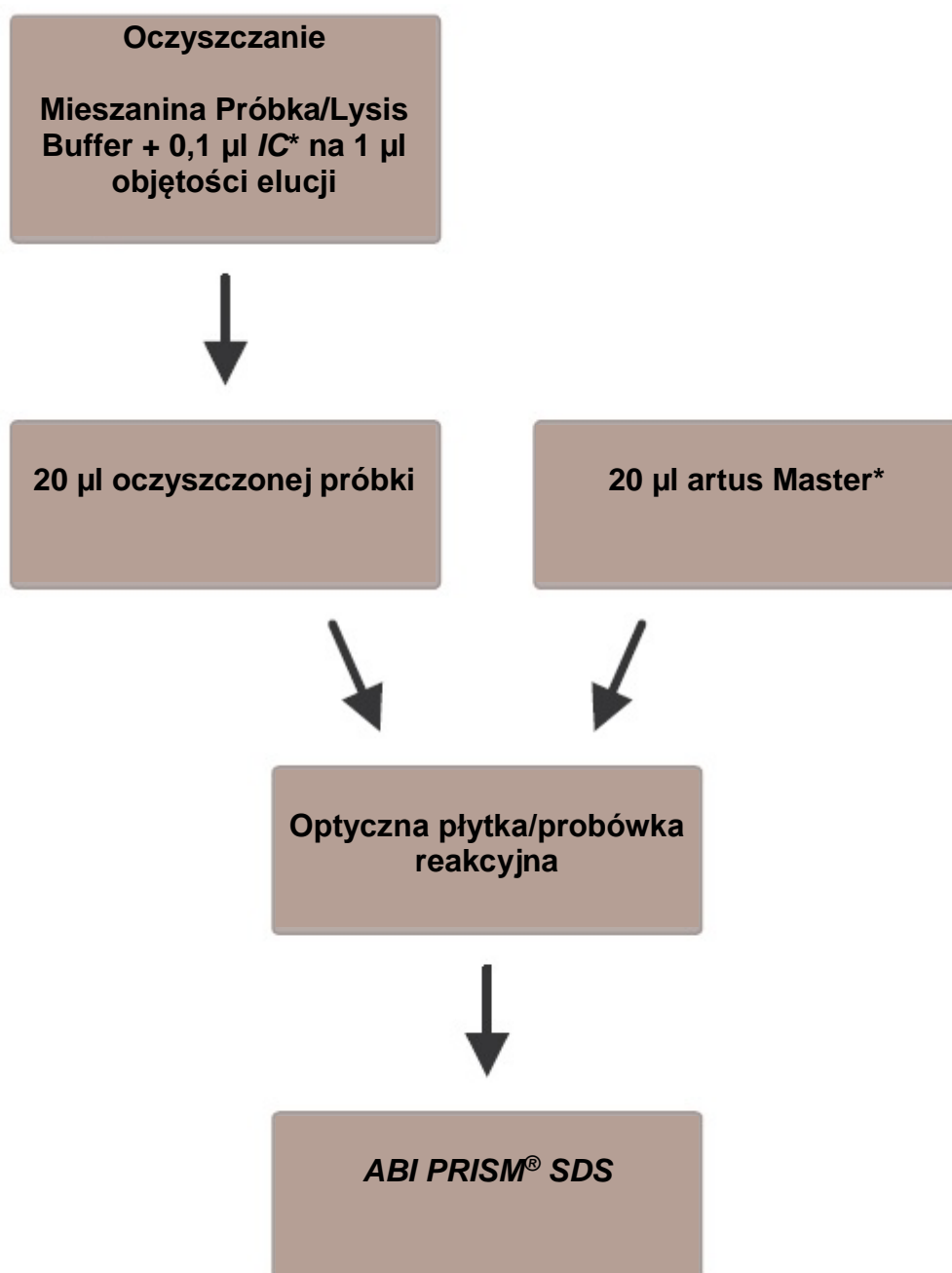
Należy pipetować 30 µl Master Mix do każdej wymaganej próbki lub dołka 96-dołkowej płytki do reakcji. Następnie należy dodać 20 µl eluatu z izolacji DNA. Dokładnie wymieszać poprzez kilkukrotne pipetowanie. Zamknąć próbki do reakcji odpowiednimi zamknięciami lub jeżeli używana jest płytka 96-dołkowa, optyczną folią samoprzylepną (*Optical Adhesive Covers*). Wirować próbki do reakcji (w statywie dla próbek PCR) lub 96-dołkową płytkę w wirówce z rotorem dla mikroplatek przez 30 sekund przy 1780 x g (4000 rpm) w celu zebrania przygotowanej mieszaniny reakcyjnej na dno próbki lub dołka. Jeżeli nie dysponujemy taką wirówką, to należy się upewnić, że Master Mix i próbka są pipetowane na dno próbek lub dołków. Przygotowane reakcje należy przechować w +4°C aż aparat *ABI PRISM SDS Instrument* zostanie zaprogramowany (zob. 8.5 Programowanie *ABI PRISM SDS*) i następnie przenieść je do aparatu.

#### **Uwaga:**

- Gdy używane są optyczne próbki do reakcji w połączeniu z optycznymi zamknięciami, zawsze należy wkładać statyw podtrzymujący (96-Well Tray/Retainer Set) do aparatu (*ABI PRISM 7000, 7700 and 7900HT SDS*). Jeśli używany jest dwuczęściowy statyw podtrzymujący, to konieczne jest otwieranie próbek przed ich wkładaniem i wyjmowaniem ze stojaka. Aby uniknąć zakażenia wskutek tej procedury należy używać tylko niższą część stojaka podtrzymującego.
- W przypadku używania 96-dołkowych optycznych płytek reakcyjnych w połączeniu z optyczną folią samoprzylepną wymagane jest nakrywanie ich nakładką do kompresji (*Optical Cover Compression Pads*).

\* Zwiększenie objętości spowodowane dodaniem kontroli wewnętrznej *Internal Control* nie jest istotne przy przygotowywaniu reakcji PCR. Czulość detekcji nie ulega osłabieniu.

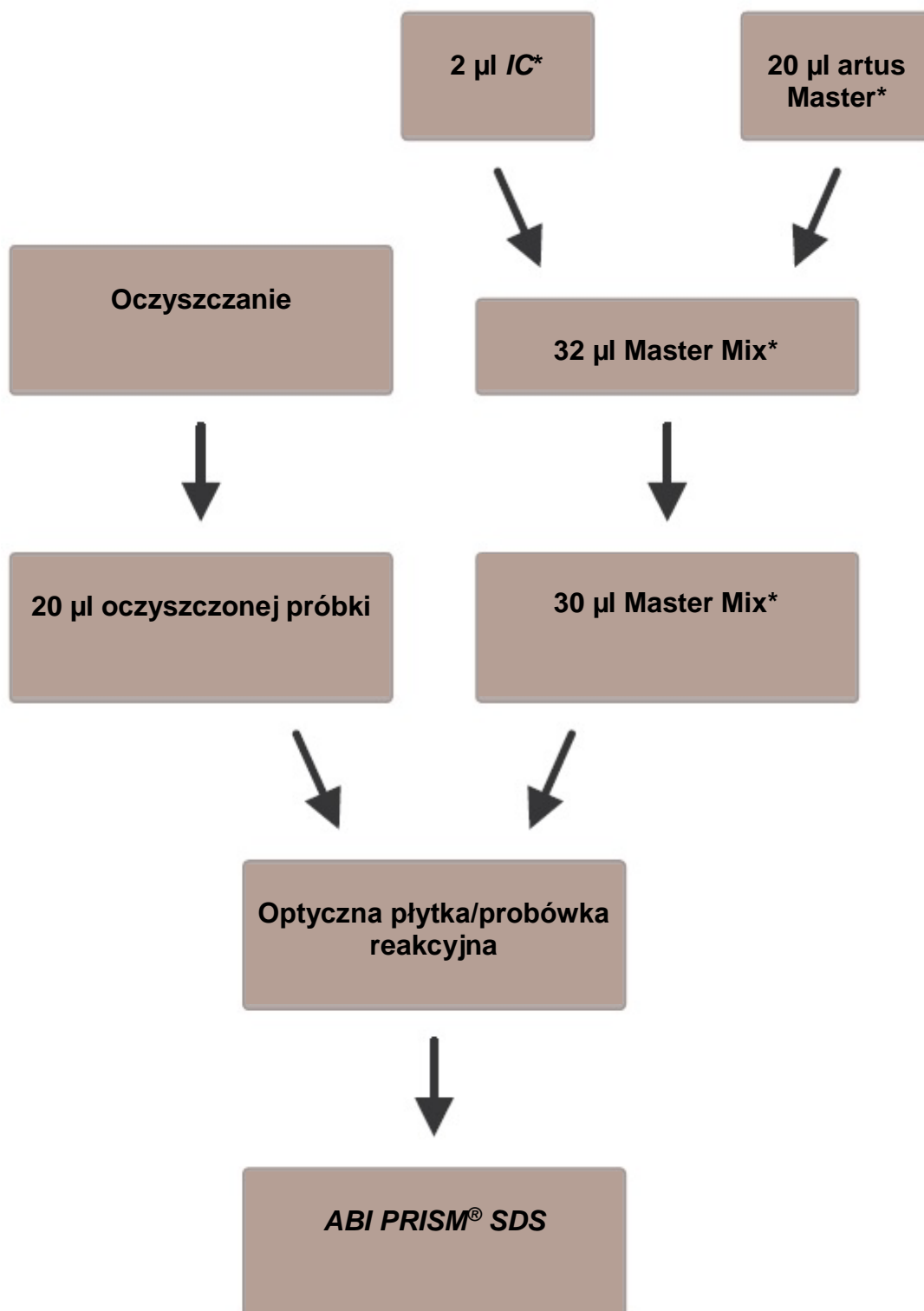
## Dodanie kontroli wewnętrznej *Internal Control* do procedury oczyszczania



Rys. 1: Schemat postępowania w celu kontroli procedury oczyszczania i inhibicji PCR.

\* Należy się upewnić, że roztwory zostały całkowicie rozmrożone, dobrze wymieszane i krótko odwirowane.

## Dodanie kontroli wewnętrznej *Internal Control* do *artus Master*



Rys. 2: Schemat postępowania dotyczący kontroli inhibicji PCR.

\* Należy się upewnić, że roztwory zostały całkowicie rozmrożone, dobrze wymieszane i krótko odwirowane.

## 8.5 Programowanie *ABI PRISM SDS*

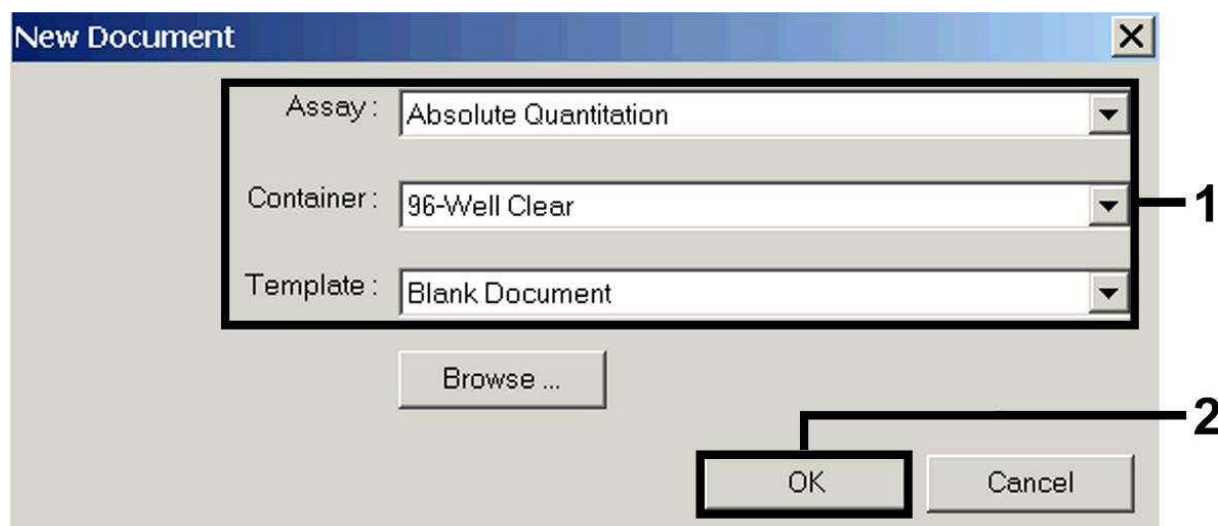
Oprogramowanie *ABI PRISM 7000*, *7700* oraz *7900HT Sequence Detection Systems (SDS)* wymaga kilku dodatkowych informacji przed uruchomieniem reakcji PCR. Procedury programowania aparatów znacznie różnią się od siebie, dlatego są opisane w poniższych osobnych rozdziałach.

### 8.5.1 Programowanie *ABI PRISM 7000 SDS*

W celu wykrycia EBV DNA należy utworzyć w aparacie *ABI PRISM 7000 SDS* profil zgodnie z następującymi sześcioma krokami (8.5.1.1 – 8.5.1.6). Cała specyfikacja odnosi się do programu *ABI PRISM 7000 SDS* w wersji 1.0.1. Szczegóły dotyczące programowania *ABI PRISM 7000 SDS* zamieszczono w instrukcji *ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. Ustawienia programu są wyróżnione pogrubioną czarną ramką w celu ułatwienia zapoznania się z opisem.

#### 8.5.1.1 Ustawienia wstępne dla przygotowania nowej reakcji PCR (New PCR Run)

Należy wybrać pozycję *New* z menu *File* w *ABI PRISM 7000 SDS* i zaprogramować następujące wstępne ustawienia dla nowego dokumentu (zob. rys. 3). Zapasowy szablon (*SDS Template* [\*.sdt]) jest dostępny na liście szablonów *Template* lub poprzez wybranie przy użyciu funkcji przewijania (*Browse*) (zob. 8.5.1.5 zapisywanie reakcji PCR). Wybrane ustawienia należy potwierdzić za pomocą *OK*.



Rys. 3: Wstępne ustawienia dla utworzenia nowej reakcji PCR (*New Document*).

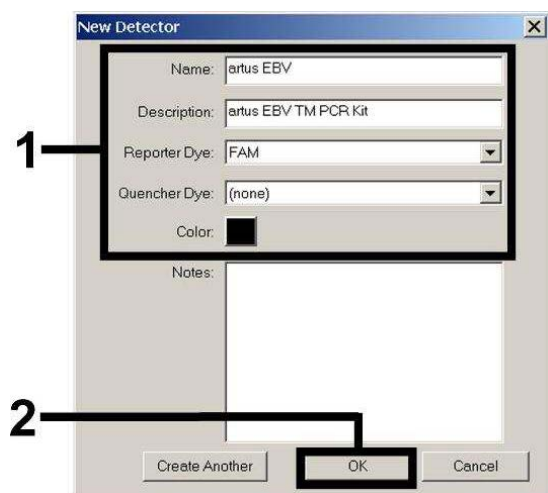
#### 8.5.1.2 Tworzenie/wybieranie detektorów

Za pomocą podmenu *Detector Manager* z menu *Tools* należy przyporządkować do pliku odpowiednie barwniki detektora. Dla wykrycia EBV DNA oraz dla kontroli wewnętrznej *Internal Control* za pomocą zestawu *artus EBV TM PCR Kit* należy zdefiniować reportery/wygaszacze (reporters/quenchers) wymienione w poniższej tabeli:

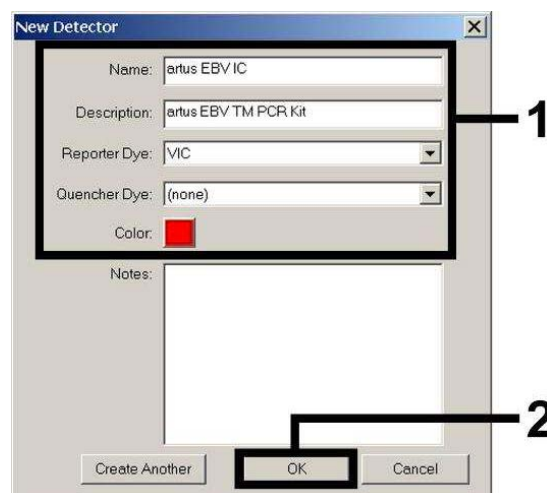


Detekcja	Reporter	Quencher (wygaszacz)
EBV DNA	FAM	brak
Kontrola wewnętrzna (EBV RG/TM IC)	VIC	brak

Aby utworzyć te detektory należy wybrać opcję *File* (na dole po lewej w *Detector Manager*) i następnie wybrać opcję *New*.

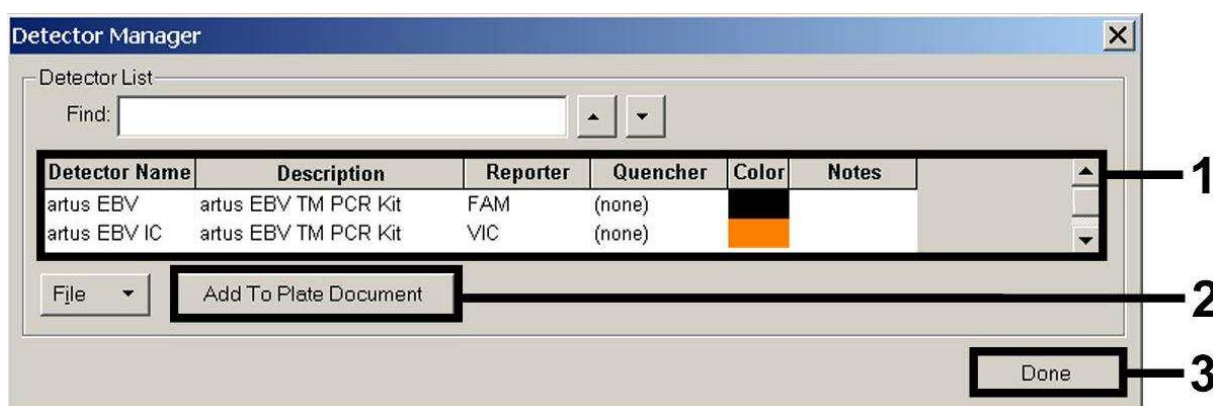


Rys. 4: Tworzenie konkretnego detektora EBV (*Detector Manager*).



Rys. 5: Tworzenie konkretnego detektora IC (*Detector Manager*).

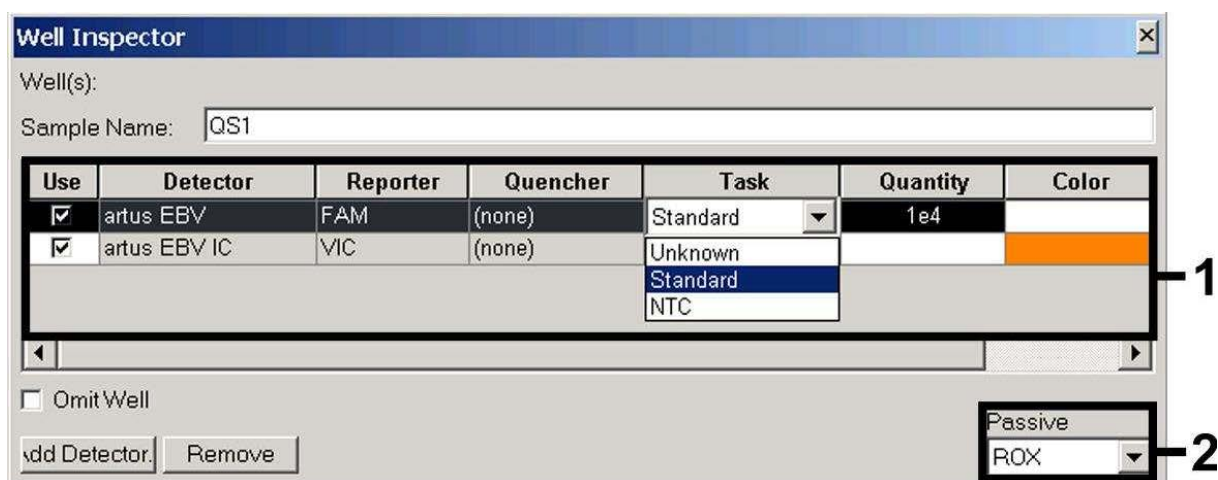
W celu wykrycia DNA EBV należy zdefiniować w nowym oknie kombinację reporter/wygaszacz **FAM/none**. Dla wykrycia kontroli wewnętrznej *Internal Control* należy wybrać kombinację VIC/none (jak pokazano na rys. 4 i rys. 5). Potwierdzając dane wejściowe (OK) powracamy do *Detector Manager*. Należy zaznaczyć nowo utworzone detektory i przenieść każdy wybór do *Well Inspector* poprzez kliknięcie na opcję *Add to Plate Document* (zob. rys. 6). Zamknąć okno (*Done*).



Rys. 6: Wybieranie detektorów (*Detector Manager*).

### 8.5.1.3 Przypisywanie niezbędnych informacji do pozycji płytki

Należy otworzyć *Well Inspector* z menu *View*, aby znaleźć detektory wybrane w kroku 8.5.1.2 (zob. rys. 7).



Rys. 7: Przypisanie niezbędnych informacji do pozycji płytki (*Well Inspector*).

Zaznaczyć pozycje płytki zarezerwowane dla wykrycia EBV DNA. Przypisać wybrane detektory do tych pozycji poprzez aktywację opcji *Use* obu detektorów, powyżej których pojawi się zaznaczenie. Dla określenia każdej pojedynczej reakcji należy zaznaczyć odpowiednią pozycję na płytce i wpisać nazwę próbki (*Sample Name*). Należy zwrócić uwagę, że przypisanie identycznej nazwy próbki *Sample Name* i identycznego detektora będzie rozpoznawane przez program jako powtórzenia (replikacje) i będzie uśrednione z uwzględnieniem ilościowego oznaczenia wirerii (quantified pathogen load). Następnie należy zaznaczyć odpowiednią funkcję (*Task*) dla każdego rodzaju próbki zgodnie z poniższą tabelą:

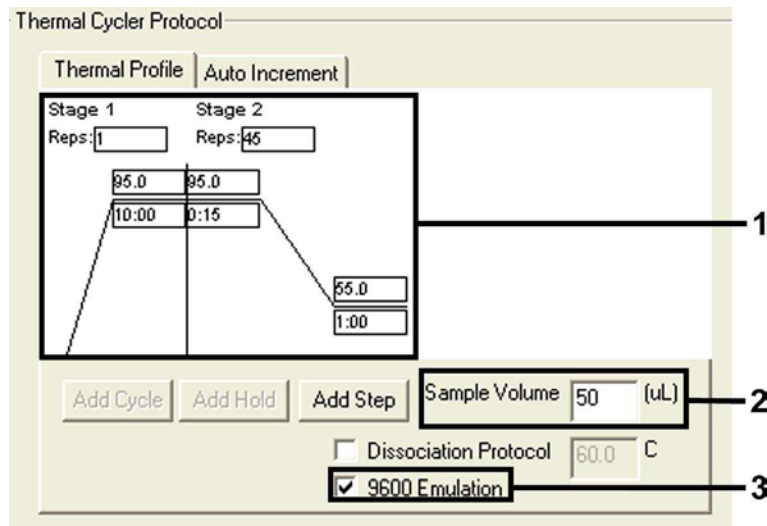
Rodzaj próbki	Funkcja ( <i>Task</i> )	Stężenie ( <i>Quantity</i> )	Reporter	Quencher (wygaszacz)
Próbka	Unknown (nieznana):	–	FAM	brak
Kontrola bez matrycy	NTC	–	FAM	brak
Standard	Standard	Zobacz Zawartość p.1	FAM	brak

Aby wygenerować krzywą standardową należy użyć wszystkich dostarczonych standardów oznaczania ilościowego *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* dla każdej reakcji PCR i wpisać odpowiednie stężenia (Zobacz Zawartość p.1) dla każdego standardu (*Quantity*). Należy zwrócić uwagę, że dla reakcji PCR z Zestawem artus EBV TM PCR, **ROX** musi być ustawiony jako odniesienie pasywne (*Passive Reference*). Równa dystrybucja barwnika

ROX we wszystkich reakcjach PCR danej partii poprzez mieszanie *EBV RG/TM Master* gwarantuje rozpoznanie i kalkulację rozrzutów pomiędzy probówkami [tube-to-tube variations] (różnice fluorescencji pomiędzy różnymi reakcjami PCR) za pomocą programu *Sequence Detection Software* (normalizacja).

#### 8.5.1.4 Tworzenie profilu temperaturowego

Aby utworzyć profil temperaturowy, należy w oprogramowaniu przejść z poziomu *Setup* do poziomu *Instrument*. Wprowadzić określony profil temperaturowy dla detekcji EBV DNA zgodnie z rys. 8. Aby usunąć krok 50°C zapisany we wstępnych ustawieniach, należy zaznaczyć go lewym klawiszem myszy przytrzymując jednocześnie klawisz Shift, a następnie usunąć go używając klawisza backspace. Upewnić się, że objętość reakcji ustawiona jest na 50 µl. Opcja *9600 Emulation* powinna być aktywowana, wstępne ustawienia *Auto Increment* powinny pozostać niezmienione (*Auto Increment: 0,0°C, 0,0 Seconds*).



Rys. 8: Tworzenie profilu temperaturowego

#### 8.5.1.5 Zapisywanie ustawień reakcji PCR

Należy zapisać ustawienia (Setup) jako szablon w celu późniejszego ich użycia w zmodyfikowanej lub niezmienionej formie. Zapisanie ustawień jako *SDS Template (\*.sdt)* w katalogu *Template Directory (Local Disk [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates*, utworzonym przez Applied Biosystems), pozwoli na wybranie tego pliku bezpośrednio w oknie *New Document* z rozwijanej listy *Template*. Kopie zapisane w innych folderach muszą być otwierane za pośrednictwem *Browse*. Przed uruchomieniem reakcji PCR należy zapisać je ponownie jako *SDS Document (\*.sds)*, aby zagwarantować zapisanie danych, które zostaną zczytane podczas przebiegu PCR.

#### 8.5.1.6 Rozpoczęcie reakcji PCR

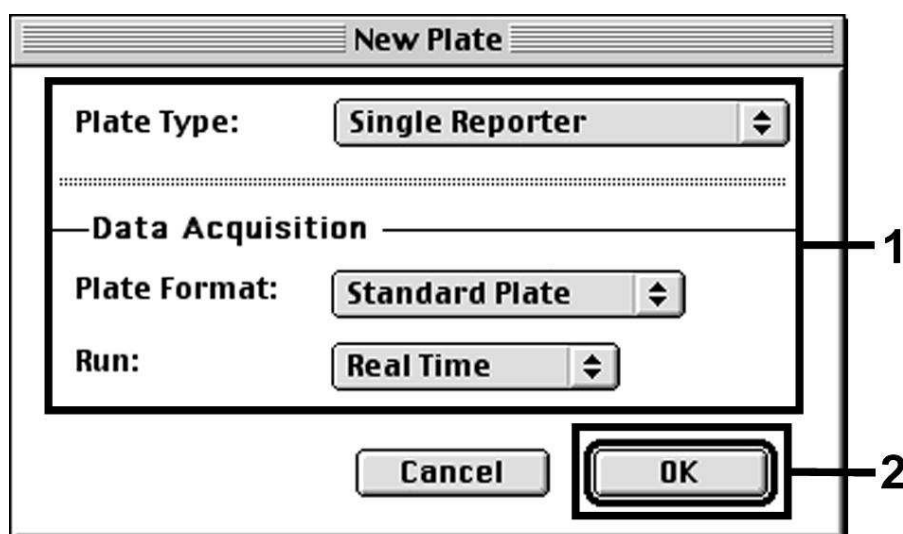
Rozpocznij reakcję PCR wybierając opcję *Start* z pozycji menu *Instrument* lub pola *Start* na poziomie *Instrument*.

## 8.5.2 Programowanie *ABI PRISM 7700 SDS*

Dla wykrycia EBV DNA w aparacie *ABI PRISM 7700 SDS* należy utworzyć profil zgodnie z następującymi siedmioma krokami (8.5.2.1 – 8.5.2.7). Cała specyfikacja odnosi się do programu *ABI PRISM 7700 SDS* w wersji 1.9.1. Szczegóły dotyczące programowania *ABI PRISM 7700 SDS* zamieszczono w instrukcji *ABI PRISM 7700 SDS User's Manual*. W celu ułatwienia zapoznania się z opisem ustawienia programu są wyróżnione pogrubioną czarną ramką.

### 8.5.2.1 Ustawienia wstępne dla przygotowania nowej reakcji PCR (New PCR Run)

Należy wybrać pozycję *New Plate* z menu *File* w *ABI PRISM 7700 SDS* i zaprogramować następujące wstępne ustawienia dla nowego dokumentu (zob. rys. 9). Wybrane wstępne ustawienia należy potwierdzić za pomocą *OK*.



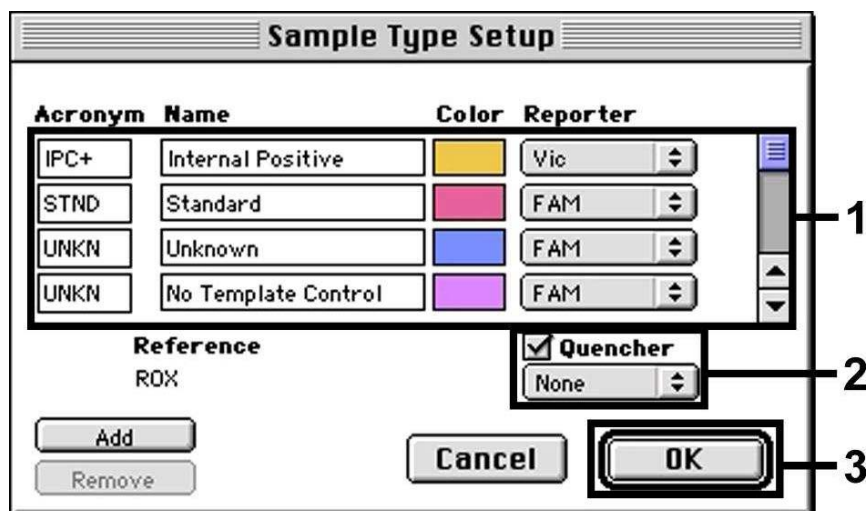
Rys. 9: Wstępne ustawienia dla utworzenia nowej reakcji PCR (*New Plate*).

### 8.5.2.2 Wybór barwników fluorescencji i przyporządkowanie rodzaju próbki

Za pomocą *Sample Type Setup* (poziom *Setup: Sample Type/Sample Type Setup*) należy przyporządkować do pliku odpowiednie barwniki detektora oraz odpowiednie rodzaje próbek. W celu wykrycia EBV DNA oraz dla kontroli wewnętrznej *Internal Control* za pomocą Zestawu *artus EBV TM PCR* należy zdefiniować reportery/wygaszacze (reporters/quenchers) wymienione w poniższej tabeli:

Detekcja	Reporter	Quencher (wygaszacz)
EBV DNA	FAM	brak
Kontrola wewnętrzna (EBV RG/TM IC)	VIC	brak

Dla analizy EBV DNA przy użyciu Zestawu *artus* EBV TM PCR należy wybrać barwnik reportera FAM jak to podano w tabeli. Ma to zastosowanie do standardów (STND) i próbek (UNKN) jak również do kontroli non-template [negatywnej] (UNKN). Dla analizy kontroli wewnętrznej *Internal Control* (IPC+) należy zdefiniować VIC jako reporter. Jako quencher (wygaszacz) należy wybrać „none”. Przyporządkowanie barwników i rodzajów próbek w oknie *Sample Type Setup* zostało pokazane na rys. 10.



Rys. 10: Wybieranie barwników fluorescencyjnych i przyporządkowanie rodzaju próbki (*Sample Type Setup*).

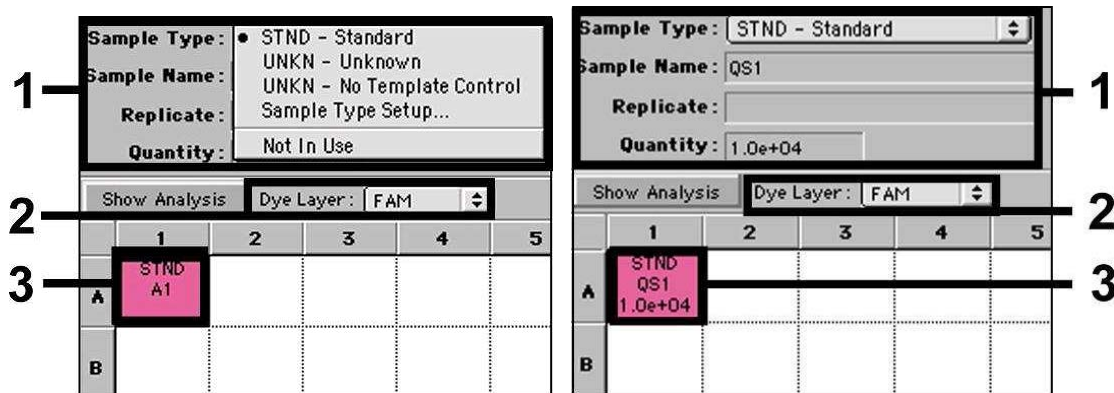
Należy przyporządkować rodzaj próbki do odpowiedniej funkcji (*Acronym*) zgodnie z poniższą tabelą:

Rodzaj próbki	Funkcja ( <i>Acronym</i> )	Stężenie ( <i>Quantity</i> )	Reporter	Quencher (wygaszacz)
Próbka	UNKN	–	FAM	brak
Kontrola bez matrycy	UNKN	–	FAM	brak
Standard	STND	Zobacz Zawartość p. 1	FAM	brak

### 8.5.2.3 Przypisywanie niezbędnych informacji do pozycji na płycie

Aby przyporządkować detektory i rodzaje próbek do indywidualnych pozycji płytki, należy wybrać odpowiednie pola. Następnie otworzyć okno dialogowe *Dye Layer* na poziomie *Setup* i przyporządkować odpowiedni reporter. Po aktywacji rozwijanego („wyskakującego”) menu *Sample Type*, widoczne będą na pojawiającej się liście rodzaje próbek przypisane do reportera w *Sample Type Setup* (zob. rys. 11). Należy wybrać odpowiednie rodzaje próbek (zob. Tab. pod 8.6.2.2) i przyporządkować pozostałe pozycje płytki za pomocą menu *Dye Layers* oraz *Sample Type*. W polu *Sample Name* można przypisać

nazwę do każdej próbki. Pola zdefiniowane jako *Replicates* (wpisywanie nazwy próbki referencyjnej do kolumny *Replicate*) są przez program uśredniane z uwzględnieniem ilościowego oznaczenia wirerii (quantified pathogen load) i obliczane jest odchylenie standardowe.

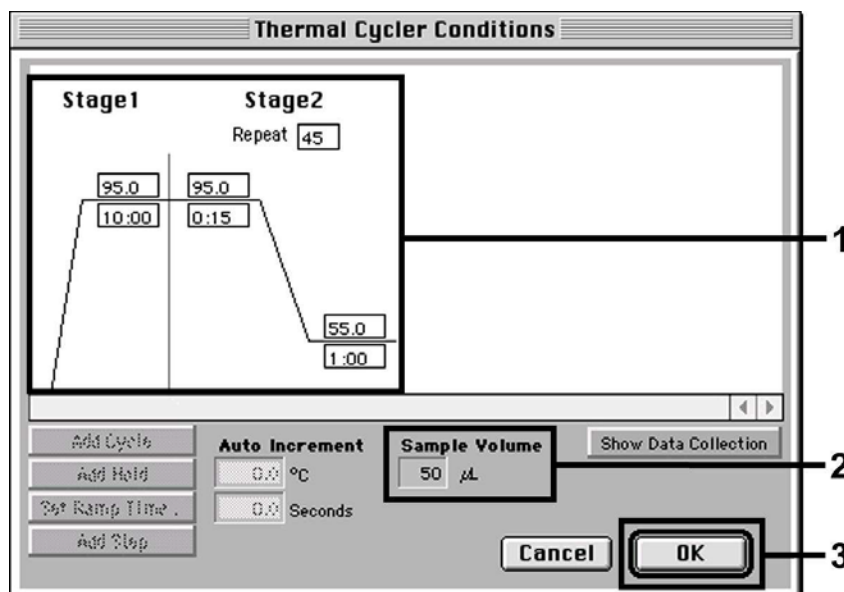


Rys. 11/12: Przypisanie niezbędnych informacji do pozycji płytki.

Aby wygenerować krzywą standardową należy użyć wszystkich dostarczonych standardów oznaczania ilościowego *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* dla każdej reakcji PCR i wpisać odpowiednie stężenia (zobacz Zawartość p.1) dla każdego standardu w polu *Quantity* (zob rys. 12). Jest to jednak możliwe tylko wtedy, gdy pozycje zarezerwowane dla standardów zostały zdefiniowane jako takie wcześniej za pomocą menu *Sample Type*.

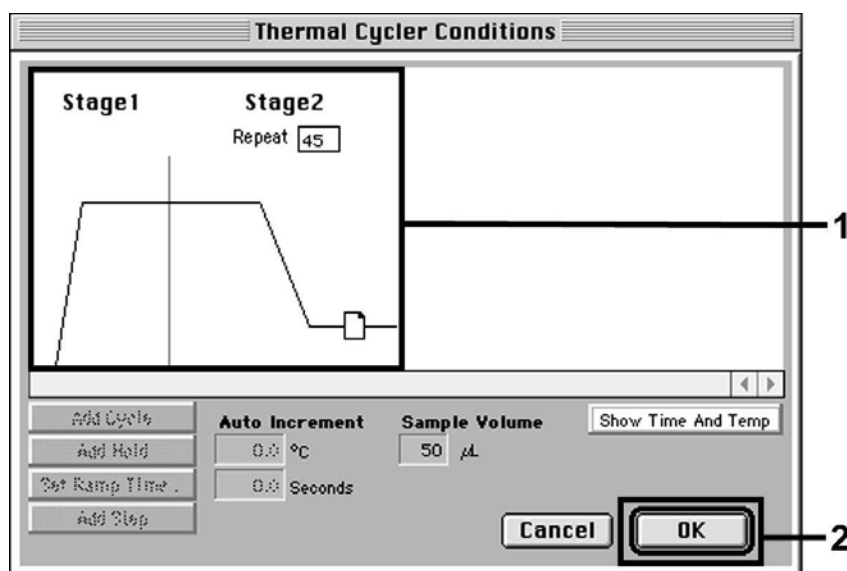
### 8.5.2.4 Tworzenie profilu temperaturowego

Aby utworzyć profil temperaturowy należy przejść do menu *Thermal Cycler Conditions* na poziomie *Setup*. Wprowadzić określony profil temperaturowy dla detekcji EBV DNA zgodnie z rys. 13. Upewnij się, że objętość reakcji ustawiona jest na 50  $\mu$ L. Wstępne ustawienia czasu *Ramp* oraz *Auto Increment* pozostają niezmienione (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0,0°C, 0,0 Seconds).



Rys. 13: Tworzenie profilu temperaturowego.

Ponadto menu *Thermal Cycler Conditions* zawiera opcję *Show Data Collection*. Zaznaczenie tej opcji spowoduje otwarcie okna przedstawionego na rys. 14. Każde zbocze i każde plateau temperatury pokazuje *Data Collection Icon*, która ilustruje dane zebrane na danym etapie reakcji. Należy usunąć wszystkie symbole z wyjątkiem symbolu dla kroku *Annealing-Extension (Stage2/Step2)*, aby wykluczyć zbędne pomiary fluorescencji. Dzięki temu całkowity czas reakcji i ilość danych będzie ograniczony do minimum.



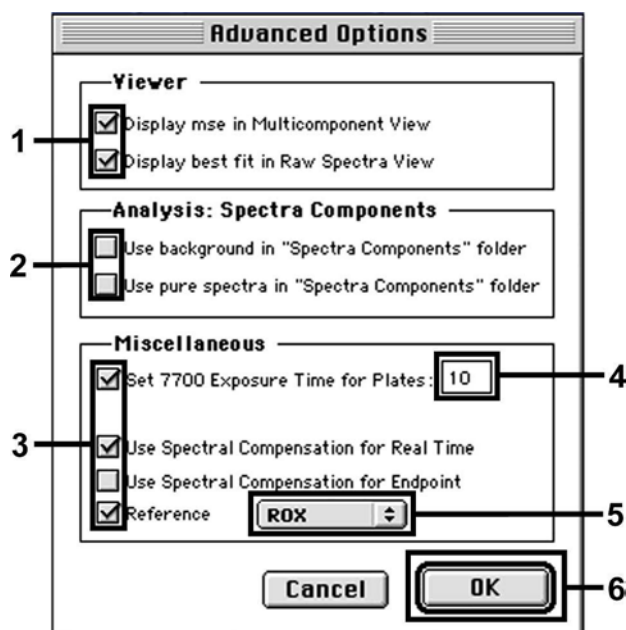
Rys. 14: Zbieranie danych

### 8.5.2.5 Ważne ustawienia dodatkowe

W celu ustawienia czasu ekspozycji (wzbudzenia barwników fluorescencyjnych), jak również selekcji plików *Pure Spectra/Background* należy przejść z poziomu *Setup* do poziomu *Analysis*. Zaznaczyć aktywowany pod-element *Advanced Options*, aby znaleźć go w menu *Instrument* pod *Diagnostics*. Dopasować ustawienia z zgodnie z rys. 15. Przez wyłączenie opcjonalnej funkcji *Spectra Components (Analysis)* aktualne pliki kalibracji zapisane w pliku *Spectra Components* w momencie generowania danych zostają automatycznie użyte do ponownej ewaluacji już wcześniej analizowanych reakcji. W celu analizy wcześniejszych reakcji przy użyciu świeżo wprowadzonego *Spectra Components* należy aktywować te dwa pola. Należy zwrócić uwagę, że dla reakcji PCR z Zestawem *artus EBV TM PCR, ROX* musi być ustawiony jako pasywny odnośnik (*Reference*). Równa dystrybucja barwnika ROX we wszystkich reakcjach PCR danej partii poprzez mieszanie *EBV RG/TM Master* gwarantuje rozpoznanie i kalkulację różnic pomiędzy probówkami [tube-to-tube variations] (różnice fluorescencji pomiędzy różnymi reakcjami PCR) za pomocą programu *Sequence Detection Software* (normalizacja).

**Uwaga:** Kiedy do optycznych pomiarów używane są 96-dołkowe płytki reakcyjne w połączeniu z optyczną folią samoprzylepną lub optyczne probówki reakcyjne z płaskimi zamknięciami, czas ekspozycji wynosi dziesięć

milisekund. W przypadku używania **optycznych probówek reakcyjnych z wypukłymi zamknięciami** czas ekspozycji musi zostać wydłużony do **25 milisekund**.



Rys. 15: Ważne dodatkowe ustawienia (*Advanced Options*).

#### 8.5.2.6 Zapisywanie ustawień reakcji PCR

Należy zapisać ustawienia (Setup) jako szablon w celu późniejszego ich użycia w zmodyfikowanej lub niezmienionej formie. W tym celu należy zapisać plik w formacie *Stationary File Format*. Przed uruchomieniem nowo zaprogramowanej reakcji PCR należy zapisać ją ponownie w formacie *Normal File Format*, aby zagwarantować zapisanie danych, które zostaną zebrane podczas przebiegu PCR.

#### 8.5.2.7 Uruchomienie reakcji PCR

Uruchomić reakcję PCR wybierając opcję *Run* z pozycji menu *Instrument* lub pola *Start* na poziomie *Analysis*.

### 8.5.3 Programowanie **ABI PRISM 7900HT SDS**

Dla wykrycia EBV DNA w aparacie **ABI PRISM 7900HT SDS** należy utworzyć profil zgodnie z następującymi sześcioma krokami (8.5.3.1 – 8.5.3.6). Cała specyfikacja odnosi się do programu **ABI PRISM 7900HT SDS** w wersji 2.1. Szczegóły dotyczące programowania **ABI PRISM 7900HT SDS** zamieszczono w instrukcji **ABI PRISM 7900HT SDS User Guide**. W celu ułatwienia zapoznania się z opisem ustawienia programu są wyróżnione pogrubioną czarną ramką.

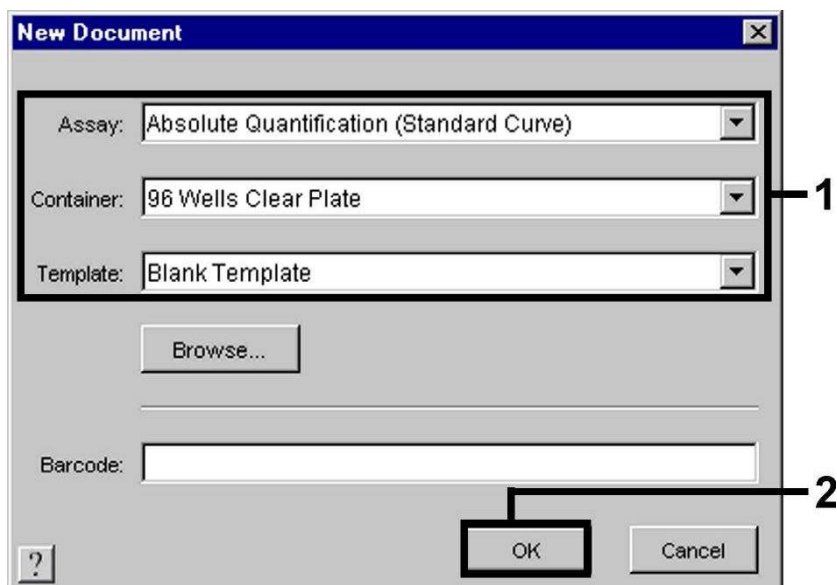
#### 8.5.3.1 Ustawienia wstępne dla przygotowania nowej reakcji PCR (New PCR Run)

Należy wybrać pozycję *New* z menu *File* w **ABI PRISM 7900HT SDS** i zaprogramować podane niżej wstępne ustawienia dla nowego dokumentu (zob. rys. 16). Zapasowy szablon (*ABI PRISM SDS Template Document*



[\*.sdt]) jest dostępny na liście szablonów *Template* lub poprzez wybranie przy użyciu funkcji przewijania (*Browse*) (zob. 8.5.3.5 Zapisywanie reakcji PCR). Wybrane wstępne ustawienia należy potwierdzić za pomocą *OK*.

**Uwaga:** Zestaw *artus EBV TM PCR* nie może być używany w połączeniu z 384-dołkowym formatem płytki ABI PRISM 7900HT SDS



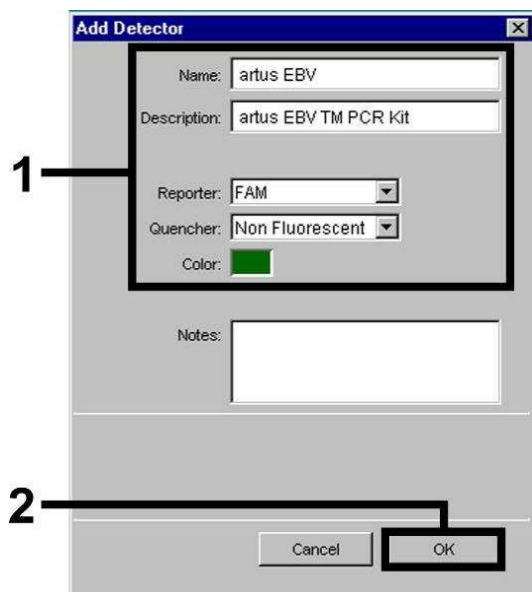
Rys. 16: Wstępne ustawienia dla utworzenia nowej reakcji PCR (New Document).

### 8.5.3.2 Tworzenie/wybieranie detektorów

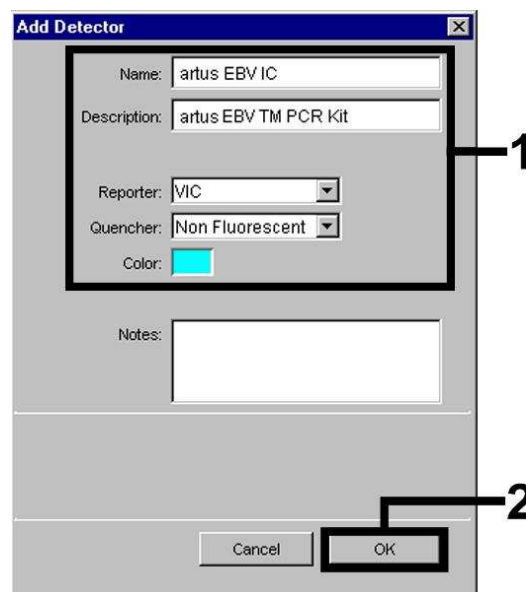
Za pomocą podmenu *Detector Manager* z menu *Tools* (alternatywnie: poziom *Setup* / wybrać funkcję *Add Detector*), należy przyporządkować do pliku odpowiednie barwniki detektorów. W celu wykrycia EBV DNA oraz dla kontroli wewnętrznej *Internal Control* za pomocą Zestawu *artus EBV TM PCR* należy zdefiniować reportery/wygaszacze (reporters/quenchers) wymienione w poniższej tabeli:

Detekcja	Reporter	Quencher (wygaszacz)
EBV DNA	FAM	Nie fluorescencyjny
<i>Kontrola wewnętrzna (EBV RG/TM IC)</i>	VIC	Nie fluorescencyjny

Aby utworzyć te detektory należy wybrać opcję *New* (na dole po lewej w *Detector Manager*).

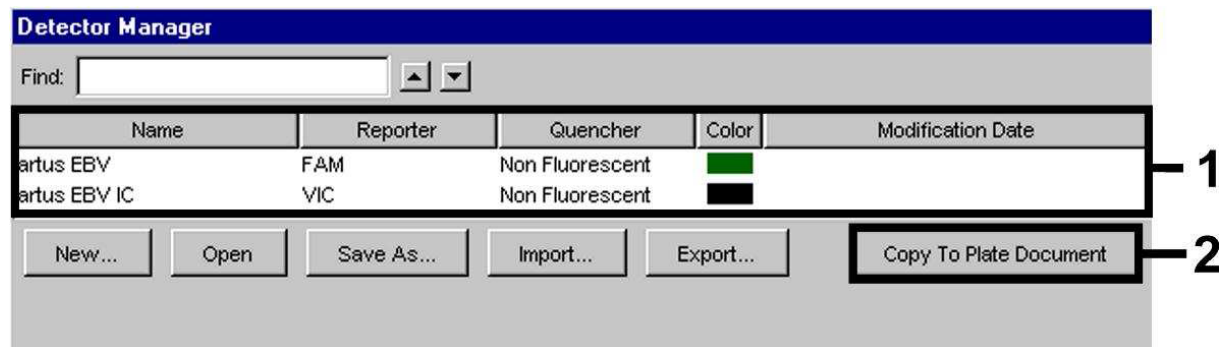


Rys. 17: Tworzenie konkretnego detektora EBV (*Detector Manager*).



Rys. 18: Tworzenie konkretnego detektora IC (*Detector Manager*).

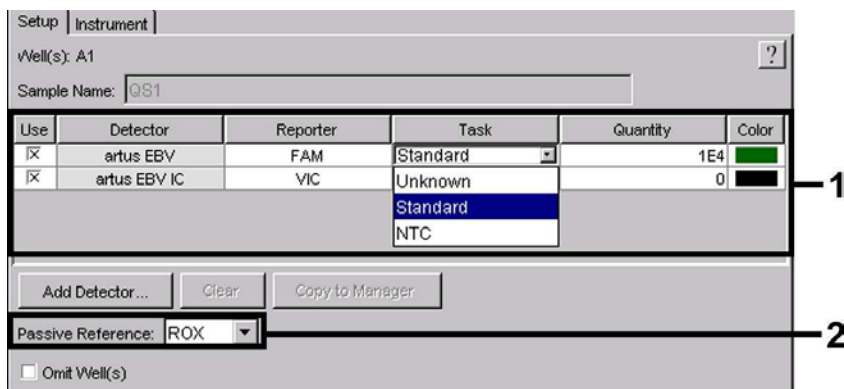
W celu wykrycia DNA EBV należy zdefiniować w nowym oknie kombinację reporter/wygaszacz FAM/Non Fluorescent. Dla wykrycia kontroli wewnętrznej *Internal Control* należy wybrać kombinację VIC/Non Fluorescent (jak pokazano na rys. 17 i rys. 18). Potwierdzając dane wejściowe (OK) powracamy do *Detector Manager*. Należy zaznaczyć nowo utworzone detektory i przenieść każdy wybór do *Setup level* poprzez kliknięcie na opcję *Copy to Plate Document* (zob. rys. 19). Zamknąć okno (*Done*).



Rys. 19: Wybieranie detektorów (*Detector Manager*).

### 8.5.3.3 Przypisywanie niezbędnych informacji do pozycji płytki

Po zamknięciu *Detector Manager* (*Done*) detektory wybrane pod 8.5.3.2 znajdą się na poziomie *Setup* w postaci listy w tabeli (zob. rys. 20).



Rys. 20: Przypisanie niezbędnych informacji do pozycji płytki.

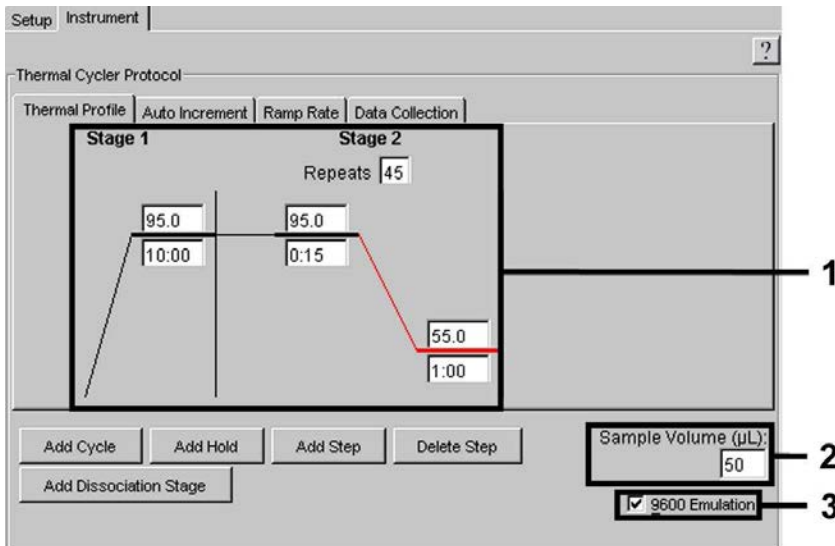
Zaznaczyć pozycje płytki zarezerwowane dla wykrycia EBV DNA. Przypisać wybrane detektory do tych pozycji poprzez aktywację opcji *Use* obydwu detektorów, powyżej których pojawi się krzyżyk. W celu określenia każdej pojedynczej reakcji należy zaznaczyć odpowiednią pozycję na płytce i wpisać nazwę próbki (*Sample Name*). Należy zwrócić uwagę, że przypisanie identycznej nazwy próbki *Sample Name* i identycznego detektora będzie rozpoznawane przez program jako powtórzenia (replikacje) i będzie uśrednione z uwzględnieniem zmierzonej ilościowo wirerii (quantified pathogen load). Następnie należy zaznaczyć odpowiednią funkcję (*Task*) dla każdego rodzaju próbki zgodnie z poniższą tabelą:

Rodzaj próbki	Funkcja ( <i>Task</i> )	Stężenie ( <i>Quantity</i> )	Reporter	Quencher (wygaszacz)
Próbka	Unknown (nieznana)	–	FAM	Nie fluorescencyjny
Kontrola bez matrycy	NTC	–	FAM	Nie fluorescencyjny
Standard	Standard	Zobacz Zawartość p.1	FAM	Nie fluorescencyjny

Aby wygenerować krzywą standardową należy użyć wszystkich dostarczonych standardów oznaczania ilościowego *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* dla każdej reakcji PCR i wpisać odpowiednie stężenia (zobacz Zawartość p.1) dla każdego standardu (*Quantity*). Należy zwrócić uwagę, że dla reakcji PCR z Zestawem artus EBV TM PCR, ROX musi być ustawiony jako odniesienie pasywne (*Passive Reference*). Równa dystrybucja barwnika ROX we wszystkich reakcjach PCR danej partii poprzez mieszanie *EBV RG/TM Master* gwarantuje rozpoznanie i kalkulację różnic pomiędzy próbkami [tube-to-tube variations] (różnice fluorescencji pomiędzy różnymi reakcjami PCR) za pomocą programu *Sequence Detection Software* (normalizacja).

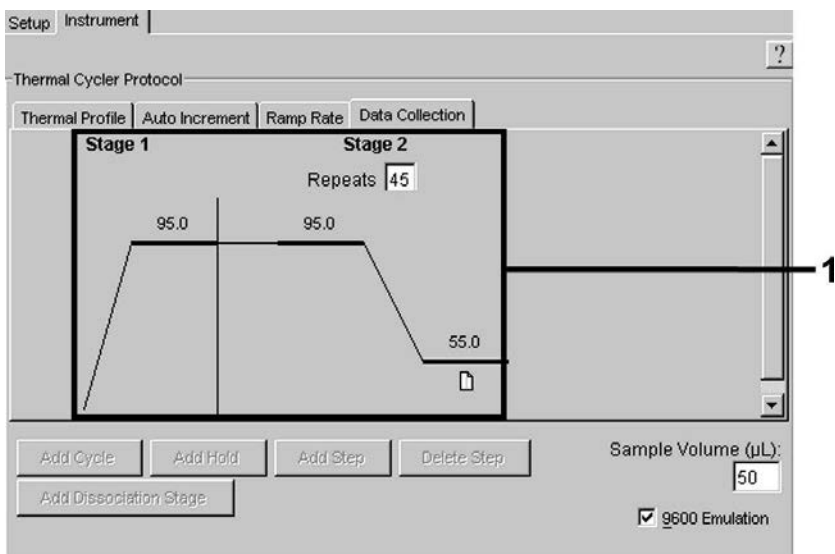
### 8.5.3.4 Tworzenie profilu temperaturowego

Aby utworzyć profil temperaturowy, należy w programie przejść z poziomu *Setup* do poziomu *Instrument*. Wprowadzić aktualny (obowiązujący) profil temperaturowy dla detekcji EBV DNA zgodnie z rys. 21. Upewnić się, że objętość reakcji ustawiona jest na 50 µl. Opcja *9600 Emulation* powinna być aktywowana, wstępne ustawienia czasu *Ramp* oraz *Auto Increment* powinny pozostać niezmienione (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0,0°C, 0,0 Seconds).



Rys. 21: Tworzenie profilu temperaturowego

Ponadto poziom *Instrument* zawiera opcję *Data Collection*. Zaznaczenie tej opcji spowoduje otwarcie okna przedstawionego na rys. 22. Każda zmiana oraz plateau temperatury pokazuje *Data Collection Icon*, która ilustruje dane zebrane na danym etapie reakcji. Należy usunąć wszystkie symbole, poprzez ich kliknięcie, z wyjątkiem symbolu dla kroku *Annealing-Extension* (*Stage2/Step2*), aby wykluczyć zbędne pomiary fluorescencji. Dzięki temu całkowity czas reakcji i ilość danych będzie ograniczony do minimum.



Rys. 22: Zbieranie danych.

### 8.5.3.5 Zapisywanie ustawień reakcji PCR

Należy zapisać ustawienia (Setup) jako szablon w celu późniejszego ich użycia w zmodyfikowanej lub niezmienionej formie. Zapisanie ustawień jako *ABI PRISM SDS Template Document (\*.sdt)* w katalogu *Template Directory ([D:]Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates*, utworzonym przez Applied Biosystems), pozwoli na wybranie tego pliku bezpośrednio w oknie *New Document* z listy *Template*. Kopie zapisane w innych folderach muszą być otwierane za pośrednictwem *Browse*. Przed uruchomieniem reakcji PCR należy zapisać je ponownie jako *ABI PRISM SDS Document (\*.sds)*, aby zagwarantować zapisanie danych, które będą zbierane podczas przebiegu PCR.

### 8.5.3.6 Rozpoczynanie reakcji PCR

Rozpocznij reakcję PCR wybierając opcję *Start* z pozycji menu *Instrument*.

## 9. Analiza Danych

Poprawna kalibracja barwników (*Pure Spectra Component File*) i tła (*Background Component File*) jest konieczna w momencie włączenia aparatu do pracy. Wspomniane pliki kalibracji są niezbędne do dokładnej kalkulacji wyników:

Wszystkie sygnały zakłócające generowane przez aparaty mające wpływ na pomiar są eliminowane przez program *Sequence Detection Software* systemu *ABI PRISM Sequence Detection Systems* za pomocą pliku *Background Component File*.

Ponadto zakłócenia pojawiają się podczas wielokolorowej analizy pomiędzy widmami pojedynczych barwników fluorescencyjnych. Program *ABI PRISM SDS* kompensuje te interferencje w oparciu o obliczenia przy wykorzystaniu danych ze spektrum poszczególnych barwników przechowywanych w *Pure Spectra Component File*. Program używa tego samego pliku dla przyporządkowywania danych fluorescencyjnych zawierających całe mierzone spektrum zebrane do zaprogramowanych detektorów w czasie reakcji PCR. Dane fluorescencyjne indywidualnych barwników są następnie dzielone przez wartość otrzymaną dla sygnału pasywnej referencji (ROX) w celu wyliczenia różnic pomiędzy próbkami (różnice fluorescencji pomiędzy kilkoma przygotowaniami PCR). Znormalizowane w ten sposób sygnały mogą zostać poddane ocenie za pomocą *Amplification Plot*.

Pliki kalibracji używane do oceny reakcji PCR są automatycznie zapamiętywane podczas zapisywania reakcji. Jeżeli żadne pliki kalibracji nie zostały zainstalowane, to należy je utworzyć zgodnie z instrukcjami podanymi w podręczniku *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Jeżeli w reakcji PCR zintegrowanych jest więcej niż jeden system *artus*™ PCR (należy zwrócić uwagę na profil temperaturowy), to oznaczenie to powinno być analizowane oddzielnie. Próbkę z przyporządkowanymi identycznym nazwami próbki *Sample Name* i z identycznym detektorem będą

automatycznie identyfikowane przez program *ABI PRISM 7000 and 7900HT SDS Software* jako replikacje i będą uśrednione względem ilościowo oznaczonej wirerii.

Możliwe są następujące wyniki:

1. Został wykryty sygnał fluorescencji FAM.

**Wynik analizy jest pozytywny: Próbka zawiera EBV DNA.**

W tym przypadku wykrycia sygnału fluorescencyjnego VIC (*Internal Control*) jest bez znaczenia, ponieważ wysokie początkowe stężenia EBV DNA (pozytywny sygnał fluorescencji FAM) może prowadzić do redukcji lub braku sygnału fluorescencyjnego kontroli wewnętrznej *Internal Control* (kompetycja).

2. Nie został wykryty sygnał fluorescencji FAM. W tym samym czasie pojawia się sygnał fluorescencji VIC z kontroli wewnętrznej *Internal Control*.

**W próbce nie wykryto EBV DNA. Może zostać uznana jako ujemna.**

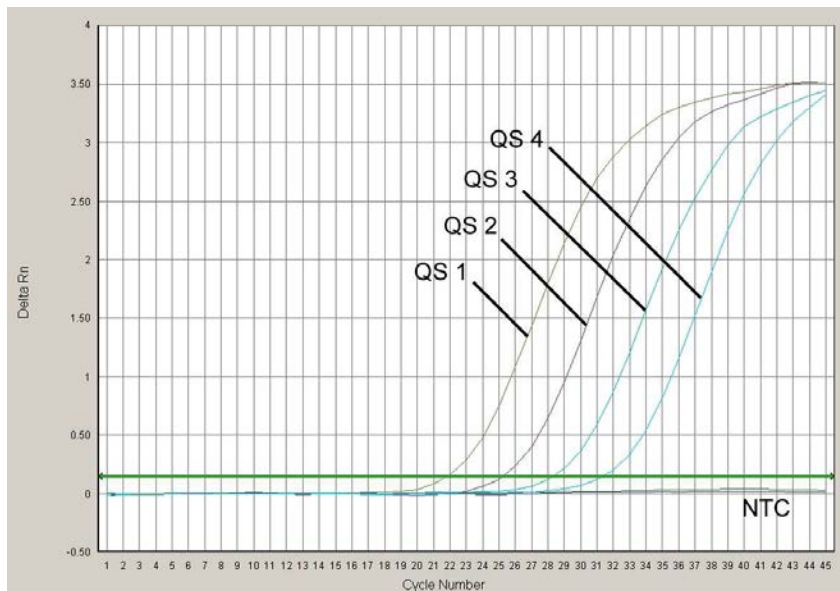
W przypadku ujemnego EBV PCR wykryty sygnał kontroli wewnętrznej *Internal Control* wyklucza możliwość inhibicji PCR.

3. Nie został wykryty ani sygnał fluorescencji FAM ani też sygnał fluorescencji VIC.

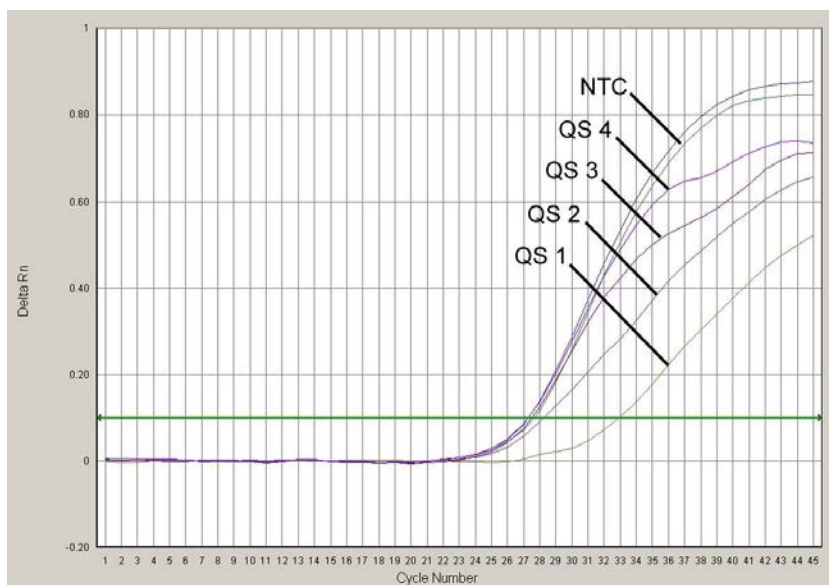
**Nie można postawić żadnej diagnozy.**

Informacje dotyczące źródeł błędów i ich rozwiązania można znaleźć w rozdziale 10. Rozwiązywanie Problemów.

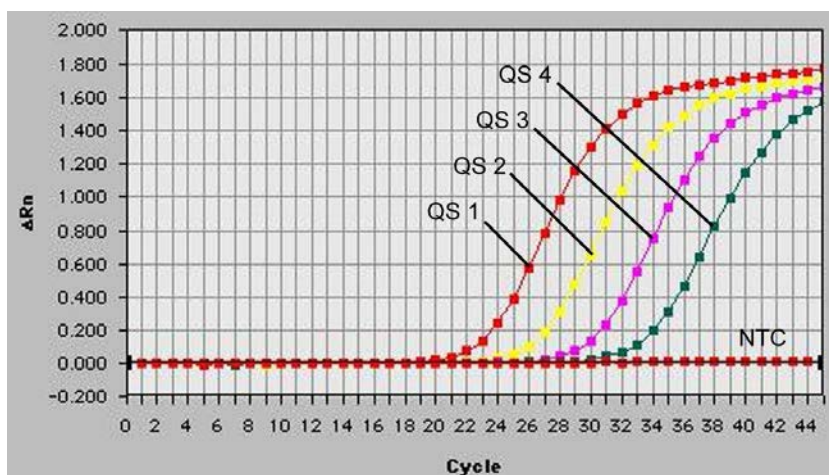
Przykłady pozytywnych i negatywnych reakcji PCR zostały podane na rys. 23/24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) oraz 27/28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).



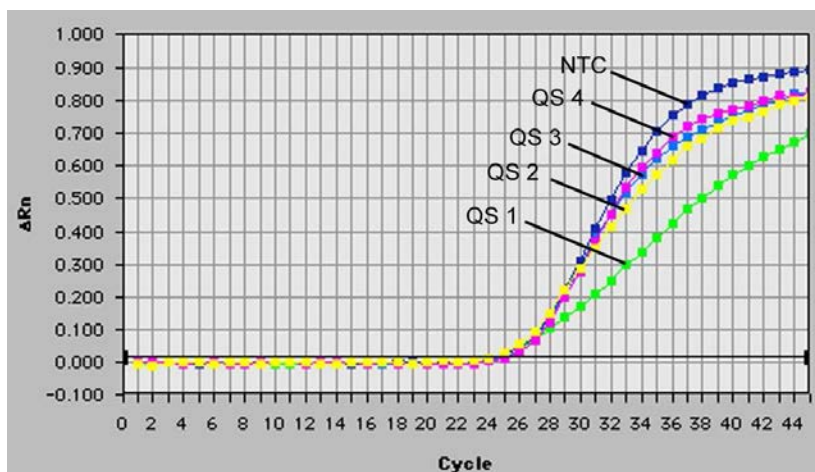
Rys. 23: Detekcja standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji FAM (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).



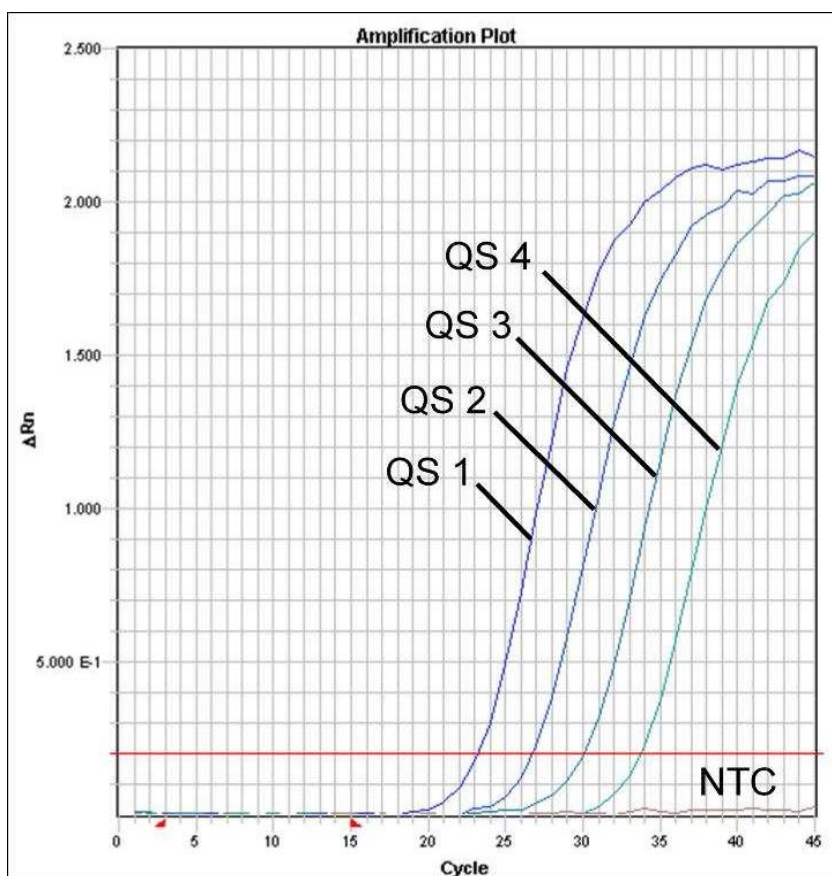
Rys. 24: Detekcja kontroli wewnętrznej *Internal Control (IC)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji VIC (*ABI PRISM 7000 SDS*) z jednoczesną amplifikacją standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)*. NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).



Rys. 25: Detekcja standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji FAM (*ABI PRISM 7700 SDS*). NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).

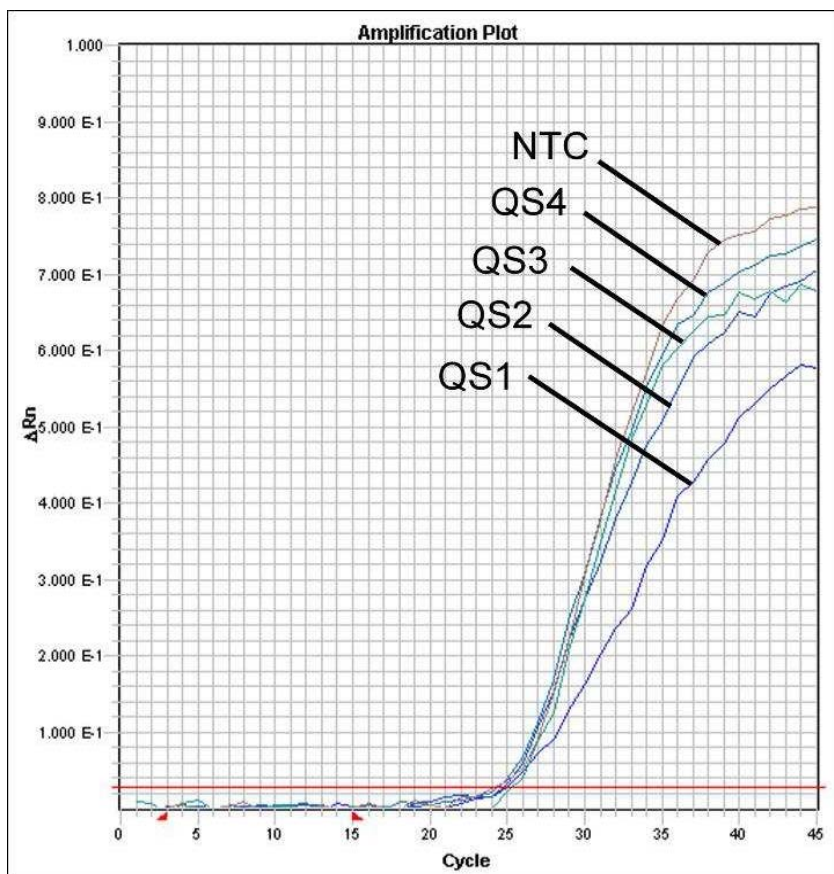


Rys. 26: Detekcja kontroli wewnętrznej *Internal Control (IC)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji VIC (*ABI PRISM 7700 SDS*) z jednoczesną amplifikacją standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)*. NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).



Rys. 27: Detekcja standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji FAM (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).





Rys. 28: Detekcja kontroli wewnętrznej *Internal Control (IC)* w oparciu o pomiar sygnału fluorescencji VIC (*ABI PRISM 7900HT SDS*) z jednoczesną amplifikacją standardów ilościowych *Quantitation Standards (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)*. NTC: non-template control (kontrola negatywna bez matrycy).

## 10. Rozwiązywanie Problemów

### Brak sygnału fluorescencji FAM dla kontroli pozytywnych (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*):

- Wybrany barwnik detekcji do analizy danych PCR nie jest zgodny z protokołem.
  - ➔ W celu analizy danych należy wybrać barwnik detekcji FAM do analitycznego PCR EBV oraz barwnik detekcji VIC do kontroli wewnętrznej *Internal Control* PCR.
- Ustawienia użyte do analizy danych pod *Options (Extension Phase Data Extraction)* nie odpowiadają ustawieniom *Data Collection* (w przypadku *ABI PRISM 7700 SDS* zob. 8.5.2.4 Tworzenie profilu temperaturowego, w przypadku *ABI PRISM 7900HT SDS* zob. 8.5.3.4 Tworzenie profilu temperaturowego).
  - ➔ Należy przeprowadzić analizę reakcji PCR z poprawionymi ustawieniami i powtórzyć analizę danych (*Analysis*).

- Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperaturowego *ABI PRISM Sequence Detection System*.
  - ➔ Należy porównać profil temperaturowy z protokołem (zob. 8.5 Programowanie *ABI PRISM SDS*).
- Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR.
  - ➔ Należy sprawdzić własne kroki pracy w oparciu o schemat pipetowania (zob. 8.4 Przygotowanie reakcji PCR) i powtórzyć PCR, jeśli jest to konieczne.
- Warunki przechowywania jednego lub więcej komponentów zestawu nie są zgodne z instrukcjami podanymi w p. 2. Przechowywanie lub Zestaw *artus EBV TM PCR* przekroczył datę ważności.
  - ➔ Należy sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności odczynników (patrz etykieta zestawu) i użyć nowego zestawu, jeśli niezbędne.

Słaby sygnał lub brak sygnału kontroli wewnętrznej *Internal Control* (sygnał fluorescencyjny VIC) i jednoczesny brak sygnału fluorescencyjnego FAM dla określonego (konkretnego) EBV PCR:

- Warunki PCR nie są zgodne z protokołem.
  - ➔ Należy sprawdzić warunki PCR (patrz powyżej) i powtórzyć PCR ze skorygowanymi ustawieniami, jeśli to niezbędne.
- Reakcja PCR podlegała inhibicji.
  - ➔ Upewnić się, że jest używana zalecana metoda izolacji (patrz p. 8.1 Izolacja DNA) i ściśle postępować według instrukcji producenta.
  - ➔ Upewnić się, że podczas izolacji DNA został wykonany dodatkowy zalecany krok odwirowania przed elucją, żeby usunąć wszelkie pozostałości etanolu (patrz p. 8.1 Izolacja DNA ).
- DNA zostało utracone w trakcie ekstrakcji.
  - ➔ Jeśli do ekstraktu została dodana wewnętrzna kontrola *Internal Control*, to brak sygnału kontroli wewnętrznej *Internal Control* może wskazywać na utratę materiału DNA podczas ekstrakcji. Upewnić się, że jest używana zalecana metoda izolacji (patrz p. 8.1 Izolacja DNA) i ściśle postępować według instrukcji producenta.
- Warunki przechowywania jednego lub więcej komponentów zestawu nie są zgodne z instrukcjami podanymi w p. 2. Przechowywanie lub Zestaw *artus EBV TM PCR* przekroczył datę ważności.
  - ➔ Należy sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności odczynników (patrz etykieta zestawu) i użyć nowy zestaw, jeśli niezbędne.

Sygnal fluorescencyjny FAM analitycznego PCR z negatywnymi kontrolami:

- Nastąpiło zanieczyszczenie podczas przygotowywania PCR.
  - Należy powtórzyć PCR z nowymi odczynnikami w powtórzeniach.
  - Jeśli to możliwe zamknąć probówki PCR bezpośrednio po dodaniu próbki przewidzianej do testowania (badanej).
  - Dokładnie pipetować kontrole pozytywne na końcu.
  - Zadbać, aby przestrzeń robocza i aparaty były dekontaminowane w regularnych odstępach czasu.
- Podczas ekstrakcji pojawiło się zanieczyszczenie.
  - Powtórzyć ekstrakcję i PCR próbki przewidzianej do testowania (badanej) przy użyciu nowych odczynników.
  - Zadbać, aby przestrzeń robocza i aparaty były dekontaminowane w regularnych odstępach czasu.

W przypadku dalszych pytań lub problemów należy skontaktować się z naszym Działem Technicznym.

## 11. Specyfikacje

### 11.1 Czulość analityczna

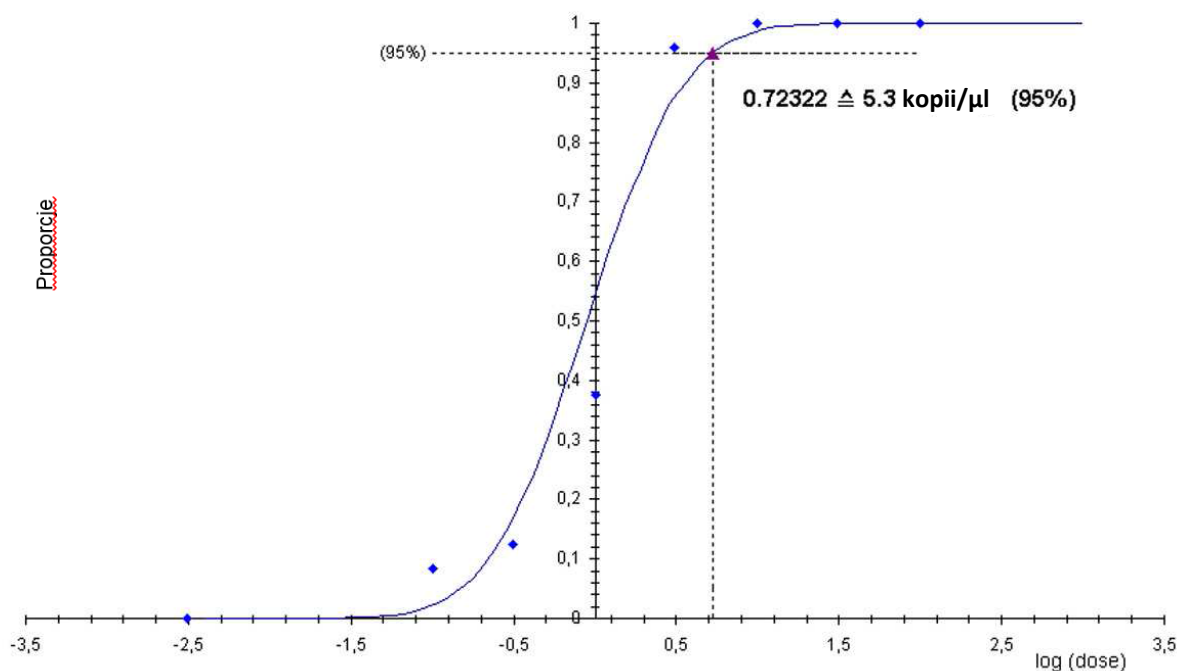
Aby określić czulość analityczną zestawu *artus EBV TM PCR Kit*, przygotowano serię rozcieńczeń standardów od 50 do 0,01 nominalnych ekwiwalentów kopii EBV\*/ $\mu\text{l}$  i analizowano przy użyciu *ABI PRISM 7000*, *7700* oraz *7900HT Sequence Detection Systems* z pomocą Zestawu *artus EBV TM PCR*. Testy aparatów przeprowadzono w 3 różnych dniach z 8 powtórzeniami (replikacjami). Wyniki zostały określone za pomocą analizy probitowej. Graficzną ilustrację analizy probitowej (*ABI PRISM 7000 SDS*) pokazano na rysunku 29.

<b>Granica wykrywalności (p = 0,05)</b>	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	5,3 kopii/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	1,4 kopii/ $\mu\text{l}$
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,7 kopii/ $\mu\text{l}$

Oznacza to, że istnieje prawdopodobieństwo równe 95 % że zostanie wykryte 5,3 kopii/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM 7000 SDS*), 1,4 kopii/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM 7700 SDS*) oraz 0,7 kopii/ $\mu\text{l}$  (*ABI PRISM 7900HT SDS*).

\* Standardem jest sklonowany produkt PCR, którego stężenie zostało określone za pomocą spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej.

## Analiza probitowa: Wirus Epstein-Barr (ABI PRISM 7000 SDS)



Rys. 29: Czulość analityczna zestawu *artus* EBV TM PCR Kit (*ABI PRISM 7000 SDS*).

### 11.2 Specyficzność

Specyficzność zestawu *artus* EBV TM PCR jest zapewniona przede wszystkim przez dobór primerów i sond, a także dobór rygorystycznych warunków reakcji. Primery i sondy zostały sprawdzone za pomocą analizy porównawczej sekwencji pod kątem możliwego występowania homologii do wszystkich sekwencji opublikowanych w bankach genów. Tym samym została zapewniona wykrywalność wszystkich odpowiednich genotypów.

Ponadto swoistość została zvalidowana przy użyciu sześciu różnych próbek osocza z ujemnym EBV. Próbki te nie generowały żadnych sygnałów w obecności primerów specyficznych dla EBV i sond znajdujących się w *EBV RG/TM Master*.

W celu oznaczenia specyficzności Zestawu *artus* EBV TM PCR testowano grupę kontrolną wymienioną w poniższej tabeli (zob. tabela 1) poprzez badanie reakcji krzyżowych. Żaden z testowanych patogenów nie był reaktywny.

**Tabela 1. Testowanie swoistości zestawu z patogenami mogącymi wywołać reakcję krzyżową**

<b>Grupa kontrolna</b>	<b>EBV (FAM)</b>	<b>Internal Control (VIC)</b>
Ludzki wirus opryszczki 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Ludzki wirus opryszczki 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Ludzki wirus opryszczki 3 (varicella-zoster virus)	–	+
Ludzki wirus opryszczki 5 (Cytomegalovirus)	–	+
Wirus leukemii 1 ludzkich komórek T (Human T cell leukemia virus 1)	–	+
Wirus leukemii 2 ludzkich komórek T (Human T cell leukemia virus 2)	–	+

### 11.3 Odtwarzalność

Dane dotyczące odtwarzalności umożliwiają regularną ocenę działania zestawu *artus* EBV TM PCR Kit, jak również porównanie wydajności w odniesieniu do innych produktów. Dane te zostały uzyskiwane przez uczestnictwo w ustalonych programach testowych.

### 11.4 Ocena diagnostyczna

Obecnie Zestaw *artus* EBV TM PCR jest poddawany serii badań i testów.

## 12. Ograniczenia Stosowania Produktu

- Wszystkie odczynniki mogą być wykorzystane wyłącznie w diagnostyce in vitro.
- Produkt ten może być użyty wyłącznie przez personel specjalnie poinstruowany i przeszkolony w procedurach diagnostycznych in vitro.
- Dla uzyskania optymalnych wyników PCR wymagane jest ściśle przestrzeganie instrukcji dla użytkownika.
- Należy zwrócić uwagę na daty przydatności do użycia wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników produktu. Nie należy używać przeterminowanych komponentów.

## 13. Ostrzeżenia i Środki Ostrożności

W celu uzyskania informacji na temat bezpieczeństwa Zestawu *artus* EBV TM PCR, należy zapoznać się z właściwą kartą charakterystyki substancji niebezpiecznych (SDS). Karty SDS są dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).

## 14. Kontrola Jakości

W związku z tym, że firma QIAGEN posiada system zarządzania jakością ISO 9001 oraz certyfikat ISO 13485, każda partia odczynników w Zestawach *artus* EBV TM PCR została przetestowana zgodnie z góry ustalonymi zasadami, by zapewnić stałą jakość produktu.

## 15. Literatura

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

## 16. Objasnienie Symboli



Użyj do



Kod partii



Producent



Numer katalogowy



Numer materiału



Podręcznik



Wyrób medyczny do diagnozy in vitro



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające dla wykonania <N> testów



Globalny Numer Jednostki Handlowej (Global Trade Item Number)



Ograniczenia temperaturowe

**QS**

*Standard do oznaczeń ilościowych*

**IC**

*Kontrola wewnętrzna*

Zestaw *artus* EBV TM PCR

Znaki Towarowe i Wyłączenia

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

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe etc. użyte w niniejszym dokumencie nie mogą być uważane jako niechronione prawem, nawet jeśli nie zostało to wyraźnie zaznaczone.

Zestawy *artus* EBV TM PCR Kit, stacja robocza BioRobot EZ1 Workstation oraz zestaw EZ1 DSP Virus Kit i Cardt są zestawami diagnostycznymi oznakowanymi znakiem CE zgodnie z Europejską dyrektywą 98/79/EC dotyczącą diagnostyki in vitro (European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC). Dostępne nie we wszystkich krajach.

Zestawy QIAamp Kits są przeznaczone do ogólnego użytku laboratoryjnego. Żadne informacje ani oświadczenia nie odnoszą się do procedur diagnostycznych, prewencyjnych, terapii lub chorób.

Zakup Zestawów *artus* PCR wiąże się z zaakceptowaniem ograniczonej licencji do ich użytkowania w procedurach PCR (polymerase chain reaction) przy diagnostyce ludzkiej i weterynaryjnej in vitro w powiązaniu z termocyklerem, którego użytkowanie do automatycznego procesu PCR jest objęte opłatą licencyjną należną firmie Applied Biosystems lub zgodnie z warunkami zakupu aparatu. Procedura PCR jest objęta międzynarodowymi patentami odpowiadającymi U.S. Patents o numerach 5.219.727 oraz 5.322.770 oraz 5.210.015 oraz 5.176.995 oraz 6.040.166 oraz 6.197.563 oraz 5.994.056 oraz 6.171.785 oraz 5.487.972 oraz 5.804.375 oraz 5.407.800 oraz 5.310.652 oraz 5.994.056 będącymi własnością *F. Hoffmann-La Roche Ltd.*

© 2015 QIAGEN, wszystkie prawa zastrzeżone.

---

**www.qiagen.com**

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

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

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

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

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

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

