

artus[®] EBV TM PCR Kit

Manuale

 24 (N. catalogo 4501163)

 96 (N. catalogo 4501165)

Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'impiego con

ABIPRISM[®] 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection Systems

Versione 1



4501163, 4501165



1046895IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1046895IT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN určuje standardy:

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

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

Indice

1. Contenuto	5
2. Conservazione	5
3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti	6
4. Precauzioni generali.....	7
5. Informazioni sull'agente patogeno.....	7
6. Principio della real-time PCR.....	7
7. Descrizione del prodotto.....	8
8. Protocollo	9
8.1 Estrazione del DNA.....	9
8.2 Controllo interno	12
8.3 Quantificazione	14
8.4 Preparazione della PCR.....	15
8.5 Programmazione di <i>ABI PRISM SDS</i>	20
9. Analisi dei dati	37
10. Risoluzione dei problemi.....	42
11. Specifiche	44
11.1 Sensibilità analitica	44
11.2 Specificità	45
11.3 Riproducibilità	46
11.4 Valutazione diagnostica	46
12. Avvertenze speciali per l'uso del prodotto	46
13. Avvertenze e precauzioni	47

14. Controllo di qualità.....	47
15. Riferimento bibliografico.....	47
16. Spiegazione dei simboli.....	48

artus[®] EBV TM PCR Kit

Kit da utilizzare con ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection Systems.

Attenzione: l'artus EBV TM PCR Kit non può essere utilizzato né in combinazione con il GeneAmp[®] 5700 SDS né con il formato piastra 384 di ABI PRISM7900HTSDS.

1. Contenuto

	Etichettatura e contenuto	Art. N. 4501163 24 reazioni	Art. N. 4501165 96 reazioni
Blu	EBV RG/TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Rosso	EBV LC/RG/TM QS ¹ 5 x 10 ⁴ cop/ul	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	EBV LC/RG/TM QS ² 5 x 10 ³ cop/ul	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	EBV LC/RG/TM QS ³ 5 x 10 ² cop/ul	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	EBV LC/RG/TM QS ⁴ 5 x 10 ¹ cop/ul	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	EBV RG/TM IC [⌘]	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Bianco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

[⌘] QS = Standard di quantificazione
IC = Controllo intern

2. Conservazione

I componenti dell'artus EBV TM PCR Kit devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -30 e -15 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe provocare una riduzione della sensibilità. In caso di utilizzo non regolare è necessario congelare aliquote dei reagenti. Qualora fosse necessario conservare i componenti a +4°C, non superare l'intervallo massimo di cinque ore.

3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Guanti da laboratorio senza talco
- Kit di estrazione del DNA (vedi **8.1 Estrazione del DNA**)
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro sterili per pipette
- Miscelatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre da microtitolazione (opzionale)
- Piastra di reazione da 96 pozzetti/provette di reazione per misurazioni ottiche con i relativi materiali di chiusura ottici* (vedi **8.4 Preparazione della PCR**)
- Telaio di supporto bipartito da 96 pozzetti per l'impiego con provette di reazione ottiche (*96-Well Tray/Retainer Set*, cat. n. 403 081, Applied Biosystems), vedi **8.4 Preparazione della PCR**
- Compression pad per l'impiego con pellicole ottiche adesive (*Optical Cover Compression Pads*, cat. n. 4 312 639, Applied Biosystems), vedi **8.4 Preparazione della PCR**
- Applicatore per la chiusura delle piastre di reazione con l'impiego di pellicole ottiche adesive (*Adhesive Seal Applicator Kit*, cat. n. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000, 7700 o 7900HT SDS*

Attenzione: all'atto della messa in funzione degli strumenti è assolutamente necessario eseguire una taratura valida dei coloranti (*Pure Spectra Component File*) e del fondo (*Background Component File*).

* L'utilizzo di provette di reazione per misurazioni ottiche con tappi a cupola è ammesso solo per *ABI PRISM® 7700 SDS* e richiede la modifica del tempo di esposizione (vedi **8.5.2 Programmazione di *ABI PRISM® 7700 SDS*, 8.5.2.5 Altre impostazioni importanti**).

4. Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali con filtro sterili per pipette.
- Estrarre e conservare il materiale positivo (campioni, controlli, ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerlo alla mix di reazione in luogo separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente.
- Una volta scongelati miscelare i componenti e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento.

5. Informazioni sull'agente patogeno

La trasmissione del virus di Epstein-Barr (EBV) avviene per via orale, principalmente attraverso la saliva infetta. Di solito, particolarmente nell'infanzia, l'infezione da EBV è asintomatica. Il segno clinico di un'infezione acuta in atto è la mononucleosi infettiva associata a febbre, stanchezza, angina e inoltre ingrossamento dei linfonodi e della milza. In alcuni pazienti questi disturbi possono presentarsi in forma cronica recidiva. Le forme progressive più gravi dell'infezione da EBV si manifestano soprattutto nei pazienti immunodepressi e con anomalie dei linfociti T.

6. Principio della real-time PCR

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Per la real-time PCR la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito associate a sonde oligonucleotidiche, che si legano specificatamente al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare i prodotti senza dover riaprire le provette dei campioni al termine della PCR (Mackay, 2004).

7. Descrizione del prodotto

L'*artus* EBV TM PCR Kit è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA di EBV tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) con *ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection System*. L'*EBV RG/TM Master* contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione

specificata di una regione pari a 97 bp del genoma di EBV. La rilevazione dell'amplicone avviene misurando la fluorescenza FAM in *ABI PRISM SDS*.

L'*artus* EBV TM PCR Kit contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologo per la rilevazione di una possibile inibizione della PCR, che viene rilevato come *Controllo interno (IC)* misurando la fluorescenza VIC. In questo modo non viene ridotto il limite di rilevabilità della PCR analitica di EBV (vedi **11.1 Sensibilità analitica**). Il kit comprende controlli positivi esterni (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*), che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito, consultare il paragrafo

8.3 Quantificazione.

8. Protocollo

8.1 Estrazione del DNA

Sono disponibili kit per l'estrazione del DNA di diversi produttori. Attenendosi al protocollo del produttore prescelto utilizzare la quantità di campione indicata e eseguire l'estrazione del DNA conformemente alle istruzioni. Si raccomanda l'utilizzo dei seguenti kit d'estrazione:

Campione	Kit di estrazione	Numero di catalogo	Produttore	Carrier RNA
siero, plasma, liquor	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	non incluso
	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	incluso
cellule del sangue	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	non incluso
plasma	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	incluso

*Per l'impiego in combinazione con la workstation BioRobot[®] EZ1 DSP (cat. n. 9001360) e l'EZ1 DSP Virus Card (cat. n. 9017707).

Importante per l'uso del QIAamp UltraSens Virus Kit, del QIAamp DNA Blood Mini Kit e del QIAamp DNA Mini Kit:

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Nel caso in cui il kit di estrazione utilizzato non dovesse contenere carrier RNA, si raccomanda assolutamente di aggiungere carrier RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, cat. n. 27-4110-01) soprattutto quando si estraggono acidi nucleici da fluidi corporei privi di cellule e da materiali a basso contenuto di DNA/RNA (per esempio liquor). Procedere come segue:

- a) Risospendere il carrier RNA liofilizzato nel tampone di eluizione (non nel tampone di lisi) del kit di estrazione (per es. tampone AE del QIAamp DNA Mini Kit / QIAamp DNA Blood Mini Kit) e effettuare una diluizione ad una concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ripartire questa soluzione di carrier RNA nel numero desiderato di aliquote, da conservare a -20 C . Evitare di scongelare più volte ($> 2 \times$) un' aliquota di carrier RNA.
- b) Per ogni procedura di purificazione dovrebbe essere utilizzato 1 μg di carrier RNA per 100 μl di tampone di lisi. Se per esempio il protocollo di estrazione prevede 200 μl di tampone di lisi per ogni campione da purificare, aggiungere 2 μl di carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) direttamente al tampone di lisi. Prima dell'inizio di ogni procedura di purificazione deve essere preparata a fresco una miscela di tampone di lisi e di carrier RNA (e eventualmente di *Controllo interno*, vedi **8.2 Controllo interno**) in base al seguente schema di pipettamento.

Numero dei campioni	1	12
tampone di lisi	per es. 200 μl	per es. 2.400 μl
carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
volume totale	202 μl	2.424 μl
volume per la purificazione	200 μl	200 μl ciascuno

- c) Utilizzare subito la miscela di tampone di lisi e di carrier RNA preparata a fresco per la purificazione. Non è possibile conservare la miscela.
- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Per ottenere una maggiore stabilità del carrier RNA in dotazione con il QIAamp UltraSens Virus Kit consigliamo la seguente procedura diversa da quella indicata dal manuale del kit di estrazione:
 - a. Prima del primo utilizzo del kit di estrazione risospendere il carrier RNA liofilizzato in 310 μl del tampone di eluizione contenuto nel kit

(concentrazione finale 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, non utilizzare tampone di lisi) e ripartire questa soluzione di carrier RNA nel numero desiderato di aliquote, da conservare a -20 C . Evitare di scongelare più volte ($> 2 \times$) un' aliquota di carrier RNA.

- b. Prima dell'inizio di ogni procedura di purificazione deve essere preparata a fresco una miscela di tampone di lisi e di carrier RNA (e eventualmente di *Controllo interno*, vedi **8.2 Controllo interno**) in base al seguente schema di pipettamento.

Numero dei campioni	1	12
tampone di lisi AC	800 μl	9.600 μl
carrier RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
volume totale	805,6 μl	9.667,2 μl
volume per la purificazione	800 μl	800 μl ciascuno

- c. Utilizzare subito la miscela di tampone di lisi e di carrier RNA preparata a fresco per la purificazione. Non è possibile conservare la miscela.
- Utilizzando il **QIAamp UltraSens Virus Kit** si ottiene una concentrazione del campione. Se il campione non è siero o plasma, aggiungere almeno il 50 % (v/v) di plasma umano negativo.
 - Gli **anticoagulanti** contenuti nelle provette di prelievo del sangue possono agire come inibitori della PCR, ma verranno eliminati utilizzando i kit di estrazione sopra elencati. Si raccomanda di evitare l'utilizzo di sangue trattato con eparina.
 - Nelle procedure di estrazione del DNA che richiedono l'utilizzo di tamponi di lavaggio contenenti **etanolo**, assicurarsi di eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (tre minuti, 13.000 rpm) prima dell'eluizione, onde rimuovere residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.
 - L'*artus* EBV TM PCR Kit non deve essere utilizzato con procedure di estrazione del DNA basate su **fenolo**.

Importante per l'uso dell'EZ1 DSP Virus Kit:

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Ad ogni estrazione aggiungere un'adeguata quantità di carrier RNA seguendo le istruzioni contenute nell'*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Importante: il *Controllo interno* dell'*artus EBV TM PCR Kit* può essere impiegato direttamente nella procedura di estrazione del DNA (vedi **8.2 Controllo interno**).

8.2 Controllo interno

Il kit comprende un *Controllo interno (EBV RG/TM IC)*, che consente di verificare sia la procedura di estrazione del DNA che una possibile inibizione della PCR (vedi Fig. 1). Se si usa l'*EZ1 DSP Virus Kit* per l'estrazione, il *Controllo interno* deve essere aggiunto seguendo le istruzioni contenute nell'*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Se si usa il **QIAamp UltraSens Virus Kit**, il **QIAamp DNA Blood Mini Kit** o il **QIAamp DNA Mini Kit**, durante l'estrazione aggiungere il *Controllo interno* in un rapporto di 0,1 μ l per 1 μ l del volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il **QIAamp UltraSens Virus Kit** e il DNA è diluito in 60 μ l di tampone AVE, aggiungere 6 μ l di *Controllo interno*. Se l'eluizione avviene in 50 μ l, aggiungere il corrispondente volume di 5 μ l. La quantità di *Controllo interno* impiegato dipende **solo** dal volume di eluizione. Il *Controllo interno* e il carrier RNA (vedi **8.1 Estrazione del DNA**), possono essere aggiunti solo

- alla miscela di tampone di lisi e di campione o
- direttamente al tampone di lisi

Il *Controllo interno* non deve essere aggiunto direttamente al campione. Quando si aggiunge il tampone di lisi occorre considerare che la miscela di

Controllo interno e di tampone di lisi/carrier RNA va usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un difettoso funzionamento del *Controllo interno* e quindi ad una minore efficacia della procedura di purificazione). **Non** aggiungere il *Controllo interno* e il carrier RNA direttamente al campione.

In alternativa è possibile utilizzare il *Controllo interno* **esclusivamente per il controllo di una possibile inibizione della PCR** (vedi Fig. 2). A tale scopo aggiungere per ogni reazione 2 μ l di *Controllo interno* direttamente a 30 μ l di *EBV RG/TM Master*. Per ogni reazione di PCR utilizzare 30 μ l di *Master Mix**

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è trascurabile. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

preparata come descritto sopra, quindi aggiungere 20 µl di campione purificato. Se si desidera effettuare una corsa di PCR per più campioni, aumentare le quantità di *EBV RG/TM Master* e di *Controllo interno* in base al numero dei campioni (vedi **8.4 Preparazione della PCR**).

8.3 Quantificazione

Gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) vengono trattati come campioni già purificati e se ne utilizza lo stesso volume (20 µl). Per creare una curva standard in un *ABI PRISM Sequence Detection System*, utilizzare tutti e quattro gli *Standard di quantificazione* in dotazione e definirli come standard indicando le rispettive concentrazioni (vedi

8.5 Programmazione di ABI PRISM SDS). Non è possibile importare curve standard da cicli precedenti con il software di *ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS*.

Attenzione: gli *Standard di quantificazione* vengono definiti in copie/µl. Per convertire in copie/ml di campione i valori ottenuti con l'aiuto della curva standard, utilizzare la formula seguente:

$$\text{risultato (copie/ml)} = \frac{\text{risultato (copie/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{volume del campione (ml)}}$$

Notare che nella formula di cui sopra occorre utilizzare il volume iniziale del campione. Questo è da tenere presente soprattutto quando il volume campione è stato modificato prima dell'estrazione degli acidi nucleici (per esempio per riduzione dovuta a centrifugazione o per aumento dovuto ad aggiunta di volume per raggiungere la quantità richiesta per la purificazione).

Importante: per semplificare l'analisi quantitativa dei sistemi *artus* in *ABI PRISM 7000 SDS* consultare la guida **Technical Note for Quantitation on ABI PRISM 7000 SDS** all'indirizzo Internet www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

8.4 Preparazione della PCR

Preparare il numero di provette di reazione necessario per le reazioni programmate o la piastra di reazione da 96 pozzetti. La tabella riportata di seguito fornisce un elenco dei materiali raccomandati:

Articolo	Denominazione	Numero di catalogo	Produttore	Telaio di supporto*	Compression pad
Piastra ottica di reazione da 96 pozzetti	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	no	-
Pellicole adesive ottiche	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	sì
Provette di reazione ottiche	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	sì	-
Provette di reazione ottiche	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	sì	-
Tappi ottici (piatti)	ABI PRISM Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	-	no

Attenzione: l'impiego di provette di reazione per misurazioni ottiche con tappi a cupola è ammesso solo per lo strumento *ABI PRISM 7700 SDS* e richiede una regolazione del tempo di esposizione (vedi **8.5.2 Programmazione di ABI PRISM 7700 SDS**, **8.5.2.5 Altre impostazioni importanti**).

Nella preparazione della PCR assicurarsi che per ciascuna corsa di PCR siano eseguiti parallelamente almeno uno *Standard di quantificazione* e un controllo negativo (*Water, PCR grade*). Per la creazione di una curva standard utilizzare per ogni PCR tutti gli *Standard di quantificazione* forniti (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Prima di iniziare il test tutti i reagenti devono essere scongelati completamente a temperatura ambiente, miscelati con cura

* In caso di impiego del telaio di supporto bipartito è necessario aprire le provette di reazione sia all'atto dell'inserimento che dell'estrazione. Per evitare contaminazioni da ciò dipendenti, utilizzare solo la parte inferiore del telaio di supporto.

(pipettamento ripetuto oppure breve agitazione su vortex) ed infine centrifugati.

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno* per controllare sia la procedura di estrazione del DNA che una possibile inibizione della PCR, il *Controllo interno* deve essere aggiunto precedentemente alla procedura di purificazione (vedi **8.2 Controllo interno**). In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 1):

		Numero dei campioni	
		1	12
1. Preparazione della Master Mix	EBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
	EBV RG/TM IC	0 μ l	0 μ l
	volume totale	30 μl	360 μl
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	30 μ l	30 μ l ciascuno
	campione	20 μ l	20 μ l ciascuno
	volume totale	50 μl	50 μl ciascuno

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno* **esclusivamente per la verifica di un'inibizione della PCR**, è necessario aggiungerlo direttamente all'EBV RG/TM Master. In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 2):

		Numero dei campioni	
		1	12
1. Preparazione della Master Mix	EBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
	EBV RG/TM IC	2 μ l	24 μ l
	volume totale	32 μl*	384 μl*
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	30 μ l*	30 μ l* ciascuno
	campione	20 μ l	20 μ l ciascuno
	volume totale	50 μl	50 μl ciascuno

Pipettare in ogni provetta di reazione o in ogni pozzetto della piastra di reazione da 96 pozzetti 30 μ l di Master Mix. Quindi aggiungere 20 μ l di DNA estratto. Accertarsi che le due soluzioni vengano ben miscelate pipettandole

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è irrilevante. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

ripetutamente. Chiudere le provette di reazione con i rispettivi tappi o in caso di utilizzo di una piastra di reazione da 96 pozzetti usare in alternativa le pellicole adesive ottiche (*Optical Adhesive Covers*). Per raccogliere il volume di reazione sul fondo della provetta di reazione o della piastra, centrifugare le provette di reazione (in un rack di conservazione specifico per provette PCR) o la piastra di reazione da 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastre da microtitolazione per 30 secondi a 1.780 x g (4.000 rpm). Se non è disponibile una centrifuga di questo genere, preparare le reazioni di PCR accertandosi di pipettare sul fondo delle provette di reazione o delle unità di reazione (pozzetti) sia la Master Mix che il volume campione. Conservare i preparati della reazione a +4°C finché lo strumento *ABI PRISM SDS* non è programmato (vedi **8.4 Programmazione di ABI PRISM SDS**) e quindi trasferirli nello strumento.

Attenzione:

- In caso di utilizzo di provette di reazione ottiche con tappi ottici inserire sempre un telaio di supporto (*96-Well Tray/Retainer Set*) nello strumento (*ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS*). In caso di utilizzo del telaio di supporto bipartito è necessario aprire le provette di reazione sia per l'inserimento che per l'estrazione. Per evitare contaminazioni conseguenti, utilizzare solo la parte inferiore del telaio di supporto.
- L'impiego di una piastra ottica di reazione da 96 pozzetti in combinazione con pellicole adesive ottiche richiede l'applicazione di un *compression pad* (*Optical Cover Compression Pads*).

Aggiunta del *Controllo interno* alla procedura di purificazione

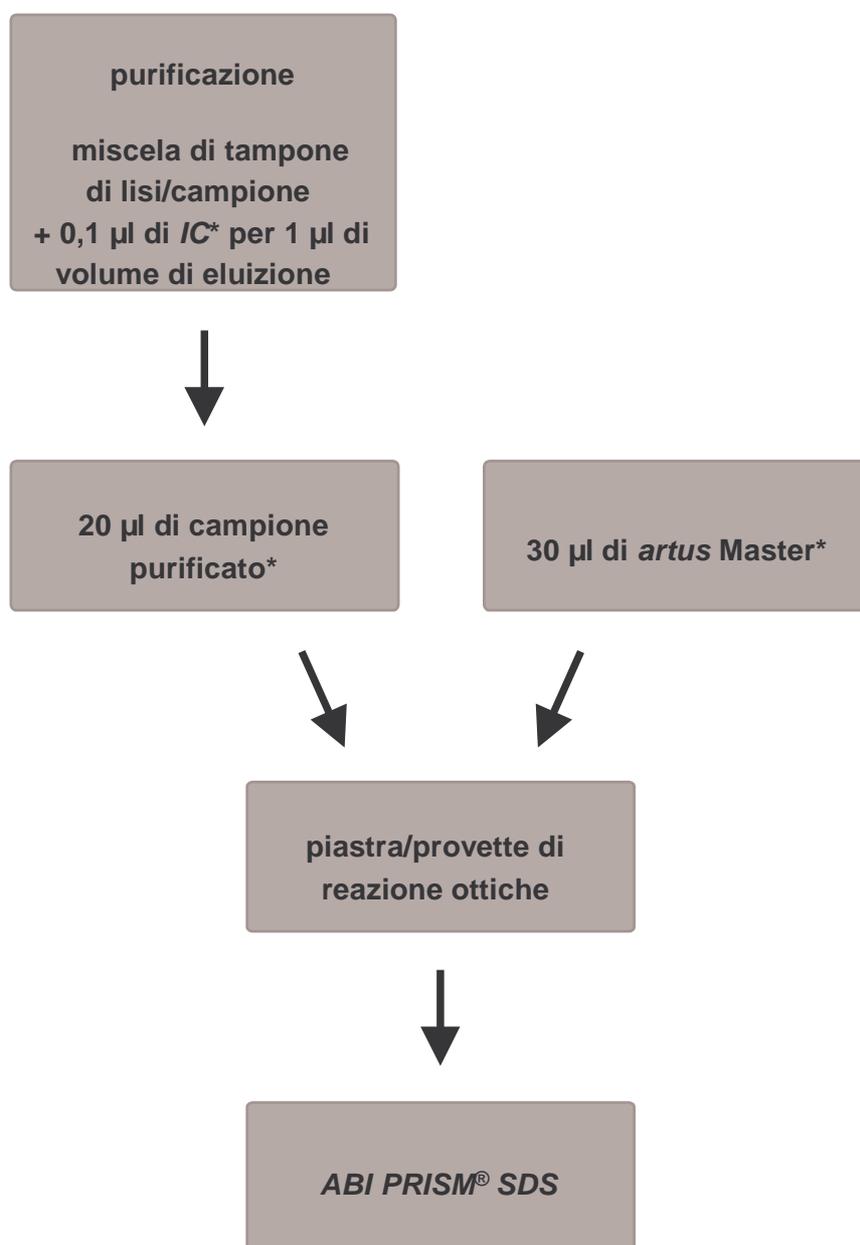


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'estrazione del DNA e dell'inibizione della PCR.

*

Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

Aggiunta del *Controllo interno* alla soluzione *artus Master*

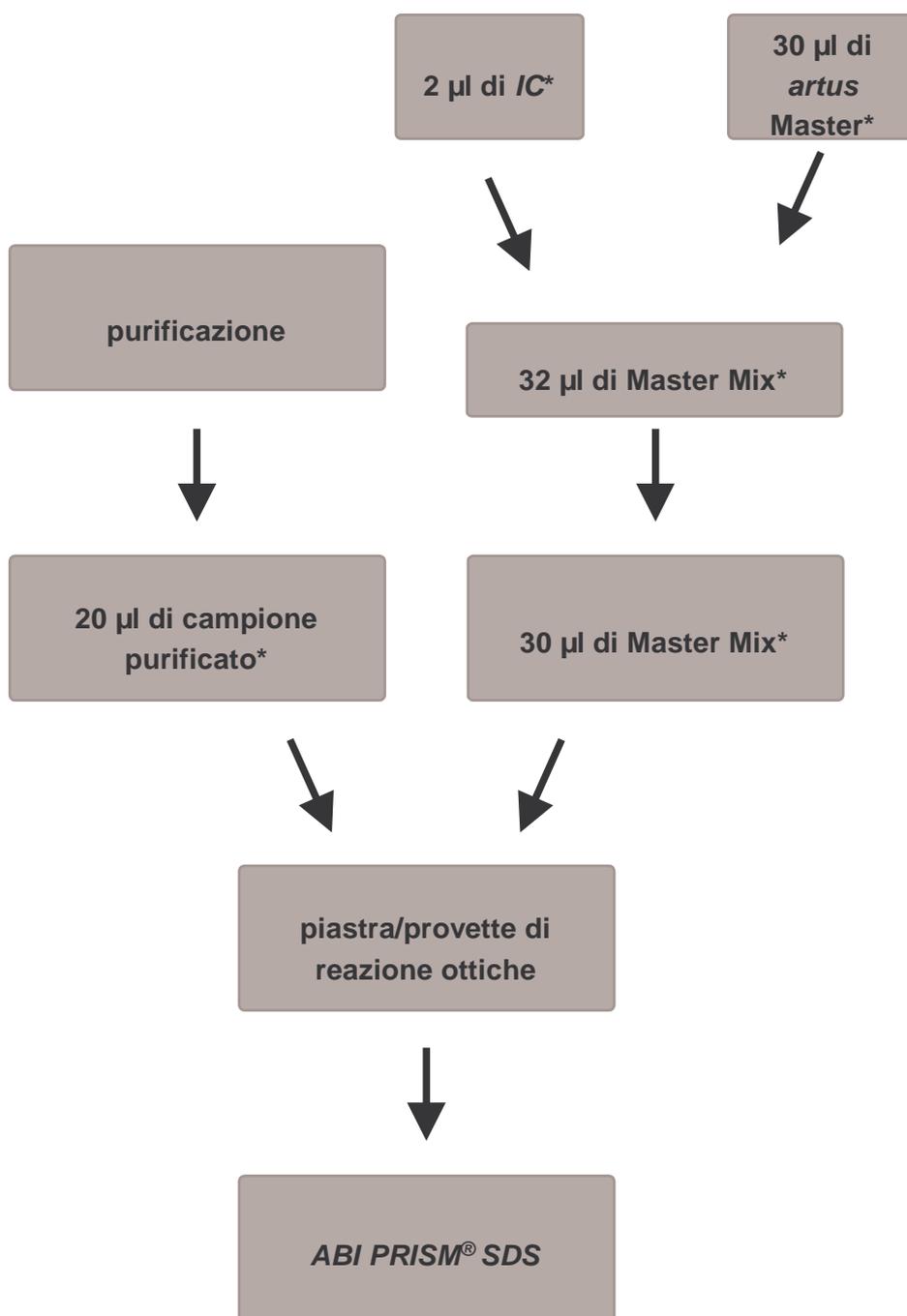


Fig. 2: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'inibizione della PCR.

*

Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

8.5 Programmazione di **ABI PRISM SDS**

Prima di avviare la corsa di PCR il software di *ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection Systems (SDS)* necessita di alcune informazioni aggiuntive. La metodica applicata nella programmazione cambia enormemente da uno strumento all'altro; pertanto segue una trattazione in capitoli separati.

8.5.1 Programmazione di **ABI PRISM 7000 SDS**

Per rilevare il DNA di EBV creare nel proprio *ABI PRISM 7000 SDS* un profilo rispettando le sei fasi operative riportate di seguito (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Tutte le indicazioni fanno riferimento a *ABI PRISM 7000 SDS Software-Version 1.0.1*. Per i dettagli riguardanti la programmazione di *ABI PRISM 7000 SDS* consultare l'*ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.5.1.1 Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR

Selezionare in *ABI PRISM 7000 SDS* la voce di menu *New* in *File* ed inserire per il nuovo documento le seguenti impostazioni di base (vedi Fig. 3). Un template precedentemente salvato (*SDS Template [*.sdt]*) è a disposizione nella lista *Template* oppure selezionandolo con la funzione *Browse* (vedi 8.5.1.5 *Come salvare la corsa di PCR*). Confermare i dati inseriti (OK).

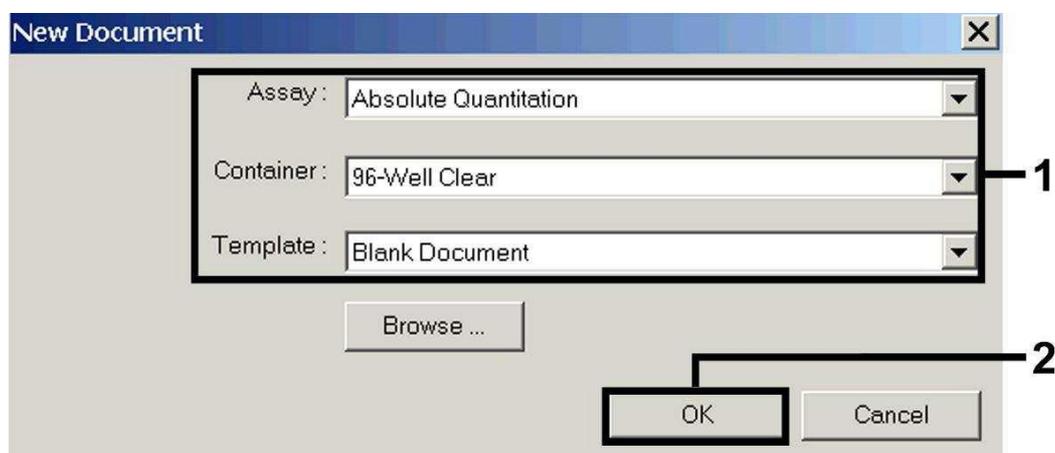


Fig. 3: Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR (*New Document*).

8.5.1.2 Creazione/selezione dei rilevatori

Con l'ausilio del sottomenu *Detector Manager* che si trova in *Tools* assegnare al documento i rispettivi coloranti di rilevazione. Per la rilevazione del DNA di EBV ed anche del *Controllo interno* con l'impiego dell'*artus EBV TM PCR Kit* devono essere definiti i reporter/quencher indicati nella tabella che segue:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di EBV	FAM	none
<i>Controllo interno (EBV RG/TMIC)</i>	VIC	none

Per creare questi rilevatori selezionare l'opzione *File* che si trova in basso a sinistra nel *Detector Manager* e di seguito l'opzione *New*.

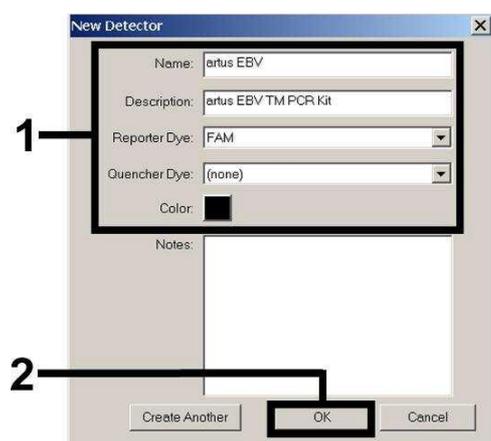


Fig. 4: Creazione del rilevatore specifico di EBV (*DetectorManager*).

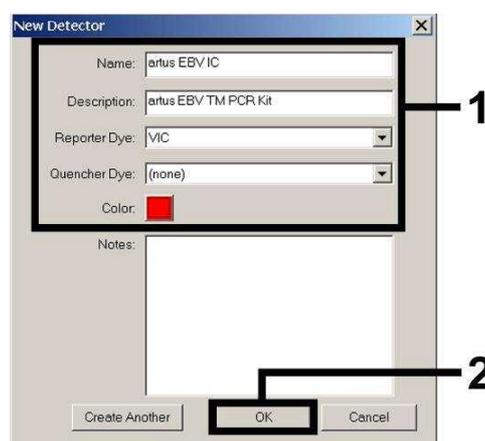


Fig. 5: Creazione del rilevatore specifico del *Controllo interno* (*Detector Manager*).

Per la rilevazione del DNA di EBV definire nella finestra visualizzata (analogamente a Fig. 4 e Fig. 5) la combinazione reporter/quencher **FAM/none**, per la rilevazione del *Controllo interno* selezionare invece la combinazione **VIC/none**. Con la conferma dei dati inseriti (OK) si torna al *Detector Manager*. Evidenziare i rilevatori appena creati e trasferire al *Well Inspector* ogni selezione, facendo clic sull'opzione *Add to Plate Document* (vedi Fig. 6). Chiudere la finestra (*Done*).

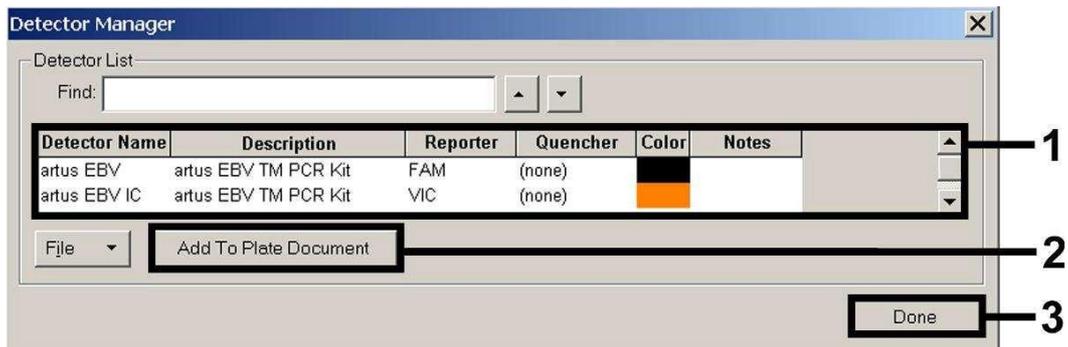


Fig. 6: Selezione dei rilevatori (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Aprire l'opzione *Well Inspector* che si trova in *View*. In questo modo si ritrovano i rilevatori selezionati in 8.5.1.2 (vedi Fig. 7).

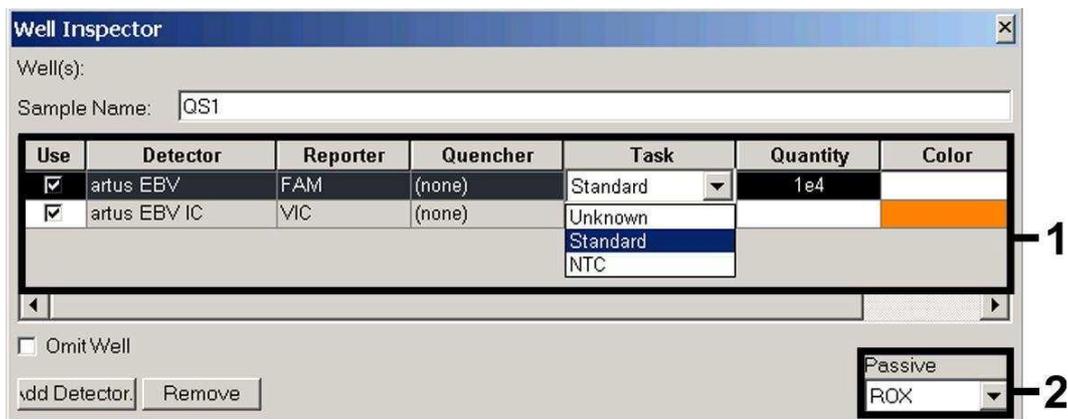


Fig. 7: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra (*Well Inspector*).

Selezionare le posizioni della piastra destinate alla rilevazione del DNA di EBV. Assegnare a queste posizioni i rilevatori selezionati attivando con un clic l'opzione *Use* dei due rilevatori. Compare un piccolo segno di spunta. Per l'identificazione delle singole miscele di reazione, selezionare la posizione corrispondente sulla piastra e registrare il nome in *Sample Name*. E' importante ricordare che le miscele con *Sample Name* identico e

assegnazione di rilevatore identico vengono identificate dal software come replica e, rispetto alla loro carica patogena quantificata, ne viene calcolata la media. Selezionare quindi per ogni tipo di campione la rispettiva funzione (*Task*) in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo di campione	Funzione (<i>Task</i>)	Concentrazione (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
campione	Unknown	-	FAM	none
controllo	NTC	-	FAM	none
standard	Standard	vedi 1. Contenuto	FAM	none

Per creare una curva standard utilizzare per ogni corsa di PCR tutti gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) ed inserire le rispettive concentrazioni (vedi **1. Contenuto**) per ogni singolo standard nel campo *Quantity*. Occorre ricordare che per una corsa di PCR con l'*artus EBV TM PCR Kit* deve essere impostato **ROX** come riferimento passivo (*Passive Reference*). La distribuzione uniforme del colorante ROX su tutte le reazioni di PCR di un lotto mediante miscelazione dell'*EBV RG/TM Master* garantisce l'identificazione e il calcolo di variazioni *tube-to-tube* (differenze di fluorescenza tra le diverse reazioni di PCR) grazie al *Sequence Detection Software* (normalizzazione).

8.5.1.4 Creazione del profilo della temperatura

Per inserire il profilo della temperatura passare nel software dal livello *Setup* al livello *Instrument*. Inserire conformemente a Fig. 8 il profilo di temperatura valido per rilevare il DNA di EBV. Per eliminare la fase da 50°C memorizzata nelle preimpostazioni, evidenziarla con l'impiego del tasto sinistro del mouse tenendo contemporaneamente premuto il tasto *Shift*, quindi cancellarla con il tasto *Backspace*. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 µl. L'opzione *9600 Emulation* dovrebbe essere attivata, mentre le preimpostazioni di *Auto Increment* dovrebbero rimanere invariate (*Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).

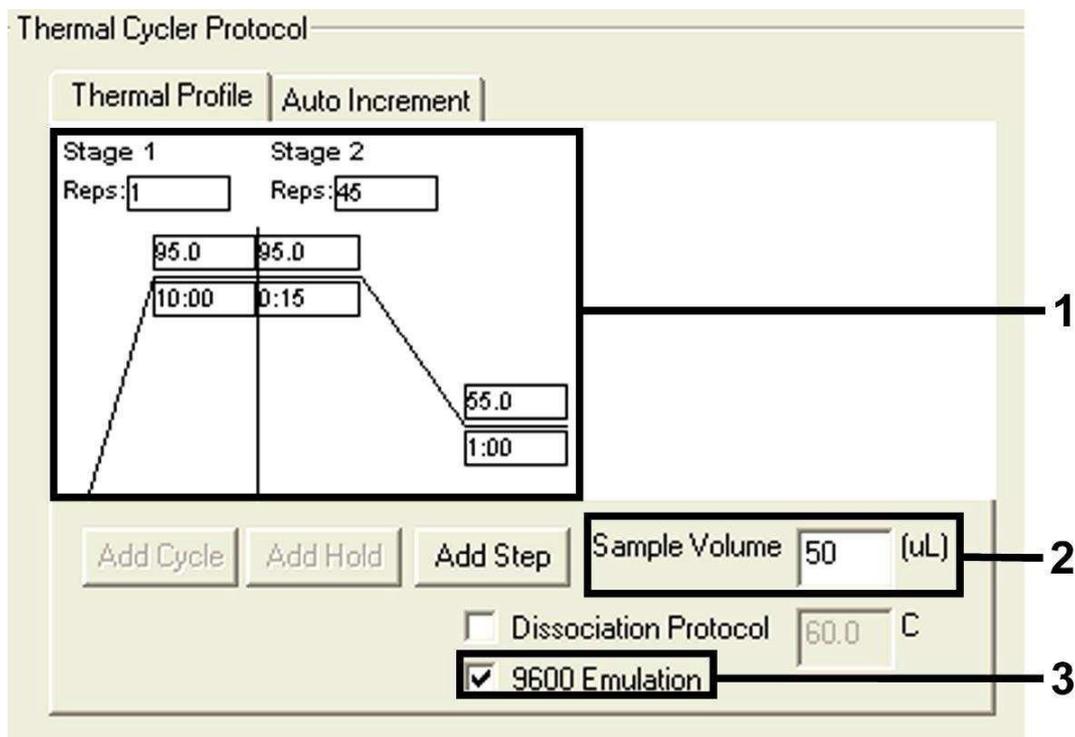


Fig. 8: Creazione del profilo della temperatura.

8.5.1.5 Come salvare la corsa di PCR

A questo punto le impostazioni inserite (*Setup*) possono essere salvate come maschera ed essere quindi nuovamente utilizzate per applicazioni successive in forma invariata o modificata. Salvando le impostazioni come *SDS Template* (*.sdt) nella cartella *Template Directory* (disco locale [C:] \Program Files\ABI PRISM 7000\Templates creata dalla Applied Biosystems), tale file si può selezionare direttamente dall'elenco a tendina del *Template* all'interno della finestra *New Document*. I modelli salvati in altre cartelle devono essere aperti mediante *Browse*. Prima di avviare la corsa di PCR, accertarsi di salvarla di nuovo come *SDS Document* (*.sds). In questo modo si garantisce che i dati raccolti nel corso della PCR vengano salvati.

8.5.1.6 Avvio della corsa di PCR

Avviare la corsa di PCR selezionando l'opzione *Start* dal menu *Instrument* o il campo *Start* al livello *Instrument*.

8.5.2 Programmazione di ABI PRISM 7700 SDS

Per rilevare il DNA di EBV creare nel proprio ABI PRISM 7700 SDS un profilo rispettando le sette fasi operative riportate di seguito (8.5.2.1 - 8.5.2.7). Tutte le indicazioni fanno riferimento al software ABI PRISM 7700 SDS Software-Version 1.9.1. Per i dettagli riguardanti la programmazione di ABI PRISM 7700 SDS consultare l'ABI PRISM 7700 SDS User's Manual. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.5.2.1 Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR

Selezionare in ABI PRISM 7700 SDS la voce di menu *New Plate* in *File* ed inserire per il nuovo documento le seguenti impostazioni di base (vedi Fig. 9). Confermare i dati inseriti (OK).

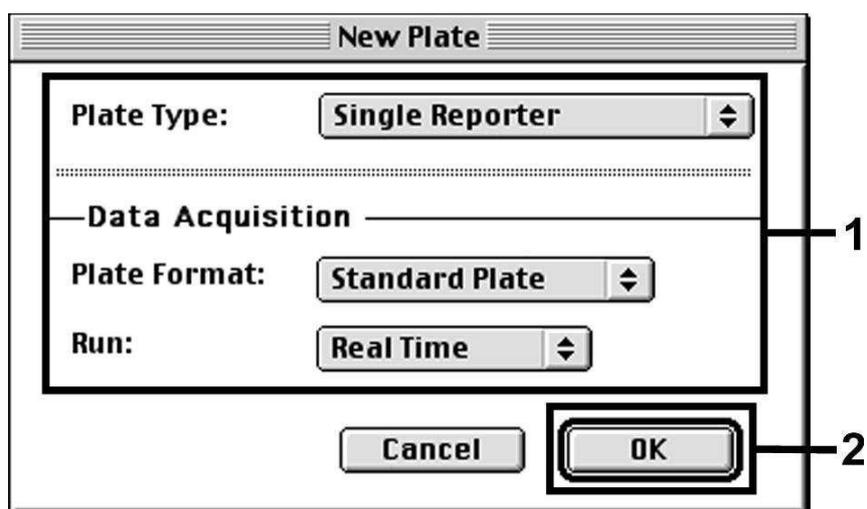


Fig. 9: Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR (*New Plate*).

8.5.2.2 Selezione dei coloranti di fluorescenza ed assegnazione del tipo di campione

Con l'impiego del *Sample Type Setup* (Livello *Setup: Sample Type/Sample Type Setup*) assegnare al documento i rispettivi coloranti di rilevazione e il tipo di campione corrispondente. Per la rilevazione del DNA di EBV ed anche del *Controllo interno* con l'impiego dell'*artus EBV TM PCR Kit* devono essere definiti i reporter/quencher indicati nella tabella seguente:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di EBV	FAM	none
Controllo interno (EBV RG/TMIC)	VIC	none

Per misurare il DNA di EBV con l'impiego dell'*artus* EBV TM PCR Kit selezionare il colorante reporter **FAM** analogamente a quanto indicato nella tabella. La stessa procedura è valida per gli standard (STND), i campioni (UNKN) ed anche per i controlli negativi (UNKN). Per la misurazione del *Controllo interno* (IPC+) provvedere alla rispettiva definizione come reporter **VIC**. Impostare come quencher **none**. L'assegnazione dei coloranti e dei tipi di campioni nella finestra *Sample Type Setup* è illustrata in Fig. 10:.

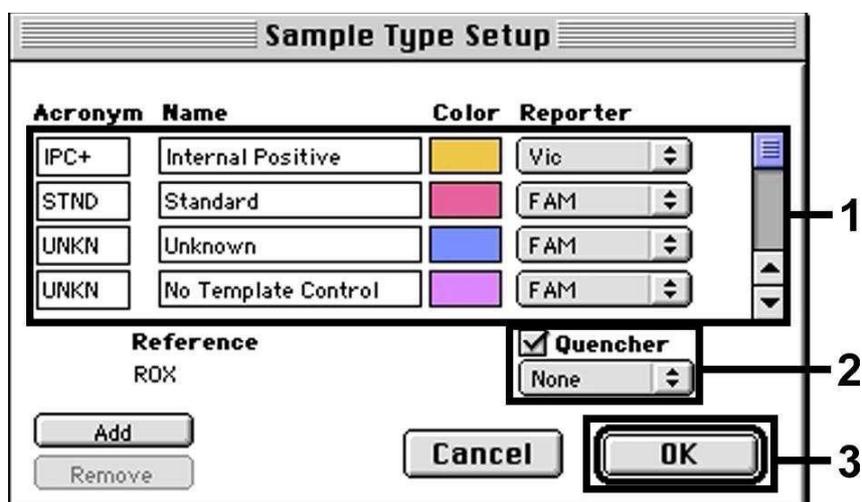


Fig. 10: Selezione dei coloranti di fluorescenza ed assegnazione del tipo di campione (*Sample Type Setup*).

L'assegnazione del tipo di campione ad una rispettiva funzione (*Acronym*) avviene in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo di campione	Funzione (<i>Acronym</i>)	Concentrazione (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
campione	UNKN	-	FAM	none
controllo	UNKN	-	FAM	none
standard	STND	vedi 1. Contenuto	FAM	none

8.5.2.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Per l'assegnazione dei rilevatori e dei tipi di campioni alle singole posizioni della piastra selezionare i rispettivi campi. Aprire al livello *Setup* la finestra di dialogo *Dye Layer* ed effettuare l'assegnazione ai rispettivi reporter. Attivare il menu pop-up *Sample Type*; in questo modo è possibile ritrovare nella lista visualizzata i tipi di campioni assegnati al reporter nel *Sample Type Setup* (vedi Fig. 11). Selezionare il tipo di campione adeguato (vedi tabella in 8.5.2.2) e servendosi dei menu *Dye Layers* e *Sample Type* assegnare alle restanti posizioni della piastra. Nel campo *Sample Name* è possibile assegnare un nome a ciascun campione. Dei campi definiti come *Replicate* (inserimento del nome del campione di riferimento nella colonna *Replicate*) il software calcola la media dei rispettivi valori della carica patogena quantificata e ne calcola anche la rispettiva deviazione standard.

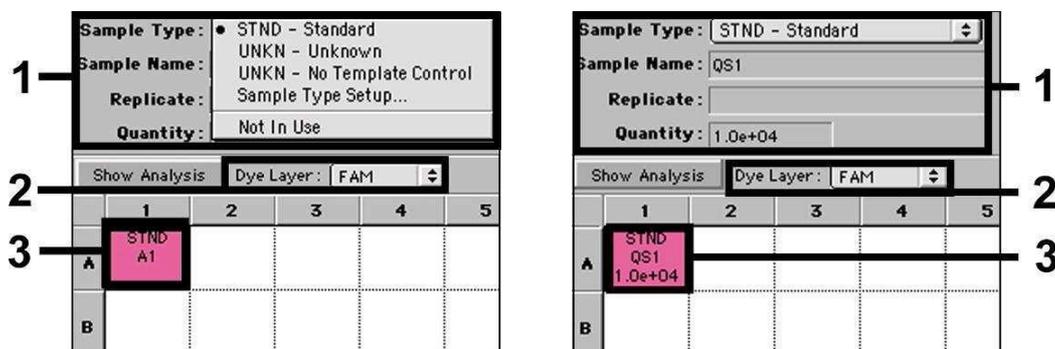


Fig. 11/12: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra.

Per creare una curva standard utilizzare per ogni corsa di PCR tutti gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) ed inserire le rispettive concentrazioni (vedi **1. Contenuto**) per ogni singolo standard (*Quantity*, vedi Fig. 12). Tuttavia ciò è possibile solo se le posizioni occupate con gli standard sono state precedentemente definite come tali con l'impiego del menu *Sample Type*.

8.5.2.4 Creazione del profilo della temperatura

Per inserire il profilo della temperatura passare al menu *Thermal Cycler Conditions* nella videata *Setup*. Inserire conformemente a Fig. 13 il profilo della temperatura valido per la rilevazione del DNA di EBV. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 μ l. Le preimpostazioni dei tempi *Ramp* e di *Auto Increment* rimangono immutate (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

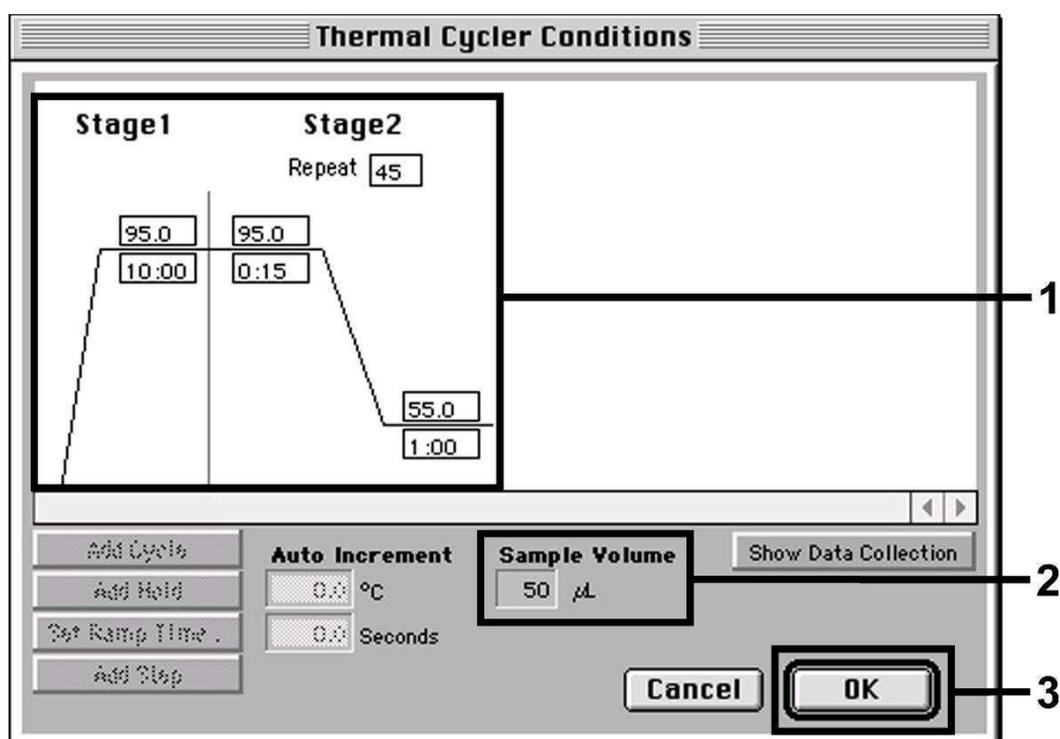


Fig. 13: Creazione del profilo della temperatura.

Nel menu *Thermal Cycler Conditions* è disponibile anche l'opzione *Show Data Collection*. Selezionando questa opzione si passa alla finestra illustrata in Fig. 14. Ogni singola temperatura di *Ramp* e di *Plateau* è provvista di un simbolo di acquisizione dei dati (*Data Collection Icon*), che mostra l'acquisizione dei dati nel momento presente della corsa. Facendo clic rimuovere tutti i simboli fino a quello corrispondente al momento della fase *Annealing-Extension* (*Stage2/Step2*), per evitare inutili misurazioni della

fluorescenza e così da mantenere quanto più basso possibile il tempo di corsa totale e la quantità di dati.

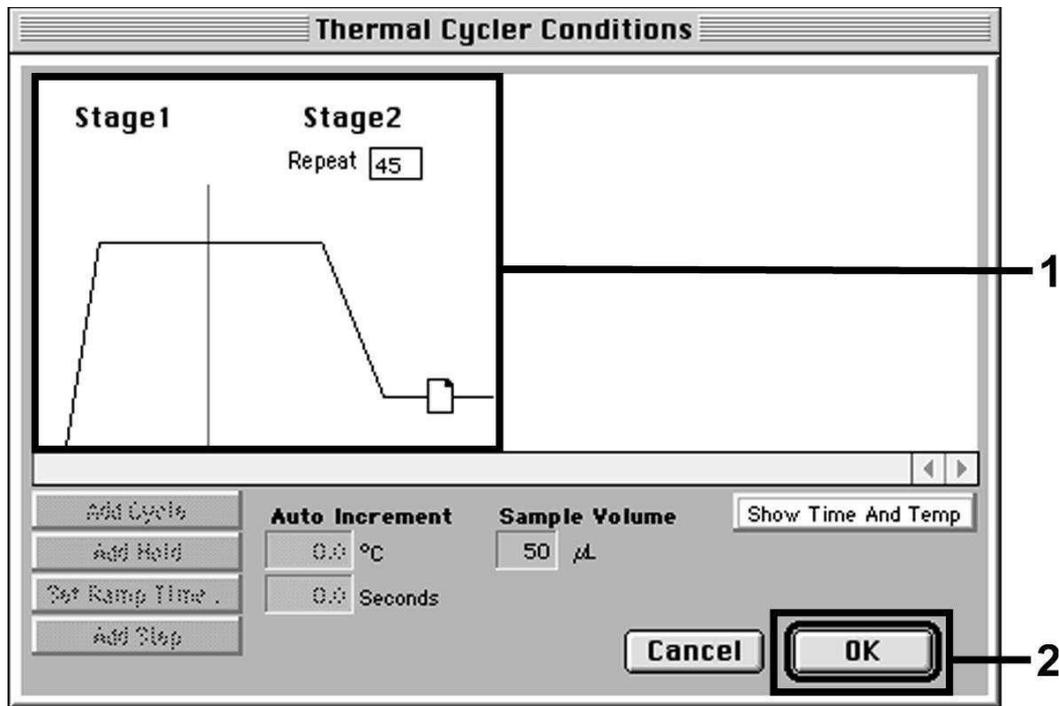


Fig. 14: Raccolta dati (*Data Collection*).

8.5.2.5 Altre impostazioni importanti

Per impostare il tempo di esposizione (eccitazione dei coloranti di fluorescenza) ed anche per selezionare i file *Pure Spectra/Background* passare dal livello *Setup* al livello *Analysis*. Selezionare la sottovoce *Advanced Options* ora attivata che si trova nel menu *Instrument* sotto *Diagnostics*. Eseguire le impostazioni in base alla Fig. 15. Disattivando la funzione opzionale *Spectra Components (Analysis)*, la nuova analisi delle corse già analizzate utilizza automaticamente i file di taratura attuali, archiviati nella cartella *Spectra Components* al momento della generazione dei dati. Per effettuare un'analisi di corse precedenti con l'impiego di *Spectra Components* di nuova lettura, attivare tutti e due i campi. Occorre ricordare che per una corsa di PCR con l'*artus EBV TM PCR Kit* deve essere impostato **ROX** come riferimento passivo (*Reference*). La distribuzione uniforme del colorante ROX

su tutte le reazioni di PCR di un lotto mediante miscelazione dell'*EBV RG/TM Master* garantisce l'identificazione e il calcolo di variazioni *tube-to-tube* (differenze di fluorescenza tra le diverse reazioni di PCR) grazie al *Sequence Detection Software* (normalizzazione).

Attenzione: in caso di utilizzo di piastre da 96 pozzetti per misurazioni ottiche con pellicole adesive ottiche (*Optical Adhesive Covers*) o di provette di reazione ottiche con tappi piatti, il tempo di esposizione (*Exposure Time*) è di dieci millisecondi. In caso di utilizzo di **provette di reazione ottiche con tappi a cupola**, commutare il tempo su **25 millisecondi**.

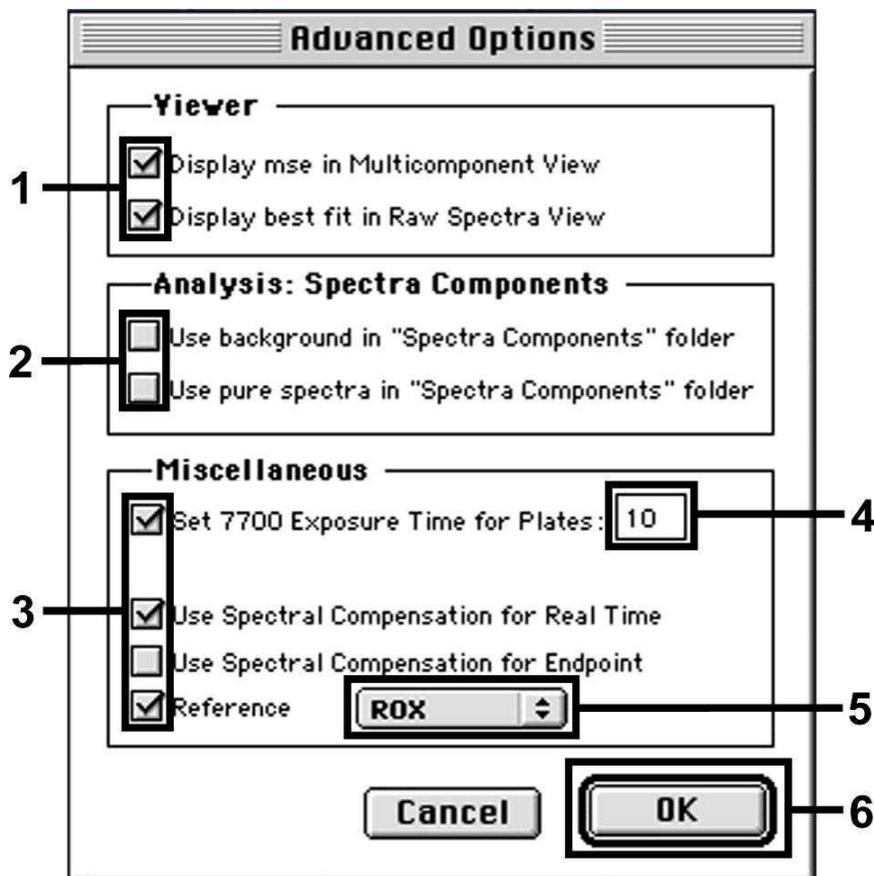


Fig. 15: Altre impostazioni importanti (*Advanced Options*).

8.5.2.6 Come salvare la corsa di PCR

A questo punto le impostazioni inserite (*Setup*) possono essere salvate come maschera e quindi nuovamente utilizzate per applicazioni successive in forma

invariata o modificata. A tale scopo salvare questo file in *Stationary File Format*. Prima di iniziare la corsa di PCR attualmente programmata assicurarsi di salvarla nuovamente in *Normal File Format*. In questo modo si garantisce che i dati raccolti nel corso della PCR vengano salvati.

8.5.2.7 Avvio della corsa di PCR

Avviare la corsa di PCR selezionando l'opzione *Run* dal menu *Instrument* o il campo *Run* al livello *Analysis*.

8.5.3 Programmazione di ABI PRISM 7900HT SDS

Per rilevare il DNA di EBV creare nel proprio *ABI PRISM 7900HT SDS* un profilo rispettando le sei fasi operative riportate di seguito (8.5.3.1 - 8.5.3.6). Tutte le indicazioni fanno riferimento a *ABI PRISM 7900HT SDS Software-Version 2.1*. Per dettagli sulla programmazione di *ABI PRISM 7900HT SDS* consultare l'*ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.5.3.1 Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR

Selezionare in *ABI PRISM 7900HT SDS* la voce di menu *New* in *File* ed inserire per il nuovo documento le seguenti impostazioni di base (vedi Fig. 16). Un template precedentemente salvato (*ABI PRISM SDS Template Document [*sdt]*) è a disposizione nella lista *Template* oppure selezionandolo con la funzione *Browse* (vedi **8.5.3.5 Come salvare la corsa di PCR**). Confermare i dati inseriti (OK).

Attenzione: l'*artus EBV TM PCR Kit* non può essere utilizzato con il formato piastra 384 di *ABI PRISM 7900HT SDS*.

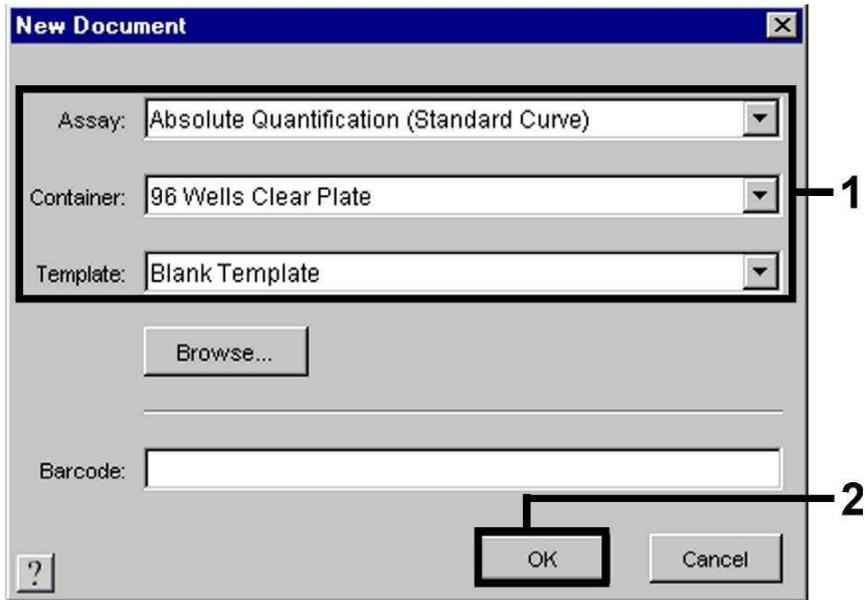


Fig. 16: Preimpostazioni per la creazione di una nuova corsa di PCR (*New Document*).

8.5.3.2 Creazione/selezione dei rilevatori

Con l'ausilio del sottomenu *Detector Manager* che si trova in *Tools* (in alternativa: selezionare livello *Setup*/funzione *Add Detector*) assegnare al documento i rispettivi coloranti di rilevazione. Per la rilevazione del DNA di EBV ed anche del *Controllo interno* con l'impiego dell'*artus EBV TM PCR Kit* devono essere definiti i reporter/quencher indicati nella tabella seguente:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di EBV	FAM	Non Fluorescent
<i>Controllo interno (EBV RG/TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

Per creare questi rilevatori selezionare l'opzione *New* che si trova in basso a sinistra nel *Detector Manager*.

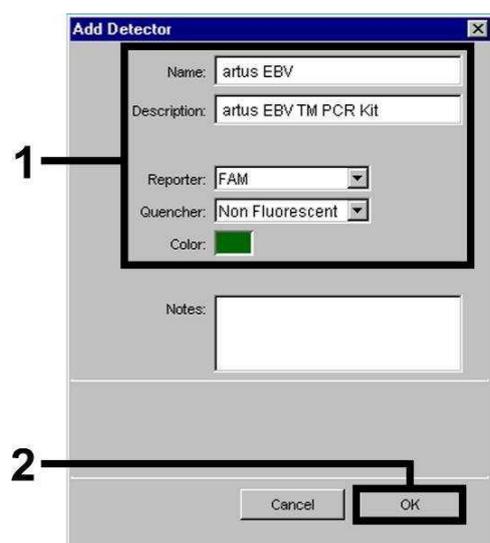


Fig. 17: Creazione del rilevatore specifico di EBV (*Detector Manager*).

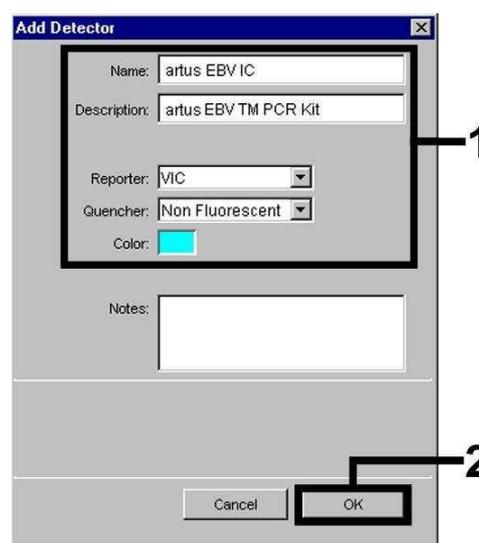


Fig. 18: Creazione del rilevatore specifico del *Controllo interno* (*Detector Manager*).

Per la rilevazione del DNA di EBV definire nella finestra visualizzata (analogamente a Fig. 17 e Fig. 18) la combinazione reporter/quencher **FAM/Non Fluorescent**, per la rilevazione del *Controllo interno* selezionare invece la combinazione **VIC/Non Fluorescent**. Con la conferma dei dati inseriti (OK) si torna al *Detector Manager*. Evidenziare i rilevatori appena creati e trasferire ogni selezione facendo clic sull'opzione *Copy to Plate Document* al livello *Setup* (vedi Fig. 19). Chiudere la finestra (*Done*).

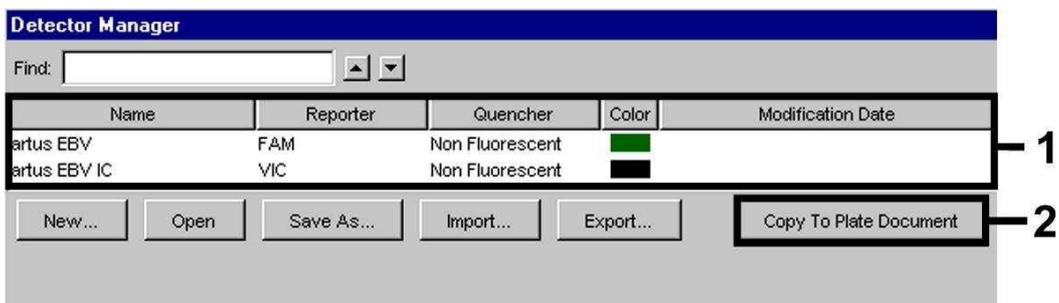


Fig. 19: Selezione dei rilevatori (*Detector Manager*).

8.5.3.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Dopo la chiusura del *Detector Manager* (*Done*) i rilevatori selezionati in 8.5.3.2 possono essere ritrovati al livello *Setup* (*Well Inspector*), elencati in forma di tabella (vedi Fig. 20).

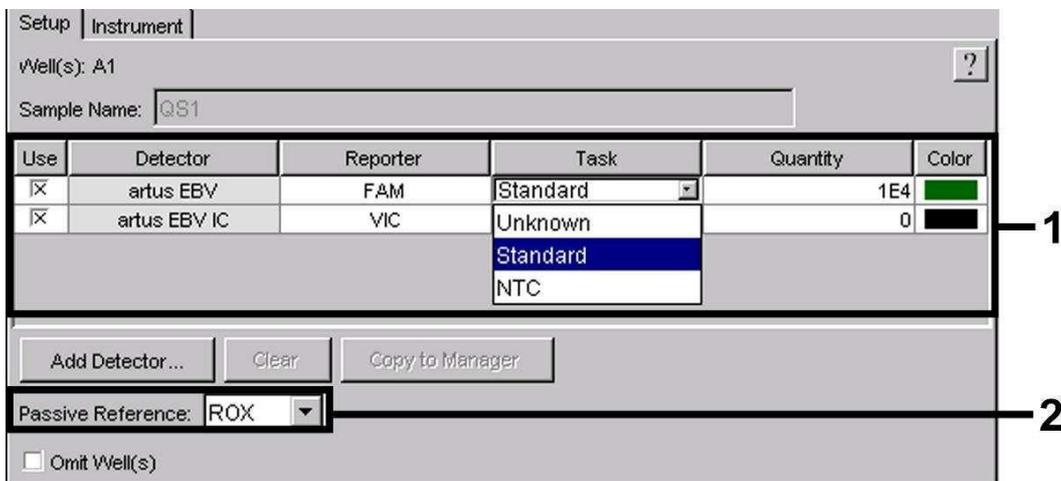


Fig. 20: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra.

Selezionare le posizioni della piastra destinate alla rilevazione del DNA di EBV. Assegnare a queste posizioni i rilevatori selezionati attivando con un clic l'opzione *Use* dei due rilevatori. Viene visualizzata una crocetta. Per la denominazione delle singole miscele di reazione selezionare la posizione corrispondente sulla piastra e registrare il nome in *Sample Name*. E' importante ricordare che le miscele con *Sample Name* identico e assegnazione di rivelatore identico vengono identificate dal software come replica e, riguardo la rispettiva carica patogena quantificata, ne viene calcolata la media. Selezionare quindi per ogni tipo di campione la rispettiva funzione (*Task*) in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo campione	Funzione (<i>Task</i>)	Concentrazione (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
campione	Unknown	-	FAM	Non Fluorescent
controll o	NTC	-	FAM	Non Fluorescent
standard	Standard	vedi 1. Contenuto	FAM	Non Fluorescent

Per creare una curva standard utilizzare per ogni corsa di PCR tutti gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) ed inserire le rispettive concentrazioni (vedi **1. Contenuto**) di ogni singolo standard nel campo *Quantity*. Occorre ricordare che per una corsa di PCR con l'*artus EBV TM PCR Kit* deve essere impostato **ROX** come riferimento passivo (*Passive Reference*). La distribuzione uniforme del colorante ROX su tutte le reazioni di PCR di un lotto mediante miscelazione dell'*EBV RG/TM Master* garantisce l'identificazione e il calcolo di variazioni *tube-to-tube* (differenze di fluorescenza tra le diverse reazioni di PCR) grazie al *Sequence Detection Software* (normalizzazione).

8.5.3.4 Creazione del profilo della temperatura

Per inserire il profilo della temperatura passare nel software dal livello *Setup* al livello *Instrument*. Inserire conformemente a Fig. 21 il profilo di temperatura

valido per rilevare il DNA di EBV. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 μ l. L'opzione *9600 Emulation* dovrebbe essere attivata, mentre le preimpostazioni di tempo *Ramp* e di *Auto Increment* dovrebbero rimanere invariate (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

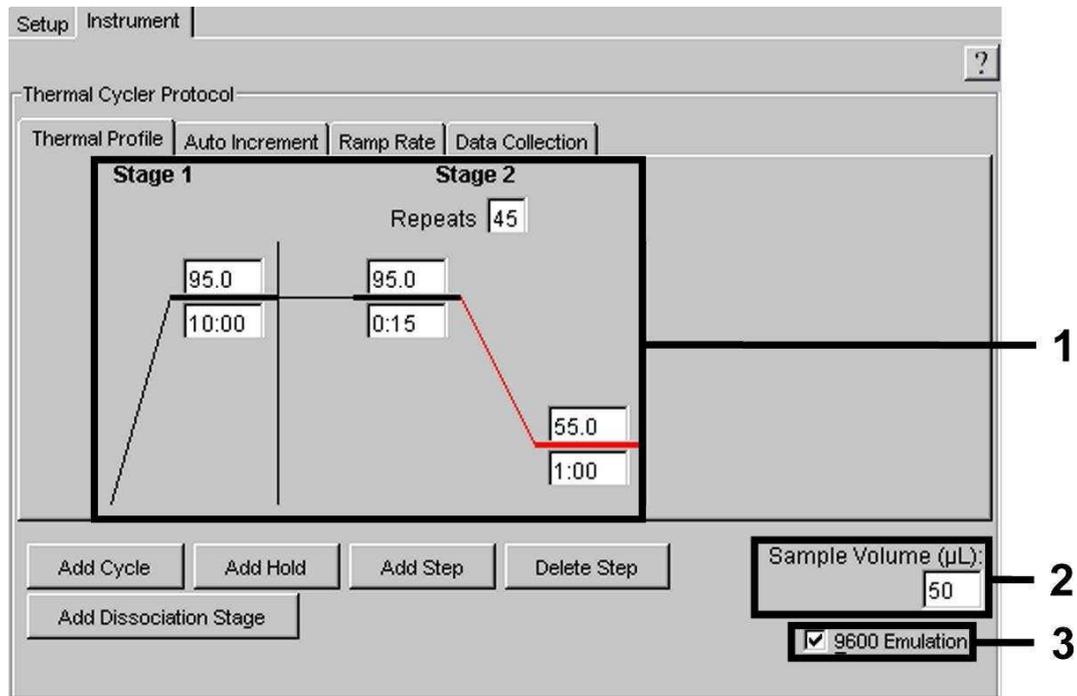


Fig. 21: Creazione del profilo della temperatura.

Al livello *Instrument* si trova anche l'opzione *Data Collection*. Selezionando questa opzione si passa alla finestra illustrata in Fig. 22. Ogni singola temperatura di *Ramp* e di *Plateau* è provvista di un simbolo di acquisizione dei dati (*Data Collection Icon*), che dimostra l'acquisizione dei dati nel momento presente della corsa. Rimuovere tutti i simboli fino a quello corrispondente al momento della fase di *Annealing-Extension* (*Stage2/Step2*) per evitare inutili misurazioni della fluorescenza e così da mantenere quanto più basso possibile il tempo di corsa totale e la quantità di dati.

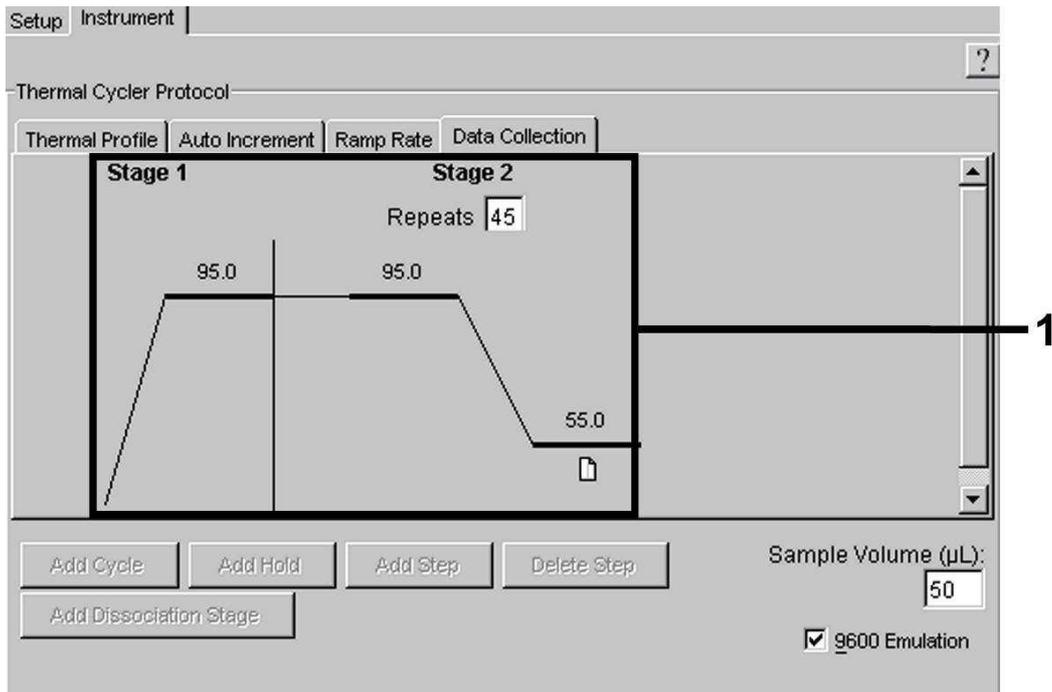


Fig. 22: Raccolta dati (*Data Collection*).

8.5.3.5 Come salvare la corsa di PCR

A questo punto le impostazioni inserite (*Setup*) possono essere salvate come maschera e quindi essere nuovamente utilizzate per applicazioni successive in forma invariata o modificata. Salvando le impostazioni come *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* nella cartella *Template Directory* ([D:]\Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates creata dalla Applied Biosystems), tale file si può selezionare direttamente dall'elenco *Template* all'interno della finestra *New Document*. I modelli salvati in altre cartelle devono essere aperti mediante *Browse*. Prima di avviare la corsa di PCR accertarsi di salvarla di nuovo come *ABI PRISM SDS Document (*.sds)*. In questo modo si garantisce la memorizzazione dei dati raccolti nel corso della PCR.

8.5.3.6 Avvio della corsa di PCR

Avviare la corsa di PCR selezionando l'opzione *Start* dal menu *Instrument*.

9. Analisi dei dati

Al momento dell'avvio degli strumenti è indispensabile eseguire una taratura valida dei coloranti (*Pure Spectra Component File*) e del fondo (*Background Component File*). Questi file di taratura servono per effettuare un calcolo esatto dei risultati come di seguito indicato.

Tutti i segnali di disturbo, generati dallo strumento e che influenzano la misurazione, sono eliminati dal *Sequence Detection Software* di *ABI PRISM Sequence Detection Systems* con l'impiego del *Background Component File*.

Inoltre durante le analisi multicolore compaiono interferenze tra gli spettri d'emissione dei singoli coloranti di fluorescenza. Il software di *ABI PRISM SDS* compensa tali interferenze calcolando i dati dello spettro dei singoli coloranti, salvati nel *Pure Spectra Component File*. Il software utilizza i *Pure Spectra Components* per assegnare ai rilevatori programmati i dati di fluorescenza, raccolti sull'intero spettro misurabile nel corso della PCR. In seguito i dati di fluorescenza rilevati, appartenenti ai singoli coloranti, vengono divisi per il segnale di riferimento passivo (ROX) al fine di calcolare le variazioni *tube-to-tube* (differenze di fluorescenza tra le diverse reazioni di PCR). I segnali normalizzati in questo modo possono essere analizzati con l'aiuto dell'*Amplification Plot*.

Il back-up dei file di taratura utilizzati per l'analisi di una corsa di PCR è eseguito automaticamente. In caso di mancata installazione dei **file di taratura**, creare i file attenendosi alle istruzioni fornite da *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

In caso di avvenuta integrazione di più di un sistema *artus*™ PCR nella corsa di PCR (**osservare il profilo della temperatura**), procedere ad un'analisi singola dei sistemi di analisi. Campioni con denominazione identica (*Sample Name*) e assegnazione di rilevatore identico vengono identificati automaticamente da *ABI PRISM 7000* e *7900HT SDS software* come replica e,

rispetto alla loro carica patogena quantificata, ne viene calcolata la media.

Si possono ottenere i seguenti risultati:

1. Viene rilevato un segnale di fluorescenza FAM.

Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di EBV.

In questo caso la rilevazione di un segnale di fluorescenza VIC (*Controllo interno*) è trascurabile, dal momento che alte concentrazioni iniziali del DNA di EBV (segnale di fluorescenza FAM positivo) possono portare ad un segnale di fluorescenza del *Controllo interno* ridotto o assente (competizione).

2. Non viene rilevato alcun segnale di fluorescenza FAM, ma solo un segnale di fluorescenza VIC (segnale del *Controllo interno*).

Nel campione non è possibile rilevare alcun DNA di EBV. Il risultato dell'analisi può essere quindi considerato negativo.

In caso di PCR negativa per EBV il segnale del *Controllo interno* rilevato esclude la possibilità d'inibizione della PCR.

3. Non viene rilevato alcun segnale di fluorescenza FAM né alcun segnale di fluorescenza VIC.

Non è possibile formulare una diagnosi.

Per informazioni riguardanti le origini degli errori e le possibili soluzioni, consultare

10. Risoluzione dei problemi.

Nelle figure 23/24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) e 27/28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*) sono riportati esempi di reazioni di PCR positive e negative.

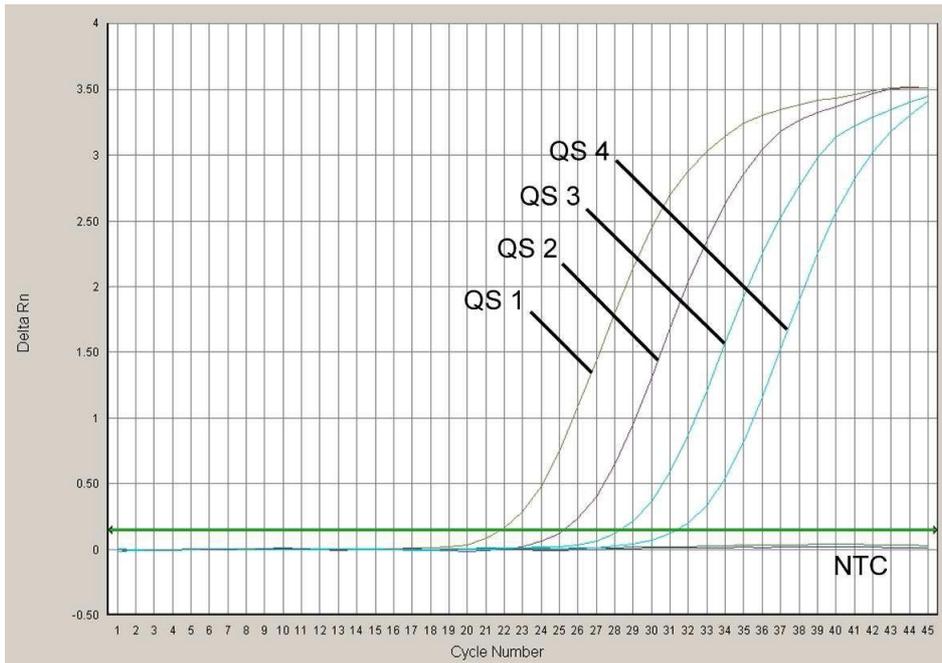


Fig. 23: Rilevazione degli *Standard di quantificazione* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: non-template control (controllo negativo).

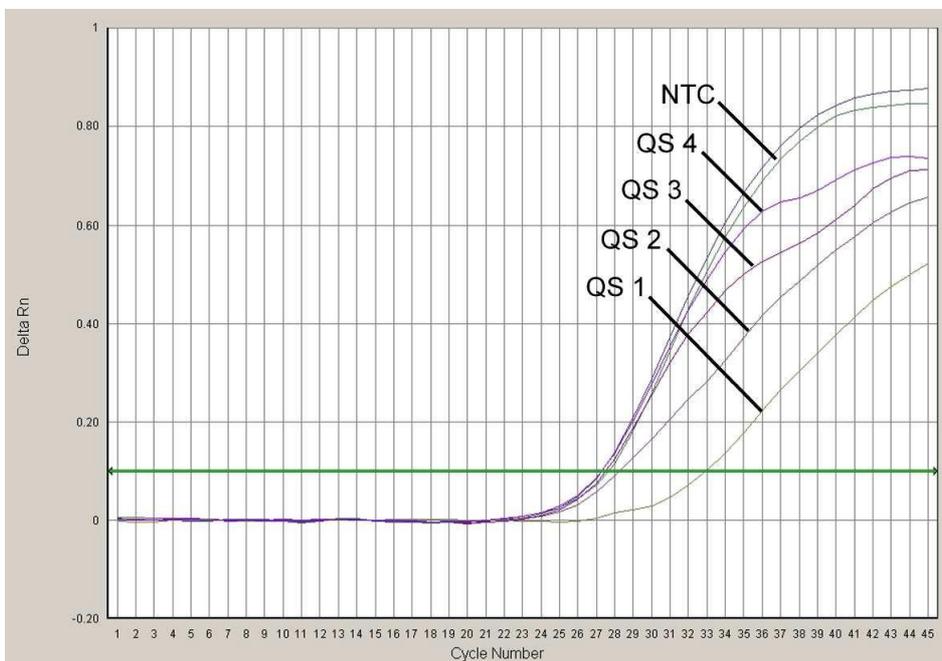


Fig. 24: Rilevazione del *Controllo interno (IC)* mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza VIC (ABI PRISM 7000 SDS) con contemporanea amplificazione degli *Standard di quantificazione* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controllo negativo).

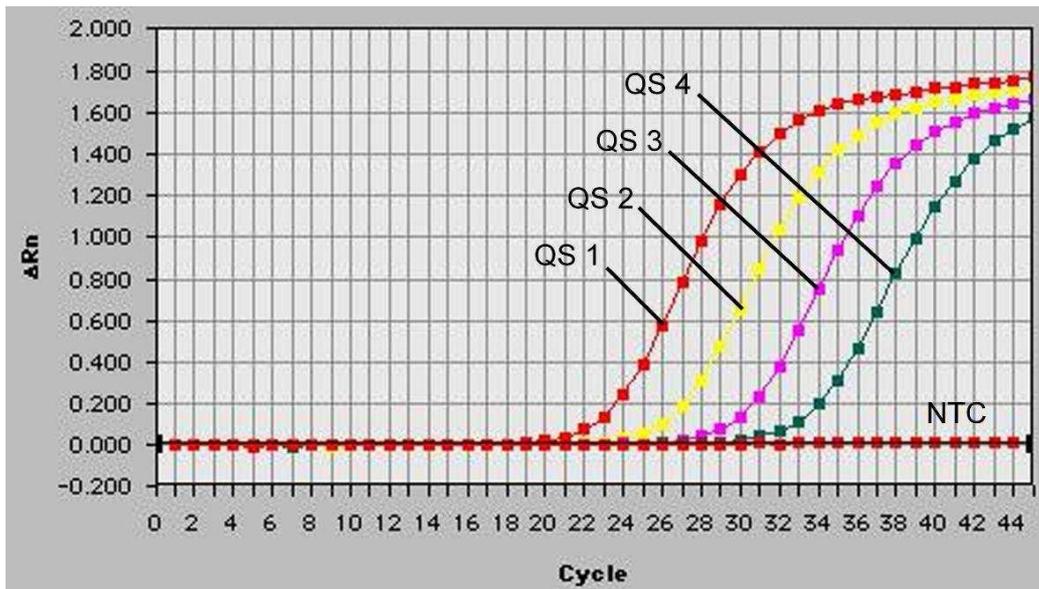


Fig. 25: Rilevazione degli Standard di quantificazione (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza FAM (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: non-template control (controllo negativo).

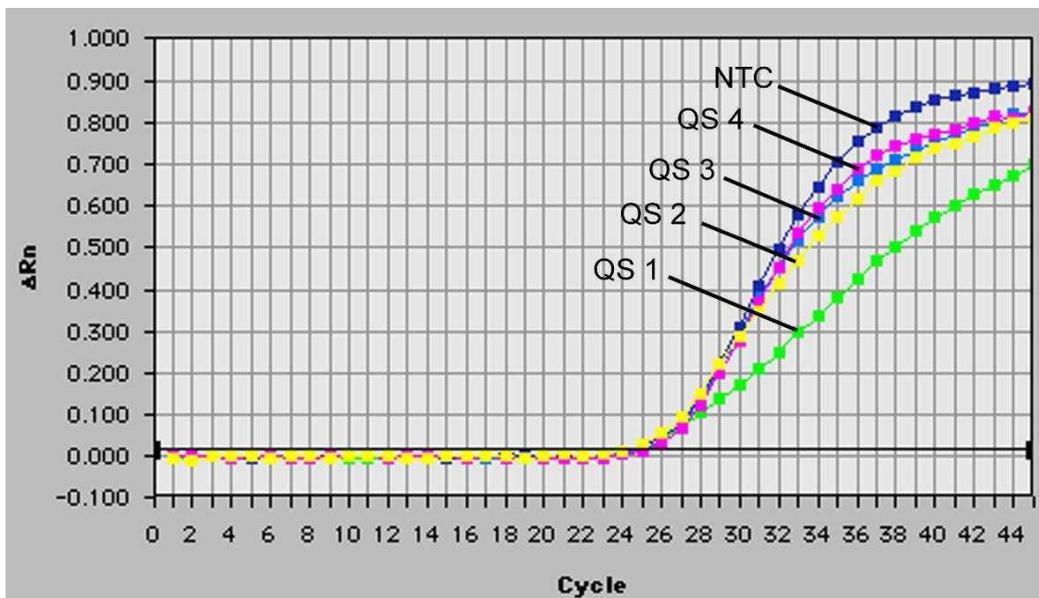


Fig. 26: Rilevazione del Controllo interno (IC) mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza VIC (ABI PRISM 7700 SDS) con contemporanea amplificazione degli Standard di quantificazione (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controllo negativo).

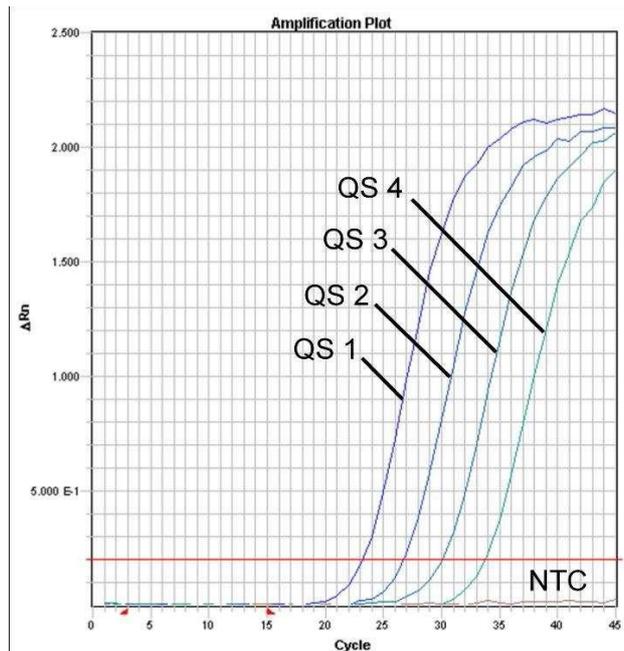


Fig. 27: Rilevazione degli *Standard di quantificazione (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza FAM (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (controllo negativo).

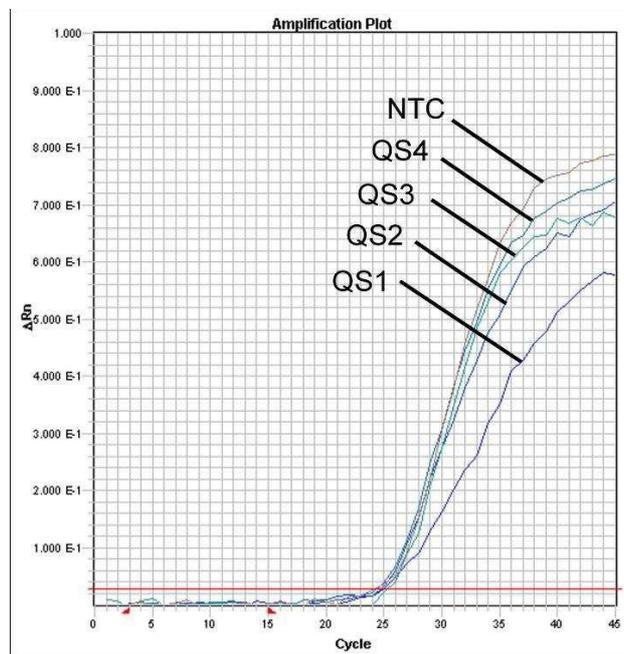


Fig. 28: Rilevazione del *Controllo interno (IC)* mediante la rilevazione di un segnale di fluorescenza VIC (*ABI PRISM 7900HT SDS*) con contemporanea amplificazione degli *Standard di quantificazione (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)*. NTC: non-template control (controllo negativo).

10. Risoluzione dei problemi

Nessun segnale di fluorescenza FAM con i controlli positivi (EBV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- La selezione del colorante di rilevazione durante l'analisi dei dati della PCR non corrisponde a quanto indicato nel protocollo.
 - ❖ Per l'analisi dei dati selezionare il colorante di rilevazione FAM per la PCR analitica di EBV e il colorante di rilevazione VIC per la PCR del *Controllo interno*.
- L'impostazione (sotto *Options*) dei dati utilizzati per l'analisi (*Extension Phase Data Extraction*) non corrisponde alle impostazioni del *Data Collection* (vedi **8.5.2.4 Creazione del profilo della temperatura per ABI PRISM® 7700 SDS** e **8.5.3.4 Creazione del profilo della temperatura per ABI PRISM 7900 HT SDS**).
 - ❖ Analizzare la corsa di PCR con le impostazioni corrette e ripetere l'analisi (*Analysis*).
- Errata programmazione del profilo della temperatura di *ABI PRISM Sequence Detection System*.
 - ❖ Confrontare il profilo della temperatura con quanto indicato nel protocollo (vedi **8.5 Programmazione di ABI PRISM SDS**).
- Errata preparazione della reazione PCR.
 - ❖ Con l'aiuto dello schema di pipettamento (vedi **8.4 Preparazione della PCR**) verificare nuovamente le fasi operative eseguite e eventualmente ripetere la PCR.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus EBV TM PCR Kit*.
 - ❖ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale debole o mancante del *Controllo interno* (segnale di fluorescenza

VIC) con contemporanea assenza di un segnale di fluorescenza FAM della PCR specifica di EBV:

- Le condizioni della PCR non corrispondono a quanto indicato nel protocollo.
 - ❖ Verificare le condizioni della PCR (vedi sopra) e eventualmente ripetere la PCR con le impostazioni corrette.
- La PCR è stata inibita.
 - ❖ Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
 - ❖ Accertarsi che durante l'estrazione del DNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi **8.1 Estrazione del DNA**).
- Ci sono state perdite di DNA durante l'estrazione.
 - ❖ Se è stato aggiunto il *Controllo interno* alla procedura di purificazione, il mancato segnale del *Controllo interno* può indicare una perdita di DNA dovuta alla purificazione. Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione del DNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus EBV TM PCR Kit*.
 - ❖ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale di fluorescenza FAM della PCR analitica con i controlli negativi:

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR.
 - ❖ Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati.
 - ❖ Chiudere le singole provette PCR possibilmente subito dopo l'aggiunta del campione da analizzare.
 - ❖ Pipettare i controlli positivi rigorosamente per ultimi.

- ◆ Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.
- Si è verificata una contaminazione dovuta all'estrazione.
- ◆ Ripetere l'estrazione e la PCR dei campioni da analizzare con reagenti non ancora utilizzati.
- ◆ Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.

In caso di dubbi o problemi contattare il nostro servizio tecnico.

11. Specifiche

11.1 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica dell'*artus EBV TM PCR Kit* è stata effettuata una serie di diluizioni di uno standard da 50 a nominali 0,01 copie equivalenti*/ μl di EBV. Tale serie è stata poi analizzata con l'impiego dell'*artus EBV TM PCR Kit* in combinazione con *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT Sequence Detection Systems*. Per ogni strumento le analisi sono state eseguite in tre diversi giorni su otto replicati. I risultati sono stati determinati grazie a un'analisi probit, la cui rappresentazione grafica (*ABI PRISM 7000 SDS*) è illustrata in Fig. 29.

Limite di rilevabilità ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	5,3 copie/ μl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	1,4 copie/ μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,7 copie/ μl

Ciò significa che la probabilità di rilevare 5,3 copie/ μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 1,4 copie/ μl (*ABI PRISM 7700 SDS*) e 0,7 copie/ μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*) è pari al 95 %.

* Lo standard utilizzato è un prodotto PCR clonato, la cui concentrazione è stata determinata tramite fotometria spettrale e di fluorescenza.

Analisi probit: virus Epstein Barr (ABI PRISM 7000 SDS)

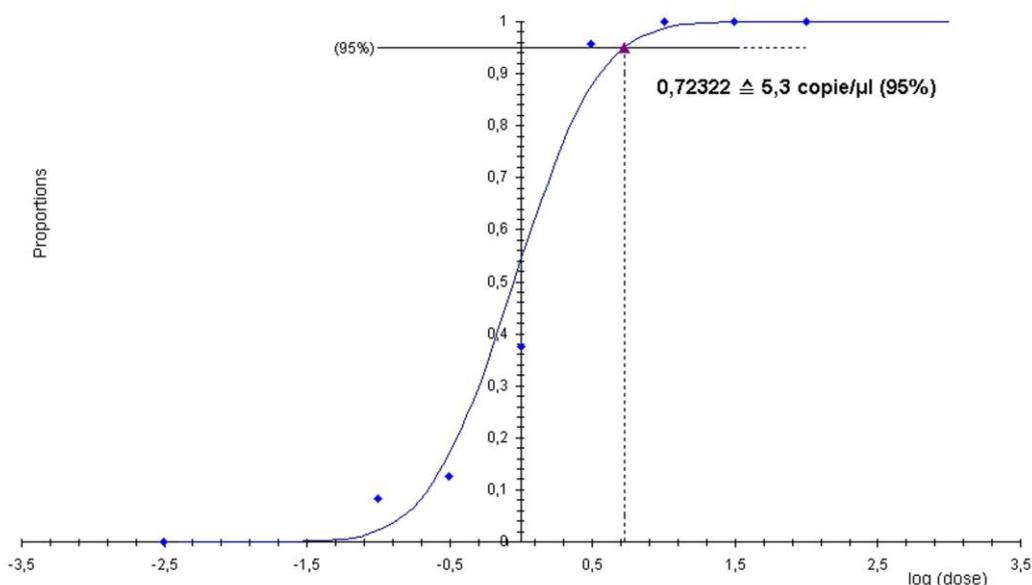


Fig. 29: Sensibilità analitica dell'artus EBV TM PCR Kit (ABI PRISM 7000 SDS).

11.2 Specificità

La specificità dell'artus EBV TM PCR Kit viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti della reazione di PCR. Primer e sonde sono stati controllati per mezzo di un'apposita analisi di confronto delle sequenze, onde verificare l'eventuale presenza di omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genomiche. In tal modo è stato possibile controllare anche la rilevabilità di tutti i genotipi significativi.

La convalida della specificità è stata effettuata inoltre su sei diversi campioni di siero EBV-negativi, che non hanno generato alcun segnale con i primer e le sonde specifici per EBV contenuti nell'EBV RG/TM Master.

Per determinare la specificità dell'artus EBV TM PCR Kit il gruppo controllo presentato nella Tabella 1 è stato analizzato al fine di verificarne la reattività crociata. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1: analisi di specificità del kit con agenti patogeni potenzialmente dotati di reattività crociata.

Gruppo controllo	EBV (FAM)	Controllo interno (IC)
Virus dell'herpes umano 1 (virus herpes simplex 1)	-	+
Virus dell'herpes umano 2 (virus herpes simplex 2)	-	+
Virus dell'herpes umano 3 (virus varicella-zoster)	-	+
Virus dell'herpes umano 5 (citomegalovirus)	-	+
Virus della leucemia dei linfociti T umana 1	-	+
Virus della leucemia dei linfociti T umana 2	-	+

11.3 Riproducibilità

I dati di riproducibilità vengono rilevati allo scopo di effettuare una valutazione continua dell'*artus* EBV TM PCR Kit ed anche per un confronto con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti mediante la partecipazione a programmi di controllo di qualità interlaboratori.

11.4 Valutazione diagnostica

Attualmente l'*artus* EBV TM PCR Kit è ancora in corso di valutazione in numerosi studi.

12. Avvertenze speciali per l'utilizzo del prodotto

- Tutti i reagenti devono essere impiegati esclusivamente per la diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.
- Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

13. Avvertenze e precauzioni

Per le informazioni di sicurezza riguardanti l'*artus* EBV TM PCR Kit consultare la relativa scheda di sicurezza (safety data sheet, SDS), disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/safety nel comodo e compatto formato PDF.

14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO 9001 e ISO 13485 ogni lotto dell'*artus* EBV TM PCR Kit è stato testato in base a specificità prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

15. Riferimento bibliografico

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

16. Spiegazione dei simboli

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

artus EBV TM PCR Kit

Marchi registrati e clausola di esclusione di responsabilità

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot® EZ1®, UltraSens® (Gruppo QIAGEN); AB/ PR/SM®; MicroAmp®, GeneAmp® (Life Technologies Corporation).

Nomi, marchi registrati, ecc., usati in questo documento, anche se non contrassegnati specificatamente come tali, non devono essere considerati non protetti da legge.

L'artus EBV TM PCR Kit, la workstation BioRobot EZ1 DSP e l'EZ1 DSP Virus Kit e Card sono kit diagnostici contrassegnati CE secondo la Direttiva Europea per la diagnostica In Vitro 98/79/CE. Non disponibili in tutti i paesi.

I kit QIAamp sono destinati all'uso generale di laboratorio. Le indicazioni o le rappresentazioni del prodotto non sono destinate a fornire indicazioni per la diagnosi, la prevenzione o il trattamento di malattie.

Con gli artus PCR Kits si acquisisce anche una licenza limitata per il loro impiego nelle procedure di reazione a catena della polimerasi (PCR) nell'ambito della diagnostica umana e veterinaria in vitro, in combinazione con un termociclo, il cui uso nell'esecuzione automatizzata della procedura PCR è coperto da licenza upfront da pagare o a Applied Biosystems o tramite l'acquisto di un termociclo autorizzato. La procedura PCR è coperta da equivalenti nazionali dei brevetti USA n. 5,219,727 e 5,322,770 e 5,210,015 e 5,176,995 e 6,040,166 e 6,197,563 e

5,994,056 e 6,171,785 e 5,487,972 e 5,804,375 e 5,407,800 e 5,310,652 e 5,994,056 in possesso di F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati

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

