



## EliGene® Borrelia UNI (flagellin)



REF

90024-UNI (pro 50 stanovení)

### Složení soupravy:

5 x 150 µl **Borrelia UNI Mix**  
2 x 50 µl **PC DNA Borrelia**  
5 x 200 µl **IC DNA 01**  
1 x 20 µl **Eli Blocker**  
1 x 20 µl **ROX dye**  
Návod k použití

### Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

### Účel použití

Souprava EliGene® Borrelia UNI slouží k DNA diagnostice patogenních druhů borélií *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* z izolované DNA.

### Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci DNA borélie a interní kontroly jsou použity primery a fluorescenční sondy (FAM a HEX).

### Obecný úvod

Borelióza je onemocnění způsobené spirochétou *Borrelia burgdorferi*. Průkaz této bakterie je možný z jakéhokoliv klinického materiálu pomocí DNA diagnostiky. V České republice se vyskytují tři patogenní druhy borélií: *B. b. sensu stricto*, *B. afzelii* a *B. garinii*. Kit EliGene® Borrelia UNI obsahuje směs primerů a prób, které jsou specifické ke zmíněným třem druhům borélií. Kit EliGene® Borrelia UNI má vysokou senzitivitu – zachytí 1–10 borélií v 5 µl DNA izolátu. DNA diagnostiku je vhodné použít v případě podezření na boreliózu (v anamnéze přisáté klíště nebo pobodání krev sajícím hmyzem). Z klinických vzorků pro diagnostiku lze doporučit: a) celou krev do EDTA (pouze v případě teplot a akutní fáze onemocnění); b) moč; c) mozkomíšní mok (v případě neuroboreliózy); d) synoviální tekutinu; e) tkáň (kožní biopsie).

### Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Krev, moč, mozkomíšní mok, synoviální tekutina, tkáň

Doporučená izolace DNA:

Manuální: EliGene® Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON)

Automatická: **ZEPHYRUS Magneto** (ELISABETH PHARMACON)

**Krev:**

Doporučuje se odebírat krev pacientům s podezřením na boreliózu, kteří mají teploty. Nesrážlivou krev odebírejte do tekuté EDTA. Pro DNA diagnostiku borélií je nutné DNA izolovat ze vzorku v den odběru. Vzorek krve je nutné přepravovat a uchovávat při 4 °C, v žádném případě vzorek nemrazte!

*Manuální izolace:*

Ke vzorku přidejte 10 µl Proteinázy K a 20 µl DNA interní kontroly 01 (IC DNA 01) a pak pokračujte podle standardního protokolu kitu EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) pro izolaci DNA z krve. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Koncentrace izolované DNA se při každém procesu zmrazování snižuje a hrozí výskyt falešně negativních výsledků. Alternativním způsobem bezprostřední izolace DNA v případě manuální izolace je možnost provádět částečnou izolaci DNA. Vzorek se v prvním kroku zahřívá s proteinázou K a lyzačním pufrům. Další kroky DNA izolace se provedou později. Lyzovaný vzorek je uložen při teplotě 4 °C a během několika dnů je izolace dokončena.

*Automatické izolace:*

Přidejte 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01) a izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu dle protokolu pro vzorky krve s elucí do 50 µl elučního pufru.

**Mozkomíšní mok:**

Dle standardního protokolu odeberte mozkomíšní mok do sterilních zkumavek. Vzorky je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Pro DNA diagnostiku borélií je nutné DNA izolovat ze vzorku v den odběru. Pro izolaci DNA musí být použito nejméně 200 µl vzorku.

*Manuální izolace:*

Ke vzorku přidejte 20 µl Proteinázy K a 20 µl DNA interní kontroly 01 (IC DNA 01) a pak pokračujte podle standardního protokolu kitu EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) pro izolaci DNA z krve. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C, pro skladování delší, než jeden týden zamrazte na -20 °C.

*Automatické izolace:*

Přidejte 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01) a izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu dle protokolu pro vzorky plazmy s elucí do 50 µl elučního pufru.

**Moč, synoviální tekutina:**

Tyto vzorky odebírejte dle standardního protokolu do sterilních zkumavek. Vzorky je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Pro DNA diagnostiku borélií je nutné DNA izolovat ze vzorku v den odběru. Před izolací DNA je nutné vzorek centrifugovat po dobu 20 minut při 6 000 x g. Použijte 8–15 ml vzorku moče. **V žádném případě nesnižujte počet otáček ani nezkracujte dobu centrifugace!** V případě, že laboratoř nedisponuje potřebnou centrifugou, je možné vzorek moče rozpipetovat na menší objemy o celkovém objemu minimálně 8 ml.

*Manuální izolace:*

1. Supernatant odsajte. Zabezpečte, aby před rozsuspendováním sedimentu byla ze zkumavky odsáta veškerá moč! Pelet rozsuspendujte ve 180 µl vody pro molekulární biologii s 200 µl roztoku MI3 z kitu EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit, přidejte 10 µl Proteinázy K a 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01). Vortexujte 15 sekund. Dále pokračujte dle standardního protokolu ke kitu EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit.



2. Eluci provádějte do 100 µl elučního pufru. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší, než jeden týden zamrazte na -20 °C.

#### *Automatická izolace:*

1. Otevřete zkumavky a opatrně odsajte supernatant. Rozsuspendujte pelet vortexováním ve 180 µl PBS pufru a přidejte 20 µl interní kontroly (IC DNA 01).

**UPOZORNĚNÍ:** Zbytek moči ve zkumavce může ovlivnit čistotu izolované DNA.

2. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu podle protokolu pro vzorky plasmu s elucí do 50 µl elučního pufru.

#### **Tkáně:**

Tkáně ihned po odběru uložte v lednici při 4 °C a ještě týž den dopravte do laboratoře.

#### *Manuální izolace:*

Pro diagnostické účely je nezbytné izolovat DNA za použití kitu UltraClean Tissue DNA Kit (MoBio) v den odběru vzorku.

**Ke vzorku do rozbíjecí mikrozukavky přidejte 20 µl interní kontroly (IC DNA 01).** Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

#### *Automatická izolace*

Rozřežte 10 mg tkáně na malé kousky, přidejte 200 µl lyzačního pufru, 6 µl Proteinázy K a 20 µl interní kontroly (IC DNA 01) a izolujte DNA ze vzorku pomocí Prepito DNA Tissue10 Kitu dle protokolu s elucí do 50 µl elučního pufru.

### **Nezbytné vybavení pro laboratoř**

- Sterilní automatická pipeta 5–20 mikrolitrů a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro Real Time PCR – kit je optimalizován pro přístroje LightCycler 2.0, LightCycler 480 a LightCycler Nano (Roche), Quant Studio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific), RealTime System ABI 7500FAST (Applied Biosystems), Rotor-Gene 6000 nebo Rotor-Gene Q (Qiagen), CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), MIC qPCR Cyclor (Bio Molecular Systems).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný RealTime PCR přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

### **Konfigurace RealTime PCR přístroje**

- Pro detekci DNA borélie je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm).
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm).



### LightCycler® 2.0 (Roche):

Pro reakci používejte pouze skleněné kapiláry.

#### Nastavte následující teplotní profil:

##### Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C	3 min	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	--------------------	-------------------------

##### Step 2 - Analysis mode "Quantification", 50 Cycles

95°C	5 s	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"
55°C	20 s	Ramp rate (5°C/s)	Acquisition mode "Single"
72°C	10 s	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_LC2\_v00.ixo". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

### LightCycler® 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře.

V okně "Detection format" zvolte "Dual Color Hydrolysis probe".

#### Nastavte následující teplotní profil:

##### Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C	3 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

##### Step 2 - Analysis mode "Quantification", 50 Cycles

95°C	5 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
55°C	20 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "Single"
72°C	10 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"

##### Step 3 - Analysis mode "None", 1 Cycle

40°C	1 min	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_LC480\_v00.ixo". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

### QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako reportér vyberte barvy FAM (Borrelia) a VIC/HEX (IC DNA 01), a jako pasivní referenční barvivo zvolte ROX.

#### Nastavte následující teplotní profil:

##### Udržovací fáze (Holding stage)

95°C	3 min	Ramp rate (1.6°C/s)
------	-------	---------------------

##### Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cyklů

95°C	5 s	Ramp rate (1.6°C/s)
55°C	20 s	Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON
72°C	10 s	Ramp rate (1.6°C/s)

##### Post-Read Stage

40°C	1 min	Ramp rate (1.6°C/s)
------	-------	---------------------

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.



Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_QS3\_v00.edt" nebo "EliGene\_UNI\_QS5\_v00.edt". Run Template může být importován do softwaru z CD přiloženého v kitu.

### **LightCycler<sup>®</sup> Nano (Roche):**

Pro reakci používejte pouze průhledné stripy.

V menu "Run Settings" vyberte možnosti "Hydrolysis Probes" a "High Quality".

#### **V "Profile menu" nastavte následující teplotní profil:**

Step 1 - Hold

95°C	3 min	Ramp rate (5°C/s)
------	-------	-------------------

Step 2 – 3-Step Amplification, 50 cycles

95°C	5 s	Ramp rate (5°C/s)
------	-----	-------------------

55°C	20 s	Ramp rate (4°C/s) "Acquire" signal
------	------	------------------------------------

72°C	10 s	Ramp rate (5°C/s)
------	------	-------------------

Step 3 - Hold

40°C	1 min	Ramp rate (4°C/s)
------	-------	-------------------

V menu "Samples" klikněte na okno "Targets" (okno nahoře vpravo) na ikonu "+" a vyberte FAM barvu jako "Target 1". Znovu klikněte na ikonu "+" a vyberte HEX barvu jako "Target 2". V okně "Samples" (okno nahoře vlevo) klikněte na ikonu "+" a přidejte vaše vzorky. Pak přiřadte vzorkům pozice a označte FAM a HEX jako Unknown sample (Samples) nebo Standard.

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_LCNANO\_v00.ppf". Run Template lze zkopírovat z CD přiloženého v kitu.

### **RealTime System ABI7500 (Applied Biosystems):**

Použijte programový modul pro absolutní kvantifikaci (Plate Type "Quantitation-Standard Curve" experiment pro ABI 7500FAST). V případě ABI7500FAST použijte "7500 (96wells)" instrument type.

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C	3 min
------	-------

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cycles*

95°C	5 s
------	-----

55°C	20 s	Data collection ON
------	------	--------------------

72°C	10 s
------	------

*Odečet emisního signálu ve druhém kroku při 55 °C.*

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_ABI7500\_v00.edt". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### **CFX96 Touch (Bio-Rad):**

V úvodní možnosti "Startup Wizard" založte "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

Step 1	95°C	3 min
--------	------	-------

Step 2	95°C	5 s
--------	------	-----



Step 3 55°C 20 s + Plate Read

Step 4 72°C 10 s

Step 5 GOTO Step 2 49x

Step 7 40°C 60 s

Doplňte "Sample Volume" na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 3 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene UNI\_CFX96\_v00.pcr1" anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### **Rotor-Gene 6000 nebo Q (Qiagen):**

V okně "New Run" vyberte "Three Step".

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C 3 min

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cycles*

95°C 5 s

55°C 20 s Odečet signálu v kanálech "Green", "Yellow"

72°C 10 s

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_RG6000\_v00.ret". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### **MIC qPCR (Bio Molecular Systems Pty Ltd):**

V Run Setup vytvořte nový Run Profile pro daný přístroj MIC. Zadejte objem vzorku 20 µl a Temperature Control "Fast TAQ (v3)".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C 3 min

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cycles*

95°C 5 s

55°C 20 s Odečet signálu v kanálech "Green", "Yellow"

72°C 10 s

*Udržovací fáze (Holding stage)*

40°C 60 s

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene\_UNI\_MIC\_v00.mictemplate". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.





### **Příprava reagensií**

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.
- V kroku izolačního protokolu, kdy se k izolovanému vzorku přidává Proteináza K, přidejte také 20 µl interní kontroly (IC DNA 01). V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované DNA těsně před analýzou.
- Pokud nespotebujete celý objem MasterMixu, skladujte zkumavku v temnu při teplotě 4°C až 14 dní. Pro dlouhodobé skladování použijte mrazák (-20 °C, tma). MasterMix by neměl projít více než pěti cykly zmrazení-rozmrazení.

**Upozornění:** Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

### **Příprava reakčního mixu pro přístroje LightCycler 480, Rotor-Gene, CFX96 a MIC qPCR**

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s BORRELIA UNI Mixem a po rozmrazení napipetujte 15 µl mixu do každé amplifikační zkumavky nebo jamky a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků.
2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s BORRELIA UNI Mixem a po úplném rozmrazení napipetujte 15 µl MasterMixu do amplifikační zkumavky nebo jamky a přidejte 5 µl PC DNA Borrelia. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte zkumavky nebo destičky do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### **Příprava reakčního mixu pro LightCycler® 2.0**

1. Příprava MasterMixu: Připravte MasterMix smícháním roztoku Eli Blocker s BORRELIA UNI Mixem. Vezměte jednu zkumavku s BORRELIA UNI Mixem a nechte rozmraznout při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce stočte a přidejte 3 µl roztoku Eli Blocker do jedné zkumavky s BORRELIA UNI Mixem. Propipetujte a krátce stočte.
2. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a napipetujte 15 µl mixu do skleněné kapiláry a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků.
3. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a napipetujte 15 µl MasterMixu do skleněné kapiláry a přidejte 5 µl PC DNA Borrelia. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte skleněné kapiláry do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### **Příprava reakčního mixu pro přístroje QuantStudio 3 a 5 a ABI7500**

1. Příprava MasterMixu: Připravte MasterMix smícháním barvy ROX s BORRELIA UNI Mixem. Vezměte jednu zkumavku s BORRELIA UNI Mixem a nechte rozmraznout při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce stočte a přidejte 3 µl barvy ROX do jedné zkumavky s BORRELIA UNI Mixem. Propipetujte a krátce stočte.
2. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a napipetujte 15 µl mixu do každé amplifikační zkumavky nebo jamky a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků.



3. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a napipetujte 15 µl MasterMixu do amplifikační zkumavky nebo destičky a přidejte 5 µl PC DNA *Borrelia*. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte zkumavky nebo destičky do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### Odečet výsledků

#### **LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche):**

RealTime PCR výsledky analyzujte v kanálech 530 a 560 (LightCycler<sup>®</sup> Software 4.X) za použití modulu Qualitative detection (LightCycler<sup>®</sup> Analysis Software).

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (530). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (560).

Hodnoty Cp odpovídají kvantitě pozitivního výsledku. Hodnota "Score" musí být vyšší než 3.5.

#### **LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche):**

V nabídce "Sample Editor" zvolte možnost "Abs Quant".

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

V okně "Analysis" klikněte na ikonu "Color Comp" a zvolte Universal CC FAM (510)-VIC (580) calibration. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu "Calculate".

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580).

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

#### **LightCycler<sup>®</sup> Nano (Roche):**

V nabídce "Analysis" klikněte v okně "Select Analysis" na ikonu "+" a vyberte "Automatic Quantification".

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu FAM (510-528). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (530-548).

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

#### **RealTime systém ABI7500 (Applied Biosystems):**

V nabídce "Analysis Settings" vyberte možnosti "Automatic Threshold" a "Automatic Baseline" a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (em. 518 nm). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.





V případě, že je výsledek negativní nebo slabě pozitivní se amplifikuje vnitřní kontrola charakterizovaná nárůstem emisního spektra pro HEX kanál (em. 548 nm). V případě silně pozitivního výsledku nedochází k amplifikaci vnitřní kontroly.

Hodnoty "Qty" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "result undet." znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

### **Rotor-Gene 6000 nebo Q (Qiagen)- verze 1.7 a vyšší:**

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct".

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (Green) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (Yellow).

Hodnoty "Calc. conc." u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

### **QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):**

V nabídce "Analyse Settings" vyberte možnosti "Automatic Threshold" a "Automatic Baseline" a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC DNA 01) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve VIC (HEX) kanálu.

### **CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):**

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Threshold“ a vyberte v „Baseline Cycles“ možnost „Auto Calculated“ a v Single „Threshold“ možnost „Auto Calculated“

Poté v okně "Data Analysis" vyberte jednotlivé fluorofory (FAM a HEX) kliknutím na box s jejich označením pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (em. 518 nm). V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde.

Interní kontrola (IC DNA 01) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (em. 548 nm).

### **MIC qPCR (Bio Molecular Systems):**

Pro zobrazení a analýzu naměřených dat, klikněte na malý křížek vedle Cyklování v modulu Analýza a poté vyberte cíl – Non-Assay Green (FAM) and Non-Assay Yellow (HEX). V pravém dolním rohu zvýšte „Fluorescence Cut-off Level“ na 20 %. Pro každou pozitivní jamku se zobrazí hodnota kvantifikačního cyklu (Cq). Toto je číslo cyklu, při kterém fluorescence vzorku stoupne nad prahovou hodnotu (červená vodorovná čára v dolní části grafu amplifikační křivky). V panelu „Samples“ na pravé straně klikněte na názvy vzorků, chcete-li skrýt nebo zobrazit související amplifikační křivky a výsledky.

Pozitivní výsledek pro *Borrelia*: Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního signálu v „Green channel“. V případě negativních výsledků k amplifikaci nedojde.

Interní kontrola musí být amplifikována v každém vzorku. Amplifikace Interní kontroly je charakterizována růstem



fluorescenčního signálu v „Yellow channel“.

## Interpretace výsledků

### Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM před 50. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní na přítomnost DNA borélie nebo je její koncentrace pod detekčním limitem soupravy (10 genomových DNA/reakci). Signál pro interní kontrolu musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* infekce, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované DNA borélie.

### Pozitivní výsledek

Amplifikační signál v FAM kanálu se objeví před 45. cyklem. DNA borélie byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na přítomnost DNA borélie.

**Upozornění:** Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

### Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM (specifického pro DNA borélie) a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX (specifického pro interní kontrolu), je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.

## Kontrolní postup

Souprava EliGene® Borrelia UNI Kit zahrnuje interní kontrolu (IC DNA 01) a pozitivní kontrolu (PC DNA Borrelia). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby v procesu izolace DNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě, že vzorek je negativní na boréliovou DNA, Ct Interní kontroly musí být  $C_p < 35$ .

Pozitivní kontrola sleduje správnou funkci MasterMixu. Minimalní  $C_p$  pro pozitivní kontrolu musí být 35 nebo méně.  $C_p$  vyšší než 35 nemůže být akceptováno a detekce DNA musí být provedena s novým vzorkem. V případě opakovaně vyššího  $C_p$  kontaktujte výrobce ELISABETH PHARMACON.

Používejte negativní kontrolu pro každý běh. Jako negativní kontrolu použijte vodu pro molekulární biologii používanou ve vaší laboratoři. Pro negativní kontrolu použijte pipetu pro vzorky DNA.

### Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít vzorek pozitivní na DNA borélie. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

### Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.



## Funkční charakteristiky

### Analytické funkční charakteristiky:

Kit EliGene® Borrelia UNI má vysokou citlivost – detekuje 2–20 genomových DNA (borélií) přidaných do amplifikačního mixu.

**Analytická citlivost** byla ověřena následovně. Čistá kultura *B. afzelii*, poté čistá kultura *B. garinii* a poté čistá kultura *B. b. s. s.* byla rozsuspendována ve fyziologickém roztoku a pod mikroskopem byla spočítána koncentrace borélií. Byla připravena ředící řada tak, že do MasterMixu bylo přidáno 2, 20 a 200 genomů borélií. Zkouška proběhla celkem třikrát. Detekce borélií byla úspěšná ze 100 % u všech vzorků, které obsahovaly 20 a více borélií všech tří druhů. U vzorků, které obsahovaly 2 borélie na MasterMix byla nalezena senzitivita 44,4 % (4 z 9 vzorků). Po přidání lidské DNA do vzorku v obvyklém množství nedošlo k ovlivnění citlivosti metodiky.

**Analytická specifita** soupravy byla ověřena jednak porovnáním použitých sekvencí primerů a prób s databází všech známých sekvencí DNA (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), jednak přidáním lidské DNA do MasterMixu. 50 různých vzorků lidské DNA nezpůsobilo falešně pozitivní výsledek. Falešně pozitivní výsledek nezpůsobilo ani přidání DNA následujících organismů: *C. trachomatis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. cansasii*, *M. xenopii*, *M. avium*, *M. marinum*, *Lactobacillus*, *Enterococcus faecalis*, genus *Pseudomonas*, *E. coli*, *A. niger*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum*, adenovirus, HBV, EBV, CMV, HSV1, HSV2, VZV.

**Klinická specifita** se testovala na 486 klinických vzorcích a byla zjištěna 100% specifita prób a primerů soupravy Borrelia UNI.

### Diagnostické funkční charakteristiky:

Klinická citlivost a specifita EliGene® Borrelia UNI kitu je 100%.

## Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci  $10^1$ – $10^8$  boréliových DNA molekul v reakční směsi.

## Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola 01 (IC DNA 01) pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.

## Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Úspěšná detekce DNA je podmíněna přijetím vzorku od pacienta (s teplotou) v přiměřené době. Citlivost detekce DNA borélie závisí na odběru vzorku (celé nesražené krve, u chronických pacientů je lepší použít moč), způsobu skladování (skladujte při 4 °C), způsobu zpracování (DNA izolace, den přijetí vzorku, detekce ihned po izolaci), způsobu izolace DNA (striktně doporučujeme použít výše uvedené DNA izolační soupravy EliGene® Urine Isolation Kit nebo MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kit).

## Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.



## Upozornění

Po smíchání je MasterMix stabilní po dobu 2 týdnů při -20 °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

## Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započetím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!

## Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagensy musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.



- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

### **Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy**

- Mikrozkušavka obsahující Borrelia UNI mix je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkušavka obsahující IC DNA 01 je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

**P280** Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

**P281** Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

### **Literatura**

Barbara A. Bannister, Norman T. Begg and Stephen H. Gillespie: Infectious Disease. Blackwell Science, 2th Ed., 2000

Hytönen J, Hartiala P, Oksi J, Viljanen MK. 2008. Borreliosis: recent research, diagnosis, and management. Scand J Rheumatol. 37(3):161-172

Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A. 1997. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of Borrelia burgdorferi in patients with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol. 35(3): 685–690



## Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

## Výrobce

**ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.**

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: [info@elisabeth.cz](mailto:info@elisabeth.cz)