

GeneProof®

Epstein-Barr Virus (EBV)

PCR Kit



in vitro Diagnostics

Souprava je určena pro profesionální použití ve specializovaných klinických a výzkumných laboratořích.

Složení soupravy

Cat. No	Interní standard je součástí MasterMixu pro kontrolu inhibice			Obsahuje interní standard samostatně pro kontrolu inhibice a izolačního procesu		
	EBV/ISIN/025 25 reakcí	EBV/ISIN/050 50 reakcí	EBV/ISIN/100 100 reakcí	EBV/ISEX/025 25 reakcí	EBV/ISEX/050 50 reakcí	EBV/ISEX/100 100 reakcí
MasterMix EBV	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl
Calibrator EBV 10 ⁴ kopií/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Calibrator EBV 10 ³ kopií/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Calibrator EBV 10 ² kopií/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Calibrator EBV 10 ¹ kopií/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Internal standard EBV	-	-	-	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl

Podmínky skladování a přepravy

Souprava je doporučeno přepravovat při teplotách v rozmezí -20 °C až -80 °C. Souprava je stabilní při teplotě -20°C 9 měsíců od data výroby. Opětovné zmrazování a rozmrazování MasterMixu, Interního standardu anebo Kalibrátorů může vést ke snížení kvality detekce. Výrobce proto doporučuje připravený MasterMix rozaliquetovat po 30 µl přímo do PCR zkumavek a takto skladovat při -20 °C. Pozitivní kontrolu a interní standard je možné skladovat při 4 °C.

Informace o patogenu

Infekce EBV jsou typické celosvětově vysokou promořeností populace a schopností dlouhodobě až celoživotně perzistovat v organismu (latentní infekce), stejně jako schopností vyvolávat lymfocytární infekci. Virus je spojován, především u pacientů s imunodeficitem, s řadou maligních onemocnění - u nás např. Hodgkinova nemoc, T-lymfom, či B-lymfomem. Vstupní branou infekce jsou většinou ústa, virus se pak množí ve slinných žlázách a v této fázi infekce je možné jej nalézt ve slinách a výplachu z nosohltanu. Poté napadá B-lymfocyty, imunitní systém reaguje masívní tvorbou „atypických mononukleárů“ (T lymfocyty CD8+). Infekce probíhá často bezpříznakově. U mladších jedinců se manifestuje jako typická infekční mononukleóza (IM) s nálezem atypických mononukleárů a s pozitivní Paul-Bunnelovou reakcí. V séru se při infekci objevují specifické protilátky, jejichž detekce metodou ELISA je využívána především pro diagnostiku EB virových infekcí dětí a imunosuprimovaných pacientů (*protilátky proti VCA ve třídách IgM, IgA nebo IgE či nízkoadivní IgG a současně negativní anti-EBNA-1 při čerstvé infekci; protilátky proti EBNA-1 eventuelně i EBNA 2,3A,3B,4 při latentní infekci nebo EBV-řízené lymfoproliferaci a malignitě*). Především v analýze latentních infekcí bývá užíváno také metod detekce antigenů přímou i nepřímou imunofluorescencí (antigeny EBNA a LMP). Význam přímé DNA diagnostiky spočívá především v rozpoznání rizika komplikací u pacientů po transplantacích, s AIDS a u onkologických pacientů, kde velmi vhodně doplňuje sérologické metody. Kvalitativní metody detekce DNA EBV mají velmi nízkou predikční hodnotu. Proto se v současné době pro přímou diagnostiku EB virových komplikací doporučují metody kvantitativní PCR, jejichž výsledky jsou velmi přínosné v případech, že jsou interpretovány v souvislosti s výsledky sérologických vyšetření a s ohledem na klinický stav pacienta. Pro interpretaci vyšetření jsou důležité *symptomaticky kritické hladiny viremie* (DNAémie), které jsou udávány v počtu kopií virového genomu na 50µl plasmu nebo na 2x10⁵ leukocytů periferní krve, a jsou pro určité skupiny diagnóz typické (>10⁴ u IM, >10⁵ u chronických aktivních EBV infekcí). Na druhou stranu je třeba nepodceňovat trvalé dlouhodobě nízké (až hraniční) pozitivitu, které mohou být vodítkem při odhalení lymfoproliferativních infekcí u imunosuprimovaných pacientů a bývají také dávány do souvislosti se syndromem chronické únavy a dlouhodobých subfebrilií až febrilií neznámé etiologie u dětí. Pozitivní záchyt EBV v mozkomíšním moku je známý při lymfomu CNS u pacientů s AIDS; u imunokompetentních pacientů pak při EBV encefalitidě. Detekce EBV metodou PCR v biotrickém vzorku je velmi přínosná pro rozpoznání EBV řízených maligních onemocnění, jejichž terapie se od jiných EBV negativních maligních onemocnění může lišit.

Princip metody

Průkaz infekce EBV je založen na principu detekce specifické konzervativní sekvence DNA jednokopiového genu pro část nukleárního antigenu EBNA1 metodou real-time polymerázové řetězové reakce (real-time PCR). Přítomnost EBV viru je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce a účinnost DNA izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro JOE fluorofor. Detekční souprava využívá technologii "hot start" minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. To umožňuje velmi vysokou citlivost laboratorní detekce EBV ve vzorcích tělních tekutin. Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní i kvantitativní detekci.

PCR soupravy firmy GeneProof jsou konstruovány tak, aby je bylo možno používat na real-time přístrojích různých výrobců. Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit byl validován na následujících přístrojích:

Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science)
Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science)
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
LightCycler® 480 System (Roche)
SLAN Real-time Quantitative PCR Fluorescent Detection System (Shanghai Odín Scienc & Technology Co.)

Podrobné informace o použití PCR kitů na konkrétních přístrojích naleznete na [www stránkách výrobce \(www.geneproof.com\)](http://www.geneproof.com) anebo si je vyžádejte u dodavatele soupravy.

Pro použití soupravy na jiných real-time přístrojích kontaktujte prosím výrobce: support@geneproof.com

Upozornění:

- Souprava je vyrobena v souladu s evropskou Směrnicí Rady 98/79/ES jako diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.
- Při manipulaci s pozitivní kontrolou nebo při práci s klinickým materiálem dbejte zvýšené opatrnosti, při nesprávné manipulaci by mohlo dojít ke kontaminaci a tím ke znehodnocení složek soupravy nebo MasterMixu! Za znehodnocení soupravy nesprávnou manipulací nebo skladováním výrobce neručí.
- Soupravu je po použití doporučeno likvidovat podle aktuální právní úpravy s ohledem na skutečnost, že souprava neobsahuje žádné nebezpečné, infekční nebo toxické látky, které by podléhaly zvláštním bezpečnostním předpisům a použité obalové materiály jsou vyrobeny z papíru a z polypropylenu.

Návod k použití

Odběr a uchování vzorků

Odběr všech typů vzorků kromě krve (mozkomíšni mok, biopsie, stěry, sliny) je nutno provést do sterilní zkumavky bez transportního média a transportovat do 12 hodin při +4°C. Je třeba odebrat od 50 µl do 2ml vzorků tělních tekutin (mozkomíšni mok, sliny); cca 1x1x1mm tkáně; stěr nebo výtěr na tampónu „na sucho“. Odběr krve: vzorek nesrážlivé periferní krve se odebírá do EDTA a transportuje při +4°C do 24h do laboratoře. Při delším skladování je potřeba všechny vzorky uchovávat zamražené při -20°C.

DNA izolace

Izolaci DNA je možno provádět na trhu dostupnými izolačními soupravami dle příslušných protokolů pro izolaci příslušného mikroorganismu. Výrobce doporučuje následující izolační soupravy:

PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof); Arrow Viral NA Kit (NorDiag), Arrow Blood DNA Kit (NorDiag).

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard (IS), pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

PCR kit ISIN (Cat. No. EBV/ISIN...)

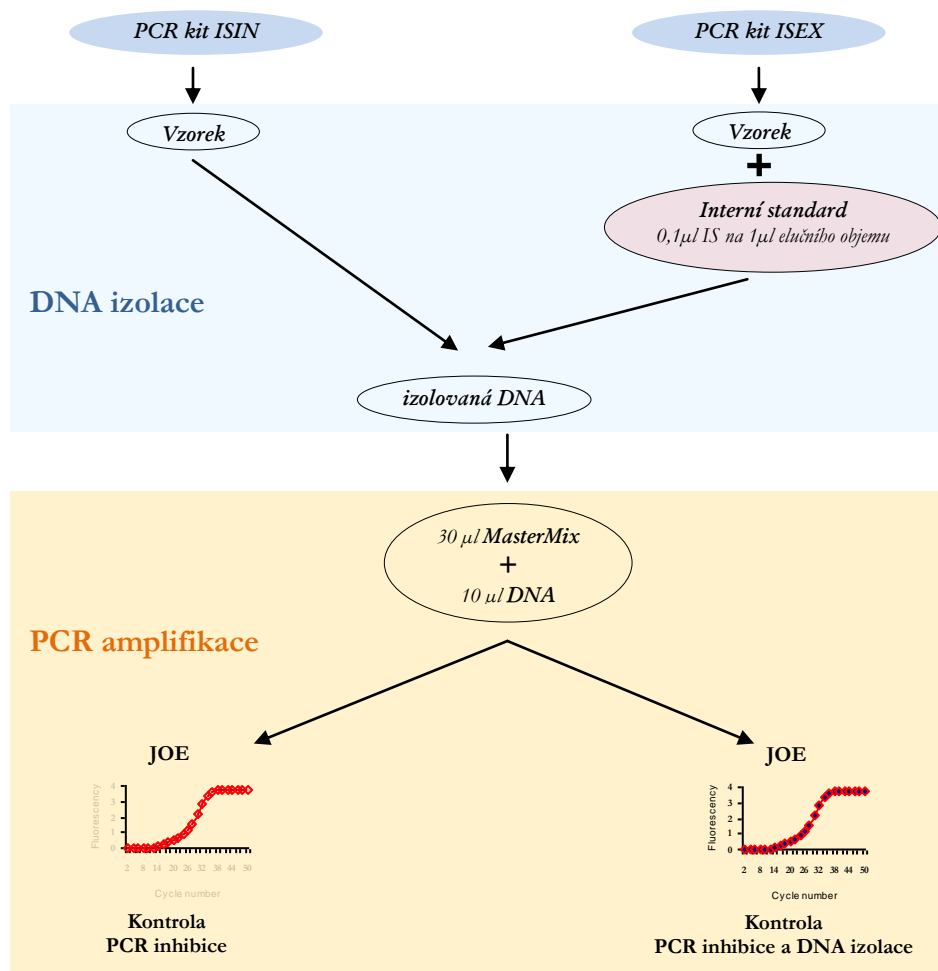
V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přímo součástí zkumavky s MasterMixem. Tato varianta kitu umožňuje účinnou kontrolu inhibice PCR reakce.

PCR kit ISEX (Cat. No. EBV/ISEX...)

V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít jak ke kontrole inhibice PCR reakce, tak i ke kontrole účinnosti izolace DNA.

Při použití ISEX varianty PCR kitů je IS přidáván přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu tak, aby na 1 µl výsledného elučního objemu připadlo 0,1 µl IS:

Eluční objem	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Interní standard	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl



PCR amplifikace

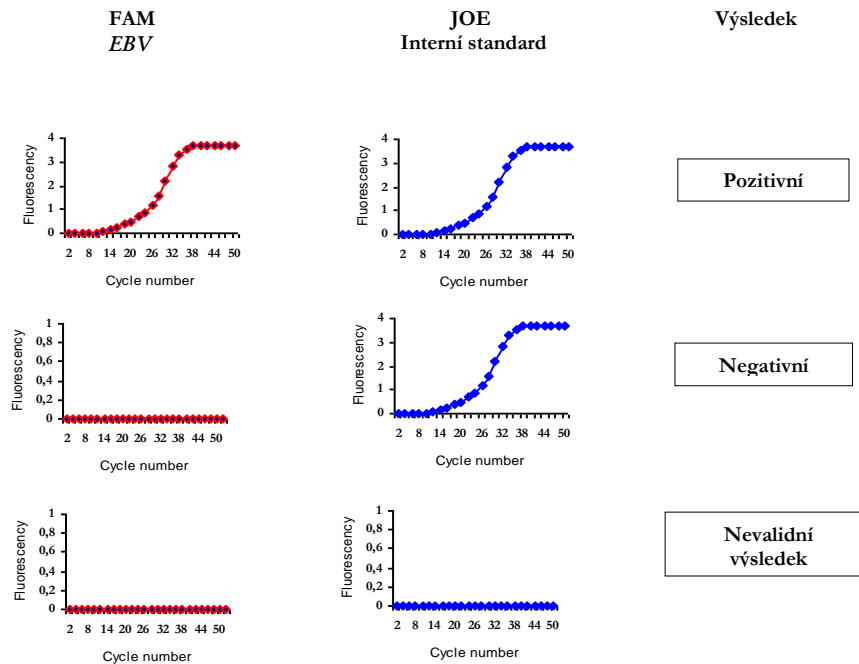
1. Do zkumavky přidat **30 µl MasterMixu** a **10 µl izolátu DNA** nebo **10 µl Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 40 µl.
2. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

Amplifikační program:

UDG dekontaminace 37 °C/2 min.
počáteční denaturace 95 °C/10 min.

denaturace 95 °C/5 sec.
annealing 60 °C/40 sec. – čtení fluorescenčního signálu
extenze 72 °C/20 sec.
počet cyklů 45

Kvalitativní vyhodnocení detekce



Kvantitativní vyhodnocení detekce

Při kvantitativním hodnocení výsledků je možné validně měřit pouze koncentrace v rozsahu daném kalibrační křivkou.

Kvantifikace vzorků, jejichž koncentrace přesahuje horní mez pro měření dané rozsahem kalibrační křivky (kalibrátorem s nejvyšší koncentrací) je pouze orientační. Tyto vzorky je možno naředit a stanovení opakovat.

Vzorky s koncentrací nižší než je dolní mez pro měření dané rozsahem kalibrační křivky (kalibrátorem s nejnižší koncentrací) je možno kvantifikovat pouze orientačně.

Pro přepočet koncentrace vzorku na *jednotky/ml* s ohledem na izolační postup lze použít následující vzorec:

$$\text{Koncentrace/ml} = \frac{cVZ \times EO}{I}$$

cVZ = koncentrace vzorku v jednotkách/µl
EO = zvolený eluční objem v µl
I = objem materiálu použitého k izolaci v ml