

artus[®] EBV LC PCR

Kit Manuál

 24 (Katalogové čís. 4501063)

 96 (Katalogové čís. 4501065)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení Pro

použití s přístrojem LightCycler[®]

Verze 1



4501063, 4501065



1046892CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2

MAT

1046892CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

1. Obsah.....	5
2. Skladování.....	5
3. Další potřebné vybavení	5
4. Všeobecná preventivní opatření.....	6
5. Informace o původcích.....	6
6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase.....	6
7. Popis produktu	7
8. Protokol.....	7
8.1 Izolace DNA.....	7
8.2 Interní kontrola	10
8.3 Kvantifikace.....	11
8.4 Příprava PCR	12
8.5 Programování přístroje <i>LightCycler</i>	16
9. Vyhodnocení	19
10. Řešení problémů	22
11. Specifikace.....	24
11.1 Analytická senzitivita	24
11.2 Specifická.....	25
11.3 Přesnost	26
11.4 Reprodukovatelnost.....	28
11.5 Diagnostické hodnocení.....	28
12. Zvláštní pokyny pro použití produktu	28
13. Varování a bezpečnostní opatření.....	28

14. Kontrola kvality.....	28
15. Literatura	29
16. Vysvětlení symbolů.....	29

artus EBV LC PCR Kit

Pro použití s přístrojem *LightCycler*[®].

1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4501063 24 reakcí	Kat. čís. 4501065 96 reakcí
Modrá	EBV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Červená	EBV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 5 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	EBV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 5 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	EBV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 5 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Červená	EBV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 5 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Zelená	EBV LC IC ^{xx}	1 x 1 000 μl	2 x 1 000 μl
Bílá	Water (PCR grade)	1 x 1 000 μl	1 x 1 000 μl

^{xx} QS = Kvantifikační standard
IC = Interní kontrola

2. Skladování

Komponenty *artus EBV LC PCR Kit* se skladují při -30 až -15 °C a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2 x), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagenty alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě +4°C, skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- DNA-izolační souprava (viz 8.1 Izolace DNA)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer

- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kat. č. 2 158 850) pro vytvoření souboru *Crosstalk Color Compensation*
- *LightCycler* kapiláry (20 μ l)
- *LightCycler* Cooling Block
- *LightCycler* přístroj
- *LightCycler* Capping Tool

4. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte plynule na ledu nebo v *LightCycler* Cooling Block.

5. Informace o původcích

Přenos viru Epstein a Barrové (EBV) probíhá orálně, většinou kontaminovanými slinami. Infekce EBV probíhá zpravidla asymptomaticky, zvláště v dětství. Klinickým projevem akutní infekce je infekční mononukleóza s horečkou, únava, angína a také zduření lymfatických uzlin a sleziny. U některých pacientů mohou potíže přetrvávat chronicky a recidivovat. Formy infekce EBV s těžkým průběhem jsou sledovány zvláště u imunosuprimovaných pacientů a u osob s defektem T-buněk.

6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná

na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat testovací kapiláry (Mackay, 2004).

7. Popis produktu

artus EBV LC PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz EBV DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístroji *LightCycler*. *EBV LC Master* obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 97 bp dlouhého úseku genomu viru EBV a také pro bezprostřední detekci amplifikátu ve fluorimetrickém kanálu F2 přístroje *LightCycler*. Kromě toho obsahuje *artus* EBV LC PCR Kit druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako *Interní kontrola (IC)* ve fluorimetrickém kanálu F3. Limit detekce analytické EBV PCR (viz 11.1 **Analytická senzitivita**) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*), s jejichž pomocí lze určit množství původce ve vzorku. Prostudujte si prosím oddíl 8.3 **Kvantifikace**.

Upozornění: Teplotní profil pro detekci EBV DNA za pomoci *artus* EBV LC PCR Kit odpovídá teplotním profilům souprav *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit a *artus* CMV LC PCR Kit. Díky

tomu mohou být reakce PCR pro tyto *artus* systémy provedeny a analyzovány v jednom běhu. Dbejte přitom prosím speciálních pokynů pro vyhodnocení v kapitolách 8.3 **Kvantifikace** a 9. **Vyhodnocení**.

8. Protokol

8.1 Izolace DNA

DNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. V závislosti na protokolu zvoleného výrobce použijte dané množství vzorku a proveďte izolaci DNA podle návodu. Doporučujeme následující izolační soupravy:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
sérum, plazma, likvor	QIAamp [®] DNA Mini Kit	51 304	QIAGEN	neobsažen
	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	obsažen
krevní buňky	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	neobsažen
plazma	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	obsažen

*Pro použití v kombinaci s BioRobot[®] EZ1 DSP Workstation (Kat. čís. 9001360) a EZ1 DSP Virus Card (Kat. čís. 9017707).

Důležité pokyny pro použití souprav QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit a QIAamp DNA Mini Kit:

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Pokud použitá izolační souprava neobsahuje žádný nosič RNA, povšimněte si prosím, že je při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin resp. materiálů s malým obsahem DNA/RNA (např. likvor) důrazně doporučeno přidat nosič RNA (RNA homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. čís. 27-4110-01). Prosím postupujte následujícím způsobem:
 - Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační soupravy (např. AE pufr soupravy QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C . Zabraňte opakovanému rozmrazení ($> 2 \times$) alikvotu nosiče RNA.
 - Použijte 1 μg nosiče RNA na 100 μl lyzačního pufru. Je-li extrakčním protokolem stanoveno 200 μl lyzačního pufru na jednovzorek, vložte 2 μl nosiče RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.2 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr	např. 200 μ l	např. 2 400 μ l
Nosič RNA (1 μ g/ μ l)	2 μ l	24 μ l
Celkový objem	202 μl	2 424 μl
Objem pro izolaci	200 μl	po 200 μl

- c) Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.
- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosiče RNA dodávaného s QIAamp UltraSens Virus Kit, doporučujeme následující postup lišící se od údajů uvedených v příručce izolační soupravy:
 - Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA před prvním použitím izolační soupravy v 310 μ l elučního pufru obsaženého v soupravě (konečná koncentrace 1 μ g/ μ l, nepoužívejte lyzační pufr). Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení (> 2 x) alikvotu nosiče RNA.
 - Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.2 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr AC	800 μ l	9 600 μ l
Nosič RNA (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Celkový objem	805,6 μl	9 667,2 μl
Objem pro izolaci	800 μl	po 800 μl

- c) Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.
- Použitím **QIAamp UltraSens Virus Kit** lze docílit zkoncentrování vzorku. Pokud se v případě vašeho vzorku nejedná o sérum nebo plazmu, přidejte k vzorku alespoň 50 % (v/v) negativní lidské plazmy.

- **Antikoagulanty** obsažené ve zkumavkách pro odběr krve mohou mít inhibitivní účinek na PCR, ale uvedené izolační soupravy je dobře eliminují. Doporučujeme nepoužívat heparinovou krev.
- Při izolaci využívající promývací pufr s obsahem **etanolu** bezpodmínečně zajistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
- *artus* EBV LC PCR Kit není vhodný pro izolace na bázi **fenolu**.

Důležité upozornění k použití soupravy EZ1 DSP Virus Kit:

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Přidejte tedy prosím ke každé izolaci potřebné množství nosiče RNA a držte se pokynů v *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Důležité: *Interní kontrolu* soupravy *artus* EBV LC PCR Kit lze vložit přímo do izolace (viz **8.2 Interní kontrola**).

8.2 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *Interní kontrola (EBV LC IC)*. Máte tak možnost kontrolovat **jak izolaci DNA, tak také možnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Při použití **EZ1 DSP Virus Kit** musí být *Interní kontrola* vložena podle instrukcí v *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Používáte-li **QIAamp UltraSens Virus Kit**, **QIAamp DNA Blood Mini Kit** nebo **QIAamp DNA Mini Kit**, přidejte *Interní kontrolu* k izolaci v poměru 0,1 μ l na 1 μ l elučního objemu. Jestliže například používáte **QIAamp DNA Mini Kit** a eluujete DNA v 50 μ l AE pufru, vložte 5 μ l *Interní kontroly*. Množství vkládané *Interní kontroly* závisí **pouze** na elučním objemu. *Interní kontrola* a nosič RNA (viz **8.1 Izolace DNA**) by měly být přidávány pouze k

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs *Interní kontroly*, lyzačního pufru a

nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *Interní kontroly* a ke snížení efektivity izolace). *Interní kontrolu* a nosič RNA **nepipetujte** přímo do vzorku.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 0,5 μ l *Interní kontroly* na jednu testovací směs přímo do 15 μ l *EBV LC Master*. Pro každou PCR reakci použijte 15 μ l takto vytvořeného Master Mixu* a přidejte následně 5 μ l izolátu. Jestliže připravujete jeden běh pro více vzorků, zvyšte potřebná množství *EBV LC Master* a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **8.4 Příprava PCR**).

Soupravy *artus EBV LC PCR Kit* a *artus CMV LC PCR Kit* obsahují identickou *Interní kontrolu (IC)*. Také *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* a *artus VZV LC PCR Kit* obsahují identickou *Interní kontrolu*.

8.3 Kvantifikace

S *Kvantifikačními standardy (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (5 μ l). Standardní křivku v přístroji *LightCycler* vytvoříte tak, že vložíte všechny čtyři *Kvantifikační standardy* dodávané s produktem, definujete je v *Sample Loading Screen* jako standardy a zadáte uvedené koncentrace (viz *LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry*). Tuto standardní křivku lze použít také pro následné kvantifikace, pokud je během aktuálního běhu použit alespoň jeden standard **jedné** definované koncentrace. K tomu je zapotřebí dříve vytvořenou standardní křivku importovat (viz *LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve*). U této formy kvantifikace je však třeba zohlednit skutečnost, že v důsledku variability mezi PCR běhy může nastat odchylka ve výsledku.

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

Pokud máte v běhu integrován více než jeden Herpes-artus systém, dbejte na to, aby byly analyzovány odděleně příslušnými *Kvantifikačnými standardy*.

Upozornění: *Kvantifikační standardy* jsou definovány jako kopie/ μ l. Pro přepočítání hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/\mu l)} \times \text{eluční objem (\mu l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Prosím povšimněte si, že se do výše uvedeného vzorce dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Důležité: Na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX je k dispozici příručka pro zjednodušení kvantitativního vyhodnocení systémů *artus* na přístroji *LightCycler* (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 or *LightCycler* 2.0 Instrument**).

8.4 Příprava PCR

Ověřte, že je Cooling Block s uvnitř obsaženými adaptéry (příslušenství přístroje *LightCycler*) předem vychlazen přibližně na +4°C. Do adaptéru Cooling Blocku vložte takový počet kapilár *LightCycler*, který je potřebný pro plánovanou reakci. Dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR proveden alespoň jeden *Kvantifikační standard* a jedna negativní kontrola (*Water, PCR grade*). Pro vytvoření standardní křivky použijte prosím u každého běhu PCR všechny spolu s produktem dodávané *Kvantifikační standardy* (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Chcete-li *Interní kontrolou* kontrolovat **jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR**, musí být napřed *Interní kontrola* přidána k izolaci (viz **8.2 Interní kontrola**). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

		Počet vzorků	
		1	12
1. Příprava Master Mixu	EBV LC Master	15 μ l	180 μ l
	EBV LC IC	0 μ l	0 μ l
	celkový objem	15 μl	180 μl
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 μ l	po 15 μ l
	vzorek	5 μ l	po 5 μ l
	celkový objem	20 μl	po 20 μl

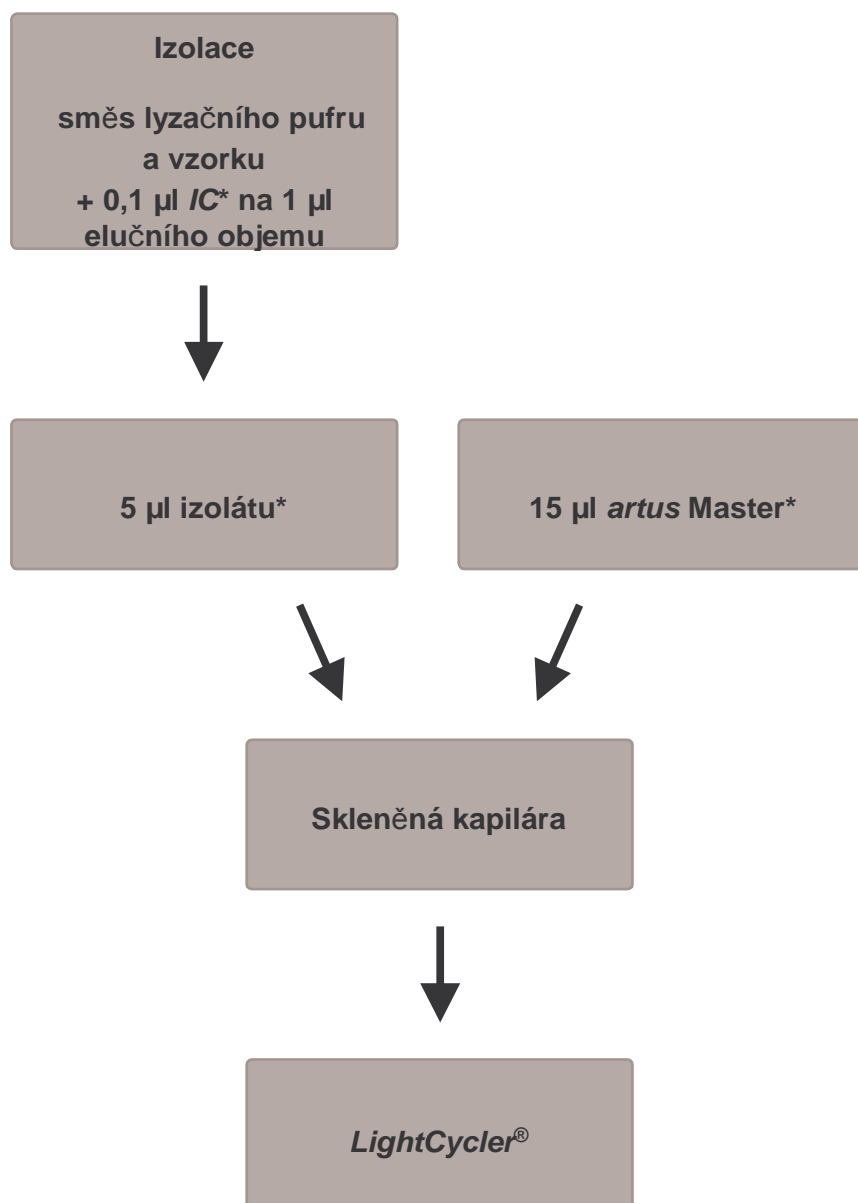
Jestliže chcete *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole PCR inhibice**, je třeba ji přidat přímo do *EBV LC Master*. V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

		Počet vzorků	
		1	12
1. Příprava Master Mixu	EBV LC Master	15 μ l	180 μ l
	EBV LC IC	0,5 μ l	6 μ l
	celkový objem	15,5 μl*	186 μl*
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 μ l*	po 15 μ l*
	vzorek	5 μ l	po 5 μ l
	celkový objem	20 μl	po 20 μl

Do plastického zásobníku každé kapiláry pipetujte 15 μ l Master Mixu. Následně přidejte 5 μ l eluátu z izolace DNA. Podobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 5 μ l alespoň jednoho *Kvantifikačního standardu (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* a jako negativní kontrolu 5 μ l vody (*Water, PCR grade*). Uzavřete kapiláry. Směs převedete z plastického zásobníku do kapiláry tak, že na stolní centrifuze centrifugujete adaptéry s uvnitř obsaženými kapilárami po dobu deseti sekund při maximálně 400 x g (2 000 ot/min).

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

Přidání *Interní* kontroly k izolaci

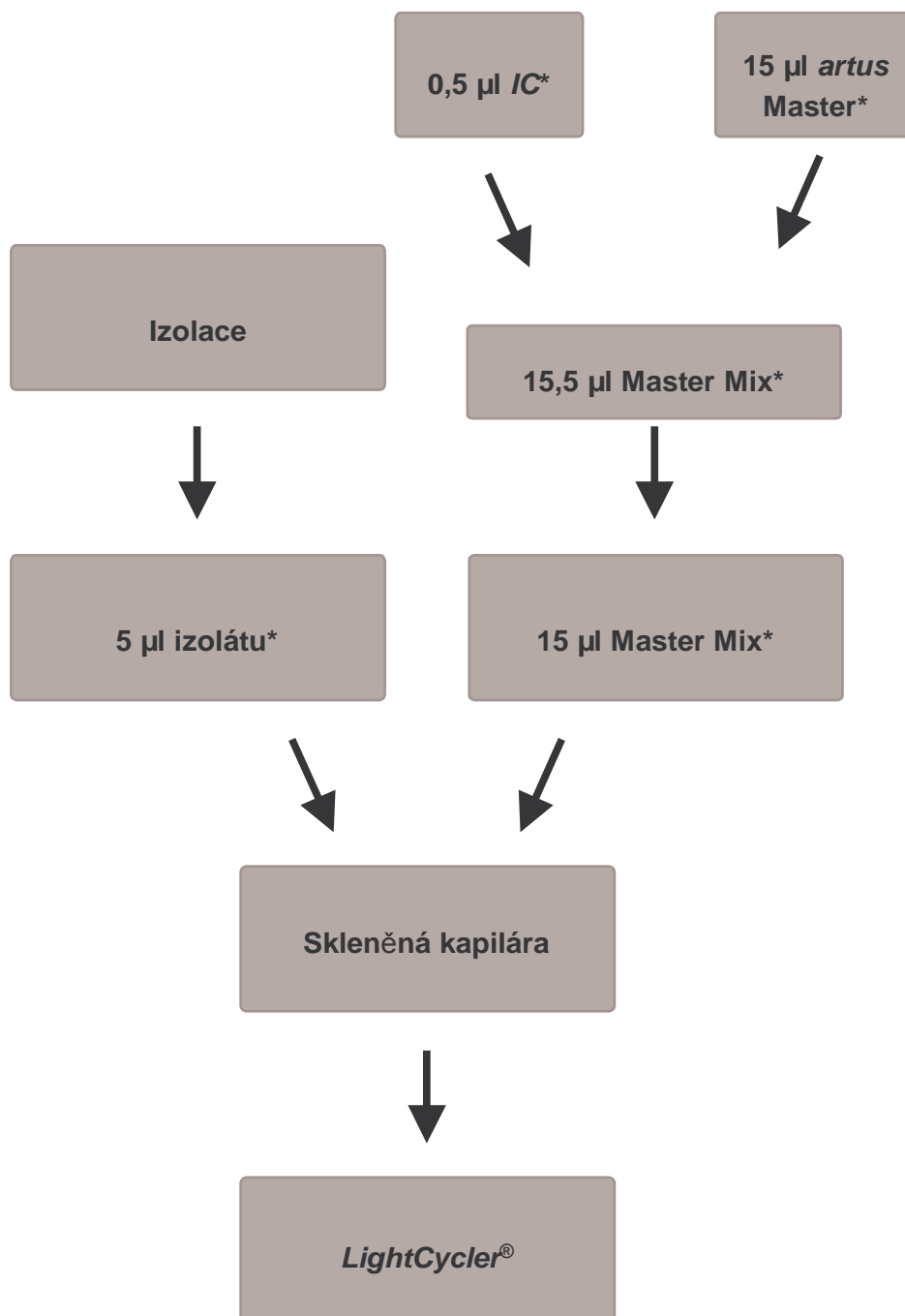


Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a PCR inhibice.

*

Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

Přidání Interní kontroly k artus Master



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu PCR inhibice.

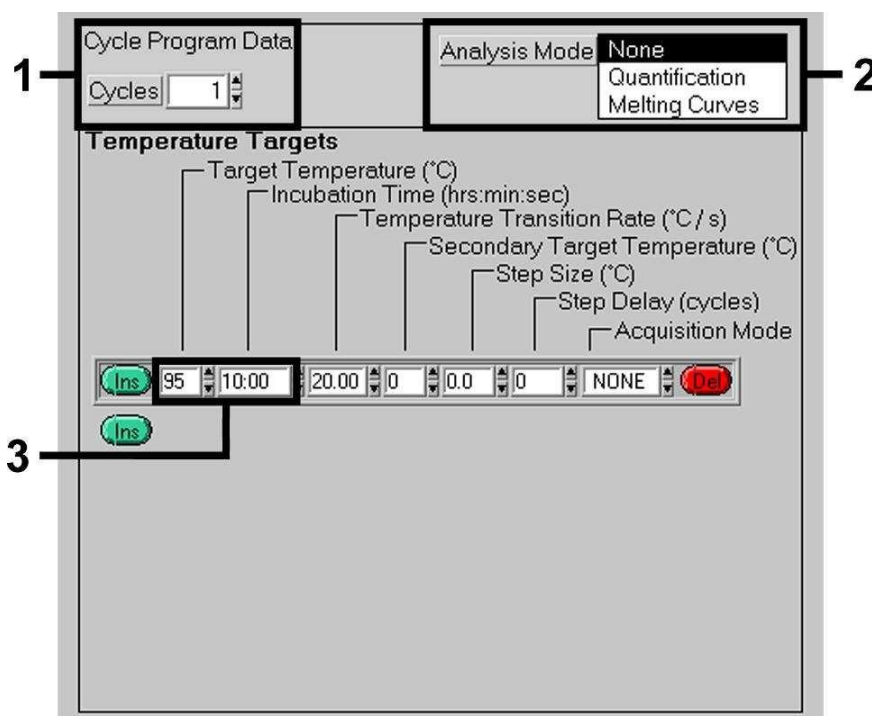
* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

8.5 Programování přístroje *LightCycler*

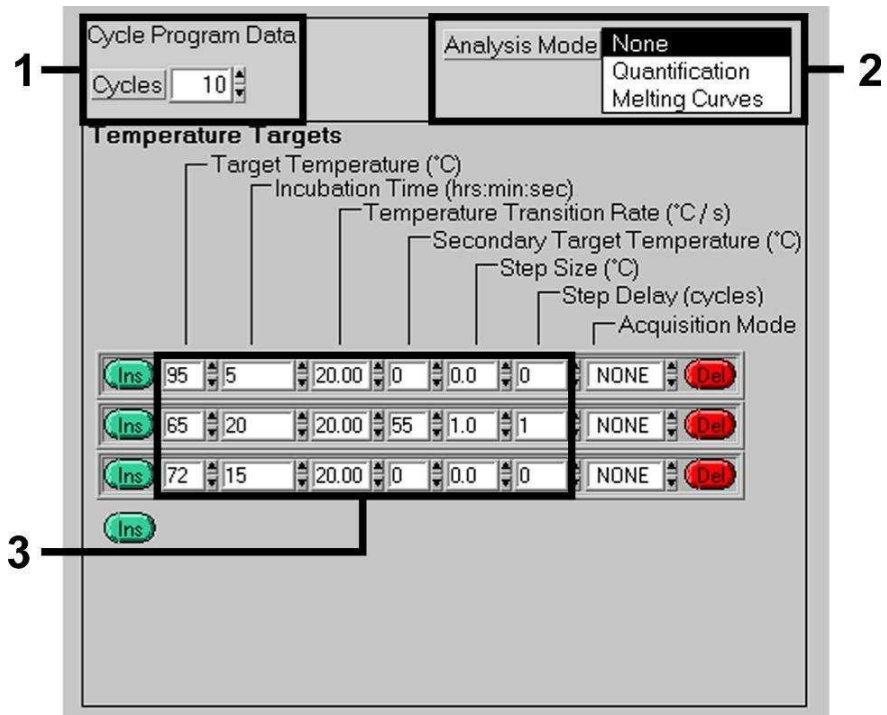
Pro detekci EBV DNA vytvořte na přístroji *LightCycler* teplotní profil následujícími pěti pracovními kroky (viz Obr. 3 - 7):

- | | | |
|----|-------------------------------------|--------|
| A. | Počáteční aktivace Hot Start enzymu | Obr. 3 |
| B. | Krok "TouchDown" | Obr. 4 |
| C. | Amplifikace DNA | Obr. 5 |
| D. | Křivka tání (volitelné) | Obr. 6 |
| E. | Chlazení | Obr. 7 |

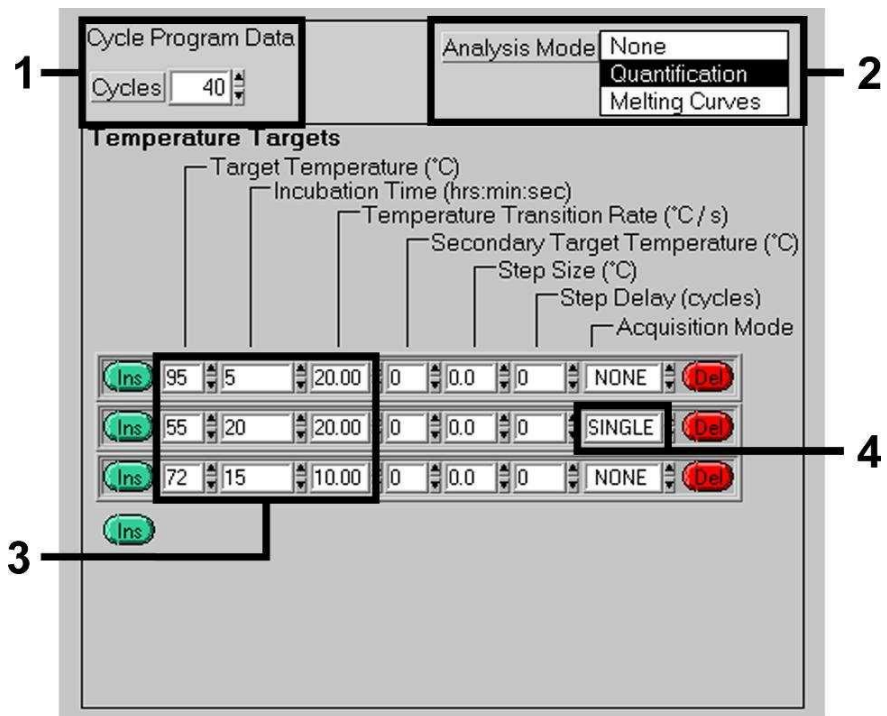
Dbejte zvláště na nastavení *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* a *Temperature Targets*. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Pokyny pro programování přístroje *LightCycler* naleznete v příručce *LightCycler Operator's Manual*. Vytvoření kroku D křivka tání je **volitelné**. Křivka je potřebná výhradně pro rozlišení mezi HSV-1 a HSV-2 při současném nasazení *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*.



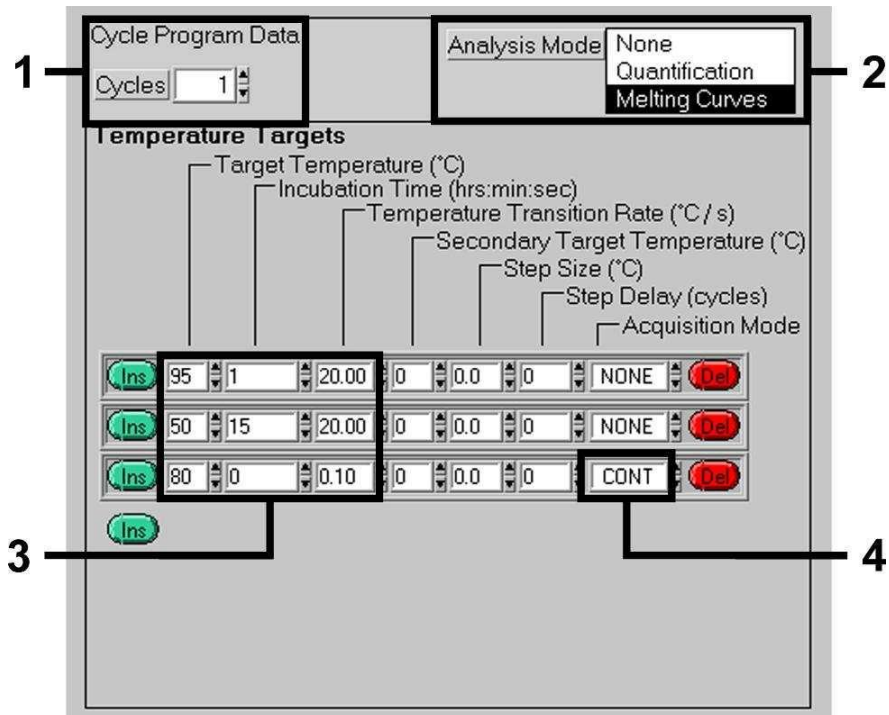
Obr. 3: Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



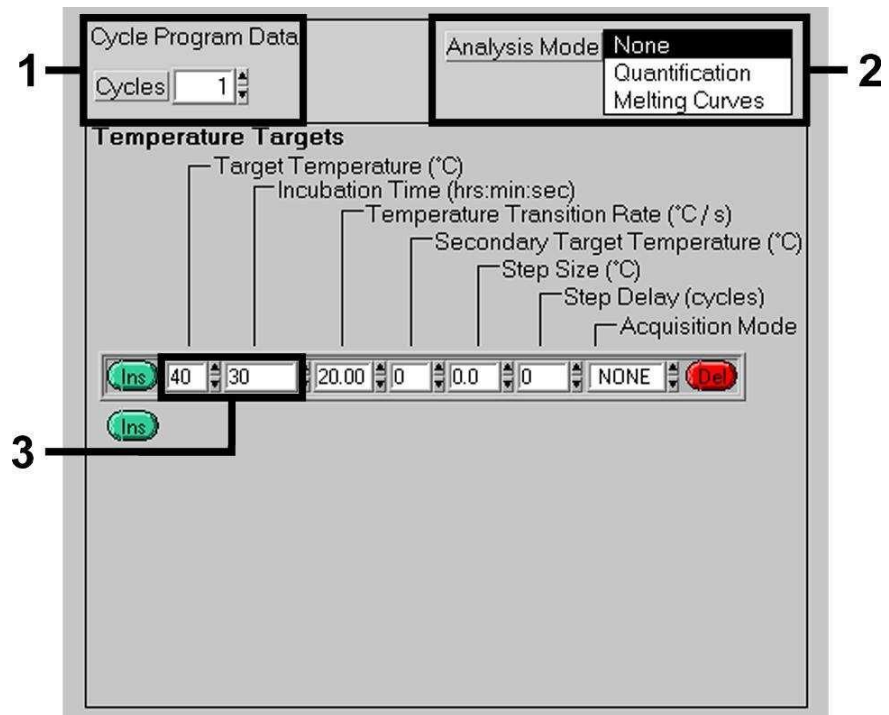
Obr. 4: Krok "Touch Down".



Obr. 5: Amplifikace DNA.



Obr. 6: Křivka tání.



Obr. 7: Chlazení.

9. Vyhodnocení

U vícebarevných analýz se mezi fluorimetrickými kanály vyskytují interference. Software přístroje *LightCycler* obsahuje soubor označený jako *Color Compensation File*, který tato záření kompenzuje. Tento soubor otevřete před, v průběhu nebo po skončení PCR aktivací přepínací plochy *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Není-li instalován žádný soubor *Color Compensation File*, vytvořte soubor podle návodu v příručce *LightCycler Operator's Manual*. Po aktivaci souboru *Color Compensation File* se ve fluorimetrických kanálech F1, F2 a F3 objeví oddělené signály. Pro analýzu výsledků PCR, které byly získány pomocí *artus EBV LC PCR Kit*, zvolte prosím pro analytickou EBV PCR pohledovou funkci F2/Back-F1 resp. F3/Back-F1 pro PCR *Interní kontroly*. Při analýze kvantitativních běhů dodržujte bezpodmínečně oddíl 8.3 Kvantifikace a **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument***, která je k dispozici na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Pokud máte v běhu PCR integrován více než jeden *Herpes-artus* systém, dbejte na to, aby byly vzorky EBV analyzovány odděleně. Pro vyhodnocení zvolte odpovídající pozice rotoru.

Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 je detekován signál.
Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje EBV DNA.
V tomto případě je detekce signálu v kanálu F3/Back-F1 podružná, protože vysoké výchozí koncentrace EBV DNA (pozitivní signál v kanálu F2/Back-F1) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* v kanálu F3/Back-F1 (kompetice).
2. Ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu F3/Back-F1 (signál *Interní kontroly*).

Ve vzorku není prokazatelná žádná EBV DNA. Lze jej proto považovat za negativní.

Při negativní EBV PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

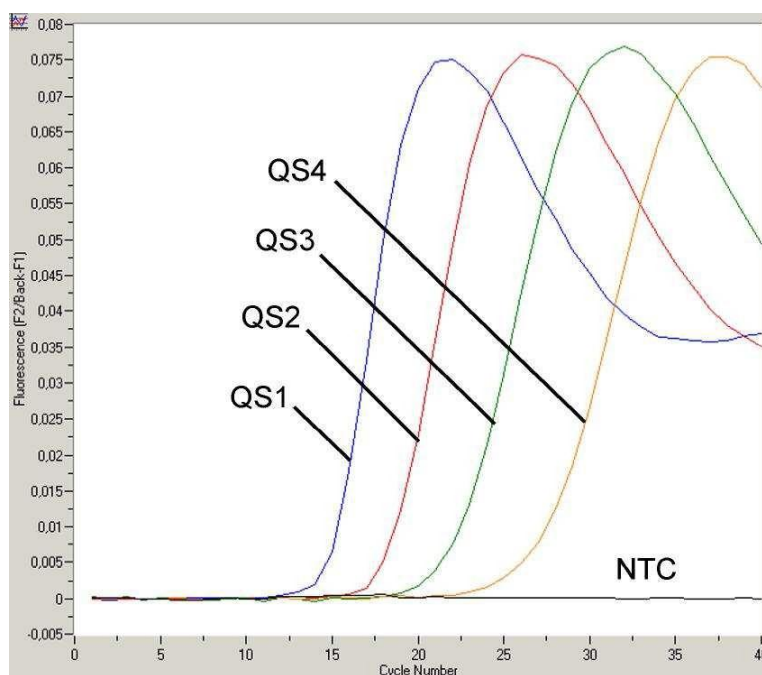
3. Signál není detekován ani v kanálu F2/Back-F1 ani v kanálu F3/Back-F1.

Není možné učinit diagnostický závěr.

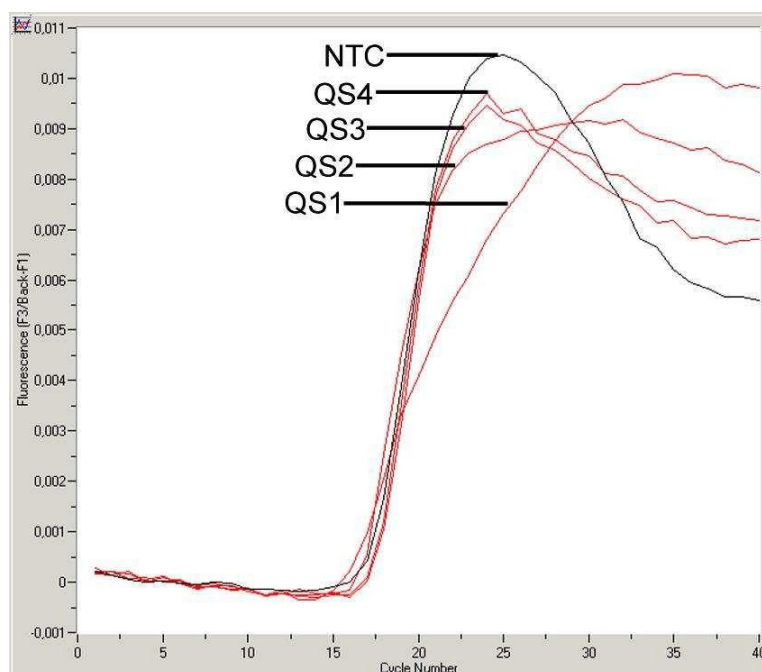
Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole

10. Řešení problémů.

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou uvedeny na Obr. 8 a Obr. 9.



Obr. 8: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 9: Průkaz InternÝ kontroly (IC) ve fluorimetrickém kanálu F3/Back-F1 při současné amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativní kontrola).

10. Řešení problémů

Žádný signál při pozitivních kontrolách (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1:

- Volba fluorimetrického kanálu při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.
 - ❖ K analýze dat zvolte fluorimetrický kanál F2/Back-F1 pro analytickou EBV PCR a fluorimetrický kanál F3/Back-F1 pro PCR *Interní kontroly*.
- Naprogramování teplotního profilu přístroje *LightCycler* je chybné.
 - ❖ Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **8.5 Programování přístroje *LightCycler***).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
 - ❖ Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem (viz **8.4 Příprava PCR**) a popř. PCR zopakujte.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus EBV LC PCR Kit*.
 - ❖ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* ve fluorimetrickém kanálu F3/Back-F1 při současné nepřítomnosti signálu v kanálu F2/Back-F1:

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
 - ❖ Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- PCR byla inhibována.
 - ❖ Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
 - ❖ Přesvědčte se, že byl při izolaci DNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz **8.1 Izolace DNA**).
- Během izolace dochází k úbytku DNA.
 - ❖ Byla-li k izolaci přidána *Interní kontrola*, může nepřítomnost signálu *Interní kontroly* znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že

používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.

- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus* EBV LC PCR Kit.
 - ❖ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály při negativních kontrolách ve fluorimetrickém kanálu F2/Back-F1 analytické PCR.

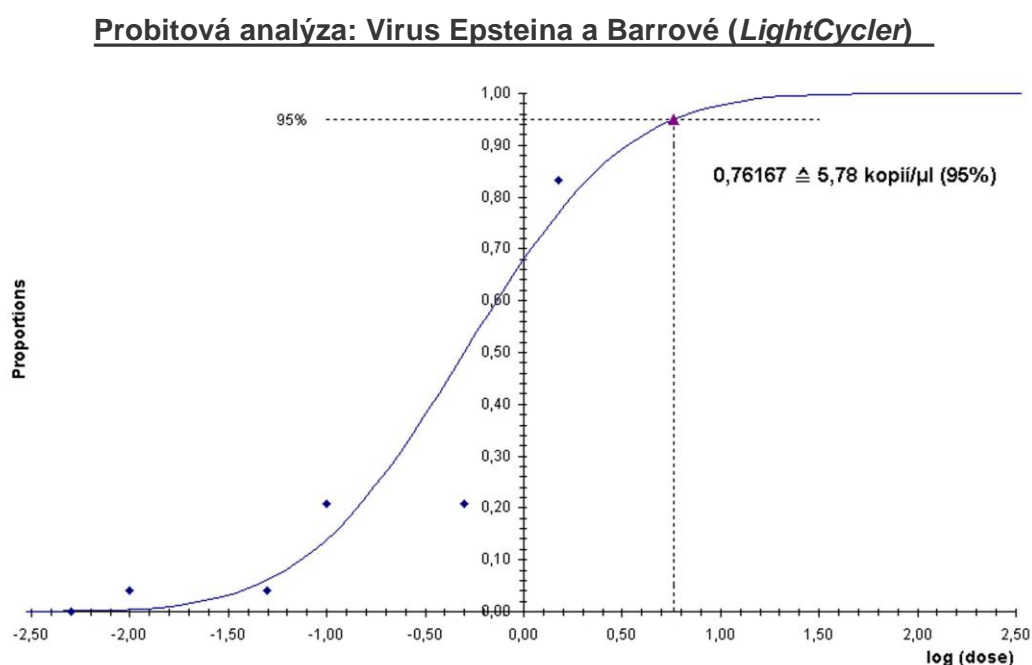
- Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci.
 - ❖ Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
 - ❖ Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
 - ❖ Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.
 - ❖ Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- Během izolace dochází ke kontaminaci.
 - ❖ Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
 - ❖ Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

11. Specifikace

11.1 Analytická senzitivita

Pro zjištění analytické senzitivity *artus* EBV LC PCR Kit byla vytvořena řada ředění standardů od 50 do nominálně 0,005 EBV-ekvivalentů kopie*/ μl a analyzována pomocí *artus* EBV LC PCR Kit. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledek byl zjištěn pomocí probitové analýzy. Jeho grafické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 10. Limit detekce *artus* EBV LC PCR Kit leží proto u 5,78 kopií/ μl ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 5,78 kopií/ μl .



Obr. 10: Analytická senzitivita *artus* EBV LC PCRKit.

* U zde použitého standardu se jedná o klonovaný PCR produkt, jehož koncentrace byla zjištěna spektrální a fluorescenční fotometrií.

11.2 Specificita

Specificita *artus* EBV LC PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuelní homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech relevantních genotypů.

Validace specificity byla provedena na šesti různých EBV negativních sérových vzorcích, které spolu s EBV specifickými primery a sondami obsaženými v *EBV LC Master* negenerovaly žádný signál.

K určení specificity *artus* EBV LC PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v Tabulce 1 testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1: Testování specificity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců.

Kontrolní skupina	EBV (F2/Back-F1)	Interní kontrola (F3/Back-F1)
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	-	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	-	+
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	-	+
Lidský herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	-	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	-	+

11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti pro *artus* EBV LC PCR Kit umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **Intra-Assay variability** (variabilita vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z **Inter-Assay variability** (variabilita způsobená provedením experimentu různými osobami v jedné laboratoři a užitím různých přístrojů stejného typu) a z **Inter-Batch variability** (variabilita způsobená použitím různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontroly*.

Tyto údaje byly pro *artus* EBV LC PCR Kit stanoveny na základě *Kvantifikačného standardu* s nejnižší koncentrací (QS 4; 50 kopií/ μ l). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: *threshold cycle*, viz Tabulka 2) a z toho určených kvantitativních hodnot v kopiích/ μ l (viz Tabulka 3). Celková variabilita libovolného vzorku uvedené koncentrace činí tedy 1,17 % (Ct) resp. 14,54 % (konc.), pro průkaz *Interní kontroly* 1,02 % (Ct). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Intra-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,04	0,00	0,28
Inter-Assay variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
Inter-Assay variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,11	0,01	0,72
Inter-Batch variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
Inter-Batch variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,19	0,03	1,23
Celková variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,17
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,15	0,02	1,02

Tabulka 3: Údaje o přesnosti na základě kvantitativních hodnot (v kopiích/ μ l).

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Inter-Assay variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Inter-Batch variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Celková variabilita: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

11.4 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus* EBV LC PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí na mezilaboratorních pokusech.

11.5 Diagnostické hodnocení

artus EBV LC PCR Kit je v současné době evaluován v několika studiích.

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagensie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Prostředek by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagensie s prošlou trvanlivostí.

13. Varování a bezpečnostní opatření

Bezpečnostní informace k soupravě *artus* EBV LC PCR Kit naleznete v odpovídajících bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/safety.











14. Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO 9001 a ISO 13485 byla každá šarže *artus* EBV LC PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

15. Literatura

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

16. Vysvětlení symbolů

	Použijte do
	Číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Číslo materiálu
	Manuál
	Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
 Σ	Obsah postačující pro <N> testů
	Teplotní rozmezí
QS	Kvantifikační standard
IC	Interní kontrola

artus EBV LC PCR Kit

Ochranné známky a vyloučení odpovědnosti

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

Registrované názvy, ochranné známky etc. použité v tomto manuálu nelze považovat za nechráněné zákonem, ani když nejsou jako takové označeny.

artus EBV LC PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation, EZ1 DSP Virus Kit a EZ1 DSP Virus Card jsou diagnostické soupravy a přístroje označené značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkty nejsou dostupné ve všech zemích.

Soupravy QIAamp Kit jsou určeny pro obecné laboratorní použití. Údaje produktu nebo jeho prezentace nejsou určeny k tomu, aby podávaly informace o diagnóze, prevenci nebo léčení nemoci.

Koupě souprav artus PCR Kit zahrnuje limitovanou licenci pro jejich použití v procesu polymerázové řetězové reakce (PCR) v rámci humánní a veterinární in vitro diagnostiky, ve spojení s termocyklem, jehož použití při automatizovaném provedení PCR je kryto předem splatným licenčním poplatkem, který se odvádí buď platbou společnosti Applied Biosystems nebo koupí autorizovaného termocyklu. Technologie PCR je chráněna národními patentními právy ekvivalentními k USA patentům čísel 5.219.727 a 5.322.770 a 5.210.015 a 5.176.995 a 6.040.166 a 6.197.563 a 5.994.056 a 6.171.785 a 5.487.972 a 5.804.375 a 5.407.800 a 5.310.652 a 5.994.56 ; vlastněno firmou F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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

