

2016. szeptember

# artus<sup>®</sup> EBV TM PCR Kit Kézikönyv



24 (Katalógusszám 4501163)



96 (Katalógusszám 4501165)

Kvantitatív in vitro diagnosztika

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

*ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 és 7900HT szekvencia detektáló rendszerekkel való használatra*

1. Kiadás



4501163, 4501165



1046895



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden; GERMANY

R2

MAT

1046895



Sample & Assay Technologies

## QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN, élvonalbeli termékkörrel rendelkezik az innovatív mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák terén, lehetővé téve bármely biológiai minta tartalmának izolálását és detektálását. Korszerű, magas színvonalú termékeink és szolgáltatásaink biztosítják a sikert ügyfeleinknek a mintáktól az eredményekig.

### **A QIAGEN meghatározó az alábbi területeken:**

- DNS, RNS és fehérjék tisztítása
- Nukleinsav- és fehérjevizsgálatok
- mikro-RNS kutatás és RNSi
- Mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy Ön kimagasló sikerek és tudományos áttörések érjen el. További információkért látogasson el honlapunkra: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Tartalom

1. A kit tartalma	4
2. Tárolás	4
3. A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek	4
4. Általános óvintézkedések	5
5. Patogenitási információk	6
6. Real-Time PCR elve	6
7. Alkalmazási terület	6
8. Protokoll	7
8.1 DNS izolálás	7
8.2 <i>Belső kontroll</i>	10
8.4 PCR előkészítése	11
8.5 <i>ABI PRISM SDS</i> készülék programozása	17
9. Adatelemzés	31
10. Hibaelhárítási útmutató	36
11. Teljesítmény-jellemzők	38
11.1 Analitikai érzékenység	38
11.2 Specifitás	39
11.3 Reprodukálhatóság	40
11.4 Diagnosztikai kiértékelés	40
12. A termék használatának korlátjai	40
13. Figyelmeztetések és óvintézkedések	41
14. Minőség-ellenőrzés	41
15. Hivatkozások	41
16. Jelmagyarázat	41

## artus EBV TM PCR Kit

ABI PRISM 7000, 7700 és 7900HT szekvencia detektáló rendszerekkel való alkalmazásra

**Megjegyzés:** Az artus EBV TM PCR Kit nem lehet együttes kombinációban használni sem a GeneAmp® 5700 SDS-el, sem pedig a 384 plate formátumú ABI PRISM 7900HT SDS-el.

### 1. A készlet tartalma

	Jelzések és tartalom	Art. No. 4501163 24 reakció	Art. No. 4501165 96 reakció
<b>Kék</b>	EBV RG/TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Piros</b>	EBV LC/RG/TM QS 1 <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>4</sup> kópia/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Piros</b>	EBV LC/RG/TM QS 2 <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>3</sup> kópia /μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Piros</b>	EBV LC/RG/TM QS 3 <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>2</sup> kópia /μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Piros</b>	EBV LC/RG/TM QS 4 <sup>α</sup> 5 x 10 <sup>1</sup> kópia /μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Zöld</b>	EBV RG/TM IC <sup>α</sup>	1 x 1,000 μl	2 x 1,000 μl
<b>Fehér</b>	Water (PCR grade) (Víz (PCR-minőségű))	1 x 1,000 μl	1 x 1,000 μl

<sup>α</sup> QS = Kvantitációs standard  
IC = Belső kontroll

### 2. Tárolás

Az artus EBV TM PCR kit részegységeit –15 és –30°C közötti hőmérsékleten kell tárolni, ahol a címkén található lejáratú időkig stabilak maradnak. Kerülni kell az ismételt (több, mint kétszeri) felolvasztást és lefagyasztást, mivel ez ronthatja a minőséget. Ha a reagenseket csak alkalmasszerűen használja, aliquotolva fagyasztva tárolja. A 2–8°C-on történő tárolás ne haladja meg az 5 órát.

### 3. A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek

- Egyszer használatos, púder mentes gumikesztyű
- DNS izoláló kit (lásd 8.1 DNS Izolálás)
- Pipetták (állítható)
- Steril, szűrős pipettahegyek
- Vortex keverő
- Asztali centrifuga\* 2 ml-es reakciócsöveknek megfelelő rotorral
- Centrifuga mikrotiter platekhez való rotorral (választható)
- Optikai mérés megfelelő optikai záró anyaggal ellátott 96-well-es reakció plate/ reakció csövek\* (lásd 8.4 PCR előkészítése)
- Optikai reakció csövekhez 96-well-es kétrészes tartó állvány (*96-Well Tálca/Retainer Set*, Katalógusszám: 403 081), lásd 8.4 PCR előkészítés
- Tömörítő pad optikai ragasztó fóliák használatához (*Optical Cover Compression Pads*, Katalógusszám: 4 312 639), lásd 8.4 PCR előkészítése
- Reakció platek ragasztó fóliával való befedésére szolgáló eszköz (*Adhesive Seal Applicator Kit*, Katalógusszám: 4 333 183)
- *ABI PRISM 7000, 7700* vagy *7900HT SDS* készülék

**Megjegyzés:** A tiszta festékek (*Pure Spectra Component File*) és a háttér (*Background Component File*) érvényes kalibrációja csak a készülék üzembe helyezésekor szükséges.

### 4. Általános óvintézkedések

A felhasználó mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Használjon szűrős, steril pipettákat.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakciómixhez térben elkülönített helyen adja hozzá.

---

\* Az optikai vizsgálatokhoz használt kupolás fedővel rendelkező reakció csövek kizárólag az *ABI PRISM 7700 SDS* készülék használatakor engedélyezett és megköveteli az expozíciós idő beállítását. (lásd 8.5.2 Az *ABI PRISM 7700 SDS* programozása, 8.5.2.5 További fontos beállítások)

- Olvassa fel az összes komponenst szobahőmérsékleten (15-25°C) a vizsgálat előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket (fel-le pipettázással, vagy vortex-el) és röviden centrifugálja le.
- Dolgozzon gyorsan és tartsa a PCR reagenseket bemérés előtt jégen vagy a hűtőblokkban.

## 5. Patogenitási információk

Az Epstein-Barr vírus (EBV) orális úton, legtöbbször fertőzött nyállal terjed. Az EBV-fertőzés általában, különösen gyermekkorban, tünetmentes. Az akut fertőzés mononucleosis infectiosa klinikai képében jelenik meg: láz, fáradtság, angina és a nyirokcsomók valamint a lép gyulladása. Egyes pacienseknél ezek a tünetek újból megjelennek. Az EBV fertőzés súlyos formái immundeficiens és T-sejt defektusos betegeknél fordul elő.

## 6. Real-Time PCR elve

A kórokozó kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR) történik, mely a kórokozó genom specifikus szakaszának amplifikációján alapszik. A valós idejű PCR esetében az amplifikált terméket fluoreszcens festék mutatja ki. A festék általában olyan oligonucleotidhoz van kapcsolva, mely specifikusan kötődik az amplifikált termékhez. A fluoreszcencia intenzitásának a PCR futtatása alatti (azaz valós idejű) követése lehetővé teszi a termék kimutatását és kvantifikálását anélkül, hogy a PCR-reakció végén ki kelljen nyitni a csöveket (Mackay, 2004).

## 7. Alkalmazási terület

Az *artus* EBV TM PCR Kit egy azonnal használható rendszert képez az EBV DNS kimutatására polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT* szekvencia detektáló rendszereken. Az *EBV RG/TM Master* olyan reagenseket és enzimeket tartalmaz, mely az EBV genomjának a 97 bp-os specifikus régióját amplifikálja. Az amplicon detektálása FAM fluoreszcencia méréssel történik *ABI PRISM SDS* készüléken. Továbbá az *artus* EBV TM PCR Kit egy második heterológ amplifikációs rendszert is tartalmaz a PCR esetleges gátlásának kimutatására. Ez belső kontrollként a VIC fluoreszcens jelölés detektálásával mérhető. Az analitikai EBV PCR kimutatási határa nem csökken. (lásd 11.1 Analitikai érzékenység). Külső pozitív kontrollok (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*) is találhatóak a kitben, melyek a patogén felhalmozódás mértékét

határozzák meg. További információért kérjük tájékozódjon a 8.3 Kvantitálás fejezetben.

## 8. Protokoll

### 8.1 DNS izolálás

Különböző gyártók különböző DNS izoláló kitéket javasolnak. A DNS izolálási folyamathoz felhasznált mintamennyiség a használt protokolltól függ. Kérjük, hogy a DNS izolálást a gyártó utasításai szerint végezze. A következő izoláló kiték használata ajánlott:

Mintatípus	Nukleinsav izoláló kit	Katalógusszám	Gyártó	Hordozó RNS
Szérum, plazma, CSF	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	nem tartalmaz
	QIAamp UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	tartalmaz
Vérsejtek	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	nem tartalmaz
Plazma	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	tartalmaz

\*Az EZ1® DSP Virus Kit-et a BioRobot® EZ1 DSP munkaállomással (Katalógusszám 9001360) és az EZ1 DSP Virus Card (Katalógusszám 9017707) kombinálva kell használni.

**Fontos megjegyzés a QIAamp UltraSens Virus Kit, a QIAamp DNA Blood Mini Kit és a QIAamp DNA Mini Kit használata során:**

- A **hordozó RNS** alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és ennek következtében a DNS/RNS kinyerésre. Ha a választott izoláló kit nem tartalmaz hordozó RNS-t, kérjük vegye figyelembe a hordozók izolációs rendszerbe történő bevitele (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Cat. No. 27-4110-01) erősen ajánlott a sejtmentes testfolyadékokból, valamint alacsony DNS/RNS tartalmú mintákból (pl. CSF) történő nukleinsav kinyeréshez. Kérjük a következő esetekben az alábbiak szerint járjon el:

- a) Szuszpendáljuk fel a liofilizált hordozó RNS-t az extrakciós kit elúciós pufferének használatával (ne használjon lízis puffert) (pl. QIAamp DNA Mini Kit AE pufferét) és készítse el az oldatot 1 µg/µl hígítási koncentrációban. Az így elkészített RNS hordozót tartalmazó oldatot az Ön igényeinek megfelelően készítsen belőle aliquotokat és –20°C-on tárolja őket. Kerülje az ismételt (több, mint kétszeri) felolvasztását és lefagyasztását a hordozó RNS aliquotoknak.
- b) 1 µg hordozó RNS-t 100 µl lízis pufferrel használjon. Például, ha az extrakciós protokoll 200 µl lízis puffert javasol, kérjük adjon hozzá 2 µl if hordozó RNS-t (1 µg/µl) közvetlenül a kimért lízis pufferbe. Minden egyes extrakciós lépés előtt a lízis puffer és a hordozó RNS keverékét (és az *“Internal Control”*, Belső kontrollt, adott esetben lásd. 8.2 Belső kontroll) frissen készítse elő az alábbi pipettázási táblázatot követve:

Mintaszámok	1	12
Lízis puffer	pl. 200 µl	pl. 2,400 µl
Hordozó RNS (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Teljes térfogat	202 µl	2,424 µl
Extrakciónkénti térfogat	200 µl	egyenként 200 µl

c) Kérjük a frissen készített lízis puffer és hordozó RNS keveréket azonnal használja fel az extrakcióhoz. A keverék tárolása nem lehetséges.

- A hordozó RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és ennek következtében a DNS/RNS kinyerésre. QIAamp UltraSens Virus Kit használata során a hordozó RNS stabilitásának növelése érdekében, az alábbi eljárást javasoljuk, mely eltérhet az extrakciós kit felhasználói kézikönyvében leírtaktól:

- a) Szuszpendálja fel a liofilizált hordozó RNS-t az extrakciós kit első használata előtt 310 µl elúciós pufferben a kitben javasoltak alapján (végkoncentráció 1 µg/µl, ne használjon lízis puffert). A hordozó RNS tartalmú oldatot az igényei szerint aliquotolja és –20°C tárolja őket. Kérjük, hogy a hordozó RNS-t tartalmazó aliquotnak az ismételt (több, mint kétszeri) felolvasztását és lefagyasztását kerülje.



b) Külön, minden egyes extrakció kezdete előtt a lízis puffert és hordozó RNS-t tartalmazó keveréket (és *Belső kontrollt*, ahol szükséges, lásd 8.2 *Belső kontroll*) frissen készítse elő az alábbi pipettázási táblázatot követve:

Mintaszám	1	12
Lízis puffer AC	800 µl	9,600 µl
Hordozó RNS (1 µg/µl)	5.6 µl	67.2 µl
<b>Teljes térfogat</b>	<b>805.6 µl</b>	<b>9,667.2 µl</b>
<b>Extrakciónkénti térfogat</b>	<b>800 µl</b>	<b>egyenként 800 µl</b>

c) Kérjük a frissen készített lízis puffer és hordozó RNS keveréket azonnal használja fel az extrakcióhoz. A keverék tárolása nem lehetséges.

- Ajánlott, hogy a DNS-t 50 µl elúciós pufferbe eluáljuk, hogy az *artus EBV TM PCR Kit* legnagyobb detektálási érzékenységét ériük el.
- A **QIAamp UltraSens Virus Kit** lehetővé teszi a minta koncentrációját. Amennyiben szérumtól vagy plazmától eltérő kiindulási mintát használ, kérjük adjon negatív human plazmát legalább 50 % (v/v)-ban a mintához.
- Az anikoagulánsokkal borított vérvételi csövek gátolhatják a PCR reakciót. Azonban, ezek a gátló anyagok eliminálhatóak a rendszerből a fentebb listázott izoláló kitek használatával. A heparinos vérminták használata elkerülendő.
- Amennyiben az izolálási protokollt **etanol** tartalmú mosópufferrel végzi, kérjük, hogy az elúció előtt további centrifugálási lépést (három perc, 13,000 rpm) illesszen be a protokollba, a visszamaradó etanolt eltávolítására. Így megelőzhető a PCR lehetséges gátlása.
- Az *artus EBV TM PCR Kit* nem használható fenol alapú izoláló módszerekhez.

#### Fontos megjegyzés az EZ1 DSP Virus Kit használata során:

- A hordozó RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és ennek következtében a DNS/RNS kinyerésre. Adjon minden extrakcióhoz megfelelő mennyiségű hordozó RNS-t a EZ1 DSP Virus Kit kézikönyvében leírtaknak megfelelően.

**Fontos:** Az *artus* EBV TM PCR Kit belső kontrollja közvetlenül az izolálási eljárás során adható hozzá. (lásd 8.2 *Belső kontroll*).

## 8.2 *Belső Kontroll*

A készlet részét képezi a belső kontroll is (*EBV RG/TM IC*). Ez lehetővé teszi a felhasználónak a DNS-izolálási eljárás kontrollálását és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzését. (lásd 1. ábra). Az extrakcióhoz használt **EZ1 DSP Virus Kit** belső kontrollját az *EZ1 DSP Virus Kit kézikönyvében* leírt utasításokat követve adják hozzá a reakcióelegyhez. A **QIAamp UltraSens Virus Kit**, a **QIAamp DNA Blood Mini Kit** vagy a **QIAamp DNA Mini Kit** használata esetén a belső kontrollt az izoláláshoz adja 0.1 µl-t 1 µl elúciós térfogathoz. Például, ha a QIAamp UltraSens Virus Kit-et használja, akkor a DNS 50 µl AVE-pufferben kerül eluálásra. Ezért az eljárás elején 5 µl belső kontrollt szükséges hozzáadni.

A felhasznált belső kontroll mennyisége **kizárólag** az elúciós térfogattól függ. A belső kontrollt és a hordozó RNS-t (lásd. 8.1 DNS izolálás) csak az alábbiakhoz kell hozzáadni,

- lízis puffer és minta keveréke vagy
- közvetlenül a lízis pufferhez.

A belső kontrollt tilos a feldolgozandó mintához adni. Amennyiben a lízis pufferhez adta a belső kontrollt, ügyeljen arra, hogy a belső kontrollt és a lízis puffert és lízis puffert/hordozó RNS-t frissen készítse elő és azonnal használja fel (a keverék szobahőmérsékleten vagy hűtőben tárolva a belső kontroll néhány órán belül tönkremegy, ezáltal csökkent extrakciós hatékonyságot okozhat). Kérjük, hogy a belső kontrollt és a hordozó RNS-t **ne** adja közvetlenül a mintához.

A belső kontroll opcionálisan kizárólag az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére is alkalmazható (lásd 2. ábra). Ebben az esetben, adjon reakciónként 2 µl belső kontrollt közvetlenül 30 µl *EBV RG/TM Master*-hez. Minden egyes PCR reakcióhoz 30 µl master mixet készítsen az előzőekben leírtak alapján és adjon hozzá 20 µl tisztított mintát. Amennyiben a PCR futtatást több mintára készíti elő, a minta számokhoz viszonyítva növelje az *EBV RG/TM Master* master mix és belső kontroll térfogatát. (lásd 8.4 PCR előkészítése).

## 8.3 *Kvantifikálás*

A mellékelt kvantifikálási standardok (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*) a korábban már megtisztított mintáknak megfelelően kerülnek kezelésre, térfogatuk is azonos (20 µl). A standard görbe *ABI PRISM Sequence Detection System* készülékeken

történi létrehozásához mind a 4 kvantifikálási standardot használni kell, valamint a megadott koncentrációval együtt kell őket definiálni (lásd 8.5 *ABI PRISM SDS* programozása). A standard görbék importálása az előzetes futtatásokból nem lehetséges az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT SDS* szoftverének alkalmazásakor.

**Megjegyzés:** A kvantifikálási standardok mértékegysége kópia/μl. A standard görbe által meghatározott értékeket az alábbi egyenlet segítségével lehet átszámolni a minták kópia/ml értékeire:

$$\text{Eredmény (kópia/ml)} = \frac{\text{Eredmény (kópia/}\mu\text{l)} \times \text{Elúciós térfogat (}\mu\text{l)}}{\text{Mintatérfogat (ml)}}$$

Alapelvként a fenti egyenletbe a kezdeti mintatérfogatot kell beírni. Ezt akkor kell felülvizsgálni, ha a minta térfogata a nukleinsav-extrakció előtt változott (pl. csökkenés centrifugálás miatt, vagy növekedés az izoláció miatt hozzáadott térfogat következtében).

**Fontos:** Az *artus* rendszer kvantitatív irányelvei az *ABI PRISM 7000 SDS*-en elérhetőek az alábbi weboldalon

[www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (Technical Note for quantitation on the *ABI PRISM 7000 SDS*).

## 8.4 PCR előkészítése

Készítse elő a felhasználni kívánt reakciócsöveket vagy a 96-well-es reakció platek-et a tervezett reakciókhoz. Az ajánlott eszközök listája az alábbi táblázatban található:

Termék	Leírás	Kataógusszám	Gyártó	Tartó állvány*	Tömörítő pad
96-well-es optikai reakció plate	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nem	–
Optikai ragasztó fólia	<i>Optical Adhesive Covers</i>	4 311 971	Applied Biosystems	–	igen
Optikai reakció csövek	<i>ABI PRISM</i> Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	igen	–
Optikai reakció csövek	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	igen	–
Optikai fedő (lapos)	<i>ABI PRISM</i> Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	–	nem

**Megjegyzés:** Az optikai vizsgálatokhoz használt kupolás fedővel rendelkező reakció csövek kizárólag az *ABI PRISM 7700 SDS* készülék használatakor engedélyezett és megköveteli az expozíciós idő beállítását. (lásd 8.5.2 *ABI PRISM 7700 SDS* programozása, 8.5.2.5 További fontos beállítások).

A PCR reakció előkészítésekor ügyeljen arra, hogy legalább egy belső kontrollt és egy negatív kontrollt (Víz, PCR-tisztaságú) használjon párhuzamosan egy PCR futtatás során. Standard görbe készítésekor To generate a standard curve, használja az összes *kvantifikálási standardot (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4)* minden egyes PCR futtatás során. Minden használat előtt az összes reagenst teljesen olvassza fel, ezután keverje meg (pipetázza többször fel és le, vagy röviden vortexelje), majd röviden centrifugálja.

Ha belső kontrollt használ a **DNS-izolálási eljárás kontrollálására és az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére**, azt már adja hozzá az izoláláshoz (lásd 8.2

\* A kétrészes tároló állvány használatakor, a reakció csöveket ki kell nyitni a tárolóba való behelyezéskor és tárolóból történő kivételekor. Annak érdekében, hogy elkerüljék a szennyeződést kizárólag csak a tároló állvány alsó részét használják.

Belső kontroll). Ebben az esetben kövesse az alábbi pipettázási vázlatot (vázlatos áttekintés 1. ábra):

	Mintaszám	1	12
1. Mastermix előkészítése	<i>EBV RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>EBV RG/TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
2. PCR assay-k előkészítése	Mastermix	30 µl	30 µl egyenként
	Minta	20 µl	20 µl egyenként
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl egyenként</b>

Ha belső kontrollt csak az esetleges PCR-gátlás ellenőrzésére használja, közvetlenül az *EBV RG/TM Master*-hez adja azt. Ebben az esetben, kérjük az alábbi pipettázási vázlatot kövesse (vázlatos áttekintés 2. ábra):

	Mintaszám	1	12
1. Mastermix előkészítése	<i>EBV RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>EBV RG/TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>
2. PCR assay-k előkészítése	Mastermix	30 µl*	30 µl egyenként*
	Minta	20 µl	20 µl egyenként
	<b>Teljes térfogat</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl egyenként</b>

Pipetázzon 30 µl master mixet minden egyes PCR-csőbe vagy minden egyes well-be a 96-well-es reakció plate-en. Ezután adjon hozzá 20 µl-t az eluált minta DNS-ből. majd ismételt fel-le pipettázással keverje össze. Zárja le a reakciócsöveket a megfelelő zárósapkákkal, vagy amikor a 96-well-es reakció plate-et használja fedje le az optikai ragasztható fedőfóliával (Optical Adhesive Covers). Centrifugálja le a reakciócsöveket (tárolóállványban vagy PCR csövekben) vagy microtiter plate rotor segítségével a 96-well-es reakció

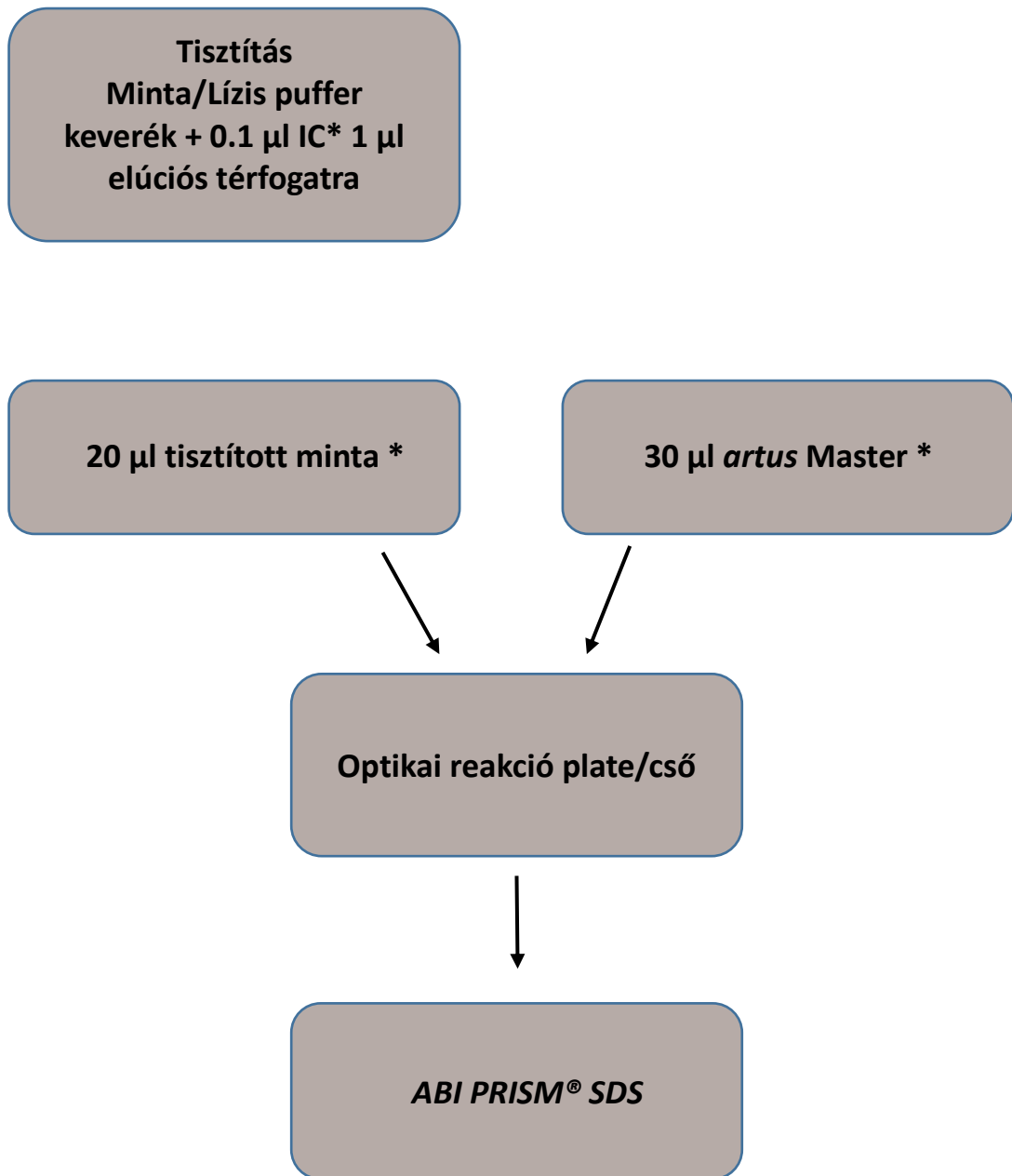
\* A belső kontroll hozzáadása általi térfogatnövekedés elhanyagolható a PCR assay előkészítése során. A detektálási rendszer érzékenységét nem befolyásolja.

platek-et 30 másodpercig 1,780 x g (4,000 rpm)-en annak érdekében, hogy összegyűjtse az előkészített reakció térfogatot a cső vagy a well alján. Ha egy ilyen centrifuga nem áll rendelkezésére, kérjük, győződjön meg arról, hogy mind a mastermix-és mintatérfogat a csövek vagy well-ek aljára lettek pipettázva. Az elkészített reakciót +4°C-on tárolhatja az *ABI PRISM SDS* készülék beprogramozásáig (lásd 8.5 ABI PRISM SDS készülék programozása) és ezt követően helyezze be a készülékbe a reakciókat.

### **Megjegyzés:**

- Ha az optikai reakció csöveket az optikai fedőkkel használja mindig tegyen egy rögzítő állványt (96-Well Tray/Retainer Set) a készülékbe a (ABI PRISM 7000, 7700 and 7900HT SDS). A kétrészes tároló állvány használatakor, a reakció csöveket ki kell nyitni a tárolóba való behelyezéskor és tárolóból történő kivételekor. Annak érdekében, hogy elkerüljék a szennyeződést kizárólag csak a tároló állvány alsó részét használják.
- 96-well-es optikai plate használata ragasztható fedőfólia használatát követeli meg tömörítő pad használatával együtt (*Optical Cover Compression Pads*).

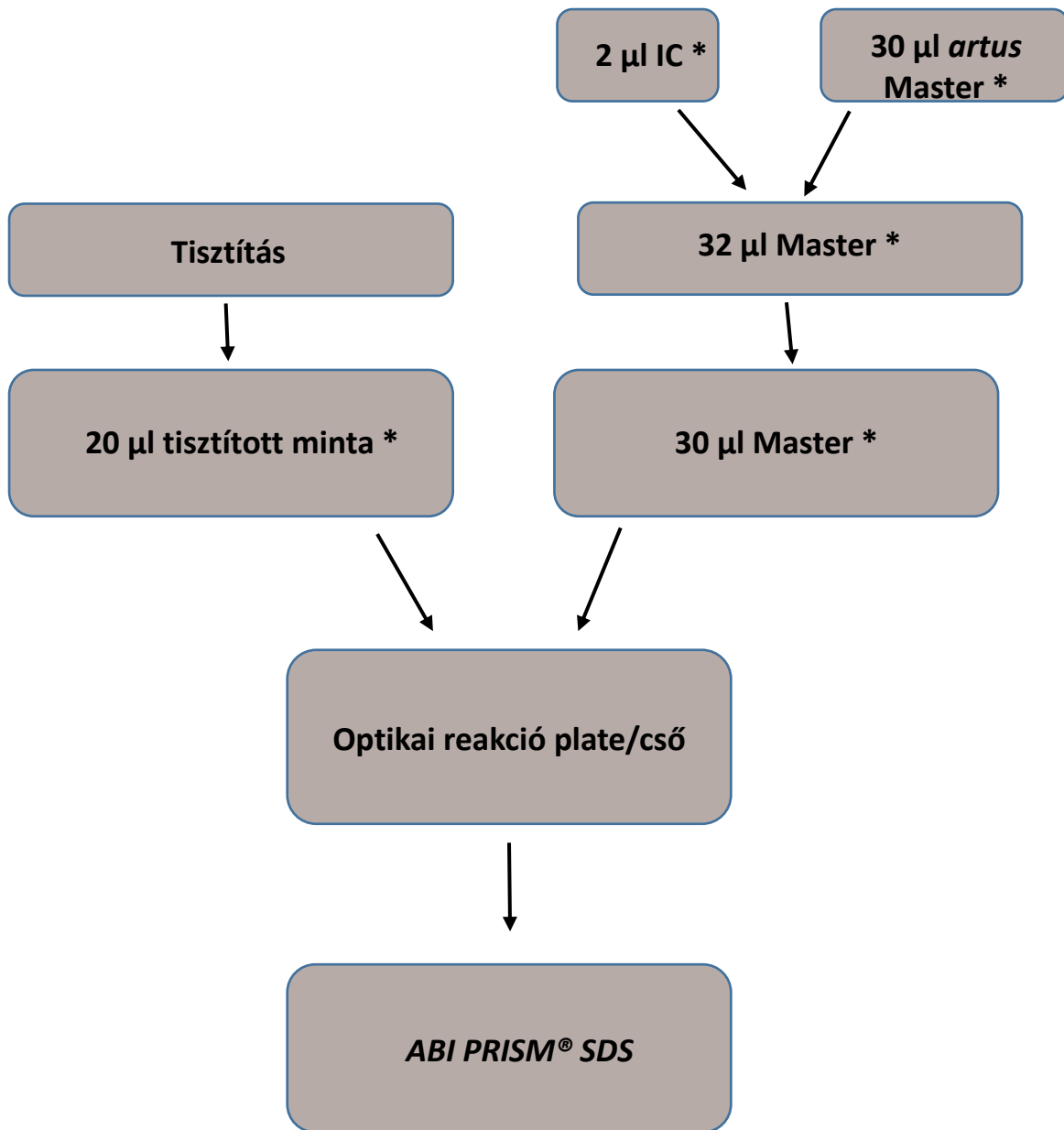
## A Belső kontroll hozzáadása a tisztítási eljáráshoz



1.ábra: Sematikus munkafolyamat a tisztítási eljárás és PCR gátlás ellenőrzéséhez.

\*Kérjük ügyeljen arra, hogy az oldatot megfelelően rázza össze, jól keverje fel és óvatosan centrifugálja le.

Az *artus* master mixhez történő belső kontroll hozzáadása



2.ábra: Sematikus munkafolyamat a PCR gátlás ellenőrzéséhez.

\* Kérjük ügyeljen arra, hogy az oldatot megfelelően rázza össze, jól keverje fel és óvatosan centrifugálja le.



## 8.5 ABI PRISM SDS készülék programozása

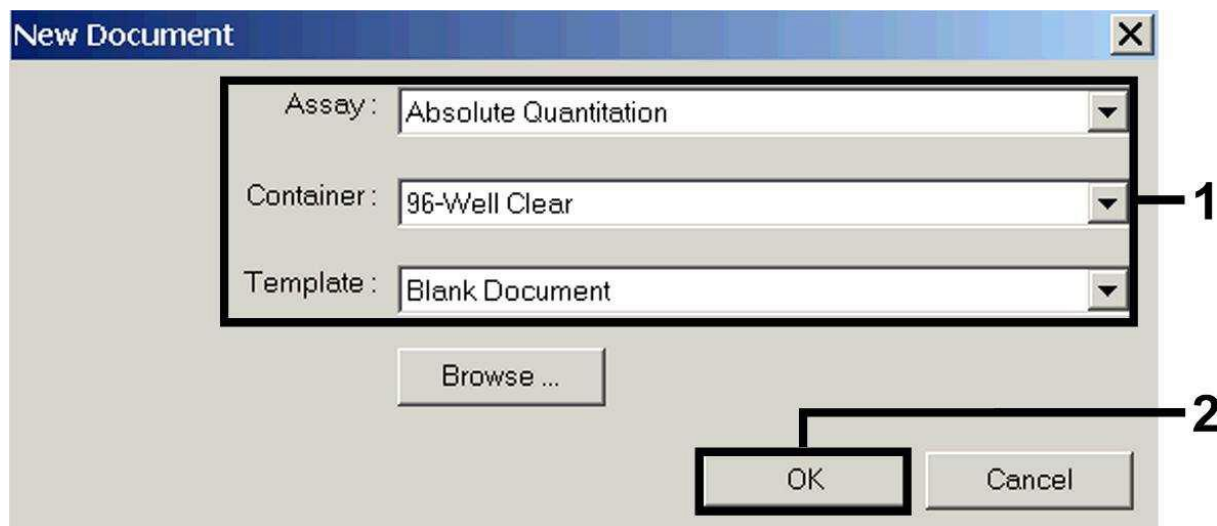
Az ABI PRISM 7000, 7700 és 7900HT Sequence Detection Systems (SDS) készülékek szoftvere néhány további információt igényel a PCR reakció futtatása előtt. A készülékek programozási folyamatai, azonban egymástól jelentősen eltérnek, ezért ezekről a következő fejezetekben bővebb információt talál.

### 8.5.1 ABI PRISM 7000 SDS készülék programozása

Az EBV DNS detektálására hozzon létre egy profilt az ABI PRISM 7000 SDS készüléken a következő hat lépés szerint (8.5.1.1 – 8.5.1.6). Minden specifikáció ABI PRISM 7000 SDS szoftver 1.0.1. verziójára utal. Az ABI PRISM 7000 SDS programozásának részleteiről kérük tájékozódjon az ABI PRISM 7000 SDS felhasználói kézikönyvből. A jobb áttekinthetőség érdekében a szoftver beállításait vastag keretbe foglalva találja.

#### 8.5.1.1 Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához

Válassza ki a "New" elemet a File menüből az ABI PRISM 7000 SDS készülék szoftveréből programozza be az új dokumentumot a következő kezdeti beállításokat alapján (lásd 3. ábra). A biztonsági sablon (SDS Template [\*.sdt]) a "Template" listában áll rendelkezésre vagy kiválaszthatja a "Browse" funkciót (lásd 8.5.1.5 PCR futás mentése). Erősítse meg az elő-beállításokat (OK).



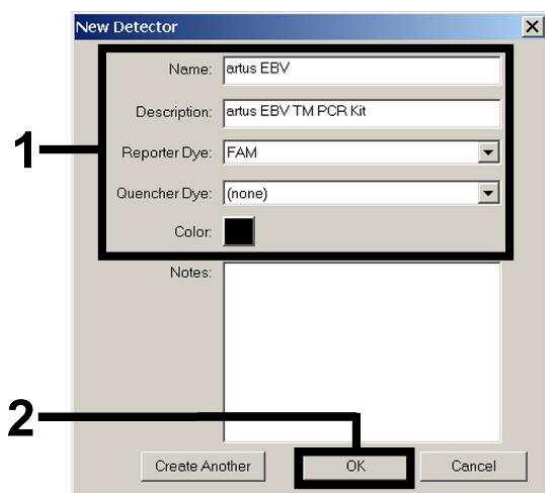
3. ábra: Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához (New Document).

#### 8.5.1.2 Detektorok létrehozása/kiválasztása

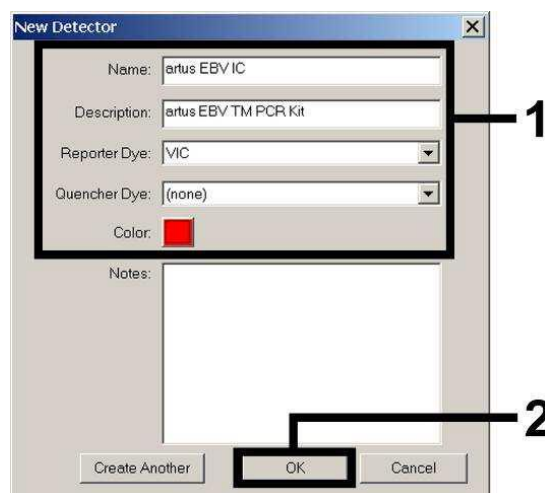
A "Detector Manager" almenü segítségével a "Tools" menüből meg kell jelölni a megfelelő detektáló festék fajtáját a fájlból. Az EBV DNS kimutatására, valamint az EBV TM PCR Kit belső kontrolljának detektálására, az alábbi táblázatban listázott riportereket/quenchereket határozták meg:

Detektálás	Riporter	Quencher
EBV DNS	FAM	nincs
Belső kontroll (EBV RG/TM IC)	VIC	nincs

Ahhoz, hogy létrehozza ezeket a detektorokat, válassza ki "File" (bal alsó sarkában a "Detector Manager"-t) és ezt követően az "New" opciót.

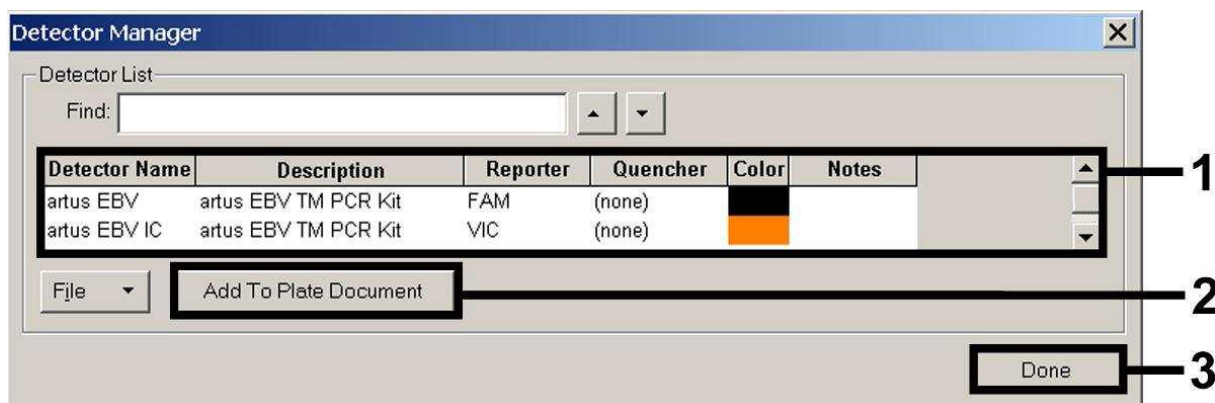


4.ábra: Hozza létre az EBV specifikus detektort (*Detector Manager*).



5.ábra: Hozza létre a belső kontroll specifikus detektort (*Detector Manager*).

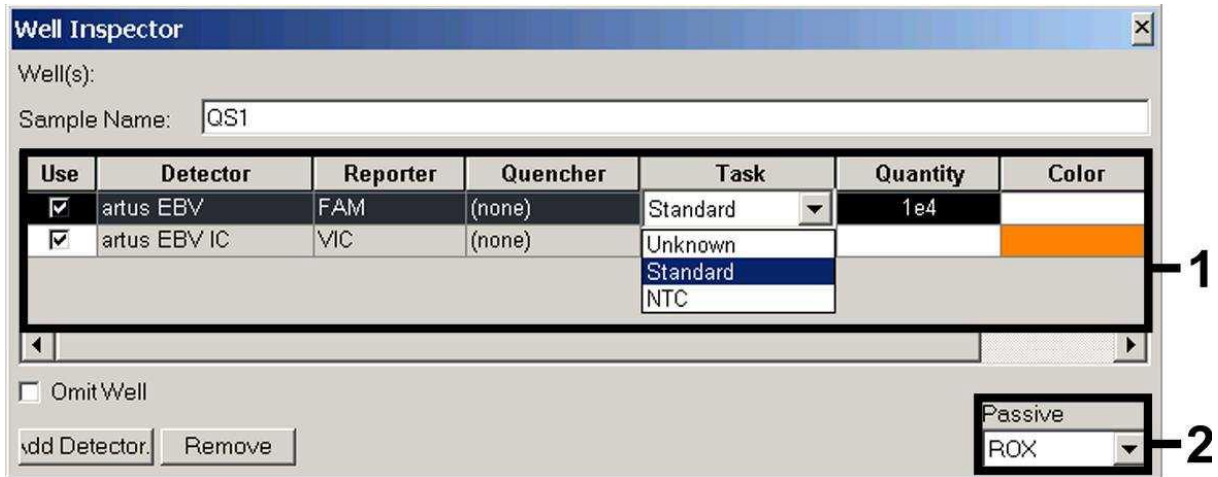
Az EBV DNS kimutatására határozza meg a reporter/quencher kombinációt **FAM/none** az új ablakban. A belső kontroll detektálására válassza ki a **VIC/none** kombinációt (amint a 4. ábra és 5. ábra mutatja). A bemeneti adatok megerősítésével (OK), térjen vissza a "Detector Manager"-hez. Jelölje ki az újonnan létrehozott detektorokat és minden kijelölést helyezzen át a "Well Inspector"-be az "Add to Plate Document" opcióra kattintva (lásd 6.ábra). Zárja be az ablakot (Done).



6.ábra: Detektorok kiválasztása (*Detector Manager*).

### 8.5.1.3 Szükséges információk hozzárendelése a plate pozíciókhoz

Nyissa meg a "Well Inspector"-t a "View" menüből, hogy kiválaszthassa a detektorokat 8.5.1.2 (lásd 7.ábra).



7.ábra: Szükséges információk hozzárendelése a plate pozíciókhoz (*Well Inspector*).

Jelölje meg azon plate pozíciókat, melyek az EBV DNS detektálására fenntartott helyeket jelentik. Rendelje a kiválasztott detektorokat ezekhez a pozíciókhoz a "Use" opció aktiválásával mindkét detektor esetében, amelyen majd egy pipa fog megjelenni. Minden egyes egyedüli reakció elnevezésére válassza ki a megfelelő pozíciót a platen és adja meg a nevet (*Sample Name*). Kérjük vegye figyelembe, hogy az előkészített minta megegyező neve "Sample Name" és a detektor megegyező jelölése replikaként fogja őket azonosítani a szoftver és a kvantifikált patogén mennyisége alapján átlagolni fogja a detektált eredményüket. Ezután válassza ki a megfelelő funkciót (*Task*) minden minta típusának megfelelően az következő táblázat alapján:

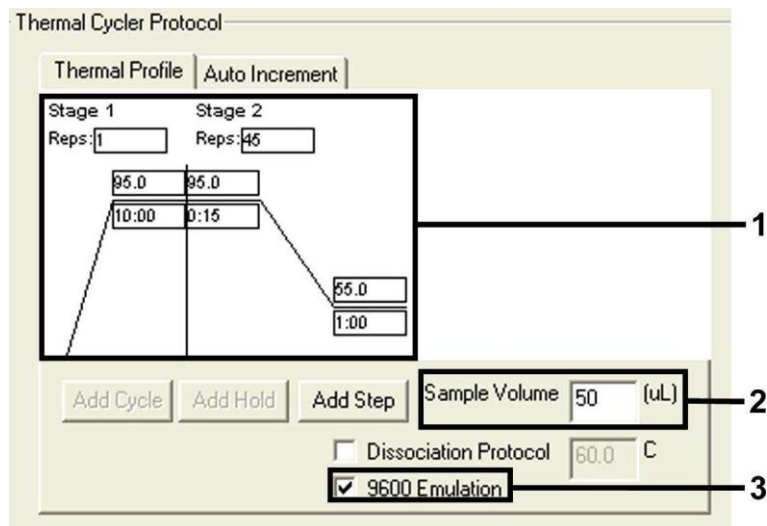
Mintatípus	Funkció ( <i>Task</i> )	Concentration ( <i>Quantity</i> )	Riporter	Quencher
Minta	Ismeretlen	–	FAM	nincs
Nincs-templát kontroll	NTC	–	FAM	nincs
Standard	Standard	lásd 1. Kit tartalma	FAM	nincs

Standard görbe létrehozásához, az összes, kitben lévő *Kvantitációs standardot* használja fel (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*) egy PCR futtatás során és adja meg a megfelelő koncentrációkat (lásd 1.Kit tartalma) minden egyes standardra

(Quantity). Felhívjuk figyelmét, hogy az *artus EBV TM PCR Kit* segítségével futtatott PCR reakciókhoz, **ROX** festéket kell beállítani, mint passzív referenciát (*Passive Reference*). A ROX festék egyenletes eloszlását az összes PCR reakciókban az *EBV RG/TM Master* mastermix-el történő elkeverése garantálja és a cső-cső közötti fluoreszcencia eltérés felismerését és kalkulációját a "*Sequence Detection Software*" segítségével állapítják meg (normalizálás).

#### 8.5.1.4 Hőmérséklet profil készítése

Ahhoz, hogy létrehozzon egy hőmérsékletprofil, váltson át a "*Setup*" fülről a "*Instrument*" fülre a szoftverben. Adja meg a specifikus hőmérséklet profilt az EBV DNS detektálásához a 8.ábra alapján. Annak érdekében, hogy eltávolítsa az elő-beállításokban tárolt 50°C-os lépést, jelölje ki ezt a bal egér gombbal és egyidejűleg tartsa lenyomva a Shift billentyű, majd törölje ki a Backspace billentyű használatával. Győződjön meg róla, hogy a reakció térfogat 50 µl-re let állítva. A "*9600 Emulation*" opciót kell aktiválni, the pre-settings of the Az "*Auto Increment*" elő-beállításai változatlanul kell hagyni (*Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).



8.ábra: Hőmérséklet profil készítése.

#### 8.5.1.5 PCR futás mentése

Mentse el a beállításokat (*Setup*) sablonként, annak érdekében, hogy azt módosított vagy változatlan formában használhassa a továbbiakban. A beállítások "*SDS Template*" (\*.sdt) "*Template Directory*"-be való mentésével (*Helyi lemez [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates*, Applied Biosystems által készített). Ezt fájlt közvetlenül a "*New Document*" ablak "*Template*" legördülő listájából választhatja ki. A "*Browse*" funkció segítségével más mappákban lévő másolatokat is meg tud nyitni. Mielőtt elindítaná a PCR futást mentse el még egyszer, mint "*SDS Document*" (\*.sds), annak érdekében, hogy a PCR során a gyűjtött adatok mentése garantált legyen.

### 8.5.1.6 PCR futás indítása

Indítsa el a PCR futást a menübőlpontról a "Start" opció kiválasztásával vagy az "Instrument" opciót a "Start" mezőből választva.

### 8.5.2 Az ABI PRISM 7700 SDS programozása

Az EBV DNS detektálására hozzon létre egy profilt az ABI PRISM 7700 SDS készüléken a következő hét lépés alapján (8.5.2.1 – 8.5.2.7). Minden specifikáció az ABI PRISM 7700 SDS 1.9.1. verziójú szoftverére utal. Az ABI PRISM 7700 SDS programozásának részleteiről kérük tájékozódjon az ABI PRISM 7700 SDS felhasználói könyvéből. A jobb áttekinthetőség érdekében a szoftver beállításait vastag keretbe foglalva találja.

#### 8.5.2.1 Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához

Válassza ki a "New Plate"-et a "File " menüből az the ABI PRISM 7700 SDS-en és programozza be az új dokumentumot a következő kezdeti beállításokat alapján (lásd 9.ábra). Erősítse meg az elő-beállításokat (OK).

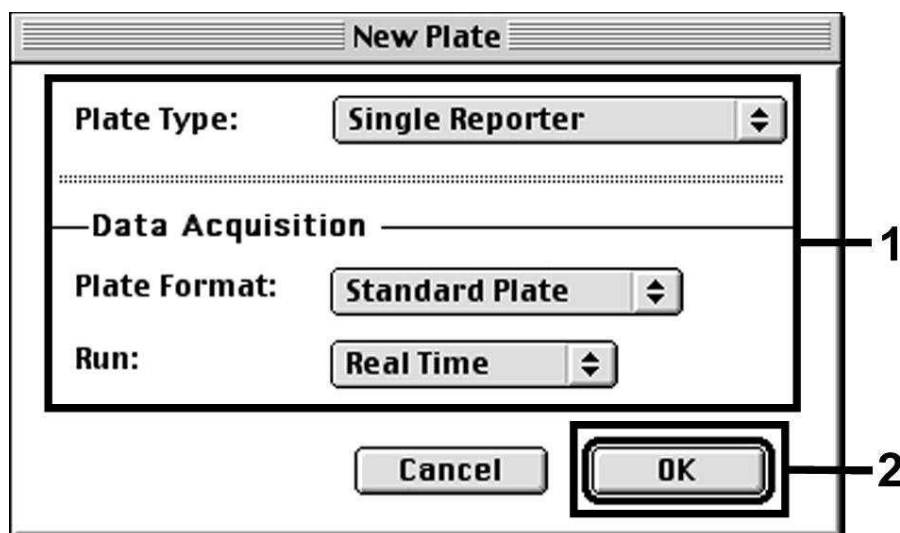


Fig. 9: Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához (New Plate).

#### 8.5.2.2 A fluoreszcens festékek kiválasztása és a mintatípus hozzárendelése

A "Sample Type Setup" segítségével (Setup szint: Sample Type/Sample Type Setup) a fájlhoz hozzárendelhető a megfelelő detektálási festék és a megfelelő mintatípus. Az EBV DNS kimutatására, valamint az EBV TM PCR Kit belső kontrolljának detektálására, az alábbi táblázatban listázott riportereket/quenchereket határozták meg:

Detektálás	Riporter	Quencher
EBV DNS	FAM	nincs
Belső kontroll (EBV RG/TM IC)	VIC	nincs

Az *artus* EBV TM PCR Kit EBV DNS vizsgálatához válassza ki a reporter festéket **FAM** a táblázatban megadott adatok alapján. Ez a standardokra (STND) és a mintákra (UNKN) is vonatkozik csakúgy mint a nem-templát kontrollra (UNKN). A belső kontroll "*Internal Control*" (IPC+), **VIC** ripoterként van definiálva. A quencher csoport "**none**". A festékek és a mintatípusok kijelölése a "*Sample Type Setup*" ablakban található a 10.ábrán.

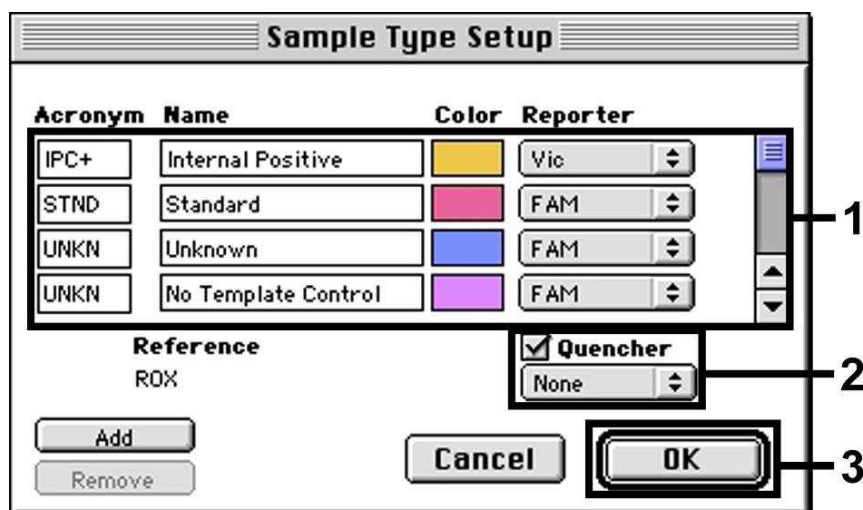


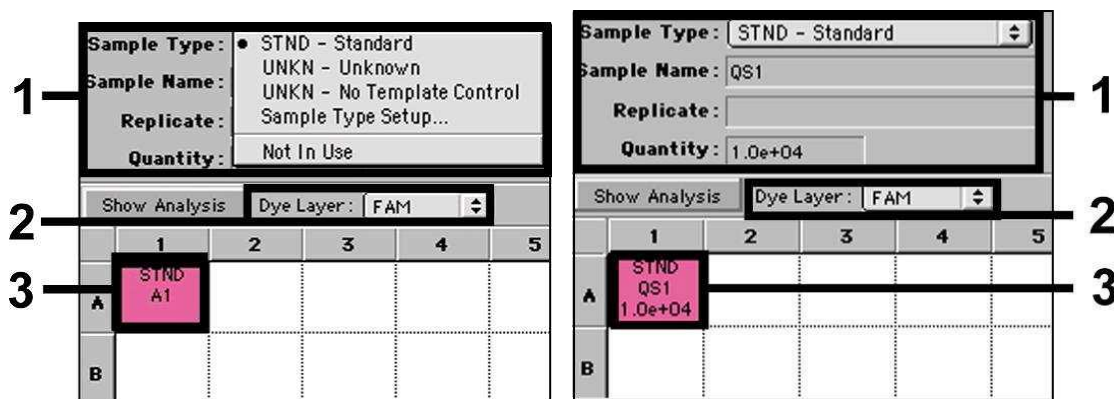
Fig. 10: A fluoreszcens festékek kiválasztása és a mintatípus hozzárendelése (*Sample Type Setup*).

Kérjük jelölje ki a mintatípus megfelelő funkcióját (*Acronym*) a következő táblázat:

Mintatípus	Funkció ( <i>Acronym</i> )	Koncentráció ( <i>Mennyiség</i> )	Riporter	Quencher
Minta	UNKN	–	FAM	nincs
Nem-templát kontroll	UNKN	–	FAM	nincs
Standard	STND	lásd 1. A kit tartalma	FAM	nincs

### 8.5.2.3 A plate pozícióhoz szükséges információk hozzárendelése

Az egyéni plate pozíciókhoz történő detektorok és a mintatípusok hozzárendeléséhez válassza ki a megfelelő területet. Ezután nyissa meg a párbeszéd ablak "Setup" szintjén a "Dye Layer" fület és rendelje hozzá a megfelelő riportert. A pop-up menü "Sample Type" aktiválásánál megtalálja "Sample Type Setup"-nál a mintatípusokhoz rendelt riporttereket a megjelenő listában (lásd 11.ábra). Válassza ki a megfelelő mintatípust (lásd táblázat alatt 8.5.2.2) és rendelje hozzá a fennmaradó plate pozíciókat a "Dye Layers" és a "Sample Type" menu segítségével. A "Sample Name" mezőben a neveket minden egyes mintához hozzá lehet rendelni. A mezőket "Replicates"-ként definiálják (Replikák) (A "Replicate" oszlopba a referencia minták nevét adja meg) így a szoftver átlagolja a kvantifikált patogén terhelésre vonatkozóan az adatokat és a szórás ezáltal kiszámítható.

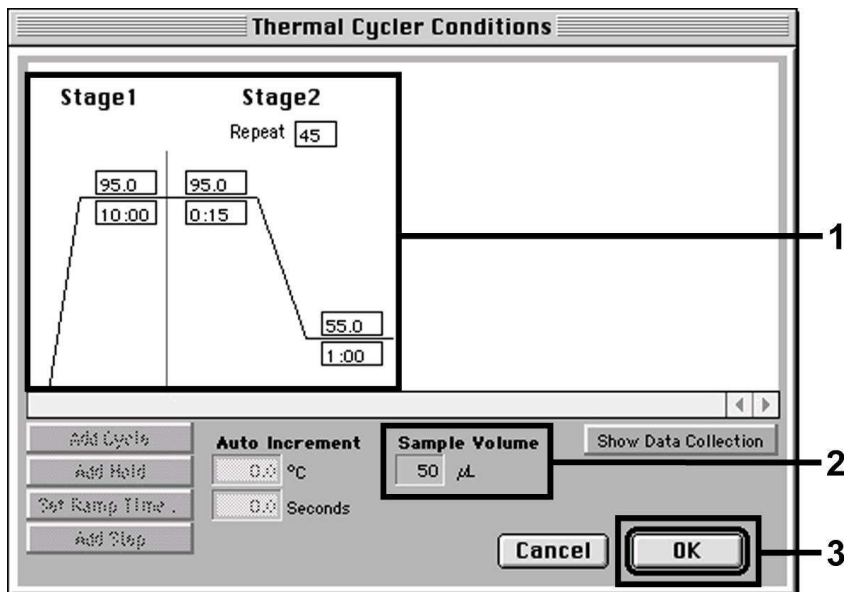


11/12. ábra: A plate pozícióhoz szükséges információk hozzárendelése

Standard görbe létrehozásához, az összes, kitben lévő *Kvantitációs standardot* használja fel (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) egy PCR futtatás során és adja meg a megfelelő koncentrációkat (lásd 1.Kit tartalma) minden egyes standardra (*Quantity*) (lásd 12.ábra). Ez azonban csak akkor lehetséges, ha az előzetesen, a "Sample Type" menü segítségével definiált standardoknak pozíciókat tartanak fenn.

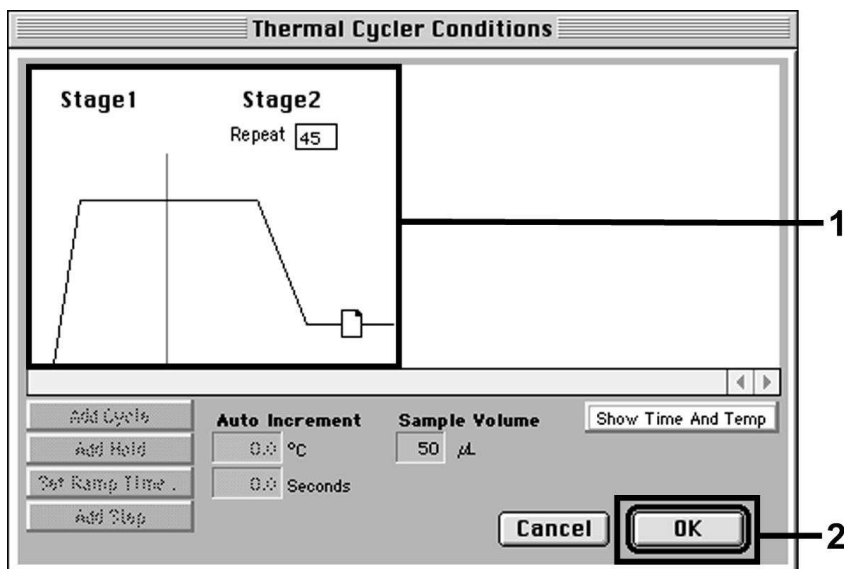
### 8.5.2.4 Hőmérséklet profil készítése

Ahhoz, hogy létrehozzon egy hőmérsékletprofil, kattintson a "Setup" fülben a "Thermal Cycler Conditions" fülre. Adja meg a specifikus hőmérséklet profilt az EBV DNS detektálásához a 13.ábra alapján. Győződjön meg róla, hogy a reakció térfogat 50 µl-re lett állítva. A "Ramp" idő és az "Auto Increment" előbeállításait változatlanul kell hagyni (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).



13.ábra: Hőmérséklet profil készítése

Továbbá a "Thermal Cycler Conditions" menü tartalmaz egy "Show Data Collection" opciót. Ezen opció választásával az ablak kinyílik lásd 14.ábra. A hőmérséklet profilt ábrázoló minden egyes meredek és plátó hőmérsékletet jelző egyenes egy "Data Collection Icon" (Adat gyűjtő ikon)-t mutat, ami illusztrálja, hogy a futás egy adott szakaszában gyűjti az adatokat. Vegye ki az összes szombólumot, kivéve az "Annealing-Extension step (Stage2/Step2)"-et, annak érdekében, hogy kizárják a felesleges fluoreszcencia méréseket. A teljes futási időt és az adat mennyiséget így minimumon tarthatjuk.



14.ábra: Adatgyűjtés

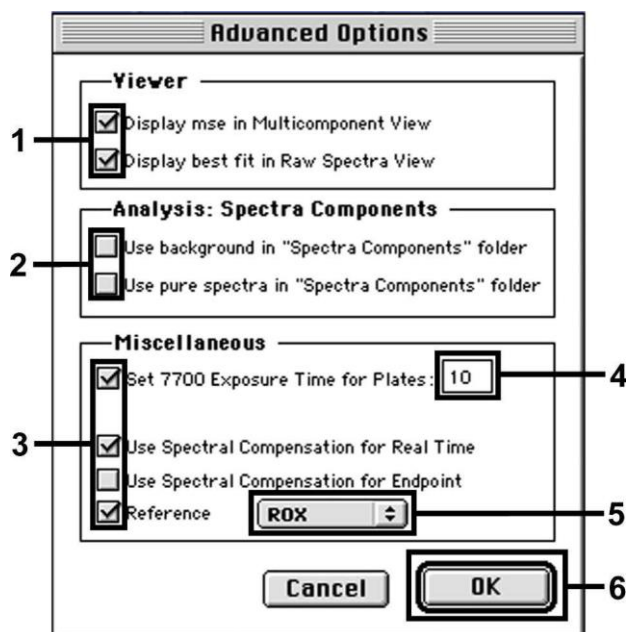
### 8.5.2.5 További fontos beállítások

Az expozíciós idő beállításához (fluoreszcens festékek gerjesztése), továbbá a "Pure Spectra/Background" fájlok kiválasztásához váltson át a "Setup" szintről az



"Analysis" szintre. Válassza ki az aktivált "Advanced Options" alpontot az "Instrument" menü megtalálásához a "Diagnostics" alatt. Állítsa be a beállításokat a 15.ábra alapján. A választható "Spectra Components (Analysis)" inaktiválásával az aktuális kalibrációs fájl a "Spectra Components" fájlban lesz tárolva az adatok előállításának pillanatától pedig automatikusan használhatóak, amikor újraértékeli a már elemzett futtatásokat. Újjonnan bevitt "Spectra Components" használatával a korábbi futások vizsgálatára ezt a két területet aktiválódik. Felhívjuk figyelmét, hogy az *artus* EBV TM PCR Kit segítségével futtatott PCR reakciókhoz, **ROX** festéket kell beállítani, mint passzív referenciát (*Passive Reference*). A ROX festék egyenletes eloszlását az összes PCR reakciókban az *EBV RG/TM Master* mastermix-el történő elkeverése garantálja és a cső-cső közötti fluoreszcencia eltérés felismerését és kalkulációját a "Sequence Detection Software" segítségével állapítják meg (normalizálás).

**Megjegyzés:** Amennyiben 96-well-es formátumú reakció platet használ az optikai méréshez optikai ragasztó fedővel kombinálva vagy optikai reakció csöveket lapos fedővel/kupakkal, úgy az expozíciós idő tíz milliszekundum lesz. Amennyiben az **optikai reakció csöveket kupolás fedővel/kupakkal** használja az expozíciós időt **25 milliszekundumra** kell állítania.



15.ábra: További fontos beállítások (*Advanced Options*).

### 8.5.2.6 PCR futás mentése

Mentse el a beállításokat (*Setup*) sablonként, annak érdekében, hogy azt módosított vagy változatlan formában használhassa a továbbiakban. Erre a célra a fájlt a "Stationary File Format"-ban tárolja. Mielőtt egy újabb PCR futás programozását kezdené meg, kérjük mentse el újra "Normal File Format"-ban,

annak érdekében, hogy a PCR futás során gyűjtött adatok mentése garantált legyen.

### 8.5.2.7 PCR futás indítása

Indítsa el a PCR futást az "Instrument" részből a "Run" opció kiválasztásával vagy a "Run" mezőt a "Analysis" szintből választva.

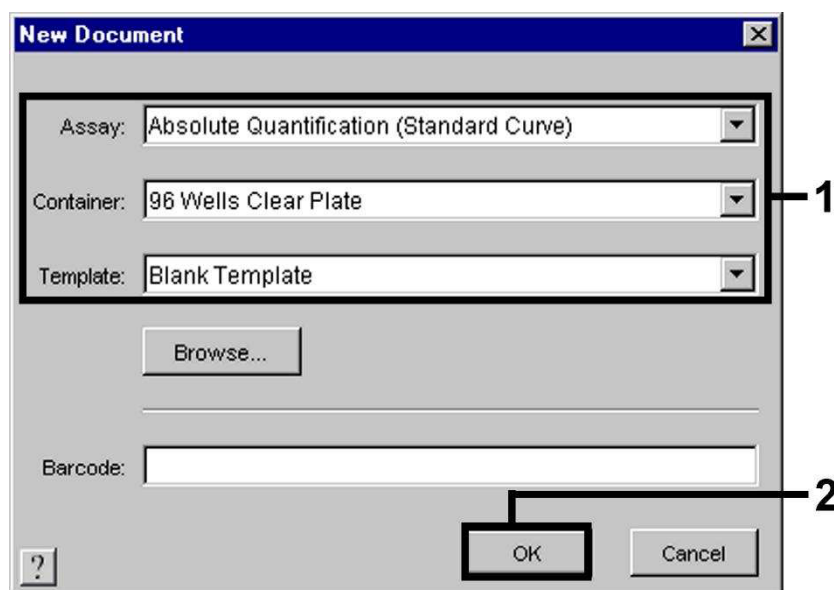
### 8.5.3 Az ABI PRISM 7900HT SDS programozása

Az EBV DNS detektálására hozzon létre egy profilt az ABI PRISM 7900HT SDS készüléken a következő hat lépés alapján (8.5.3.1 – 8.5.3.6). Minden specifikáció az ABI PRISM 7900HT SDS 2.1. verziójú szoftverére utal. Az ABI PRISM 7900HT SDS programozásának részleteiről kérjük tájékozódjon az ABI PRISM 7900HT SDS felhasználói könyvből. A jobb áttekinthetőség érdekében a szoftver beállításait vastag keretbe foglalva találja.

#### 8.5.3.1 Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához

Válassza ki a "New"-t a "File" menüből az the ABI PRISM 7900HT SDS-en és programozza be az új dokumentumot a következő kezdeti beállításokat alapján (lásd 16.ábra). A biztonsági sablon (ABI PRISM SDS Template Document [\*.sdt]) rendelkezésre áll a "Template" listában vagy kiválasztható a "Browse" funkció alkalmazásával. (lásd 8.5.3.5 PCR futás mentése). Erősítse meg az elő-beállításokat (OK).

**Megjegyzés:** Az artus EBV TM PCR Kit nem használható az ABI PRISM 7900HT SDS 384 plate formátumával.



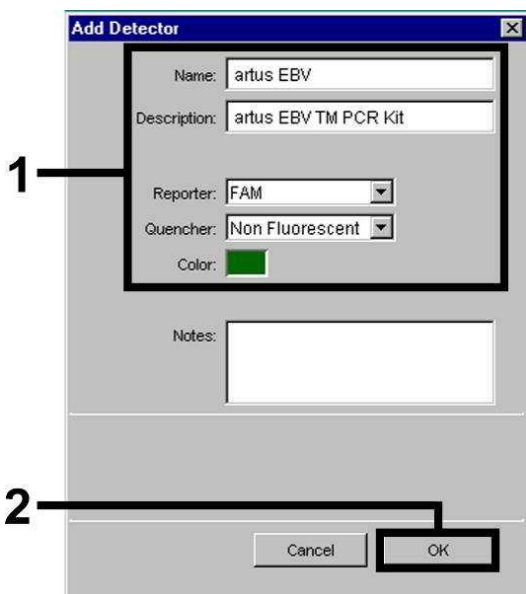
16.ábra: Elő-beállítások egy új PCR futtatás létrehozásához (New Document).

### 8.5.3.2 Detektorok létrehozása/kiválasztása

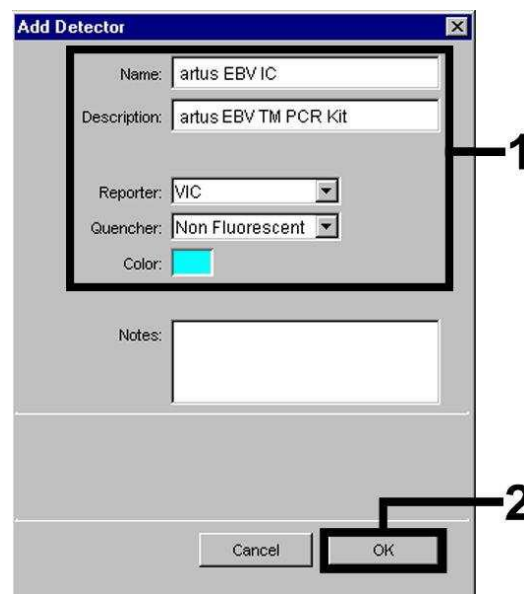
A "Detector Manager" almenü segítségével a "Tools" menüből (esetlegesen: "Setup" szint/"Add Detector" funkció választása) meg kell jelölni a megfelelő detektáló festék fajtáját a fájlból. Az EBV DNS kimutatására, valamint az EBV TM PCR Kit belső kontrolljának detektálására, az alábbi táblázatban listázott riportereket/quenchereket határozták meg:

Detektálás	Riporter	Quencher
EBV DNS	FAM	Nem fluoreszcens
Belső kontroll (EBV RG/TM IC)	VIC	Nem fluoreszcens

Ahhoz, hogy létrehozza ezeket a detektorokat, válassza ki a "New" opciót ("Detector Manager" bal also része).



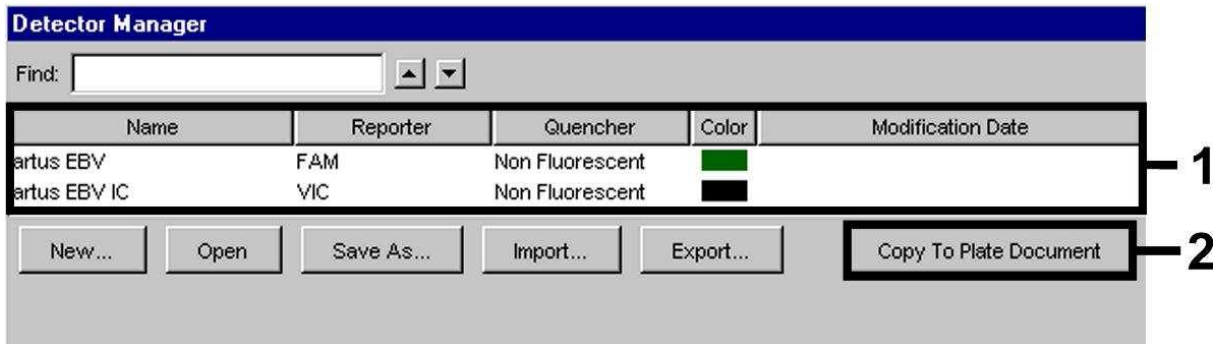
17.ábra: EBV specifikus detektor létrehozása (Detector Manager).



18.ábra: Belső kontroll (IC) detektor létrehozása (Detector Manager).

Az EBV DNS kimutatására, az alábbi táblázatban listázott riporterek/quencherek kombinációi **FAM/Non Fluorescent** (FAM/Nem Fluoreszcens) határozhatóak meg az új ablakban. Az "Internal Control " belső kontroll detektálására, válassza ki a **VIC/Non Fluorescent** (VIC/Nem Fluoreszcens) kombinációt (amint a 17.ábra és 18.ábra mutatja)

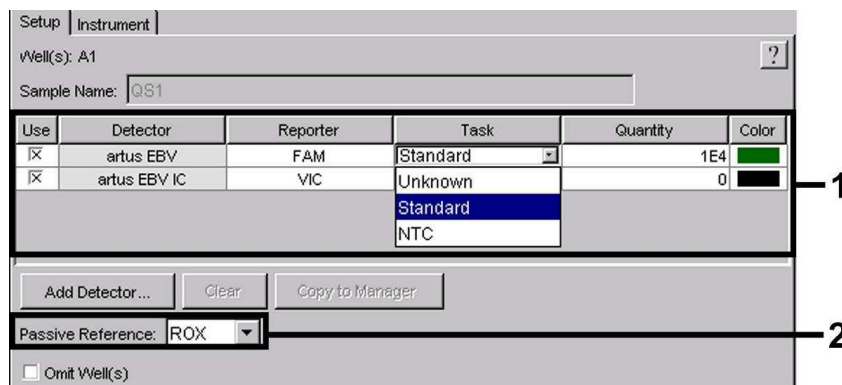
A bevitt adatok elfogadásával (OK), visszatér a "Detector Manager"-be. Jelölje ki az újonnan létrehozott detektort és a "Setup" szintről minden egyes kiválasztást másoljon át a "Copy to Plate Document" opcióra való kattintással. (lásd 19.ábra). Zárja be az ablakot (Done).



19.ábra: Detektorok kiválasztása (Detector Manager).

### 8.5.3.3 Szükséges információk hozzárendelése a plate pozícióhoz

A "Detector Manager" (Done) bezárása után a 8.5.3.2 pont alatt a detektorok kiválasztásra kerülnek a "Setup" fül táblázat listájában (lásd 20.ábra).



20.ábra: Szükséges információk hozzárendelése a plate pozíciókhoz

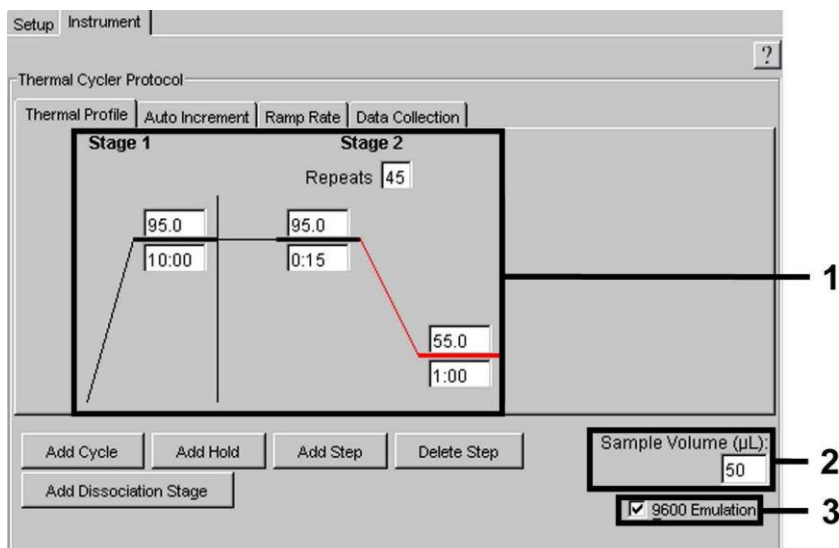
Jelölje meg az EBV DNS-nek fenntartott pozíciót a lemezen. Rendelje hozzá a kiválasztott detektorokat ezekhez a pozíciókhoz a "Use" opció mindkét detektor esetében történő aktiválásával, amelyen egy kereszt fog megjelenni. Minden egyes reakció elnevezésére válassza ki a megfelelő pozíciót a platen és vigye be a nevet (Sample Name). Kérjük vegye figyelembe, hogy az előkészített minta megegyező neve "Sample Name" és a detektor megegyező jelölése miatt replikaként fogja őket azonosítani a szoftver és a kvantifikált patogén mennyisége alapján átlagolni fogja a detektált eredményüket. Ezután válassza ki a megfelelő funkciót (Task) minden minta típusának megfelelően az következő táblázat alapján:

Mintatípus	Funkció ( <i>Task</i> )	Koncentráció ( <i>Quantity</i> )	Riporter	Quencher
Minta	Ismeretlen	–	FAM	Nem fluoreszcens
Nem-templát kontroll	NTC	–	FAM	Nem fluoreszcens
Standard	Standard	lásd 1. A kit tartalma	FAM	Nem fluoreszcens

Standard görbe létrehozásához, az összes, kitben lévő *Kvantitációs standardot* használja fel (*EBV LC/RG/TM QS 1 – 4*) egy PCR futtatás során és adja meg a megfelelő koncentrációkat (lásd 1.Kit tartalma) minden egyes standardra (*Quantity*). Felhívjuk figyelmét, hogy az *artus EBV TM PCR Kit* segítségével futtatott PCR reakciókhoz, **ROX** festéket kell beállítani, mint passzív referenciát (*Passive Reference*). A ROX festék egyenletes eloszlását az összes PCR reakciókban az *EBV RG/TM Master* mastermix-el történő elkeverése garantálja és a cső-cső közötti fluoreszcencia eltérés felismerését és kalkulációját a "*Sequence Detection Software*" segítségével állapítják meg (normalizálás).

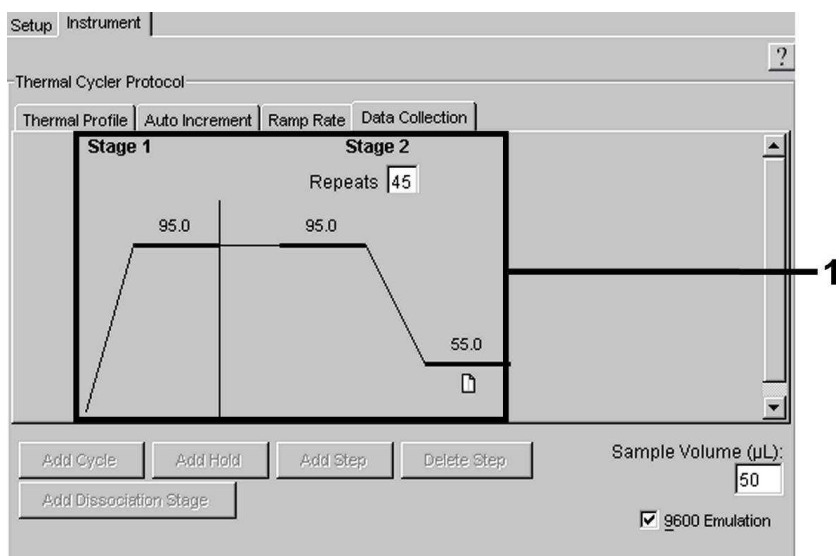
#### 8.5.3.4 Hőmérséklet profil létrehozása

Ahhoz, hogy létrehozzon egy hőmérsékletprofil, kattintson a "*Setup*" fülben az "*Instrument*" fülre. Adja meg a specifikus hőmérséklet profil az EBV DNS detektálásához a 21.ábra alapján. Győződjön meg róla, hogy a reakció térfogat 50 µl-re lett állítva. A "*9600 Emulation*" opciót kell aktiválni, a "*Ramp*" idő és az "*Auto Increment*" elő-beállításait változatlanul kell hagyni (*Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).



21.ábra: Hőmérséklet profil létrehozása

Továbbá a "Instrument" fül tartalmaz egy "Data Collection" opciót. Ezen opció választásával az ablak kinyílik lásd 22.ábra. A hőmérséklet profilt ábrázoló minden egyes meredek és plató hőmérsékletet jelző egyenes egy "Data Collection Icon" (Adat gyűjtő ikon)-t mutat, ami illusztrálja, hogy a futás egy adott szakaszában gyűjti az adatokat. Vegye ki az összes szombólumot, kivéve az "Annealing-Extension step (Stage2/Step2)"-et, annak érdekében, hogy kizárják a felesleges fluoreszcencia méréseket. A teljes futási időt és az adat mennyiséget így minimumon tarthatjuk.



22.ábra: Adatgyűjtés

### 8.5.3.5 PCR futás mentése

Mentse el a beállításokat (Setup) sablonként, annak érdekében, hogy azt módosított vagy változatlan formában használhassa a továbbiakban. A

beállítások "ABI PRISM SDS Template Document"-ként (\*.sdt) "Template Directory"-be való mentésével ([D:]\\Program Files\\ Applied Biosystems\\SDS 2.1\\Templates, Applied Biosystems által készített). Ezt fájlt közvetlenül a "New Document" ablak "Template" legördülő listájából választhatja ki. A "Browse" funkció segítségével más mappákban lévő másolatokat is meg tud nyitni. Mielőtt elindítaná a PCR futást mentse el még egyszer, mint "ABI PRISM SDS Document" (\*.sds), annak érdekében, hogy a PCR során a gyűjtött adatok mentése garantált legyen.

#### 8.5.3.6 PCR futás indítása

Indítsa el a PCR futást a "Start" opció kiválasztásával az "Instrument" menüből.

## 9. Adatelemzés

A festékek (*Pure Spectra Component File*) és a háttér (*Background Component File*) validált kalibrációja a készülék üzembe helyezése esetén szükséges. Az eredmények pontos kiszámításához a következő kalibrációs fájlok szükségesek:

Minden, készülék által generált zavaró jelek, amelyek befolyásolhatják a mérést kiküszöbölhetőek az *ABI PRISM Sequence Detection Systems Sequence Detection Software Background Component File*-nak segítségével.

További interferencia jelenhet meg a többszínű vizsgálatok alatt az egyedi fluoreszcens festék emissziós spektrumai között. Az *ABI PRISM SDS* szoftver számításokkal kompenzálja ezeket az interferenciákat az egyedi festékek spektrális adatai alapján, melyet a "Pure Spectra Component File" tartalmaz. A szoftver ugyanazt a fájlt használja a fluoreszcens adatok kijelöléséhez, melyek a PCR futás esetében programozott detektorok által összegyűjtött teljes vizsgálható spektrumot tartalmazzák. Az egyedi festékek fluoreszcens adatait osztva a passzív referencia festék (ROX) által kapott jelek értékével számszerűsíthetők a cső-cső közötti variációk (fluoreszcencia eltérések számos PCR készítmények között). Az így kapott normalizált jelek ezután értékelhetőek az "Amplification Plot" segítségével.

A PCR futások értékeléséhez használt kalibrációs fájlok automatikusan tárolódnak a futás mentésével. Ha nincs **kalibrációs fájl** telepítve kérjük készítse el ezen fájlokat az *ABI PRISM SDS* felhasználói kézikönyvében leírt utasítások alapján.

Amennyiben több, mint egy *artus*™ PCR rendszer van integrálva a PCR futásához (**vegye figyelembe a hőmérséklet profilt**), kérjük ezeket a vizsgálatokat külön-külön végezze el. Egyedi "Sample Name"-el rendelkező minta és egy egyedi detektor megjelölése automatikusan replikaként fogja azonosítani az *ABI PRISM 7000* és *7900HT SDS Software* segítségével és a kapott adatokat a patogén felhalmozódás tekintetében átlagolni fogja.

A következő eredmények fordulhatnak elő:

1. A detektált jel a FAM fluoreszcens jel.

**A vizsgálat eredménye pozitív: A minta ENB DNS-t tartalmaz.**

Ebben az esetben a VIC fluoreszcens jel (belső kontroll) elhanyagolható, mivel a magas EBV DNS kezdeti koncentráció (pozitív FAM fluoreszcens jel) csökkent vagy hiányzó belső kontroll fluoreszcens jelhez vezethet (kompetíció).

2. Nincs FAM fluoreszcens jel detektálás. Ugyanakkor, ezzel egyidőben jelenik meg a belső kontrollból a VIC fluoreszcens jel.

**A mintában nem detektálható EBV DNS. Negatívnak tekinthető.**

In the case of a negative EBV PCR the detected signal of the *Internal Control* rules out the possibility of PCR inhibition. A negatív EBV PCR esetében a belső kontroll detektált jele alapján kizárható a PCR gátlás lehetősége.

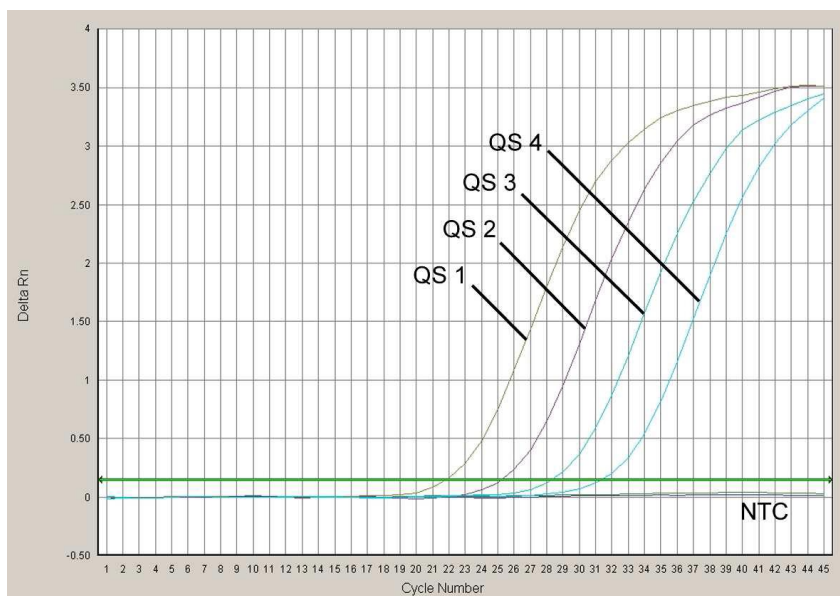
3. Sem a FAM fluoreszcens jel, sem a VIC fluoreszcens jel nem került detektálásra.

**Nem lehet következtetni a diagnózisra.**

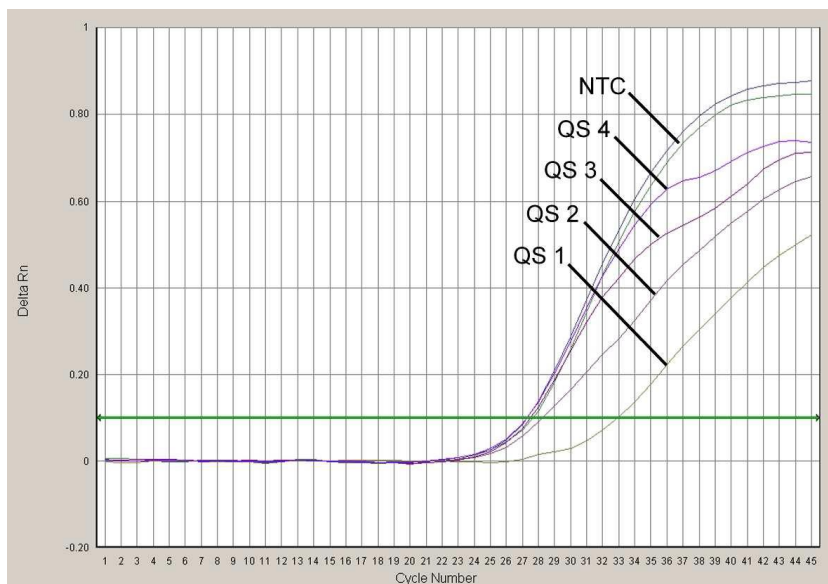
A hibaforrásokat és ezek megoldására vonatkozó információkat a 10. Hibaelhárítási útmutató-ban találja.

Példák a pozitív és negatív PCR reakciókra 23/24. ábrán (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26. ábrán (*ABI PRISM 7700 SDS*) és 27/28. ábrán (*ABI PRISM 7900HT SDS*) találhatóak.

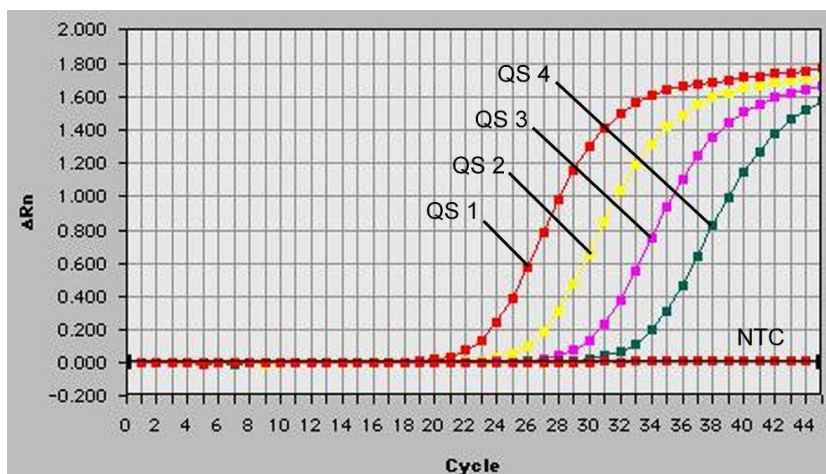




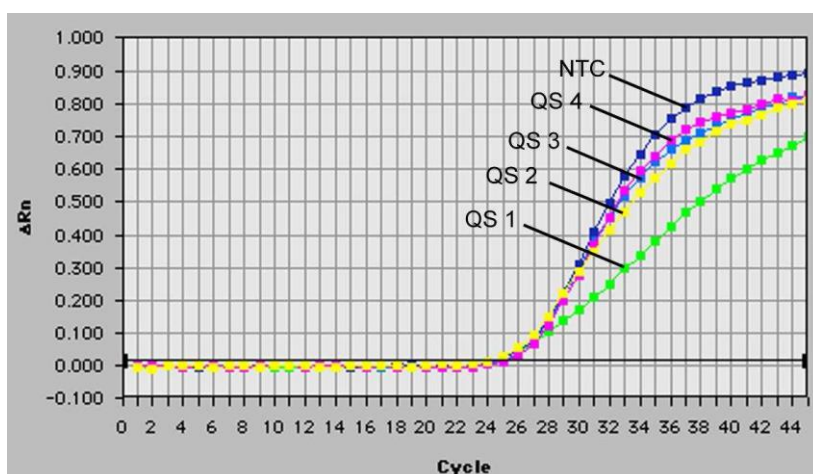
23. ábra: Kvantitációs standardok detektálása (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) a FAM fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).



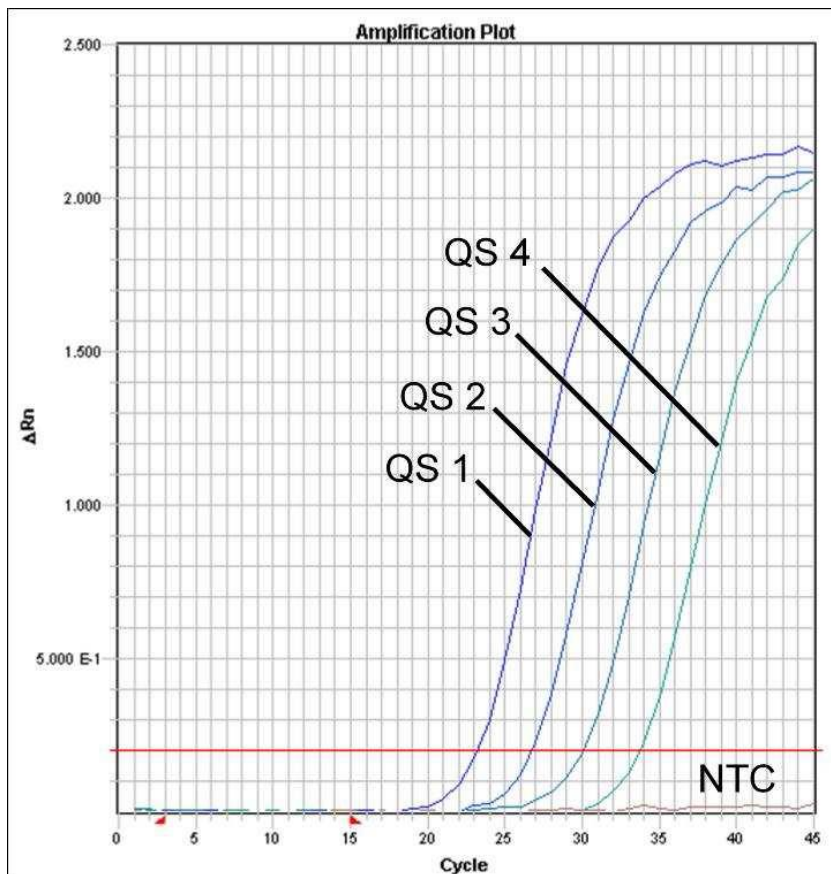
24. ábra: Belső kontroll (IC) detektálása VIC fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7000 SDS) és a kvantitációs standardok (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).



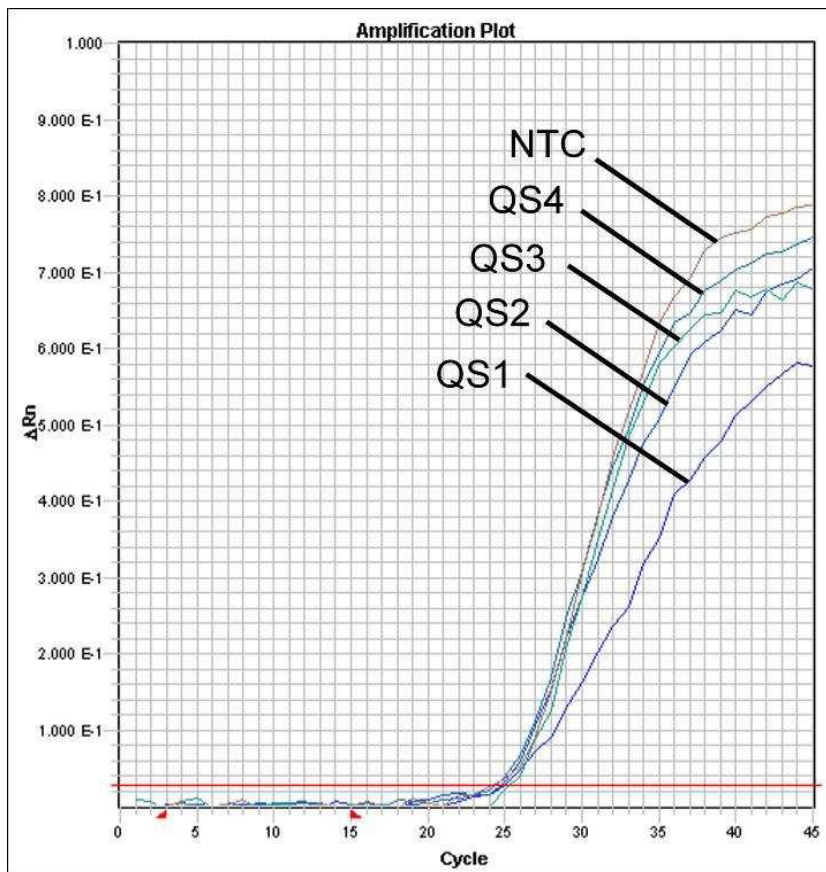
25. ábra: Detection of the *Kvantitációs standardok* detektálása (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) FAM fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).



26. ábra: *Belső kontroll (IC)* detektálása VIC fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7700 SDS) és a *kvantitációs standardok* (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).



27. ábra: Kvantitációs standardok (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) detektálása FAM fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).



28. ábra: Belső kontroll (IC) detektálása VIC fluoreszcens jel mérésével (ABI PRISM 7900HT SDS) és a kvantitációs standardok (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4) egyidejű amplifikálásával. NTC: nem-templát kontroll (negatív kontroll).

## 10. Hibaelhárítási útmutató

Nincs FAM fluoreszcens jel a pozitív kontrollokban (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- A PCR adatok elemzéséhez választott detektáló festék nem felel meg a protokollnak.
  - ➔ Az adatelemzéshez válassza ki a FAM festéket az EBV analitikai PCR (analytical EBV PCR) és a VIC festéket a belső kontroll PCR (*Internal Control* PCR) detektálásához.
- Az "Options" alatt az adatelemzéshez használt beállítások (*Extension Phase Data Extraction*) nem felelnek meg a "Data Collection" beállításoknak (ABI PRISM 7700 SDS-nél lásd 8.5.2.4 Hőmérséklet profil létrehozása, ABI PRISM 7900HT SDS-nél lásd 8.5.3.4 Hőmérséklet profil létrehozása).
  - ➔ Elemezze a PCR futást a helyes beállításokkal és ismételje meg az adatelemzést (*Analysis*).

- *ABI PRISM Sequence Detection System* hőmérséklet profiljának helytelen programozása.
  - ➔ Hasonlítsa össze a hőmérséklet profilt a protokollal (lásd 8.5 Az *ABI PRISM SDS* programozása).
- PCR reakció helytelen konfigurálása.
  - ➔ Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási vázlat alapján (lásd 8.4 PCR előkészítése) és ismétlje meg a PCR futtatást, amennyiben szükséges.
- A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a 2. Tárolás fejezetben leírt útmutatások szerint történt vagy az *artus EBV TM PCR Kit* lejárt.
  - ➔ Kérjük ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejárat dátumát (lásd a kit jelzésinél), használjon új kitet, amennyiben szükséges.

**Belső kontroll fluoreszcens jele gyengén vagy egyáltalán nem detektálható (VIC fluoreszcens jel) és az EBV PCR specifikus FAM fluoreszcens jel egyidejű megjelenése:**

- A PCR körülményei nem felelnek meg a protokollnak.
  - ➔ Ellenőrizze a PCR körülményeket (lásd fentebb) és ismétlje meg a PCR futtatást a helyes beállításokkal, amennyiben szükséges.
- A PCR gátolt.
  - ➔ Bizonyosodjon meg róla, hogy a javasolt izoláló módszert használta (lásd 8.1 DNS izolálás) és szorosan ragaszkodjon a gyártó utasításaihoz.
  - ➔ Győződjön meg arról, hogy a DNS izolálás alatt a javasolt további centrifugálási lépés kivitelezése az elúció előtt megtörtént, annak érdekében, hogy a visszamaradt etanolt eltávolítsa a rendszerből. (lásd 8.1 DNS izolálás).
- Az extrakció során a DNS elveszett.
  - ➔ Amennyiben a belső kontroll hozzá lett adva az extrakcióhoz, a belső kontroll meglévő jele utalhat a DNS elvesztésére az extrakciós lépés alatt. Győződjön meg arról, hogy a javasolt izolálási módszer szerint járt el. (lásd 8.1 DNS izolálás) és szorosan ragaszkodjon a gyártó utasításaihoz.
- A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a 2. Tárolás fejezetben leírt útmutatások szerint történt vagy az *artus EBV TM PCR Kit* lejárt.

- Kérjük ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejárat dátumát (lásd a kit jelzésinél), használjon új kitet, amennyiben szükséges.

### Az analitikai PCR FAM fluoreszcens jele negatív kontrollokkal:

Szennyeződés történt a PCR előkészítése során.

- Ismétlje meg a PCR futást replikátumban új reagensekkel.
- Amennyiben lehetséges, zárja le a PCR csövet közvetlenül a vizsgálati minta hozzáadása után.
- A pozitív kontrollt szigorúan a végén pipettázza az elegyhez.
- Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörténjen.

■ Szennyeződés történt a extrakció során.

- Ismétlje meg az extrakciót és a PCR futást a vizsgálni kívánt mintával és új reagensekkel.
- Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörténjen.

Ha bármilyen további kérdése van vagy ha probléma merülne fel kérjük forduljon bizalommal a műszaki szolgálatunkhoz.

## 11. Teljesítmény-jellemzők

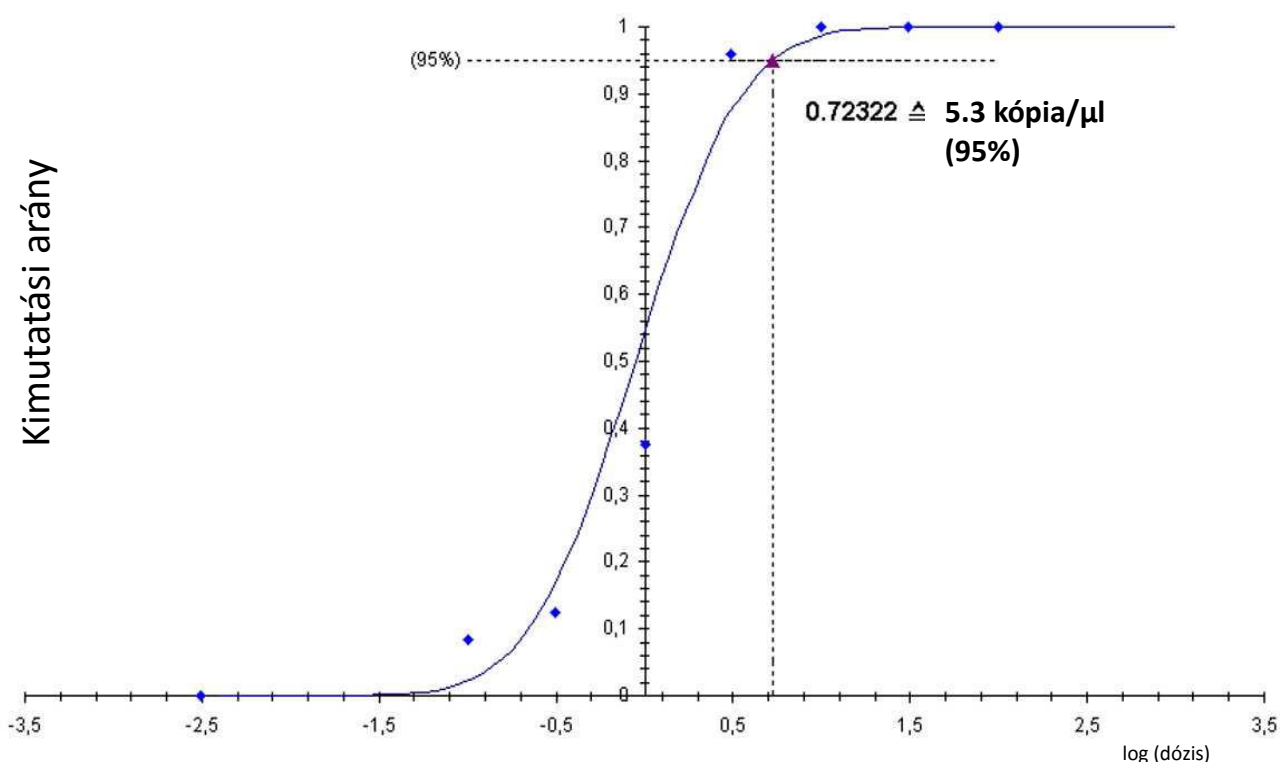
### 11.1 Analitikai érzékenység

Az *artus* EBV TM PCR Kit analitikai érzékenységének a meghatározásához egy 50 - 0.01 nominális EBV kópia/ $\mu$ l-nek megfelelő\* standard hígítási sort kell készíteni és vizsgálni az *ABI PRISM 7000*, *7700* és *7900HT Sequence Detection Systems*-en az *artus* EBV TM PCR Kit segítségével. A vizsgálatot három különböző napon nyolc párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. A probit-elemzés grafikai megjelenítése (*ABI PRISM 7000 SDS*) a 29. ábrán látható.

Kimutatási határ (p = 0.05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	5.3 kópia/ $\mu$ l
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	1.4 kópia / $\mu$ l
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0.7 kópia / $\mu$ l

Ez azt jelenti, hogy az 5.3 kópia/μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 1.4 kópia/μl (*ABI PRISM 7700 SDS*), illetve a 0.7 kópia/μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*) 95%-a detektálásra kerül.

### Probit elemzés: Epstein-Barr vírus (*ABI PRISM 7000 SDS*)



29. ábra: Az *artus* EBV TM PCR Kit analitikai érzékenysége (*ABI PRISM 7000 SDS*).

## 11.2 Specifitás

Az *artus* EBV RG PCR készlet specifitása elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztásán, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételeken alapul. A primerek és próbák a lehetséges homológiákra ellenőrzésre kerültek szekvencia-összehasonlítási elemzéssel minden génbankokban publikált szekvenciával szemben. Minden releváns genotípus detektálhatóság ezáltal biztosítva van.

Emellett a specifitást 6 különböző EBV-negatív szérummintán is validálták. Ezek nem adtak jelet az *EBV RG/TM* masterben található primerekkel és próbákkal.

Az *artus* EBV TM PCR kit lehetséges keresztreaktivitása az 1. táblázatban található kontrollcsoporttal lett tesztelve. A tesztelt patogének egyike sem mutatott keresztreaktivitást.

## 1. táblázat A kit specificitásának vizsgálata potenciális keresztreaktív patogénekkal

Kontrollcsoport	EBV (FAM)	Belső kontroll (VIC)
Humán herpeszvírus 1 (Herpes simplex vírus 1)	–	+
Humán herpeszvírus 2 (Herpes simplex vírus 2)	–	+
Humán herpeszvírus 3 (Varicella-zoster vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 5 (Cytomegalovírus)	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 1	–	+
Humán T-sejt leukémia vírus 2	–	+

## 11.3 Reprodukálhatóság

A reprodukálhatósági adatok lehetővé teszik az artus EBV RG PCR készlet teljesítmény-jellemzőinek rendszeres mérését, valamint más termékekkel történő hatékonysági összehasonlítást. Ezek az adatok laboratóriumi szakmai alkalmassági programokban történő részvételből származnak.

## 11.4 Diagnosztikai értékelés

Jelenleg az *artus* EBV TM PCR Kit egy sor értékelő tanulmányban vesz részt.

## 12. A termék használatának korlátjai

- Minden reagens kizárólag in vitro diagnosztikai célra használható.
- Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki képzett és gyakorlott az in vitro diagnosztikai eljárások területén.
- Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.
- Figyelni kell a dobozon és minden összetevő címkéjén található lejáratási időkre. Ne használjon lejárt reagenst.



## 13. Figyelmeztetések és óvintézkedések

Az *artus* EBV TM PCR Kit további információjért, kérjük olvassa el a megfelelő biztonsági adatlapokat (SDS). Ezek kényelmesen hozzáférhetőek és tömörített PDF formátumban megtalálhatóak online a [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) címen.

## 14. Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO 9001 és ISO 13485-minősített minőség-ellenőrzési rendszerének megfelelően az *artus* EBV TM PCR Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

## 15. Hivatkozások

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

## 16. Jelmagyarázat



Lejárat



Tételszám



Jogi gyártó



Katalógusszám



Anyagszám



Kézikönyv



In vitro diagnosztikus orvosi eszköz



<N>

<N> vizsgálat elvégzéséhez elegendő reagenst tartalmaz



Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)



Hőmérséklet-korlátozás



*Kvantitációs standard*



*Belső kontroll*



*artus* EBV TM PCR Kit

Védjegyek és Jogi nyilatkozat

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

Jelen dokumentumban használt bejegyzett elnevezések, védjegyek stb. törvény által védettnek tekintendők még akkor is, ha specifikusan ez nincs feltüntetve.

The *artus* EBV TM PCR Kit, a BioRobot EZ1 Workstation (munkaállomás) és az EZ1 DSP Virus Kit, valamint a Card (kártya) az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről szóló 98/79/EC direktíva alapján CE-jelöléssel rendelkezik. Nem minden országban elérhető.

The QIAamp Kitek általános laboratóriumi használatra javasolt. Nem tartunk igényt és képviselést a diagnosztra, megelőzésre vagy a betegség kezelésére irányuló információ adással kapcsolatban.

Az *artus* PCR Kitek beszerzése korlátozott engedéllyel történik, a polimeráz láncreakció (PCR) eljárás során humán és állatgyógyászati in vitro diagnosztikai használatra javasolt thermal cycler készülékkel együtt, mely PCR eljárás automatikus teljesítménye a kezdeti előfizetési díj hatálya alá tartozik, akár az Applied Biosystems-nek fizet vagy pl. felhatalmazott thermal cycler vásárló. A PCR eljárás hatálya alá tartoznak az Egyesült Államok-beli szabadalmak külföldi szabadalmi is Nos. 5,219,727 és 5,322,770 és 5,210,015 és 5,176,995 és 6,040,166 és 6,197,563 és 5,994,056 és 6,171,785 és 5,487,972 és 5,804,375 és 5,407,800 és 5,310,652 és 5,994,056 F. Hoffmann-La Roche Ltd. tulajdona.

© 2016 QIAGEN, minden jog fenntartva.

---

**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

---