

ноември 2019 г.

Наръчник към набора *artus*[®] EBV RG PCR Kit



24 (каталожен № 4501263)

96 (каталожен № 4501265)

Версия 2

Количествена ин витро диагностика
За употреба с апаратите Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF

4501263, 4501265



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1 **MAT**

1119829BG

Съдържание

| | |
|---|-----------|
| Предназначение | 3 |
| Кратко изложение и обяснение | 3 |
| Информация за патогените | 4 |
| Принципи на процедурата | 4 |
| Предоставени материали | 5 |
| Съдържание на набора | 5 |
| Необходими, но непредоставени материали | 6 |
| Предупреждения и предпазни мерки | 7 |
| Общи предпазни мерки | 7 |
| Съхранение и работа с реагенти..... | 8 |
| Процедура | 8 |
| Изолиране на ДНК | 8 |
| Вътрешна контрола | 13 |
| Протокол: PCR | 15 |
| Изпълнение на анализ за валидност | 21 |
| Интерпретиране на резултатите | 23 |
| Количествено определяне | 23 |
| Обобщение | 24 |
| Ръководство за отстраняване на проблеми | 25 |
| Контрол на качеството | 27 |
| Ограничения..... | 27 |
| Символи | 28 |
| Информация за контакт | 29 |
| Информация за поръчка | 30 |
| Хронология на редакциите на документа | 34 |

Предназначение

artus EBV RG PCR Kit представлява ин витро тест за амплификация на нуклеинови киселини за количественото определяне на ДНК на вируса на Епщайн-Бар (Epstein-Barr Virus, EBV) в човешка плазма, серум, гръбначно-мозъчна течност (ГМТ) или кръвни клетки. Този диагностичен тестов набор използва полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) и е конфигуриран за употреба с апарати Rotor-Gene Q.

Кратко изложение и обяснение

Наборът *artus* EBV RG PCR Kit представлява готова за използване система за откриването на ДНК на EBV чрез полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) на апарати Rotor-Gene Q. EBV RG Master съдържа реагенти и ензими за специфичната амплификация на регион от 97 bp от генома на EBV и за директното откриване на специфичния ампликон във флуоресцентен канал Cycling Green на Rotor-Gene Q MDx.

Освен това *artus* EBV RG PCR Kit съдържа втора хетерологична амплификационна система за установяване на евентуално инхибиране на PCR. Това се открива като вътрешна контрола (Internal Control, IC) във флуоресцентен канал Cycling Yellow на Rotor-Gene Q MDx. Аналитичната граница на откриване на EBV с PCR (вижте „**Error! Reference source not found.**“) не се редуцира. Доставят се външни положителни контроли (EBV RG QS 1–4), които позволяват определянето на количеството вирусна ДНК. За повече информация вижте „Количествено определяне“.

Информация за патогените

Вирусът на Епщайн-Бар (Epstein-Barr Virus, EBV) се предава орално, предимно чрез заразена слюнка. По принцип заразяването с EBV – особено в детството – е асимптоматично. Клиничният признак за остра инфекция е инфекциозна мононуклеоза, свързана с висока температура, отпадналост и ангина, както и възпаление на лимфните възли и далака. При някои пациенти тези симптоми хронично се появяват отново. Тежки форми на инфекция с EBV се наблюдават при пациенти с имунна недостатъчност и Т-клетъчни дефекти.


Принципи на процедурата

Откриването на патогени чрез полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) се основава на амплификацията на специфични региони от генома на патогена. В реално време амплифицираният с PCR продукт се открива с флуоресцентни оцветители. Те обикновено са свързани с олигонуклеотидни сонди, които се свързват специфично с амплифицирания продукт. Следенето на интензитетите на флуоресценцията по време на PCR (т. е. в реално време) позволява откриване и количествено определяне на натрупвания се продукт, без да бъде необходимо реакционните епруветки да се отварят отново след приключването на PCR.*

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 10, 190.

Предоставени материали

Съдържание на набора

| <i>artus</i> EBV RG PCR Kit | | (24) | (96) |
|-----------------------------|---|---|-------------------|
| Каталожен № | | 4501263 | 4501265 |
| Брой реакции | | 24 | 96 |
| Син | EBV RG Master* | 2 × 12 реакции | 8 × 12 реакции |
| Червен | EBV RG QS 1 [†] (5 × 10 ⁴ копия/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Червен | EBV RG QS 2 [†] (5 × 10 ³ копия/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Червен | EBV RG QS 3 [†] (5 × 10 ² копия/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Червен | EBV RG QS 4 [†] (5 × 10 ¹ копия/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Зелен | EBV RG IC ‡ | IC 1000 μl | 2 × 1000 μl |
| Бял | Вода (с качество за PCR) | 1000 μl | 1000 μl |
| | Наръчник |  1 | 1 |

* Съдържа 1,2,4-triazole. Вижте „Предупреждения и предпазни мерки“ за информация за безопасността.

† Стандарт за количествено определяне.

‡ Вътрешна контрола.

Необходими, но непредоставени материали

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheets, SDS), които можете да намерите при доставчика на продукта.

Реагенти

- Набор за изолиране на ДНК (вижте „Изолиране на ДНК“)

Консумативи

- Стерилни връхчета за пипети с филтри
- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, за използване със 72-well rotor (каталожен № 981103 или 981106)
- **Или:** PCR Tubes, 0,2 ml, за използване с 36-well rotor (каталожен № 981005 или 981008)

Оборудване

- Пипети (регулируеми)*
- Бъркалка†
- Настолна центрофуга† с ротор за 2-ml реакционни епруветки
- Апарат Rotor-Gene Q MDx с флуоресцентни канали за Cycling Green и Cycling †
- Софтуер за Rotor-Gene Q версия 2.3
- Блок за охлаждане (Loading Block 72 × 0,1 ml Tubes, каталожен № 9018901 или Loading Block 96 × 0,2 ml Tubes, каталожен № 9018905)

* Апаратите задължително трябва да се проверяват и калибрират по препоръките на производителя.

† В някои страни, ако е приложимо, може да се използва апаратът Rotor-Gene Q 5plex HRM с дата на производство от май 2011 г. нататък. Датата на производство може да се разбере от серийния номер на гърба на апарата. Серийният номер е във формат „mmuupnn“, където „mm“ указва месеца на производство с цифри, „уу“ указва последните две цифри от годината на производство, а „nnn“ указва уникалния идентификатор на апарата.

Предупреждения и предпазни мерки

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор и компонент от набор QIAGEN®.

Изхвърляйте отпадъците от аликвотните части и анализите съгласно местните разпоредби за безопасност.

EBV RG Master



Съдържа: 1,2,4-triazole. Внимание! Предполага се, че уврежда оплодителната способност или плода. Използвайте предпазни ръкавици/ предпазно облекло/ предпазни очила/ предпазна маска за лице.

Общи предпазни мерки

Потребителят трябва винаги да обръща особено внимание на следното:

- Използвайте стерилни връхчета за пипети с филтри.
- Съхранявайте и изтегляйте положителни материали (проби, положителни контроли и ампликони) отделно от всички други реактиви и ги прибавяйте към реакционната смес в пространствено обособено съоръжение.
- Размразете добре всички компоненти при стайна температура (15–25 °C), преди да започнете анализа.
- По време на размразяването разбъркайте компонентите (с неколккратно пипетиране навътре и навън или с бъркалка на импулси) и центрофугирайте кратко време.
- Работете бързо и дръжте компонентите на лед или в блока за охлаждане (блок за зареждане със 72/96 ямки).

Съхранение и работа с реагенти

Компонентите на набора *artus* EBV RG PCR Kit трябва да се съхраняват при температура от $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и остават стабилни до датата на изтичане на срока на годност, посочена на етикета. Неколкократно размразяване и замразяване (повече от 2 пъти) трябва да се избягва, защото може да понижи чувствителността на анализа. Ако реактивите не се използват редовно, те трябва да се замразяват на аликвоти. Съхранението при температура между $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не трябва да бъде по-дълго от 5 часа.

Процедура

Изолиране на ДНК

Наборите от QIAGEN, изброени в таблица 1, са валидирани за пречистване на вирусна ДНК от посочените видове човешки аликвотни части за употреба с набора *artus* EBV RG PCR Kit. Пречистването на вирусна ДНК трябва да се извършва по инструкциите в наръчниците към комплектите.

Таблица 1. Набори за пречистване, валидирани за употреба с набора *artus* EBV RG PCR Kit

| Материал в аликвотната част | Размер на аликвотната част | Набор за изолиране на нуклеинови киселини | Каталожен № (QIAGEN) | Носеща РНК |
|--|----------------------------|--|----------------------|--------------|
| Серум, плазма, гръбначно-мозъчна течност (ГМТ) | 200 μl | QIAamp [®] DNA Mini Kit (50) | 51304 | Не е включен |
| Серум, плазма | 1 ml | QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50) | 53704 | Включен |
| Кръвни клетки | 200 μl | QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) | 51104 | Не е включен |
| Плазма | 400 μl | EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)* | 62724 | Включен |

* EZ1 DSP Virus Kit се предлага и като маркирани със CE-IVD набори EASY*artus*[®] EBV RG PCR Kit заедно с набора *artus* EBV RG PCR Kit (вижте „Информация за поръчка“).

Забележка: Епруветки за вземане на кръв, покрити с антикоагуланти, може да инхибират PCR. Тези инхибитори обаче ще бъдат отстранени, когато се използват изброените по-горе комплекти за изолиране. Препоръчваме да се избягва употребата на хепаринизирана кръв.

Забележка: Наборът artus EBV RG PCR Kit не трябва да се използва с методи за изолиране на фенолова основа.

Използване на QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp DNA Mini Kit

Забележка: Употребата на носеща РНК е задължителна за ефективното извличане и съответно за полученото количество ДНК/РНК. Имайте предвид, че прибавянето на Carrier (RNA Homopolymer Poly[rA], не е включен в QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp DNA Mini Kit) се препоръчва силно за извличането на нуклеинови киселини от несъдържащи клетки телесни течности и материал с малки количества ДНК и РНК (например ГМТ). В такива случаи пригответе носещата РНК по следния начин:

1. Ресуспендирайте лиофилизирана носеща РНК (RNA Homopolymer Poly[rA], не е включен в QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp DNA Mini Kit) с буфера за елуиране (не използвайте буфер за лизиране) от набора за извличане (Buffer AE от QIAamp DNA Mini Kit и QIAamp DNA Blood Mini Kit) и пригответе разтвор с концентрация 1 µg/µl.
2. Разпределете разтвора носеща РНК на достатъчен за Вашите нужди брой аликвоти и ги съхранявайте при температура от –15 °C до –30 °C. Избягвайте неколккратно размразяване (повече от 2 пъти) на един аликвот с носеща РНК.
3. Използвайте 1 µg носеща РНК на 100 µl буфер за лизиране. Например, ако по протокола за извличане се използва 200 µl буфер за лизиране, прибавете 2 µl носеща РНК (1 µg/µl) директно в буфера за лизиране (Buffer AL от QIAamp DNA Mini Kit и QIAamp DNA Blood Mini Kit). Преди започването на всяко извличане, смес от буфер за лизиране и носеща РНК (и вътрешна контрола, където е необходимо – вижте „Вътрешна контрола“) трябва да се приготви по схемата за пипетиране в таблица 2.

Таблица 2. Схема за пипетиране за използване с QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp DNA Mini Kit

| Брой на аликвотните части | 1 | 12 |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| Buffer AL (буфер за лизиране)* | например 200 µl | например 2400 µl |
| Носеща РНК (1 µg/µl) | 2 µl | 24 µl |
| Общ обем | 202 µl | 2424 µl |
| Обем на едно извличане | 200 µl | по 200 µl |

* Съдържа гуанидин хидрохлорид; информация за безопасност ще намерите в наръчника към набора.

Забележка: Използвайте пряната приготвена смес от буфер за лизиране и носеща РНК незабавно за извличане. Сместа не може да се съхранява.

Забележка: Вътрешната контрола на набора artus EBV RG PCR Kit може да се използва директно в процедурата за изолиране (вижте „Вътрешна контрола“).

Забележка: Силно препоръчваме да се извърши центрофугирането на стъпка 10 от протокола (*Наръчник към QIAamp DNA Mini и Blood Mini*, пето издание, май 2016 г., страница 28 и 31), за да се отстранят всички евентуални остатъци от етанол. Препоръчваме времето за това центрофугиране да се увеличи на 3 минути.

Препоръчваме ДНК да се елуира в 50 µl буфер за елуиране, за да се постигне възможно най-високата чувствителност на набора artus EBV RG PCR Kit.

Използване на QIAamp UltraSens Virus Kit

Забележка: Употребата на носеща РНК е задължителна за ефективното извличане и съответно за полученото количество ДНК/РНК. За да се повиши стабилността на носещата РНК, доставена с QIAamp UltraSens Virus Kit, препоръчваме следващата процедура, която се различава от инструкциите в наръчника към комплекта.

1. Преди първата употреба на комплекта, ресуспендирайте лиофилизираната носеща РНК в 310 µl от буфера за елуиране (Buffer AVE), доставен с комплекта (за окончателна концентрация 1 µg/µl, не използвайте буфер за лизиране).
2. Разпределете разтвора носеща РНК на достатъчен за Вашите нужди брой аликвоти и ги съхранявайте при температура от –15 °C до –30 °C. Избягвайте неколккратно размразяване (повече от 2 пъти) на един аликвот с носеща РНК.
3. Преди започването на всяко извличане, смес от буфер за лизиране и носеща РНК (и вътрешна контрола, където е необходимо – вижте „Вътрешна контрола“) трябва да се приготви по схемата за пипетиране в таблица 3.

Таблица 3. Схеми за пипетиране за използване с QIAamp UltraSens Virus Kit

| Брой на аликвотните части | 1 | 12 |
|--------------------------------|----------|-----------|
| Buffer AC (буфер за лизиране)* | 800 µl | 9600 µl |
| Носеща РНК (1 µg/µl) | 5,6 µl | 67,2 µl |
| Общ обем | 805,6 µl | 9667,2 µl |
| Обем на едно извличане | 800 µl | по 800 µl |

*Съдържа изопропанол; информация за безопасност ще намерите в наръчника към набора.

Забележка: Използвайте прясната приготвена смес от буфер за лизиране и носеща РНК незабавно за извличане. Сместа не може да се съхранява.

Забележка: Вътрешната контрола на набора artus EBV RG PCR Kit може да се използва директно в процедурата за изолиране (вижте „Вътрешна контрола“).

Забележка: Силно препоръчваме да се извърши допълнителното центрофугиране, описано на стъпка 14 от протокола (*Наръчник към QIAamp UltraSens Virus*, юни 2012 г., страница 15), за да се отстранят всички евентуални остатъци от етанол. Препоръчваме времето за това центрофугиране да се увеличи на 3 минути.

Препоръчваме ДНК да се елуира в 50 µl буфер за елуиране, за да се постигне възможно най-високата чувствителност на набора artus EBV RG PCR Kit.

QIAamp UltraSens Virus Kit позволява концентриране на аликвотни части. Ако използвате в аликвотната част материал, различен от серум или плазма, прибавете поне 50% (по обем) отрицателна човешка плазма към пробата.

Използване на EZ1 DSP Virus Kit

Забележка: Употребата на носеща РНК е задължителна за ефективно извличане и съответно за полученото количество ДНК/РНК. Прибавете съответното количество носеща РНК при всяко извличане по инструкциите в наръчника към набора EZ1 DSP Virus Kit.

Забележка: Вътрешната контрола на набора artus EBV RG PCR Kit може да се използва директно в процедурата за изолиране (вижте „Вътрешна контрола“).

Забележка: Силно препоръчваме пречистените вирусни нуклеинови киселини да се използват за PCR незабавно след извличането с EZ1 DSP Virus Kit. Друга възможност е елуатите да се съхраняват до 3 дни при 4 °C преди анализ с PCR.

Вътрешна контрола

Доставена е вътрешна контрола (EBV RG IC). Това позволява на потребителя да контролира процедурата за изолиране на ДНК и да проверява за евентуално инхибиране на PCR. Когато EZ1 DSP Virus Kit се използва за извличане, вътрешната контрола трябва да се прибави по инструкциите в *Наръчника към EZ1 DSP Virus Kit*. Когато се използва QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp DNA Mini Kit, вътрешната контрола трябва да се прибави при изолирането в съотношение 0,1 µl на 1 µl обем за елуиране. Например, когато се използва QIAamp UltraSens Virus Kit, ДНК се елуира в 50 µl Buffer AVE. Затова първоначално трябва да се прибавят 5 µl от вътрешната контрола. Количеството на използваната вътрешна контрола зависи само от обема за елуиране.

Забележка: Вътрешната контрола и носещата РНК (вижте „Изолиране на ДНК“) трябва да се прибавят само към сместа от буфер за лизиране и материал в аликвотната част или директно към буфера за лизиране.

Вътрешната контрола не трябва да се прибавя директно към материала в аликвотната част. При прибавяне към буфера за лизиране имайте предвид, че сместа от вътрешна контрола и буфер за лизиране–носеца РНК трябва да се приготвя и използва незабавно.

Важно: Съхраняване на сместа при стайна температура или в хладилник дори само няколко часа може да направи вътрешната контрола негодна и да намали ефективността на извличането.

Забележка: Не прибавяйте вътрешната контрола и носеща РНК директно към материала в аликвотната част.

Вътрешната контрола може да се използва евентуално и за проверка за инхибиране на PCR. За целта вътрешната контрола се прибавя директно към EBV RG Master, както е описано на стъпка 2b от Протокол: PCR.

Сигналът от вътрешната контрола се използва като контрол за валидност, само когато не е получен зелен сигнал – вижте Протокол: PCR и Изпълнение на анализ за валидност.

Протокол: PCR

Важни моменти преди започване

- Отделете време да се запознаете с апарата Rotor-Gene Q, преди да започнете протокола. Прочетете ръководството за потребителя на апарата.
- Задължително включете поне един стандарт за количествено определяне и една отрицателна контрола (вода с качество за PCR) във всяка PCR. За да генерирате стандартна крива, използвайте и 4-те доставени стандарта за количествено определяне (EBV RG QS 1–4) за всяка PCR.

Какво трябва да направите, преди да започнете

- Блокът за охлаждане (от принадлежностите на апарата Rotor-Gene Q) задължително трябва да се охлади предварително до 2–8 °C.
- Преди всяка употреба всички реактиви трябва да се размразят напълно, да се разбъркат (с неколккратно пипетиране навътре и навън или с бързо разбъркване) и да се центрофугират за кратко време.

Процедура

1. Поставете необходимия брой епруветки за PCR в адаптерите на блока за охлаждане.
2. Ако използвате вътрешната контрола, за да следите процедурата за изолиране на ДНК и да проверявате за евентуално инхибиране на PCR, изпълнете стъпка 2a. Ако използвате вътрешната контрола само за проверка за инхибиране на PCR, изпълнете стъпка 2b.
 - 2a. Вътрешната контрола вече е прибавена за изолирането (вижте „Вътрешна контрола“ на страница 13). В този случай пригответе основна смес по таблица 4.
Забележка: Реакционната смес обикновено съдържа всички компоненти, необходими за PCR, освен аликвотната част.

Таблица 4. Приготвяне на основна смес (вътрешната контрола се използва за следене на изолирането на ДНК и проверка за инхибиране на PCR)

| Брой на аликвотните части | 1 | 12 |
|---------------------------|-------|--------|
| EBV RG Master | 30 µl | 360 µl |
| EBV RG IC | 0 µl | 0 µl |
| Общ обем | 30 µl | 360 µl |

2b. Вътрешната контрола трябва да се прибави директно към сместа от EBV RG Master. В този случай пригответе основна смес по таблица 5.

Реакционната смес обикновено съдържа всички компоненти, необходими за PCR, освен аликвотната част.

Таблица 5. Приготвяне на основна смес (вътрешната контрола се използва само за проверка за инхибиране на PCR)

| Брой на аликвотните части | 1 | 12 |
|---------------------------|--------|---------|
| EBV RG Master | 30 µl | 360 µl |
| EBV RG IC | 2 µl | 24 µl |
| Общ обем | 32 µl* | 384 µl* |

* Увеличаването на обема поради прибавянето на вътрешната контрола се пренебрегва при подготовката на анализа за PCR. Това не влошава чувствителността на системата за откриване.

3. Пипетирайте 30 µl от основната смес във всяка епруветка за PCR. След това прибавете 20 µl от елуираната ДНК от аликвотната част (вижте таблица 6). Съответно 20 µl от поне един стандарт за количествено определяне (EBV RG QS 1–4) трябва да се използва като положителна контрола и 20 µl вода (с качество за PCR) – като отрицателна контрола.

Таблица 6. Приготвяне на основна смес (вътрешната контрола се използва само за проверка за инхибиране на PCR)

| Брой на аликвотните части | 1 | 12 |
|---------------------------|-------|----------|
| Основна смес | 30 µl | по 30 µl |
| Аликвотна част | 20 µl | по 20 µl |
| Общ обем | 50 µl | по 50 µl |

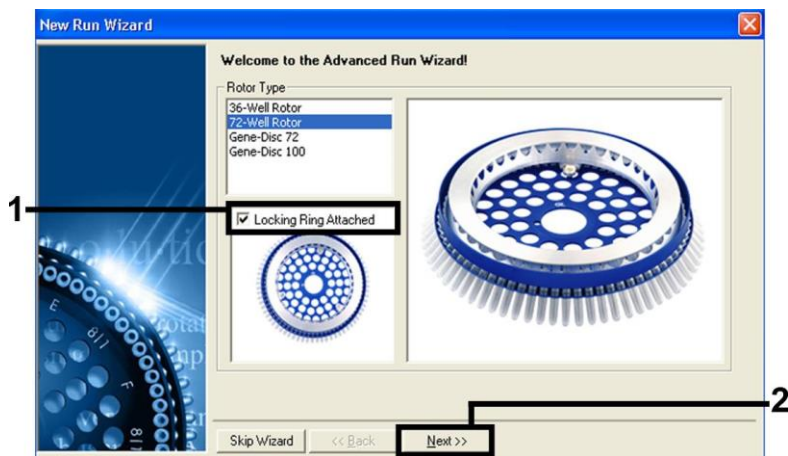
- Затворете епруветките за PCR. Фиксиращият пръстен (от принадлежностите на апарата Rotor-Gene) задължително трябва да се постави върху ротора, за да се предотврати инцидентно отваряне на епруветките по време на изпълнението.
- За откриването на ДНК на EBV създайте температурен профил по следващите стъпки.

| | |
|--|----------------|
| Задаване на общите параметри на анализа | Фигури 1, 2, 3 |
| Първоначално активиране на ензима за горещ старт | Фигура 4 |
| Амплификация на ДНК (тъчдаун PCR (touchdown PCR)) | Фигура 5 |
| Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал | Фигура 6 |
| Стартиране на изпълнението | Фигура 7 |

Забележка: Всички спецификации са за софтуера за Rotor-Gene Q версия 2.3.

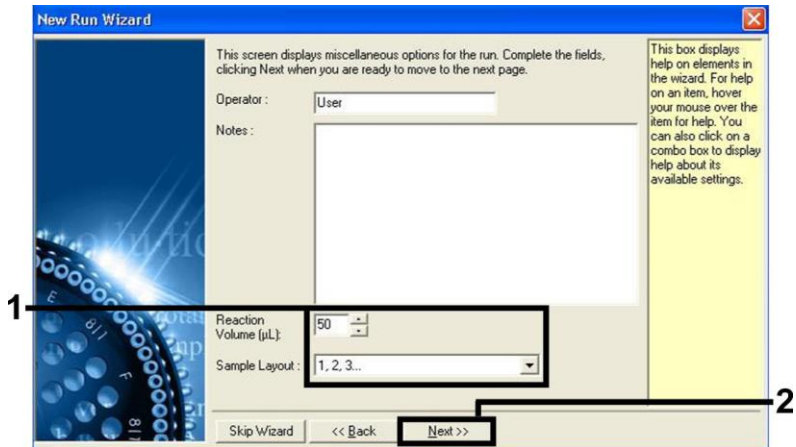
Допълнителна информация за програмирането на апаратите Rotor-Gene ще намерите в ръководството за потребителя на апарата. На илюстрациите тези настройки са оградени с черни рамки. Дадени са илюстрации за апаратите Rotor-Gene Q.

- Отворете диалоговия прозорец „New Run Wizard (Съветник за ново изпълнение)“ (фигура 1). Поставете отметка в квадратчето **Locking Ring Attached** (Поставен фиксиращ пръстен) и щракнете върху **Next** (Напред).



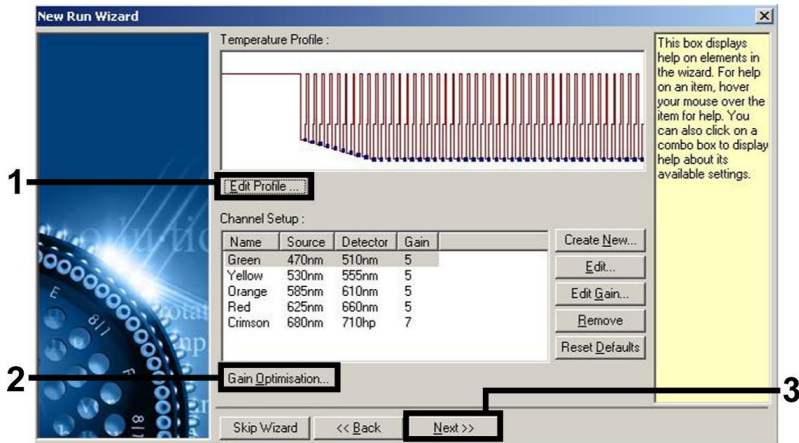
Фигура 1. Диалоговият прозорец „New Run Wizard“ (Съветник за ново изпълнение).

7. Изберете 50 за реакционния обем на PCR и щракнете върху **Next** (Напред) (фигура 2).

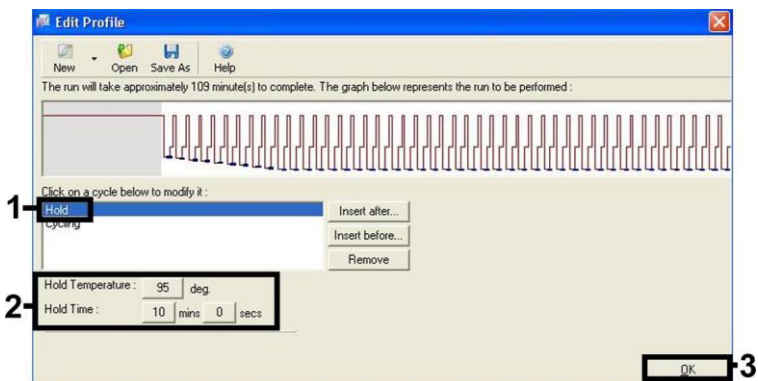


Фигура 2. Задаване на общите параметри на анализа.

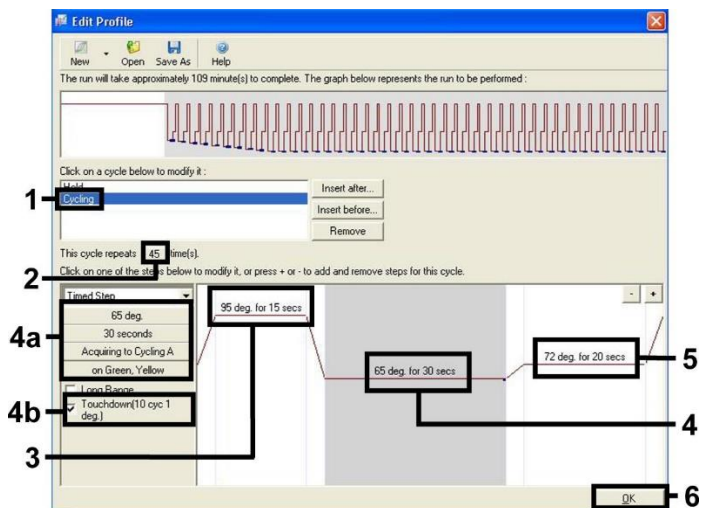
8. Щракнете върху бутона Edit Profile (Промяна на профил) в следващия диалогов прозорец „New Run Wizard (Съветник за ново изпълнение)“ (фигура 3) и програмирайте температурния профил, както е показано на фигура 3 до фигура 5.



Фигура 3. Промяна на профила.



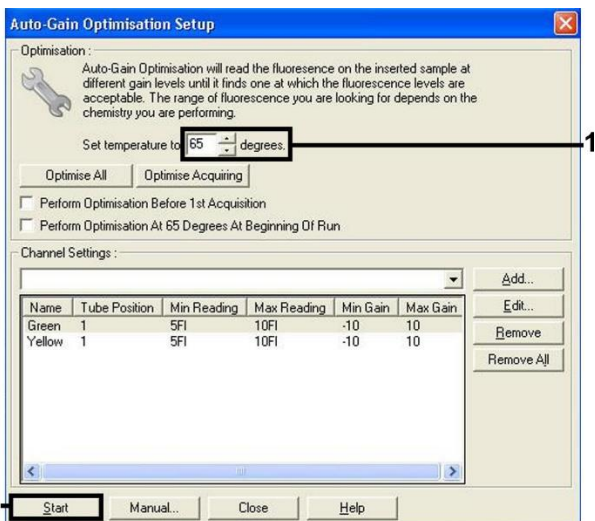
Фигура 4. Първоначално активиране на ензима за горещ старт.



Фигура 5. Амплификация на ДНК. Задължително активирайте функцията за тъчдаун за 10 цикъла на стъпката за топлинна обработка.

9. Определете диапазона на откриването на флуоресцентните канали според интензитетите на флуоресценцията в епруветките за PCR. Щракнете върху **Gain Optimisation** (Оптимизиране на усилването) в диалоговия прозорец „New Run Wizard (Съветник за ново изпълнение)“ (вижте фигура 3), за да отворите диалоговия прозорец „Auto-Gain Optimisation Setup (Настройка на оптимизирането на автоматичното усилване)“. Задайте температурата за калибриране на **65**,

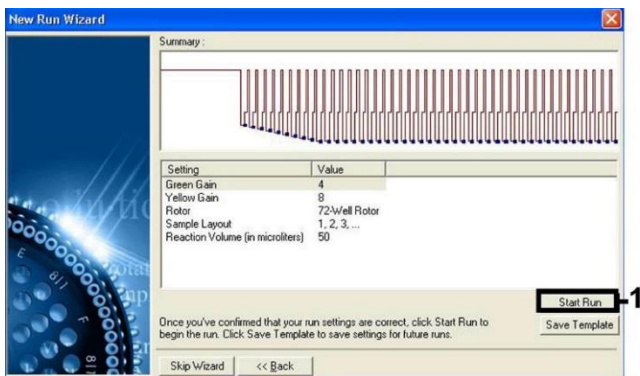
за да съответства на температурата на топлинната обработка на програмата за амплификация (фигура 6).



Фигура 6. Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал.

10. Щракнете върху „Start Run (Стартиране на изпълнението)“.

Забележка: Стойностите за усилването, определени от калибрирането на канала, се записват автоматично и се изброяват в прозореца с последното меню от процедурата за програмиране (фигура 7).

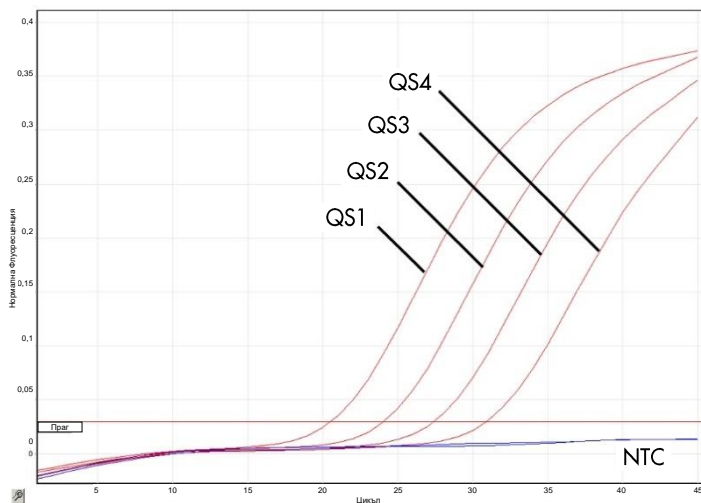


Фигура 7. Стартиране на изпълнението.

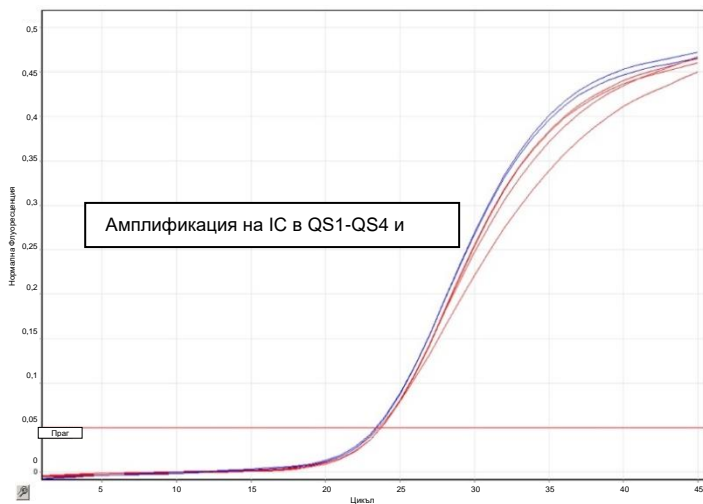
Изпълнение на анализ за валидност

1. След приключването на изпълнението анализирайте контролите.

Примери за амплификация на положителни и отрицателни контроли в каналите *Cycling Green* и *Cycling Yellow* при добавяне на IC са дадени на фигура 8 и фигура 9.



Фигура 8. Откриване на стандартите за количествено определяне (EBV RG QS 1–4) във флуоресцентен канал *Cycling Green*. NTC: Няма еталонна контрола (отрицателна контрола).



Фигура 9. Откриване на вътрешната контрола (internal control, IC) в QS1-QS4 и NTC във флуоресцентен канал Cycling Yellow NTC: Няма еталонна контрола (отрицателна контрола).

- **Положителни контроли:** изпълнението е валидно, ако е открит сигнал във флуоресцентен канал Cycling Green във всички стандарти за количествено определяне (EBV RG QS 1–4).
Забележка: в канал Cycling Green не се анализира амплификация на стандарти за количествено определяне (EBV RG QS 1–4).
- **Отрицателна контрола (вода, с качество за PCR):**
 - При подготовка на основна смес без IC изпълнението е валидно, ако не е открит сигнал в канал Cycling Green и не е открит сигнал или е открит сигнал ≥ 34 Ct в канала Cycling Yellow на „Няма еталонна контрола без IC“ (NTC-IC).
 - При подготовка на основна смес с IC изпълнението е валидно, ако не е открит сигнал в канал Cycling Green и е открит сигнал < 34 Ct в канала Cycling Yellow на „Няма еталонна контрола с IC“ (NTC+IC).
Информация за източниците на грешки и съответните решения можете да намерите в „Ръководство за отстраняване на проблеми“.

Интерпретиране на резултатите

Количествено определяне

Приложените стандарти за количествено определяне (EBV RG QS 1–4) се третират като предварително пречистени аликвотни части и се използва същият обем (20 µl). За да се генерира стандартна крива на апарати Rotor-Gene Q, и 4-те стандарта за количествено определяне трябва да се използват и да се определят в диалоговия прозорец „Edit Samples“ (Промяна на аликвотни части) като стандарти с посочените концентрации (вижте ръководството за потребителя на апарата).

Забележка: Стандартите за количествено определяне се определят като копия/µl. За да се преобразуват стойностите, определени от стандартната крива, в копия/ml от материала в аликвотната част, трябва да се използва следното уравнение:

$$\text{Резултатът (копия/ml)} = \frac{\text{Резултатът (копия/µl)} \times \text{обема за елуиране (µl)}}{\text{Обемът на аликвотната част (ml)}}$$

По принцип първоначалният обем на аликвотната част трябва да се въведе в горното уравнение. Това трябва да се съобрази, когато обемът на аликвотната част се е променил преди извличането на нуклеинови киселини (например обемът е намалял при центрофугиране или се е увеличил при прибавяне към необходимия обем за изолирането).

Обобщение

Открит е сигнал във флуоресцентен канал Cycling Green. Резултатът от анализа е положителен: аликвотната част съдържа ДНК на EBV.

В този случай откриването на сигнал в канала Cycling Yellow може да се пренебрегне, тъй като високи начални концентрации на ДНК на EBV (положителен сигнал в канала Cycling Green) могат да доведат до понижен или липсващ флуоресцентен сигнал от вътрешната контрола в канала Cycling Yellow (конкуренция).

Не е открит сигнал във флуоресцентен канал Cycling Green. В същото време в канала Cycling Yellow се появява сигнал < 34 Ct от вътрешната контрола. В аликвотната част не може да се открие ДНК на EBV. Тя може да се счита за отрицателна.

При отрицателен резултат за EBV от PCR откритият сигнал от вътрешната контрола изключва възможността за инхибиране на PCR.

Не е открит сигнал в канала Cycling Green и не е открит сигнал или е открит сигнал ≥ 34 Ct в каналите Cycling Yellow. Резултат не може да се определи еднозначно.

Информация за източниците на грешки и съответните решения можете да намерите в раздела „Ръководство за отстраняване на проблеми“.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Frequently Asked Questions (Често задавани въпроси)“ в нашия Център за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените в „Техническо обслужване“ на QIAGEN винаги с готовност ще отговорят на всички Ваши въпроси – както за информацията и протоколите в този наръчник, така и за технологиите за аликвотни части и анализи (за информация за контакт вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

Няма сигнал с положителни контроли (EBV RG QS 1–4) във флуоресцентен канал Cycling Green

- | | |
|---|---|
| а) Избраният флуоресцентен канал за анализ на данните от PCR не е в съответствие с протокола | За анализ на данните изберете флуоресцентния канал Cycling Green за аналитичната PCR за EBV и флуоресцентния канал Cycling Yellow за PCR за вътрешната контрола. |
| б) Неправилно програмиране на температурния профил на апарата Rotor-Gene | Сравнете температурния профил с протокола. Вижте „Протокол: PCR“ на страница 15. |
| в) Неправилно конфигуриране на PCR | Проверете своите работни стъпки по схемата за пипетиране и повторете PCR, ако е необходимо. Вижте „Протокол: PCR“ на страница 15. |
| г) Условието на съхранение за един или повече от компонентите на набора не съответстват на инструкциите в „Съхранение и работа с реагенти“ (страница 8) | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |
| д) Срокът на годност на <i>artus</i> EBV RG PCR Kit е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |

Коментари и предложения

Слаб или липсващ сигнал от вътрешната контрола във флуоресцентен канал **Cycling Yellow** и същевременно липса на сигнал в канал **Cycling Green**

- | | | |
|----|--|---|
| а) | Условията на PCR не съответстват на протокола | Проверете условията на PCR (вижте по-горе) и повторете PCR с коригирани настройки, ако е необходимо. |
| б) | PCR е инхибирана | Задължително използвайте препоръчителния метод за изолиране и спазвайте точно инструкциите на производителя. Когато използвате QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit или QIAamp UltraSens Virus Kit, задължително изпълнете препоръчителната стъпка за допълнително центрофугиране по време на изолирането на ДНК преди елуирането, за да се отстранят всички евентуални остатъци от етанол (вижте „Изолиране на ДНК“ на страница 8). |
| в) | ДНК е изгубена по време на извличането | Ако вътрешната контрола е била прибавена при извличането, липсващ сигнал от вътрешната контрола може да означава загуба на ДНК по време на извличането. Задължително използвайте препоръчителния метод за изолиране (вижте „Изолиране на ДНК“ на страница 8) и спазвайте точно инструкциите на производителя. |
| г) | Условията на съхранение за един или повече от компонентите на набора не съответстват на инструкциите в „Съхранение и работа с реагенти“ (страница 8) | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |
| д) | Срокът на годност на <i>artus</i> EBV RG PCR Kit е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |

Сигнали с отрицателните контроли във флуоресцентен канал **Cycling Green** на аналитичната PCR

- | | | |
|----|---|--|
| а) | Замърсяване по време на подготовката на PCR | Повторете PCR с нови реактиви на повторения. Ако е възможно, затваряйте епруветките за PCR незабавно след прибавянето на аликвотната част за тестване. Задължително пипетирайте положителните контроли последни. Задължително деконтаминирайте редовно работното място и апаратите. |
| б) | Замърсяване по време на извличането | Повторете с нови реактиви извличането и PCR на аликвотната част за тестване. Задължително деконтаминирайте редовно работното място и апаратите. |

Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната по ISO Система за управление на качеството на QIAGEN всяка производствена партида на *artus* EBV RG PCR Kit се тества по предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на продуктите.

Ограничения

Всички реактиви могат да се използват само за ин витро диагностика.

Продуктът може да се използва само от персонал, който е специално инструктиран и обучен по процедурите за ин витро диагностика.

За получаването на оптимални резултати от PCR е необходимо строго спазване на ръководството за потребителя.

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност.

Макар и рядко, мутации в силно консервираните региони на вирусния геном, използвани от праймерите и/или сондата в комплекта, могат да доведат до занижено количествено определяне или неоткриване на присъствието на вируса в тези случаи. Валидността и работните характеристики на конфигурацията на анализа се проверяват редовно.

СИМВОЛИ



Съдържа достатъчно реактиви за <N> теста



Използвайте до



Медицинско изделие за ин витро диагностика



Каталожен номер



Партиден номер



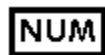
Номер на материала



Компоненти



Съдържа



Номер



Глобален номер на търговска единица



Ограничение на температурата



Производител



Направете справка с инструкциите за употреба



Опасност за здравето

Информация за контакт

За техническа помощ и повече информация вижте центъра ни за техническа поддръжка на адрес www.qiagen.com/Support или се свържете с един от отделите за техническо обслужване на QIAGEN или местните дистрибутори (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Информация за поръчка

| Продукт | Съдържание | Каталожен № |
|--|---|-------------|
| <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24) | За 24 реакции: Основна, 4 стандарта за количествено определяне, вътрешна контрола, вода (с качество за PCR) | 4501263 |
| <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (96) | За 96 реакции: Основна, 4 стандарта за количествено определяне, вътрешна контрола, вода (с качество за PCR) | 4501265 |
| Набори EASY<i>artus</i> EBV RG PCR Kit – за напълно съответстващо на CE-IVD интегрирано автоматизирано пречистване на аликвотни части и откриване на патогени | | |
| EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 1 | За 48 подготовки за вирусни нуклеинови киселини и 24 анализа: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24) | EA10123 |
| EASY <i>artus</i> EBV RG PCR Kit 2 | За 48 подготовки за вирусни нуклеинови киселини и 48 анализа: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> EBV RG PCR Kit (24) | EA10124 |
| EZ1 DSP Virus Kit – за автоматизирано, едновременно пречистване на вирусна ДНК и РНК от 1–14 аликвотни части от серум, плазма или гръбначно-мозъчна течност (ГМТ) | | |
| EZ1 DSP Virus Kit (48) | За 48 подготовки за вирусни нуклеинови киселини: Фабрично заредени касети с реактиви, държачи за връхчета за еднократна употреба, филтърни връхчета за еднократна употреба, епруветки за аликвотни части, епруветки за елуиране, буфери, носеща РНК | 62724 |
| QIAamp DNA Mini Kit – за пречистване на геномна и вирусна ДНК от тъкани и други аликвотни части | | |
| QIAamp DNA Mini Kit (50) | За 50 подготовки за ДНК: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinase K, реактиви, буфери, Collection Tubes (2 ml) | 51304 |

| Продукт | Съдържание | Каталожен № |
|---|---|-------------|
| QIAamp UltraSens Virus Kit – за концентриране и изолиране на вирусна ДНК и РНК от серум и плазма | | |
| QIAamp UltraSens Virus Kit (50) | За 50 подготовки за вирусни нуклеинови киселини: 50 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, носеща РНК, Collection Tubes (2 ml), буфери | 53704 |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit – за пречистване на до 12 µg геномна, митохондриална или вирусна ДНК от кръв и средни телесни течности | | |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) | За 50 миниподготовки за ДНК: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Protease, реактиви, буфери, Collection Tubes (2 ml) | 51104 |
| Rotor-Gene Q MDx и принадлежности | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform | Апарат за цикли на real-time PCR с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение | 9002022 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex System | Апарат за цикли на real-time PCR с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение | 9002023 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Апарат за цикли на real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение | 9002032 |

| Продукт | Съдържание | Каталожен № |
|-----------------------------------|--|--------------------|
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Апарат за цикли на real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform | Апарат за real-time PCR с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), включва лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение | 9002042 |
| Rotor-Gene Q MDx 6plex System | Апарат за real-time PCR с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), включва лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение | 9002043 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform | Апарат за цикли на real-time PCR с 2 канала (зелен, жълт), лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение | 9002002 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex System | Апарат за цикли на real-time PCR с 2 канала (зелен, жълт), лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение | 9002003 |

| Продукт | Съдържание | Каталожен № |
|--|--|-------------|
| Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform | Апарат за цикли на real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 2 канала (зелен, жълт) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение | 9002012 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System | Апарат за цикли на real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 2 канала (зелен, жълт) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности: включва 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение | 9002013 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Алуминиев блок за ръчна подготовка на реакция с едноканална пипета в 72 епруветки × 0,1 ml | 9018901 |
| Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes | Алуминиев блок за ръчна подготовка на реакция в стандартна конфигурация 8 × 12 с 96 епруветки × 0,2 ml | 9018905 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 ленти от 4 епруветки и капачки за 1000 реакции | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 × 250 ленти от 4 епруветки и капачки за 10 000 реакции | 981106 |
| PCR Tubes, 0.2 ml (1000) | 1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции | 981005 |
| PCR Tubes, 0.2 ml (10000) | 10 × 1000 тънкостенни епруветки за 10 000 реакции | 981008 |

За актуална информация за лицензиране и декларации за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчници и ръководства за потребителя на набори QIAGEN могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com, да се поръчат от „Техническо обслужване“ на QIAGEN или местния дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

| Дата | Промени |
|---------------|---|
| R1 11/2019 | Актуализация на версията на <i>artus</i> EBV RG PCR Kit от версия 1 на версия 2; актуализация на раздела „Съдържание на набора“ с добавяне на информация за EBV RG Master; добавяне на предупреждение за опасни материали в раздела за безопасността; актуализация на Rotor-Gene Q с новия софтуер и апарати; добавяне на раздел „Изпълнение на анализ за валидност“; изваждане на раздел „Работни характеристики“ за прехвърляне в отделен документ; актуализации на конфигурациите. |

Ограничено лицензно споразумение за *artus* EBV RG PCR Kit

Използването на продукта означава, че закупилиите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с нивоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да са компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са съществено тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, регенерират или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат действия, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензно споразумение или някое от правата върху интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

Актуалните условия на лиценза ще намерите на сайта www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, EASYartus®, EZ1®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™ (Life Technologies); SYBR® (Molecular Probes, Inc.). Регистрираните наименования, търговски марки и пр., използвани в този документ, дори да не са изрично обозначени като такива, не следва да се считат за незащитени от закона
1119829 11/2019 HB-2732-001 2019 © QIAGEN, всички права запазени.

