

artus[®] Borrelia LC PCR komplekts

Rokasgrāmata



24 (kataloga Nr. 4551063)



96 (kataloga Nr. 4551065)

Kvantitatīva in vitro diagnostika

Lietošanai ar

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 un *LightCycler 2.0* ierīcēm

Marts 2015 – Versija 1



4551063, 4551065



1050871



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R3

MAT

1050871



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ir vadošais inovatīvu paraugu un testu tehnoloģiju piegādātājs, kas dod iespēju izolēt un noteikt jebkura bioloģiska parauga sastāvdaļas.

Mūsu uzlabotie, augstas kvalitātes produkti un pakalpojumi nodrošina panākumus no parauga līdz rezultātam.

QIAGEN nosaka standartus:

- DNS, RNS un proteīnu attīrīšanā
- Nukleīnskābju un proteīnu testos
- mikroRNS izpētē un RNSi
- Paraugu un testēšanas tehnoloģiju automatizācijā

Mūsu mērķis ir dot jums iespēju sasniegt izcilus panākumus un atklājumus. Detalizēta informācija pieejama www.qiagen.com mājaslapā.

Satura rādītājs

1. Saturs	5
2. Uzglabāšana.....	5
3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces	6
4. Vispārējie piesardzības pasākumi	6
5. Informācija par slimības izraisītāju	7
6. Reāllaika PCR princips	7
7. Produkta apraksts	7
8. Protokols	8
8.1 DNS izolēšana.....	8
8.2 Iekšējā kontrole	10
8.3 Kvantitatīvā noteikšana	11
8.4 PCR sagatavošana.....	13
8.5 <i>LightCycler</i> ierīču programmēšana	16
8.5.1 <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5 ierīces programmēšana	16
8.5.2 <i>LightCycler</i> 2.0 ierīces programmēšana.....	19
9. Datu analīze.....	22
9.1 PCR datu analīze <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5 ierīcē.....	22
9.2 PCR datu analīze <i>LightCycler</i> 2.0 ierīcē	25
10. Problēmu novēršana.....	28
11. Specifikācijas.....	30
11.1 Analītiskā jutība	30
11.1.1 <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5 ierīce	30
11.1.2 <i>LightCycler</i> 2.0 ierīce.....	30

11.2	Specifiskums	31
11.3	Precizitāte	33
11.4	Robustums	34
11.5	Atražošanas spēja	35
11.6	Diagnostikas vērtējums	35
12.	Produkta izmantošanas ierobežojumi.....	35
13.	Drošības informācija	35
14.	Kvalitātes kontrole	36
15.	Atsauces.....	36
16.	Simboli.....	37

Sartus Borrelia LC PCR komplekts

Izmantošanai ar *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīci.

1. Saturs

	Marķēšana un sastāvs	Art. Nr. 4551063 24 reakcijas	Art. Nr. 4551065 96 reakcijas
Zils	<i>Borrelia LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Sarkans	<i>Borrelia LC QS 1st</i> 3 x 10 ⁴ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkans	<i>Borrelia LC QS 2st</i> 3 x 10 ³ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkans	<i>Borrelia LC QS 3st</i> 3 x 10 ² kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Sarkans	<i>Borrelia LC QS 4st</i> 3 x 10 ¹ kop./µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zaļš	<i>Borrelia LC ICst</i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Balts	<i>Water (PCR grade)</i> (Ūdens (PCR pakāpe))	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

▪ QS = Kvantitatīvās noteikšanas standarts
IC = Iekšējā kontrole

2. Uzglabāšana

artus Borrelia LC PCR komplekta sastāvdaļas jāuzglabā no -30°C līdz -15°C temperatūrā un tās ir stabilas līdz derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetes. Jāizvairās no atkārtotas (> 2 reizes) atkausēšanas un sasaldēšanas, jo tas var mazināt testa jutību. Ja reaģentus paredzēts izmantot neregulāri, tos nepieciešams sasaldēt alikvotās daļās. Uzglabāšanas ilgums +4°C temperatūrā nedrīkst pārsniegt piecas stundas.

3. Papildus nepieciešamie materiāli un ierīces

- Vienreizējās lietošanas cimdi bez pūdera
- DNS izolēšanas komplekts (skatīt **8.1 DNA Isolation**)
- Pipetes (pielāgojamas)
- Sterili pipetes uzgaļi ar filtriem
- Virpuļmikseris
- Galda centrifūga ar rotoru 2 ml reakcijas mēģenēm
- *Color Compensation Set* („Krāsu kompensācijas komplekts”) (Roche Diagnostics, kat. Nr. 2 158 850) faila *Crosstalk Color Compensation* instalācijai *LightCycler 1.1/1.2/1.5*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (kat. Nr. 03 624 854 001) *LightCycler 2.0* ierīcei
- *LightCycler* kapilāri (20 µl)
- *LightCycler* dzesēšanas bloks
- *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (programmatūras versija 3.5) vai *LightCycler 2.0* (programmatūras versija 4.0) ierīce
- *LightCycler* ierīce vāciņu uzlikšanai/noņemšanai

4. Vispārējie piesardzības pasākumi

Lietotājam vienmēr jāpievērš uzmanība turpmāk minētajam:

- Izmantojiet sterilus pipetes uzgaļus ar filtriem.
- Uzglabājiet un ekstrahējiet pozitīvu materiālu (paraugus, kontroles un amplikonus) atsevišķi no pārējiem reaģentiem un pievienojiet to reakcijas maisījumam telpiski atdalītā iekārtā.
- Pirms testa sākšanas rūpīgi atkausējiet visas sastāvdaļas istabas temperatūrā.
- Pēc atkausēšanas sajauciet visas sastāvdaļas un īsu brīdi centrifugējiet.
- Strādājiet ātri uz ledus virsmas vai *LightCycler* dzesēšanas blokā.

5. Informācija par slimības izraisītāju

Borrelia burgdorferi baktērija ir sastopama visā pasaulē, to izplata ērces un tā izraisa Laima slimību (laimboreliozu). Agrīnas slimības stadijas atrisinās spontāni, bet sastopamas arī hroniskas slimības formas. Dažu dienu vai nedēļu laikā pēc inficēšanās parādās cirkulāra eritēma (*Erythema migrans*), kas izplatās no centra. Sekundārā fāze skar galvenokārt ādu, centrālo un perifēro nervu sistēmu, sirdi, kā arī muskuloskeletāro sistēmu. Hroniskas slimības formas raksturo *acrodermatitis chronica atrophicans* un reimatoīdas problēmas, kas izpaužas kā locītavu iekaisumi.

6. Reāllaika PCR princips

Slimības izraisītāja konstatēšana ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) pamatojas uz slimības izraisītāja genoma specifisku reģionu amplifikāciju. Reāllaika PCR amplificētais produkts tiek noteikts ar fluorescējošo krāsu palīdzību. Tās parasti ir saistītas ar oligonukleotīdu zondēm, kas ir tieši saistītas ar amplificēto produktu. Novērojot fluorescences intensitāti PCR norises laikā (t.i., reāllaikā), var konstatēt un kvantitatīvi noteikt uzkrājušos produktu, atkārtoti neatverot reakcijas stobriņus pēc PCR norises (Mackay, 2004).

7. Produkta apraksts

artus Borrelia LC PCR komplekts ir lietošanai gatava sistēma *Borrelia* DNS noteikšanai *LightCycler* ierīcēs, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). *Borrelia LC Master* satur reaģentus un enzīmus *Borrelia* genoma 102 bp reģiona specifiskai amplifikācijai un specifiskā amplikona tiešai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcēs. Turklāt *artus Borrelia LC PCR* komplekts satur otru heterologu amplifikācijas sistēmu iespējamai PCR inhibēšanas konstatēšanai.

PCR produkts	Fluorescences kanālu izvēle	
	LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīce	LightCycler 2.0 ierīce
<i>Borrelia</i>	F1	530
<i>Borrelia LC IC</i>	F2	610

Šīs *Iekšējās kontroles (IC)* amplifikācija un noteikšana nesamazina analītiskās *Borrelia* PCR noteikšanas robežu (skatīt **11.1. Analytical Sensitivity**). Komplektācijā iekļautās ārējās pozitīvās kontroles (*Borrelia LC QS 1–4*) ļauj noteikt slimības izraisītāja slodzi. Detalizētu informāciju skatīt nodaļā **8.3. Quantitation**.

8. Protokols

8.1 DNS izolēšana

Dažādi ražotāji piedāvā DNS izolēšanas komplektus. Paraugu daudzums DNS izolēšanas procedūrai ir atkarīgs no izmantotā protokola. Lūdzu, veiciet DNS izolēšanu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Ieteicams izmantot šādus izolēšanas komplektus:

Parauga materiāls	Nukleīnskābes izolēšanas komplekts	Kataloga numurs	Ražotājs	Nesēja RNS
Ādas biopsijas, sinoviālais šķidrums, CSF, asinis, ērces, uzsējumi	QIAamp® DNA komplekts (50)	51 304	QIAGEN	nav iekļauta

- **Nesēja RNS** izmantošana ir būtiski svarīga ekstrakcijas efektivitātei un tāpat arī DNS/RNS iegūšanai. Ja izvēlētajā izolēšanas komplektā nav iekļauta nesēja RNS, ņemiet vērā, ka nesēja (RNS-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. Nr. 27-4110-01) pievienošana ir stingri ieteicama nukleīnskābju ekstrakcijai no bezšūnu organisma šķidrumiem un materiāliem ar zemu DNS/RNS saturu (piemēram, CSF). Šajos gadījumos rīkojieties šādi:

- a) Izšķīdiniet liofilizēto nesēja RNS, izmantojot ekstrakcijas komplekta eluēšanas buferšķīduma (piemēram, QIAamp DNA Mini komplekta AE buferšķīdumu) (neizmantojiet līzes buferšķīdumu) un sagatavojiet atšķaidījumu ar 1 µg/µl koncentrāciju. Sadaliet šo nesēja RNS šķīdumu alikvotās daļās atbilstoši Jūsu vajadzībām un uzglabājiet tās -20°C temperatūrā. Izvairieties no atkārtotas RNS alikvoto daļu atkausēšanas un sasaldēšanas (> 2 reizes).
- b) Izmantojiet 1 µg nesēja RNS uz 100 µl līzes buferšķīduma. Piemēram, ja saskaņā ar ekstrakcijas protokolu ieteicams izmantot 200 µl līzes buferšķīduma, pievienojiet 2 µl nesēja RNS (1 µg/µl) tieši līzes buferšķīdumam. Pirms katras ekstrakcijas jāgatavo svaigs līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījums (un *lekšējā kontrole*, ja nepieciešams, skatīt **8.2. Internal Control**) saskaņā ar turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu:

Paraugu daudzums	1	12
Līzes buferšķīdums	piemēram, 200 µl	piemēram, 2,400 µl
Nesēja RNS (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Kopējais tilpums	202 µl	2424 µl
Tilpums uz ekstrakciju	200 µl	katrs 200 µl

- c) Lai veiktu ekstrakciju, uzreiz izmantojiet tikko sagatavotu līzes buferšķīduma un nesēja RNS maisījumu. Maisījuma uzglabāšana nav iespējama.
- Lai sasniegtu visaugstāko *artus* Borrelia LC PCR komplekta jutību, DNS ir ieteicams eluēt 50 µl eluēšanas buferšķīduma.
 - Izmantojot izolēšanas protokolus ar **etilspirtu** saturošiem mazgāšanas buferšķīdumiem, pirms eluēšanas veiciet papildu centrifugēšanu (trīs minūtes, 13 000 apgr./min), lai noņemtu atlikušo etilspirtu. Tas novērš iespējamo PCR inhibēšanu.
 - *artus* Borrelia LC PCR komplektu nedrīkst izmantot ar **fenolu** saturošām izolēšanas metodēm.

Svarīgi: *artus* Borrelia LC PCR komplekta *lekšējo kontroli* iespējams izmantot tieši izolēšanas procedūrā (skatīt **8.2. Internal Control**).

8.2 lekšējā kontrole

lekšējā kontrole (*Borrelia LC IC*) ietilpst komplektā. Tas ļauj lietotājam **gan kontrolēt DNS izolēšanas procedūru, gan pārbaudīt iespējamo PCR inhibēšanu** (skatīt Fig. 1). Šim nolūkam izolējumam pievienojiet *lekšējo kontroli* attiecībā 0,1 µl uz 1 µl eluēšanas tilpuma. Piemēram, izmantojot QIAamp DNA Mini komplektu, DNS tiek eluēta 50 µl AE buferšķīdumā. Tas nozīmē, ka sākumā jāpievieno 5 µl *lekšējās kontroles*. *lekšējās kontroles* daudzums ir atkarīgs **tikai** no eluēšanas tilpuma. *lekšējā kontrole* un nesēja RNS (skatīt **8.1. DNA Isolation**) jāpievieno tikai

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

lekšējo kontroli nedrīkst pievienot tieši parauga materiālam. Ja to pievieno līzes buferšķīdumam, ņemiet vērā, ka *lekšējās kontroles* un līzes buferšķīduma/nesēja RNS maisījumam jābūt svaigi sagatavotam, un tas jāizmanto uzreiz (maisījuma uzglabāšana istabas temperatūrā vai ledusskapī tikai dažas stundas var izraisīt *lekšējās kontroles* darbības zudumu un mazināt ekstrakcijas efektivitāti). **Nepievienojiet *lekšējo kontroli*** un nesēja RNS tieši parauga materiālam.

Pēc izvēles *lekšējo kontroli* var izmantot **tikai iespējamās PCR inhibēšanas pārbaudei** (skatīt Fig. 2). Šim nolūkam pievienojiet 0,5 µl *lekšējās kontroles* uz reakciju tieši 15 µl *Borrelia LC Master* šķīdumam. Katrai PCR reakcijai izmantojiet 15 µl Master Mix šķīduma, kas ir sagatavots pēc iepriekš minēta apraksta*, un pievienojiet 5 µl attīrītā parauga. Ja PCR norise ir paredzēta vairākiem paraugiem, palieliniet *Borrelia LC Master* un *lekšējās kontroles* tilpumu atbilstoši paraugu daudzumam (skatīt **8.4. Preparing the PCR**).

* Tilpuma palielināšanās *lekšējās kontroles* pievienošanas rezultātā netiek ņemta vērā PCR testa sagatavošanas laikā. Detektēšanas sistēmas jutība netiek samazināta.

8.3 Kvantitatīvā noteikšana

Pievienotie *Kvantitatīvās noteikšanas standarti (Borrelia LC QS 1–4)* tiek apstrādāti kā iepriekš attīrīti paraugi un tiek izmantots tāds pats tilpums (5 µl). Lai izveidotu standarta līkni *LightCycler* ierīcē, visi četri *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* jāizmanto šādi:

LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīce

Logā *Sample Loading Screen* definējiet *Borrelia LC QS 1–4* kā standartus ar norādītu koncentrāciju (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 3.5, B nodaļa, 2.4. punkts Paraugu datu ieraksts).

LightCycler 2.0 ierīce

Lai definētu standartus, aktivizējiet funkciju *Analysis Type* loga *Samples* izvēlnē un izvēlieties *Absolute Quantification*. Tagad *Borrelia LC QS 1–4* var definēt kā standartus un ievadīt katram standartam atbilstošu koncentrāciju (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 4.0, 2.2. nodaļa Paraugu informācijas ievadīšana). Pārļecinieties, vai **nav** aktivizēta *Enable Controls* funkcija. Citādi analīzes iespēju izvēle datu analīzes veikšanai ir ierobežota (skatīt **9.2. PCR datu analīze LightCycler 2.0 ierīcē**).

Pēc iepriekš minētā apraksta izveidoto standarta līkni iespējams izmantot turpmākajām norisēm, nodrošinot, lai vismaz viens standarts no **vienas** koncentrācijas ir izmantots pašreizējā norisē. Šim nolūkam jāimportē iepriekš izveidotā standarta līkne (skatīt *LightCycler lietotāja instrukciju*, versija 3.5, B nodaļa, 4.2.5. punkts Kvantitatīvā noteikšana ar ārējo standarta līkni vai versija 4.0, 4.2.2 nodaļa Standarta līknes saglabāšana). Tomēr šī kvantitatīvās noteikšanas metode var izraisīt rezultātu novirzes variācijas dēļ starp dažādām PCR norisēm.

Uzmanību: *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* ir definēti kā kopijas/μl. Lai konvertētu ar standarta līkni iegūtās vērtības parauga materiāla kopijās/ml, izmantojiet šādu vienādojumu:

$$\text{Rezultāts (kopijas/ml)} = \frac{\text{Rezultāts (kop./}\mu\text{l)} \times \text{Eluēšanas tilpums (}\mu\text{l)}}{\text{Paugauga tilpums (ml)}}$$

Lūdzu, ņemiet vērā, ka iepriekš sniegtajā vienādojumā ir būtiski ievadīt sākotnējo parauga tilpumu. Tas jāievēro, ja parauga tilpums ir mainīts pirms nukleīnskābes ekstrakcijas (piemēram, samazinot tilpumu ar centrifugēšanu

vai palielinot tilpumu atkārtotas papildināšanas rezultātā līdz izolējumam nepieciešamajam tilpumam).

Svarīgi: Norādījumi *artus* sistēmu kvantitatīvajai analīzei *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcēs ir pieejami interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (Tehniskā piezīme kvantitatīvajai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcēs).

8.4 PCR sagatavošana

Pārlicinieties, vai dzesēšanas bloks, kā arī kapilāru adapteri (*LightCycler* ierīces piederumi) ir iepriekš atdzesēti līdz +4°C temperatūrai. Ievietojiet vēlamo *LightCycler* kapilāru skaitu dzesēšanas bloka adapteros. Pārlicinieties, vai PCR norisē ir iekļauts vismaz viens *Kvantitatīvās noteikšanas standarts*, kā arī viena negatīva kontrole (*Water, PCR grade*). Lai izveidotu standarta līkni, katrai PCR norisei izmantojiet visus piedāvātos *Kvantitatīvās noteikšanas standartus (Borrelia LC QS 1–4)*. Pirms katras lietošanas reizes visi reaģenti pilnībā jāatkausē, jāsamaisa (atkārtoti ievelkot pipetē un izspiežot no tās vai ātri sajaucot virpuļmikserī) un īsu brīdi jācentrifugē.

Ja vēlaties izmantot *Iekšējo kontroli*, lai monitorētu DNS izolēšanas procedūru un pārbaudītu iespējamo PCR inhibēšanu, tā jau ir pievienota izolējumam (skatīt **8.2. Internal Control**). Šajā gadījumā, lūdzu, izmantojiet turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu (shematisku attēlojumu skatīt Fig. 1):

	Paraugu daudzums	1	12
1. Master Mix sagatavošana	<i>Borrelia LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Borrelia LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Kopējais tilpums	15 µl	180 µl
2. PCR testa sagatavošana	Master Mix	15 µl	katrs 15 µl
	Paraugs	5 µl	katrs 5 µl
	Kopējais tilpums	20 µl	katrs 20 µl

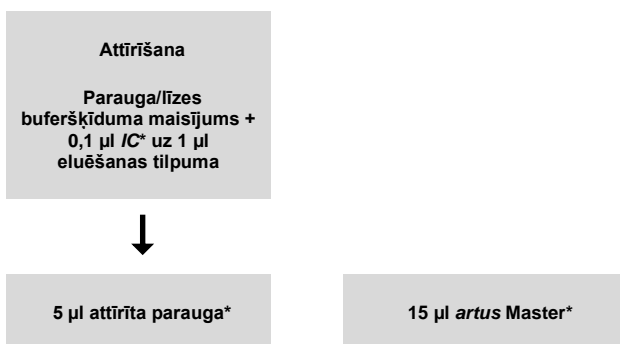
Ja vēlaties izmantot *Iekšējo kontroli* tikai PCR inhibēšanas pārbaudei, to jāpievieno tieši *Borrelia LC Master* šķīdumam. Šajā gadījumā, lūdzu,

izmantojiet turpmāk izskaidroto pipetēšanas shēmu (shematisku attēlojumu skatīt Fig. 2):

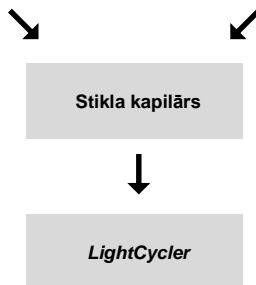
	Paraugu daudzums	1	12
1. Master Mix sagatavošana	<i>Borrelia LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>Borrelia LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Kopējais tilpums	15,5 µl*	186 µl
2. PCR testa sagatavošana	Master Mix	15 µl	katrs 15 µl
	Paraugs	5 µl	katrs 5 µl
	Kopējais tilpums	20 µl	katrs 20 µl

Ar pipeti iepilniet 15 µl Master Mix katra kapilāra plastmasas rezervuārā. Tad pievienojiet 5 µl eluētā parauga DNS. Attiecīgi 5 µl vismaz viena *Kvantitatīvās noteikšanas standarta (Borrelia LC QS 1–4)* jāizmanto kā pozitīvā kontrole un 5 µl ūdens (*Water, PCR grade*) kā negatīvā kontrole. Noslēdziet kapilārus. Lai pārņemtu maisījumu no plastmasas rezervuāra uz kapilāru, 10 sekundes centrifugējiet adapterus ar kapilāriem galda centrifūgā ar maksimālo ātrumu 400 x g (2000 apgr./min).

lekšējās kontroles pievienošana attīrīšanas procedūrai



* Tilpuma palielināšanās *lekšējās kontroles* pievienošanas rezultātā netiek ņemta vērā PCR testa sagatavošanas laikā. Detektēšanas sistēmas jutība netiek samazināta.

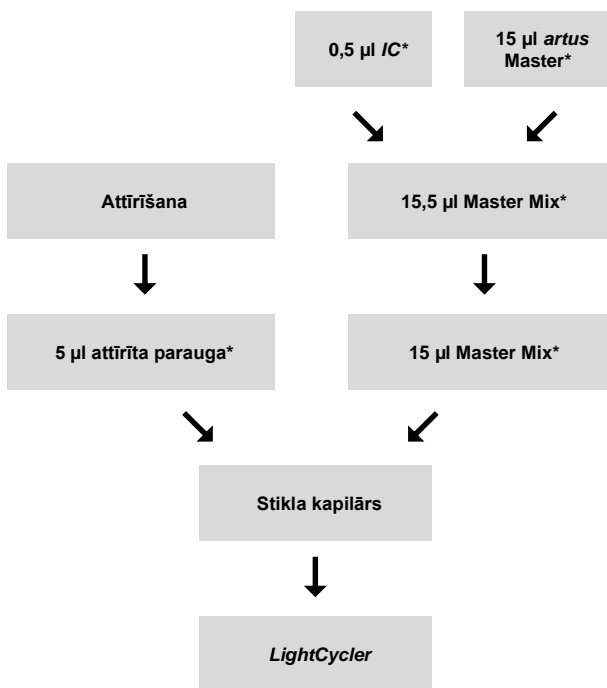


1. att.: Shematiska darba plūsma attīrīšanas procedūras un PCR inhibēšanas kontrolei.

*Pārliecinieties, vai šķīdumi ir pilnībā atkausēti, rūpīgi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

iekšējās kontroles

pievienošana *artus* Master šķīdumam



2. att.: Shematiska darba plūsma PCR inhibēšanas kontrolei.

*Pārliecinieties, vai šķīdumi ir pilnībā atkausēti, rūpīgi sajaukti un īsu brīdi centrifugēti.

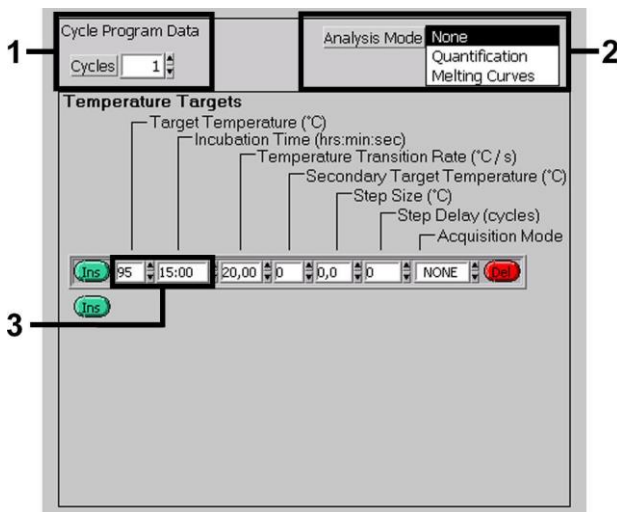
8.5 *LightCycler* ierīču programmēšana

8.5.1 *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīces programmēšana

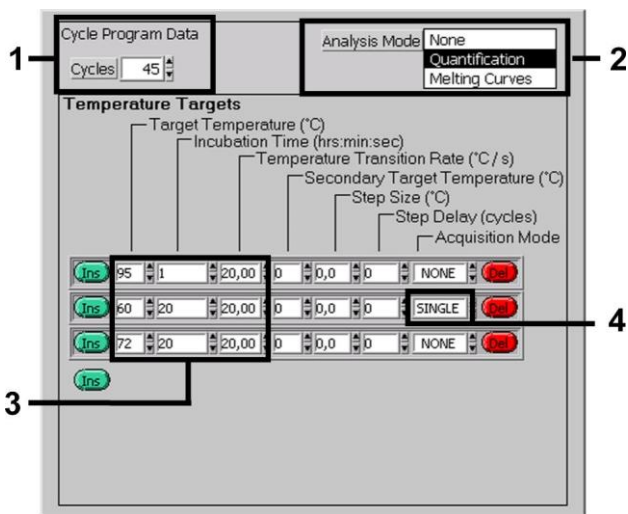
Lai noteiktu *Borrelia* DNS, izveidojiet temperatūras profilu savā *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīcē, ievērojot tālāk minētās trīs darbības (skatīt 3.–5. attēlu).

- A. Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana Fig. 3
- B. DNS amplifikācija Fig. 4

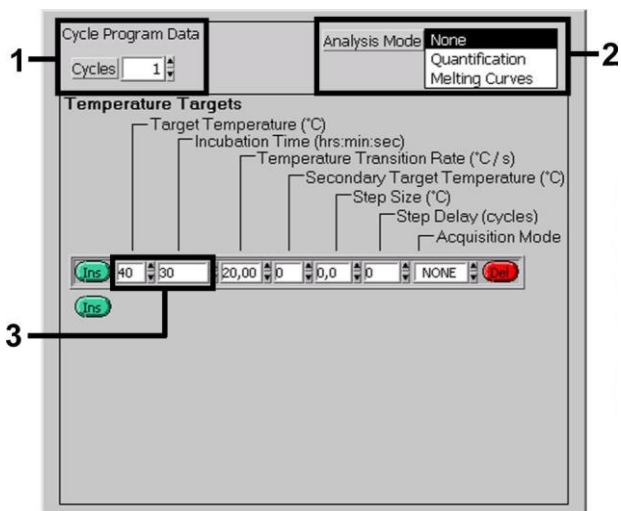
Īpašu uzmanību pievēršiet *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* un *Temperature Targets* iestatījumiem. Attēlos šie iestatījumi attēloti melnajos rāmjos. Detalizēta informācija par *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīces programmēšanu ir pieejama *LightCycler lietotāja instrukcijā*.



3. att.: Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana.



4. att.: DNS amplifikācija.



5. att.: Dzesēšana.

8.5.2 LightCycler 2.0 ierīces programmēšana

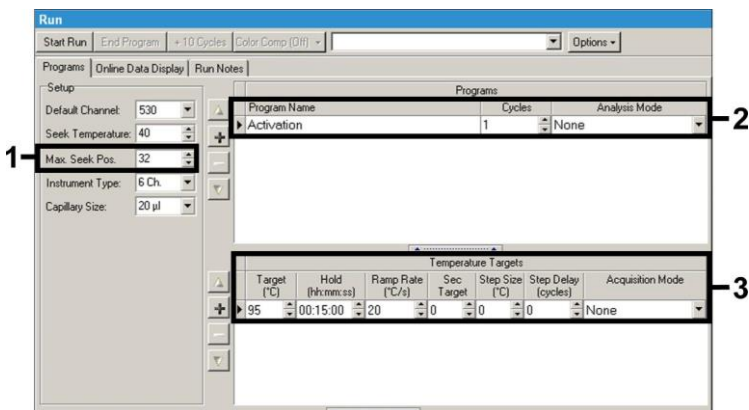
Lai programmētu PCR norisi *LightCycler 2.0* ierīcē, galvenajā izvēlnē aktivizējiet iespēju *New* un izvēlieties *LightCycler Experiment*.

Lai noteiktu *Borrelia* DNS, izveidojiet temperatūras profilu savā *LightCycler 2.0* ierīcē, ievērojot trīs turpmāk minētās darbības (skatīt 6.–8. attēlu).

- A. Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana. Fig. 6
- B. DNS amplifikācija Fig. 7
- C. Dzesēšana Fig. 8

Pievērsiet īpašu uzmanību iestatījumiem, kas attēlos atrodas melnajos rāmjos. Detalizēta informācija par *LightCycler 2.0* ierīces programmēšanu pieejama *LightCycler lietotāja instrukcijā*.

Pārliecinieties, vai vispirms ir ievadīts PCR norisei sagatavoto kapilāru daudzums (*Max. Seek Pos.*, skatīt Fig. 6).



6. att.: Karstā starta enzīma sākotnējā aktivizēšana.

Run

Start Run | End Program | +10 Cycles | Color Comp (Off) | Options

Programs | Online Data Display | Run Notes

Setup

Default Channel: 530

Seek Temperature: 40

Max. Seek Pos.: 32

Instrument Type: 6 Ch.

Capillary Size: 20 µl

Programs			
Program Name	Cycles	Analysis Mode	
Activation	1	None	
Amplification	45	Quantification	

Program Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (h:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:01	20	0	0	0	None
60	00:00:20	20	0	0	0	Single
72	00:00:20	20	0	0	0	None

7. att.: DNS amplifikācija.

Run

Start Run | End Program | +10 Cycles | Color Comp (Off) | Options

Programs | Online Data Display | Run Notes

Setup

Default Channel: 530

Seek Temperature: 40

Max. Seek Pos.: 32

Instrument Type: 6 Ch.

Capillary Size: 20 µl

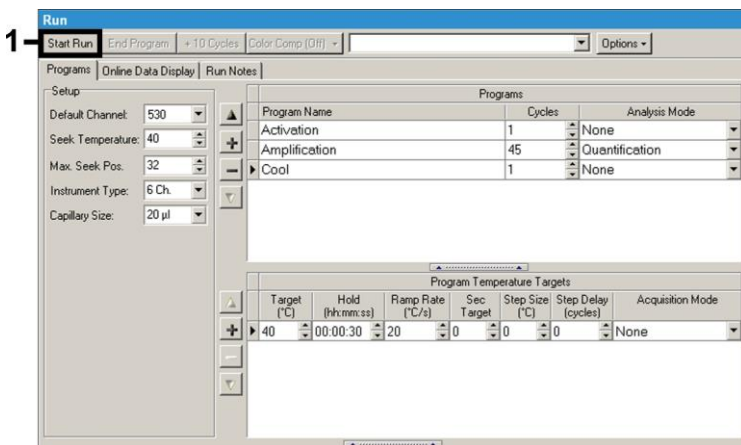
Programs			
Program Name	Cycles	Analysis Mode	
Activation	1	None	
Amplification	45	Quantification	
Cool	1	None	

Program Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (h:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20	0	0	0	None

8. att.: Dzesēšana.

Lai ievadītu parauga specififikācijas, aktivizējiet pogu *Samples*.

- Logā *Capillary View* vispirms ievadiet PCR norises kopējo PCR paraugu daudzumu (*Sample Count*).
- Logā *Sample Name* Jūs varat piešķirt paraugiem nosaukumus.
- Analītiskās *Borrelia PCR* noteikšanai zem *Selected Channels* izvēlieties fluorescences kanālu 530, bet *Iekšējās kontroles PCR* noteikšanai fluorescences kanālu 610.
- Lai definētu standartus un piešķirtu atbilstošu koncentrāciju, zem *Analysis Type* izvēlieties iespēju *Absolute Quantification* (skatīt **8.3. Quantitation**).
- Pārliecinieties, vai **nav** aktivizēta *Enable Controls* funkcija. Citādi analīzes iespēju izvēle datu analīzes veikšanai ir ierobežota (režīms *Fit Points* nav pieejams, skatīt **9.2. PCR datu analīze LightCycler 2.0 ierīcē**). Zem *Target Name* Jūs varat atlasīt izvēlētajos fluorescences kanālos 530 un 610 nosakāmās mērķa sekvenču (*Borrelia* vai *Iekšējā kontrole*). Kolonnas *Target Name* izpildi var atvieglot ar funkciju *Auto Copy*. *Target Name* uzstādīšana palīdz iegūt labāku pārskatu, bet tā nav obligāta datu analīzei.
- Lai izveidotu standarta līkni datu analīzei, jādefinē *Kvantitatīvās noteikšanas standarti* ar to atbilstošu koncentrāciju. Lai to paveiktu, zem *Sample Type* izvēlieties *Standard* un zem *Concentration* ievadiet katram standartam atbilstošu koncentrāciju.
- Ieprogramēto temperatūras profilu iespējams saglabāt datora cietajā diskā, lai to atkal izmantotu nākamajām norisēm. Šim nolūkam aktivizējiet funkciju *Save As*, nospiežot izvēlnē uz *File*. Atvērsies jauns logs. Izvēlieties apakšizvēlni *Run Templates*, uzejot uz *Templates and Macros*, un saglabājiet datus ar atbilstošu nosaukumu.
- Lai sāktu PCR norisi, izvēlieties lauku *Run* un aktivizējiet funkciju *Start Run* (skatīt Fig. 9). PCR programma startēsies, kad ievadīsiet datu saglabāšanas vietu.



9. att.: PCR norises sākšana.

9. Datu analīze

9.1 PCR datu analīze *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīcē

LightCycler 1.1/1.2/1.5 ierīcē iegūto PCR datu analīzei ieteicams izmantot *LightCycler* programmatūras versiju 3.5.

Veicot daudzkrāsu analīzi, rodas traucējumi starp fluorimetra kanāliem. *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīces programmatūrā atrodas fails ar nosaukumu *Color Compensation File*, kas kompensē šos traucējumus. Atveriet šo failu pirms, pēc vai PCR norises laikā, aktivizējot pogu *Choose CCC File* vai *Select CC Data*. Ja fails *Color Compensation File* nav instalēts, izveidojiet to saskaņā ar *LightCycler lietotāja instrukcijas* norādījumiem. Pēc *Color Compensation File* aktivizēšanas parādās atsevišķi signāli fluorimetra kanālos F1, F2 un F3. Ar *artus Borrelia LC PCR* komplektu iegūto PCR rezultātu analīzei izvēlieties fluorescences displeja iespēju F1 analītiskajai *Borrelia* PCR un F2 *leķšējās kontroles* PCR. Lai veiktu norišu kvantitatīvo analīzi, sekojiet norādījumiem **8.3 Quantitation** un **Tehniskajā piezīmē kvantitatīvajai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcēs interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.**

Ir iespējami šādi rezultāti:

1. Signāls ir uztverts fluorimetra kanālā F1.

Analīzes rezultāts ir pozitīvs: Paraugs satur *Borrelia* DNS.

Šajā gadījumā signāla uztveršana F2 kanālā nav obligāta, jo augstas *Borrelia* DNS sākotnējās koncentrācijas (pozitīvs signāls F1 kanālā) var novest pie vāja *lekšējās kontroles* fluorescences signāla vai fluorescences signāla trūkuma F2 kanālā (konkurence).

2. Fluorimetra kanālā F1 nav uztverts signāls. Vienlaicīgi *lekšējās kontroles* signāls parādās F2 kanālā.

Paraugā nav nosakāms *Borrelia* DNS. Rezultātu var uzskatīt par negatīvu.

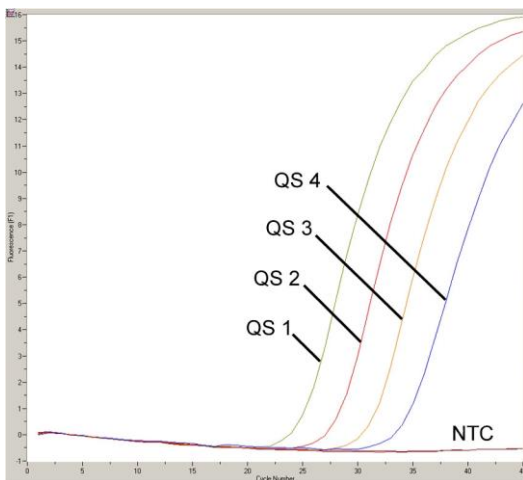
Negatīvas *Borrelia* PCR gadījumā uztverts *lekšējās kontroles* signāls izslēdz PCR inhibēšanas iespēju.

3. Signāls nav uztverts ne F1, ne F2 kanālā.

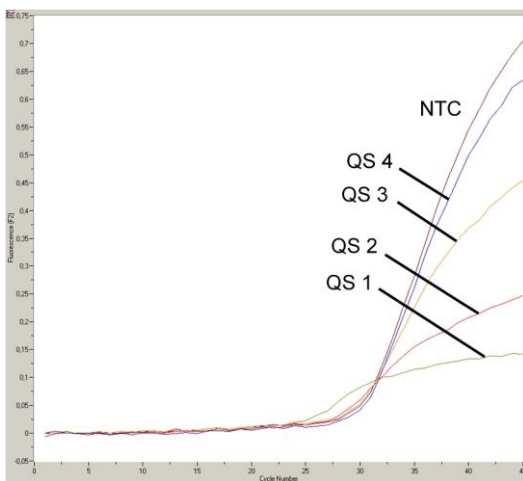
Diagnozi nevar uzstādīt.

Informācija par kļūdu avotiem un to risinājumu ir pieejama **10. Troubleshooting**.

Pozitīvo un negatīvo PCR reakciju piemēri attēloti Fig. 10 un Fig. 11.



10. att.: Kvantitatīvās noteikšanas standartu (*Borrelia* LC QS 1–4) detektēšana *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 instrumenta fluorimetra kanālā F1. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).



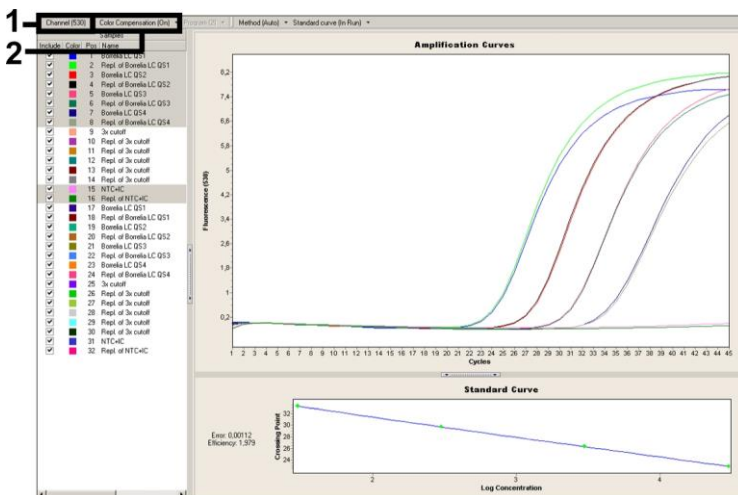
11. att.: Iekšējās kontroles (IC) detektēšana *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīces fluorimetra kanālā F2, vienlaikus veicot Kvantitatīvās noteikšanas standartu (*Borrelia* LC QS 1–4) amplifikāciju. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).

9.2 PCR datu analīze *LightCycler 2.0* ierīcē

LightCycler 2.0 ierīcē iegūto PCR datu analīzei izmantojiet *LightCycler* programmatūras versiju 4.0. Ievērojiet norādījumus, kas izklāstīti *LightCycler 2.0 ierīces lietotāja instrukcijā, versija 4.0*.

PCR datu analīzei veiciet šādas darbības (skatīt Fig. 12):

- Izvēlnes joslā aktivizējiet funkciju *Analysis* un izvēlieties iespēju *Absolute Quantification*. Būtiski, lai visi amplifikācijas dati, kas ir izveidoti ar *artus* LC PCR komplektu, būtu analizēti ar šo funkciju.
- *LightCycler* programmatūras 4.0 versijā ir fails ar nosaukumu *Color Compensation File*, kas kompensē daudzkrāsu analīzes traucējumus starp fluorescences kanāliem. Atveriet šo failu pirms, pēc vai PCR norises laikā, aktivizējot *Color Comp (On/Off)*, un izvēlieties pogu *Select Color Compensation* (skatīt Fig. 12). Ja nav instalēts fails *Color Compensation File*, izveidojiet to saskaņā ar *LightCycler lietotāja instrukcijas* norādījumiem.
- Pēc *Color Compensation File* aktivizēšanas fluorescences kanālos parādās atsevišķi signāli. Ar *artus* *Borrelia* LC PCR komplektu iegūto PCR rezultātu analīzei izvēlieties fluorescences displeja iespēju 530 analītiskajai *Borrelia* PCR un 610 – *Iekšējās kontroles* PCR.



12. att.: *Color Compensation File* aktivizēšana un fluorescences kanāla izvēle.

Lai veiktu norišu kvantitatīvo analīzi, sekojiet norādījumiem **8.3. Quantitation** un **Tehniskajā piezīmē kvantitatīvajai noteikšanai *LightCycler 1.1/1.2/1.5* vai *LightCycler 2.0* ierīcēs interneta vietnē www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.**

Kad analīzes iespējas ir iestatītas, ir iespējami šādi rezultāti:

4. Signāls ir uztverts fluorescences kanālā 530.

Analīzes rezultāts ir pozitīvs: Paraugš satur *Borrelia* DNS.

Šajā gadījumā signāla uztveršana 610 kanālā nav obligāta, jo augstas *Borrelia* DNS sākotnējās koncentrācijas (pozitīvs signāls 530 kanālā) var novest pie *lekšējās kontroles* vāja fluorescences signāla vai fluorescences signāla trūkuma 610 kanālā (konkurence).

5. Fluorescences kanālā 530 nav uztverts signāls. Vienlaicīgi *lekšējās kontroles* signāls parādās 610 kanālā.

Praugā nav nosakāms *Borrelia* DNS. Rezultātu var uzskatīt par negatīvu.

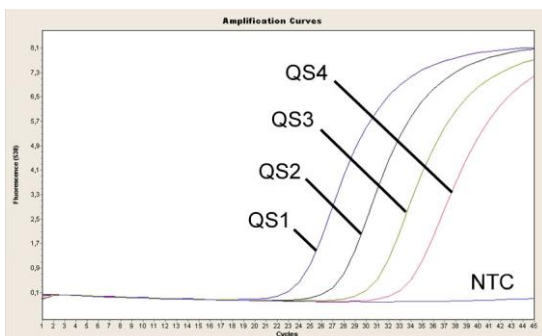
Negatīvas *Borrelia* PCR gadījumā uztverts *lekšējās kontroles* signāls izslēdz PCR inhibēšanas iespēju.

6. Signāls nav uztverts ne 530, ne 610 kanālā.

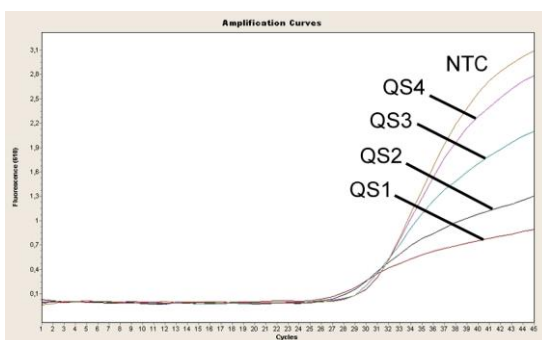
Diagnozi nevar uzstādīt.

Informācija par kļūdu avotiem un to risinājumu ir pieejama **10. Troubleshooting**.

Pozitīvo un negatīvo PCR reakciju piemēri attēloti Fig. 13 un Fig. 14.



13. att.: *Kvantitatīvās noteikšanas standartu (Borrelia LC QS 1–4) detektēšana LightCycler 2.0 instrumenta fluorescences kanālā 530. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).*



14. att.: *Iekšējās kontroles (IC) detektēšana LightCycler 2.0 ierīces fluorimetra kanālā 610, vienlaikus veicot Kvantitatīvās noteikšanas standartu (Borrelia LC QS 1–4) amplifikāciju. NTC: bez matricas kontrole (negatīva kontrole).*

10. Problēmu novēršana

Nav signāla ar pozitīvām kontrolēm (*Borrelia* LC QS 1–4) fluorescences kanālā F1 vai 530:

- PCR datu analīzei izvēlētais fluorescences kanāls neatbilst protokolam.
 - Analītiskajai *Borrelia* PCR datu analīzei izvēlieties fluorescences kanālu F1 vai 530 un *lekšējās kontroles* PCR izvēlieties fluorescences kanālu F2 vai 610.
- Nepareiza *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 vai *LightCycler* 2.0 ierīces temperatūras profila programmēšana.
 - Salīdziniet temperatūras profilu ar protokolu (skatīt **8.5. *LightCycler* Instrumentu programmēšana**).
- Nepareiza PCR reakcijas konfigurācija.
 - Pārbaudiet darba soļus ar pipetēšanas shēmas palīdzību (skatīt **8.4. Preparing the PCR**) un nepieciešamības gadījumā atkārtojiet PCR.
- Uzglabāšanas nosacījumi vienai vai vairākām komplekta sastāvdaļām neatbilst norādījumiem nodaļā **2. Storage** vai *artus Borrelia* LC PCR komplekta derīguma termiņš ir beidzies.
 - Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas nosacījumus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Vājš *lekšējās kontroles* signāls vai nav signāla fluorescences kanālā F2 vai 610 un vienlaikus nav signāla kanālā F1 vai 530.

- PCR apstākļi neatbilst protokolam.
 - Pārbaudiet PCR apstākļus (skatīt iepriekš) un nepieciešamības gadījumā atkārtojiet PCR ar pareiziem iestatījumiem.
- PCR ir inhibēta.
 - Pārlicinieties, vai pielietojat rekomendēto izolēšanas metodi (skatīt **8.1. DNA Isolation**) un stingri ievērojiet ražotāja norādījumus.
 - Pārlicinieties, vai DNS izolēšanas laikā pirms eluēšanas tika veikta rekomendētā papildu centrifugēšana, lai noņemtu jebkādus etilspirta atlikumus (skatīt **8.1. DNA Isolation**).

- DNS ekstrakcijas laikā ir pazaudēta.
 - Ja ekstrakcijai tika pievienota *lekšējā kontrole*, *lekšējās kontroles* signāla trūkums var norādīt uz DNS pazaudēšanu ekstrakcijas laikā. Pārliecinieties, vai pielietojat rekomendēto izolēšanas metodi (skatīt **8.1. DNA Isolation**) un stingri ievērojiet ražotāja norādījumus.
- Uzglabāšanas nosacījumi vienai vai vairākām komplekta sastāvdaļām neatbilst norādījumiem nodaļā **2. Storage** vai *artus Borrelia LC PCR* komplekta derīguma termiņš ir beidzies.
 - Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas nosacījumus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.

Signāli ar negatīvu kontroli analītiskās PCR fluorescences kanālā F1 vai 530.

- PCR sagatavošanas laikā radās kontaminācija.
 - Atkārtojiet PCR ar jauniem reaģentiem replikātos.
 - Ja iespējams, noslēdziet PCR mēģenes tieši pēc testējamā parauga pievienošanas.
 - Pozitīvo kontroli vienmēr pipetējiet pēdējo.
 - Pārliecinieties, vai darba vieta un ierīces tiek regulāri tīrītas.
- Ekstrakcijas laikā radās kontaminācija.
 - Atkārtojiet testējamā parauga ekstrakciju un PCR, izmantojot jaunus reaģentus.
 - Pārliecinieties, vai darba vieta un ierīces tiek regulāri tīrītas.

Ja Jums rodas jautājumi vai problēmas, sazinieties ar mūsu tehnisko dienestu.

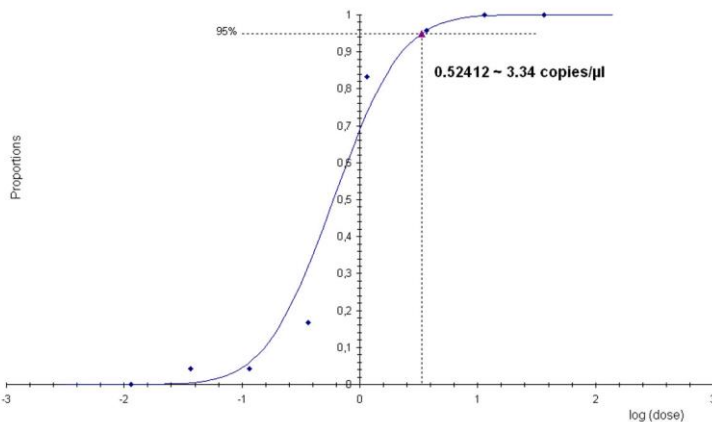
11. Specifikācijas

11.1 Analītiskā jutība

11.1.1 *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīce

Lai noteiktu *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītisko jutību, tika uzstādītas genoma *B. burgdorferi* DNS (DSMZ 4681-30) atšķaidījuma sērijas no 36,5 līdz nominālam 0,0115 *Borrelia* kopijas/μl un analizētas *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīcē, izmantojot *artus* Borrelia LC PCR komplektu. Testēšana tika veikta trīs dažādās dienās, izmantojot astoņus replikātus. Rezultāti tika noteikti ar probita analīzi. Probīta analīzes grafiskais attēlojums ir redzams Fig. 15. *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītiskā detektēšanas robeža savienojumā ar *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīci vienmēr ir 3,34 kopijas/μl ($p = 0,05$). Tas nozīmē, ka pastāv 95% varbūtība, ka 3,34 kopijas/μl tiks detektētas.

Probīta analīze: *Borrelia* (*LightCycler 1.1/1.2/1.5*)

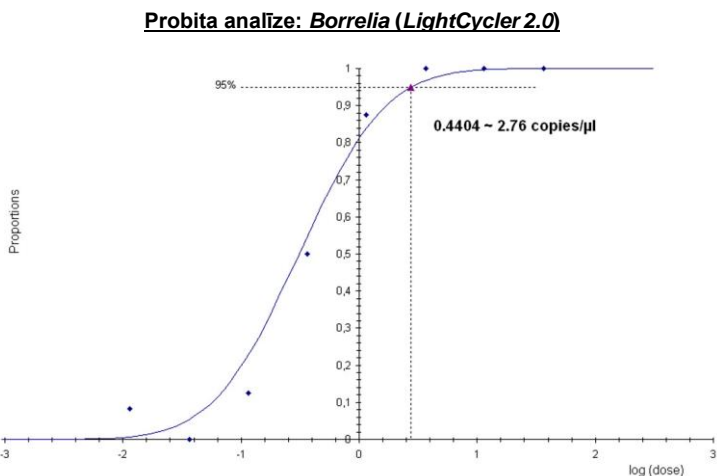


15. att.: *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītiskā jutība *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ierīcē.

11.1.2 *LightCycler 2.0* ierīce

Lai noteiktu *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītisko jutību, tika uzstādītas genoma *B. burgdorferi* DNS (DSMZ 4681-30) atšķaidījuma sērijas no 36,5 līdz nominālam 0,0115 *Borrelia* kopijas/μl un analizētas *LightCycler 2.0* ierīcē,

izmantojot *artus* Borrelia LC PCR komplektu. Testēšana tika veikta trīs dažādās dienās, izmantojot astoņus replikātus. Rezultāti tika noteikti ar probita analīzi. Probita analīzes grafiskais attēlojums ir redzams Fig. 16. *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītiskā detektēšanas robeža savienojumā ar *LightCycler 2.0* ierīci vienmēr ir 2,76 kopijas/μl ($p = 0,05$). Tas nozīmē, ka pastāv 95% varbūtība, ka 2,76 kopijas/μl tiks detektētas.



16. att.: *artus* Borrelia LC PCR komplekta analītiskā jutība *LightCycler 2.0* ierīcē.

11.2 Specifiskums

artus Borrelia LC PCR komplekta specifiskumu pirmkārt un galvenokārt nodrošina praimeru un zonžu, kā arī stingru reakcijas apstākļu izvēle. Prameri un zondes ar sekvenču salīdzināšanas analīzes palīdzību tika pārbaudīti uz iespējamām homoloģijām visām gēnu bankās publicētajām sekvencēm. Tādējādi ir nodrošināta visu *Borrelia* sugu identificējamība (Laima slimības izraisītājs un atguļas tīfa slimības izraisītājs).

Turklāt specifiskums tika apstiprināts ar 32 dažādiem *Borrelia* negatīviem cerebrospinalā šķidrums paraugiem. Paraugi nerādīja nekādus signālus ar

Borrelia LC Master iekļautajiem *Borrelia* specifiskajiem praimeriem un zondēm.

Šādas sugas tika papildus apstiprinātas PCR procedūrā *LightCycler* ierīcē (skatīt Table 1).

1. tabula: Saistīto *Borrelia* sugu specifiskuma testēšana.

<i>Borrelia</i> sugas	Avots	<i>Borrelia</i> (F1 vai 530)	Iekšējā kontrole (F2 vai 610)
<i>B. burgdorferi</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. garinii</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. afzelii</i>	DSMZ ^a	+	+
<i>B. valaisiana</i> *	INSTAND ^a	+	+
<i>B. hermsii</i>	QIAGEN ^a	+	+

^a DSMZ: Vācijas Mikroorganismu un šūnu kultūru kolekcija, Braunšveiga
INSTAND: INSTAND e. V., Diseldorfa (*Düsseldorf*)
QIAGEN: QIAGEN GmbH, Hildene

Lai noteiktu *artus Borrelia LC PCR* komplekta specifiskumu, nākamajā tabulā (skatīt Table 2) minētā kontroles grupa tika pārbaudīta uz krustenisko reaktivitāti. Neviens no pārbaudītajiem slimības izraisītājiem nebija reaktīvs.

* *B. valaisiana* patogenitātes pierādījumus apstiprina vairāki pētījumi (skatīt 15. Atsauces).

2. tabula: Komplekta specifiskuma pārbaude ar potenciāli krusteniski reaģējošiem slimības izraisītājiem.

Kontroles grupa	<i>Borrelia</i> (F1 vai 530)	<i>Iekšējā kontrole</i> (F2 vai 610)
<i>Treponema phagedenis</i>	–	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Bordetella pertussis</i>	–	+
<i>Escherichia coli</i> K12	–	+
<i>Salmonella typhi</i>	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+
<i>Legionella pneumophila</i>	–	+
<i>Legionella longbeachae</i>	–	+
<i>Bacillus anthracis</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
Cilvēka genoma DNS	–	+

11.3 Precizitāte

artus Borrelia LC PCR komplekta precizitātes dati tika savākti ar *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ierīces palīdzību un ļauj noteikt kopējo testa novirzi. Kopējo novirzi veido **vienas analīzes rezultātu variācija** (daudzu paraugu rezultātu mainīgums tādai pašai koncentrācijai viena eksperimenta ietvaros), **dažādu analīžu rezultātu variācija** (daudzu testu rezultātu mainīgums, kas ir iegūti ar tāda paša tipa dažādiem instrumentiem un ko ir veikuši dažādi operatori vienā laboratorijā) un **dažādu partiju analīžu rezultātu variācija** (daudzu testu rezultātu mainīgums, izmantojot dažādas partijas). Iegūtie dati tika izmantoti, lai noteiktu slimības izraisītājam specifiskās un *Iekšējās kontroles* PCR standartnovirzi, variāciju un variācijas koeficientu.

artus Borrelia LC PCR komplekta precizitātes dati tika savākti, izmantojot *B. burgdorferi* genoma DNS (DSMZ 4681-30) šķīdumu ar koncentrāciju 36,5 kopijas/μl. Testēšana tika veikta, izmantojot astoņus replikātus. Precizitātes

dati tika aprēķināti, pamatojoties uz amplifikācijas līkņu Ct vērtībām (Ct: sliekšņa cikls, skatīt Table 3). Pamatojoties uz šiem rezultātiem, katra dotā parauga vispārējā statistiskā izkliede ar minēto koncentrāciju sastāda 0,94% (Ct), *lekšējās kontroles* detektēšanai 1,68% (Ct). Šo vērtību pamatā ir noteikto variāciju visu atsevišķu vērtību kopums.

3. tabula: Precizitātes dati uz Ct vērtību pamata.

	Standartnovirze	Variācija	Variācijas koeficients [%]
Vienas analīzes rezultātu variācija: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopijas/μl)	0,20	0,04	0,59
Vienas analīzes rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,09	0,01	0,29
Dažādu analīžu rezultātu variācija: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopijas/μl)	0,23	0,06	0,69
Dažādu analīžu rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,39	0,15	1,28
Dažādu partiju analīžu rezultātu variācija: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopijas/μl)	0,31	0,10	0,92
Dažādu partiju analīžu rezultātu variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,62	0,38	2,04
Kopējā variācija: <i>Borrelia</i> gDNA (36,5 kopijas/μl)	0,32	0,10	0,94
Kopējā variācija: <i>lekšējā kontrole</i>	0,51	0,26	1,68

11.4 Robustums

Robustuma pārbaude ļauj noteikt kopējo *artus Borrelia* LC PCR komplekta atteižu biežumu. 32 *Borrelia* negatīvos cerebrospinalā šķidrums paraugos tika ievadīts 10 kopijas/μl *Borrelia* kontroles DNS eluēšanas tilpuma (analītiskās jutības robežas aptuveni trīskārtējā koncentrācija). Pēc ekstrakcijas ar QIAamp DNA Mini komplektu (skatīt **8.1. DNA Isolation**) šos paraugus

analizēja ar *artus* Borrelia LC PCR komplektu. Visiem *Borrelia* paraugiem kļūdu intensitāte veidoja 0%. Turklāt *lekšējās kontroles* robustums tika novērtēts, attīrot un analizējot 32 *Borrelia* negatīvus cerebrospinalā šķidruma paraugus. Kopējā kļūdu intensitāte veidoja 0%. Inhibīcijas netika novērotas. Tātad *artus* Borrelia LC PCR komplekta robustums ir $\geq 99\%$.

11.5 Atražošanas spēja

Atražošanas spējas dati ļauj veikt *artus* Borrelia LC PCR komplekta regulāru darbības vērtēšanu, kā arī efektivitātes salīdzināšanu ar citiem produktiem. Šie dati ir iegūti, piedaloties izveidotajās efektivitātes programmās.

11.6 Diagnostikas vērtējums

Šobrīd *artus* Borrelia LC PCR komplekts ir pakļauts vairākiem vērtēšanas pētījumiem.

12. Produkta izmantošanas ierobežojumi

- Visi reaģenti paredzēti izmantošanai tikai in vitro diagnostikā.
- Produktu ir atļauts izmantot tikai personālam, kas ir speciāli apmācīts un trenēts in vitro diagnostikas procedūru veikšanā.
- Lai nodrošinātu optimālus PCR rezultātus, obligāti jāievēro lietotāja instrukcijas norādījumi.
- Nepieciešams pievērst uzmanību derīguma termiņam, kas norādīts uz kastes un visu sastāvdaļu etiķetēm. Neizmantojiet sastāvdaļas, kurām ir beidzies derīguma termiņš.

13. Drošības informācija

artus Borrelia PCR komplekta drošības informācija ir pieejama attiecīgajās drošības datu lapās (SDS). Drošības datu lapas ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas tiešsaistē www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitātes kontrole

Saskaņā ar QIAGEN ISO 9001 un ISO 13485 sertificēto Vispārējo kvalitātes kontroles sistēmu, katra *artus* Borrelia LC PCR komplekta partija ir pārbaudīta uz iepriekš noteiktām specifiskajām, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti.

15. Atsauces

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190–212.
- (2) Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin Microbiol Infect., 1997; 3 (1): 109–116.
- (3) Ryffel K et al. OspA heterogeneity of *Borrelia valaisiana* confirmed by phenotypic and genotypic analyses. BMC Infect Dis., 2003; 3 (1): 14.
- (4) Ryffel K et al. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. J Clin Microbiology, 1999; 37 (12): 4086–4092.

16. Simboli



Derīgs līdz



Partijas numurs



Ražotājs



Kataloga numurs



Materiāla numurs



Rokasgrāmata



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



Etilspirts



Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs



<N>

Satur atbilstošu daudzumu <N> testiem



Temperatūras ierobežojums

QS

Kvantitatīvās noteikšanas standarts

IC

Iekšējā kontrole

Šī lapa ar nolūku ir atstāta tukša

Šī lapa ar nolūku ir atstāta tukša

artus Borrelia LC PCR komplekts

Šī produkta iegāde ļauj pircejam to izmantot, lai ar in vitro diagnostiku sniegtu diagnostikas pakalpojumus cilvēkiem. Ar šo netiek piešķirts neviens vispārējs patents vai jebkāda cita licence, izņemot šīs īpašās lietošanas tiesības pēc iegādes.

Preču zīmes un atrunas
QIAGEN®, QIAamp®, artus®, (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group).

Šajā dokumentā lietotie reģistrētie nosaukumi, preču zīmes u. tml., pat ja nav īpaši atzīmēti, ir aizsargāti ar likumu.

artus Borrelia LC PCR komplekts ir diagnostikas komplekts ar CE marķējumu, kas atbilst Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvai 98/79/EK par medicīnas ierīcēm, ko lieto in vitro diagnostikā. Nav pieejams visās valstīs.

QIAamp DNA Mini komplekts ir paredzēts vispārējai izmantošanai laboratorijā. Netiek pieņemtas nekādas pretenzijas attiecībā uz informācijas sniegšanu par slimības diagnozi, profilaksi vai ārstēšanu.

Ierobežotās licences līgums

Šī produkta lietošana jebkuram artus Borrelia LC PCR komplekta pircejam vai lietotājam nozīmē līgumu ar turpmāk minētajiem noteikumiem.

1. artus Borrelia LC PCR komplektu var lietot tikai saskaņā ar artus Borrelia LC PCR komplekta rokasgrāmatu un tikai ar sastāvdaļām, kas ietilpst šajā komplektā. QIAGEN saskaņā ar jebkuru tā intelektuālo īpašumu nepiešķir licenci lietot vai inkorporēt šī komplekta iekļautās sastāvdaļas jebkurām citām sastāvdaļām, kas nav iekļautas šajā komplektā, izņemot artus Borrelia LC PCR komplekta rokasgrāmatā un papildu protokolos, kas pieejami www.qiagen.com, aprakstīto.
2. Izņemot īpaši norādītas licences, QIAGEN negarantē, ka šis komplekts un/vai tā izmantošana nepārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencēti vienreizējai lietošanai un tos nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārpārdot.
4. QIAGEN īpaši neatzīst citas licences, kas ir izteiktas vai netieši norādītas citādi nekā nepārprotami norādītas.
5. Komplekta pircejs un lietotājs piekrīt neatļaut nevienam citam veikt jebkādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkādas iepriekš aizliegtās darbības. QIAGEN var īstenot šī ierobežotā licences līguma aizliegumus jebkurā tiesā un atgūt visus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, tostarp advokātu atlīdzības, lai jebkurā gadījumā īstenotu šo ierobežotās licences līgumu vai jebkuras tā intelektuālā īpašuma tiesības attiecībā uz komplektu un/vai tā sastāvdaļām.

Atjauninātus licences nosacījumus skatīt www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

www.qiagen.com

Austrālija ■ Pasūtījumiem: 03-9840-9800 ■ Fakss: 03-9840-9888 ■ Tehniskais dienests: 1-800-243-066

Austrija ■ Pasūtījumiem: 0800/28-10-10 ■ Fakss: 0800/28-10-19 ■ Tehniskais dienests: 0800/28-10-11

Beļģija ■ Pasūtījumiem: 0800-79612 ■ Fakss: 0800-79611 ■ Tehniskais dienests: 0800-79556

Brazīlija ■ Pasūtījumiem: 0800-557779 ■ Fakss: 55-11-5079-4001 ■ Tehniskais dienests: 0800-557779

Kanāda ■ Pasūtījumiem: 800-572-9613 ■ Fakss: 800-713-5951 ■ Tehniskais dienests: 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Ķīna ■ Pasūtījumiem: 021-51345678 ■ Fakss: 021-51342500 ■ Tehniskais dienests: 021-51345678

Dānija ■ Pasūtījumiem: 80-885945 ■ Fakss: 80-885944 ■ Tehniskais dienests: 80-885942

Somija ■ Pasūtījumiem: 0800-914416 ■ Fakss: 0800-914415 ■ Tehniskais dienests: 0800-914413

Francija ■ Pasūtījumiem: 01-60-920-926 ■ Fakss: 01-60-920-925 ■ Tehniskais dienests: 01-60-920-930 ■ Piedāvājumiem: 01-60-920-928

Vācija ■ Pasūtījumiem: 02103-29-12000 ■ Fakss: 02103-29-22000 ■ Tehniskais dienests: 02103-29-12400

Honkonga ■ Pasūtījumiem: 800 933 965 ■ Fakss: 800 930 439 ■ Tehniskais dienests: 800 930 425

Īrija ■ Pasūtījumiem: 1800-555-049 ■ Fakss: 1800-555-048 ■ Tehniskais dienests: 1800-555-061

Itālija ■ Pasūtījumiem: 02-33430411 ■ Fakss: 02-33430426 ■ Tehniskais dienests: 800-787980

Japāna ■ Tālrunis: 03-5547-0811 ■ Fakss: 03-5547-0818 ■ Tehniskais dienests: 03-5547-0811

Dienvīdkoreja ■ Pasūtījumiem: 1544 7145 ■ Fakss: 1544 7146 ■ Tehniskais dienests: 1544 7145

Luksemburga ■ Pasūtījumiem: 8002-2076 ■ Fakss: 8002-2073 ■ Tehniskais dienests: 8002-2067

Meksika ■ Pasūtījumiem: 01-800-7742-639 ■ Fakss: 01-800-1122-330 ■ Tehniskais dienests: 01-800-7742-639

Nīderlande ■ Pasūtījumiem: 0800-0229592 ■ Fakss: 0800-0229593 ■ Tehniskais dienests: 0800-0229602

Norvēģija ■ Pasūtījumiem: 800-18859 ■ Fakss: 800-18817 ■ Tehniskais dienests: 800-18712

Singapūra ■ Pasūtījumiem: 65-67775366 ■ Fakss: 65-67785177 ■ Tehniskais dienests: 65-67775366

Zviedrija ■ Pasūtījumiem: 020-790282 ■ Fakss: 020-790582 ■ Tehniskais dienests: 020-798328

Spānija ■ Pasūtījumiem: 91-630-7050 ■ Fakss: 91-630-5145 ■ Tehniskais dienests: 91-630-7050

Šveice ■ Pasūtījumiem: 055-254-22-11 ■ Fakss: 055-254-22-13 ■ Tehniskais dienests: 055-254-22-12

Apvienotā Karaliste ■ Pasūtījumiem: 01293-422-911 ■ Fakss: 01293-422-922 ■ Tehniskais dienests: 01293-422-999

Sample & Assay Technologies

ASV ■ Pasūfījumiem: 800-426-8157 ■ Fakss: 800-718-2056 ■ Tehniskais dienests: 800-DNA-PREP
(800-362-7737)

1050871 151018268

