

# artus<sup>®</sup> HBV RG PCR Kit Kézikönyv



24 (katalógusszám 4506263)



96 (katalógusszám 4506265)

Első verzió



Kvantitatív *in vitro* diagnosztikai használatra

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q készülékkel való használatra



4506263, 4506265



1046920EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R4



1046920HU



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

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


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

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

# Tartalomjegyzék

<b>A kit tartalma</b>	<b>4</b>
<b>Jelmagyarázat</b>	<b>4</b>
<b>Tárolás</b>	<b>5</b>
<b>Alkalmazási terület</b>	<b>5</b>
<b>Korlátozások</b>	<b>5</b>
<b>Figyelmeztetések és óvintézkedések</b>	<b>6</b>
<b>Minőség-ellenőrzés</b>	<b>6</b>
<b>Bevezetés</b>	<b>7</b>
Az eljárás (meghatározása) elve	7
Patogén információk	7
Teljesítmény jellemzők	8
<b>A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek</b>	<b>16</b>
<b>Fontos megjegyzések</b>	<b>17</b>
Általános óvintézkedések	17
Minta gyűjtés, tárolás és szállítás	17
DNS kivonás	18
Belső kontroll	19
A küszöbérték beállítása a PCR elemzéshez	20
Kvantitatív analízis	20
<b>Protokoll: PCR és Adatelemzés</b>	<b>21</b>
<b>Hibaelhárítási útmutató</b>	<b>30</b>
<b>Referenciák</b>	<b>33</b>
<b>Rendelési információk</b>	<b>34</b>

## A kit tartalma

<b>artus HBV RG PCR Kit</b>			<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>Katalógusszám</b>			<b>4506263</b>	<b>4506265</b>
<b>Reakciók száma</b>			<b>24</b>	<b>96</b>
Kék	HBV RG/TM Master		2 x 12 reakció	8 x 12 reakció
Piros	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 <sup>5</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Piros	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 <sup>4</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Piros	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 <sup>3</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Piros	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 <sup>2</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Piros	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 <sup>1</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Zöld	HBV RG/TM IC <sup>†</sup>	<b>IC</b>	1000 μl	2 x 1000 μl
Fehér	Water (PCR grade) Víz (PCR minőségű)		1000 μl	1000 μl
	Handbook (Kézikönyv)		1	1

\* Kvantitációs standard.

† Belső kontroll (Internal Control).

## Jelmagyarázat



A kit tartalma <N> tesztre elegendő



Lejárat



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz





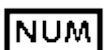





Katalógusszám



Tételszám



Anyagszám

	Összetétel
	Tartalmaz
	Szám
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)
	Hőmérséklet-korlátozás
	Gyártó
	Olvassa el a használati utasítást
	Fontos megjegyzés

## Tárolás

Az *artus* HBV RG PCR Kit komponenseit  $-15^{\circ}\text{C}$  és  $-30^{\circ}\text{C}$  között kell tárolni és szavatosságát a jelzett lejáratig időpontig őrizni meg. Az ismételt fagyasztás és felolvasztás (>2 x) elkerülendő, az assay érzékenységének csökkenése érdekében. Amennyiben a reagens használata nem folyamatos, akkor alikvótokban kell azokat lefagyasztani. A tárolásuk  $2-8^{\circ}\text{C}$ -on nem haladhatja meg az 5 órát.

## Alkalmazási terület

Az *artus* HBV RG PCR Kit a humán plazmában lévő hepatitis B vírus (HBV) DNS kvantifikálására szolgáló in vitro diagnosztikai amplifikációs teszt. Ezek a diagnosztikai teszt polimeráz láncreakción (PCR) alapuló technológiát használ és a Rotor-Gene Q készülékkel együtt használható.

## Korlátozások

Minden reagens kizárólag in vitro diagnosztikában használható.

Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki képzett és gyakorlott az in vitro diagnosztikai eljárások területén

Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.

Figyelni kell a dobozon és minden összetevő címkéjén található lejáratidőkre. Ne használjon lejárt reagenst.

A kitben használt primerek és/vagy próbák által lefedett virális genom célzott régiókban lévő potenciális mutációk megakadályozhatják a patogének jelenlétének kimutatását. Az assay érzékenysége és teljesítményadatai rendszeresen átvizsgálásra kerülnek.

## **Figyelmeztetések és óvintézkedések**

A vegyszerekkel végzett munka során, mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információ érdekében tájékozódjon a megfelelő biztonsági adatlapokból (safety data sheets, SDSs). Ezek online elérhetőek és PDF formátumban letölthetőek a [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) oldalról, megtekintheti és kinyomtathatja minden egyes QIAGEN kit és kit komponens SDS lapját.

A mintát és a vizsgálat hulladékait a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően távolítsa el.

## **Minőség-ellenőrzés**

A QIAGEN ISO-minősítésű Minőségirányítási Rendszerének megfelelően, az *artus* HBV RG PCR Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

## Bevezetés

Az *artus* HBV RG PCR Kit egy használatkész HBV DNS-t detektáló rendszer, mely valós idejű polimeráz láncreakción (qPCR) alapuló technológiát használ a Rotor-Gene Q készüléken. A HBV RG/TM Master tartalmazza a reagenseket és az enzimeket a HBV genom 134 bázispáros régiójának specifikus felszaporításához, valamint a specifikus amplikon közvetlen kimutatásához a Rotor Gene Q vagy Rotor-Gene 6000 Cycling Green/Zöld, vagy a Rotor-Gene 3000 Cycling A.FAM™ fluoreszcens csatornájában.

Emellett az *artus* HBV RG PCR Kit kit tartalmaz egy heterológ amplifikációs rendszert, amellyel felismerhetők a lehetséges hibák a vizsgálati folyamat alatt. Ezt belső kontrollként (IC) a Rotor Gene Q, Rotor-Gene 6000 Cycling Yellow/Sárga fluoreszcens csatornája vagy a Rotor-Gene 3000 A.JOE™ fluoreszcens csatornája detektálja. A HBV PCR analitikai kimutatási határa (lásd **“Analitikai érzékenység”**, 8. oldal) nem csökken. A kit tartalmaz külső pozitív kontrollokat (HBV RG/TM QS 1–5), melyek lehetővé teszik a virális DNS mennyiségének meghatározását. További információért, kérjük, nézze meg az **“Kvantitatív analízis”** fejezetet a 20. oldalon.

## Az eljárás (meghatározás) elve

A patogén detektálása a patogén genom specifikus régióinak amplifikálásán alapul, mely polimeráz láncreakciót (PCR) használ. Valós-idejű PCR esetén az amplifikált termék detektálása fluoreszcens festék segítségével történik. Ezek általában oligonukleotid próbákhoz vannak kötve, melyek specifikusan kapcsolódnak az amplifikált termékhez. A PCR futás alatt a fluoreszcens intenzitás nyomonkövetése (pl. valós-idejű PCR esetén) lehetővé teszi a felhalmozódott termék detektálását és mennyiségi meghatározását a reakciócsövek újbóli felnyitása nélkül a PCR futás után.\*

## Patogén információk

A hepatitisz B vírus (HBV) többnyire vér és vérképzőanyagok útján terjed. Szexuális, orális és prenatális úton történő fertőzés is előfordulhat azonban. Ezt követi az általános közérzet romlása beleértve az étvágytalanságot, hányást, gyomorproblémákat, a felnőttek 10-20%-nál előforduló lázat, bőrkiütést, valamint reumás ízületi-és izom problémákat. 2–14 nap elteltével sárgaság alakulhat ki, melyet viszketés kísérhet. Az összes fertőzött beteg 1%-ánál fordul elő heveny májgyulladás. A hepatitisz B betegek 5–10%-ánál krónikus májgyulladás alakulhat ki, mely májzsugorodáshoz vagy primer májsejt karcinómához vezethet.

\* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

## Teljesítmény jellemzők

### Analitikai érzékenység

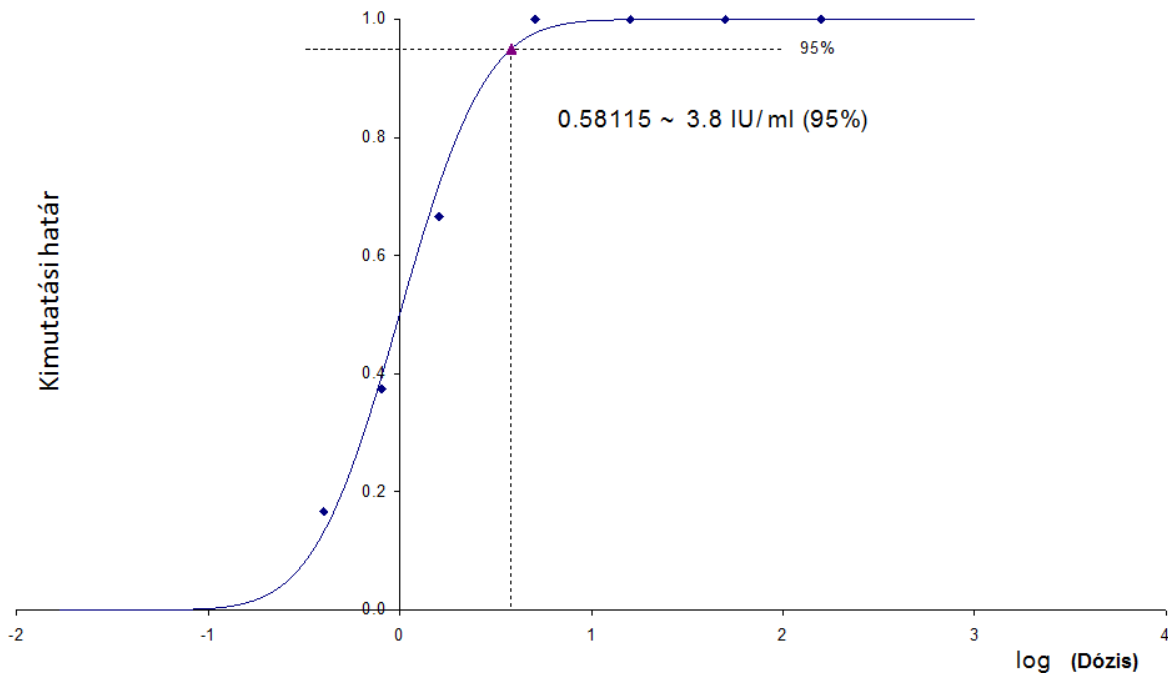
Az *artus* HBV RG PCR Kit analitikai kimutatási határát, valamint a tisztítási lépést figyelembe vevő analitikai kimutatási határt (érzékenységi határérték) kiértékelve állapították meg. A tisztítás figyelembevételével az analitikai kimutatási határ megállapításához HBV-pozitív klinikai mintákat használtak egy adott extrakciós módszerrel kombinálva. Ezzel szemben az analitikai kimutatási határ meghatározásához nem használtak klinikai mintákat és az független a választott extrakciós módszertől.

Az *artus* HBV RG PCR Kit analitikai érzékenységének meghatározásához névlegesen 10 és 0.0003 HBV IU/μl koncentráció közötti hígítási sort állítottak össze az *artus* HBV RG PCR Kit segítségével, amelyet Rotor-Gene készüléken elemeztek. A vizsgálatot három különböző napon nyolc párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. Az *artus* HBV RG PCR Kit analitikai kimutatási határát a Rotor-Gene 3000-el kombinációban 0.02 IU/μl-ben állapították meg ( $p = 0.05$ ). Ez azt jelenti, hogy a 0.02 IU/μl (HBV) 95%-os valószínűséggel detektálásra kerül.

A Rotor-Gene 3000 és a Rotor-Gene Q/6000 közötti egyenértékűséget a műszaki specifikációk alapján az analitikai teljesítmény összehasonlításával erősítették meg. Egyidejűleg, mind a két rendszeren probit-elemzést végeztek. A Rotor-Gene Q/6000 analitikai kimutatási határa a Rotor-Gene 3000 megbízhatósági tartományán belül helyezkedik el. Ezért az *artus* HBV RG PCR Kit a HBV DNS detektálásakor a Rotor-Gene Q/6000 készülékkel hasonló érzékenységét érhetünk el.

Az *artus* HBV RG PCR Kit analitikai érzékenységét, figyelembe véve a tisztítási lépést (QIAamp® DSP Virus Kit), az Első Nemzetközi HBV standard (WHO) hígítási sorának, 158 - 0.4 HBV IU/ml (nominális értékben) klinikai plazma mintákba történő bejuttatásával (spike), majd ezek vizsgálatával határozták meg. Ezen mintákat a QIAamp DSP Virus Kit segítségével extrakciós eljárásnak vetették alá (extrakciós térfogat: 0.5 ml, elúciós térfogat: 26 μl). Mind a hét hígítást, három különböző napon, nyolc ismétlésben elemezték az *artus* HBV RG PCR Kit-el. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. A probit-elemzés grafikai megjelenítését az 1. ábra mutatja. Az *artus* HBV RG PCR Kit az analitikai kimutatási határa – figyelembe véve a tisztítást is – a Rotor-Gene 3000 készülékkel 3.8 IU/ml ( $p = 0.05$ ). Ez azt jelenti, hogy a 3.8 IU/μl koncentráció 95%-os valószínűséggel detektálásra kerül.





**1. ábra: Probit-elemzés: HBV (Rotor-Gene 3000).** Az *artus* HBV RG PCR Kit analitikai érzékenysége a Rotor-Gene 3000 készüléken, figyelembe véve a tisztítást (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN).

### Specifititás

Az *artus* HBV RG PCR Kit specifitása elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztásán, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételeken alapul. A primereket és próbákat szekvencia-összehasonlítási elemzés során nyilvánosan hozzáférhető szekvenciákkal ellenőrizték. Az összes törzs detektálhatóságát az adatbázis egyezések alapján biztosítják. A Rotor-Gene készüléken a PCR futások a következő törzsek detektálását teszi lehetővé (lásd 1. táblázat).

**1. táblázat: Releváns genotípusok specificitásának tesztelése**

Vírus	Genotípus	Forrás	HBV (Cycling Green vagy A.FAM)	Belső kontroll (Cycling Yellow vagy A. JOE)
HBV	A (USA)	Teragenix*	+	+
HBV	B (Indonesia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Indonesia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	D (USA)	Teragenix	+	+
HBV	E (Cote D'Ivoire)	Teragenix	+	+
HBV	F (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	G (USA)	Teragenix	+	+
HBV	H (Nicaragua)	Teragenix	+	+

\* Teragenix Corporation, Florida, USA.

További specificitás tesztelésére a HBV genom pre-core régióiban ismert szekvencia különbségekkel rendelkező HBV törzseket (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Florida, USA) használtak. A panel mind a 9 pre-core mutáns törzsei detektálhatóak az *artus* HBV RG PCR Kit-el.

A specificitást továbbá 100 különböző HBV negatív plazma mintával validálták. Ezek nem adtak jelet a HBV specifikus primerekkel/ próbákkal, melyeket a HBV RG/TM Master mix tartalmaz.

Az *artus* HBV RG PCR Kit lehetséges kereszt-reaktivitását tesztelték a 2. táblázatban felsorolt kontroll csoportok felhasználásával (11. oldal). A tesztelt patogének egyike sem mutatott keresztreaktivitást. Nem jelent meg keresztreaktivitás a kevert fertőzéseknel sem.

### Lineáris tartomány

Az *artus* HBV RG PCR Kit lineáris tartományát (analitikai mérés) a HBV kvantitációs standardok hígítási soraival határozták meg  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l -  $1 \times 10^2$  IU/ $\mu$ l hígítási arányban. A hígítási sort a WHO Első Nemzetközi HBV DNS Standardjával szemben kalibrálták.

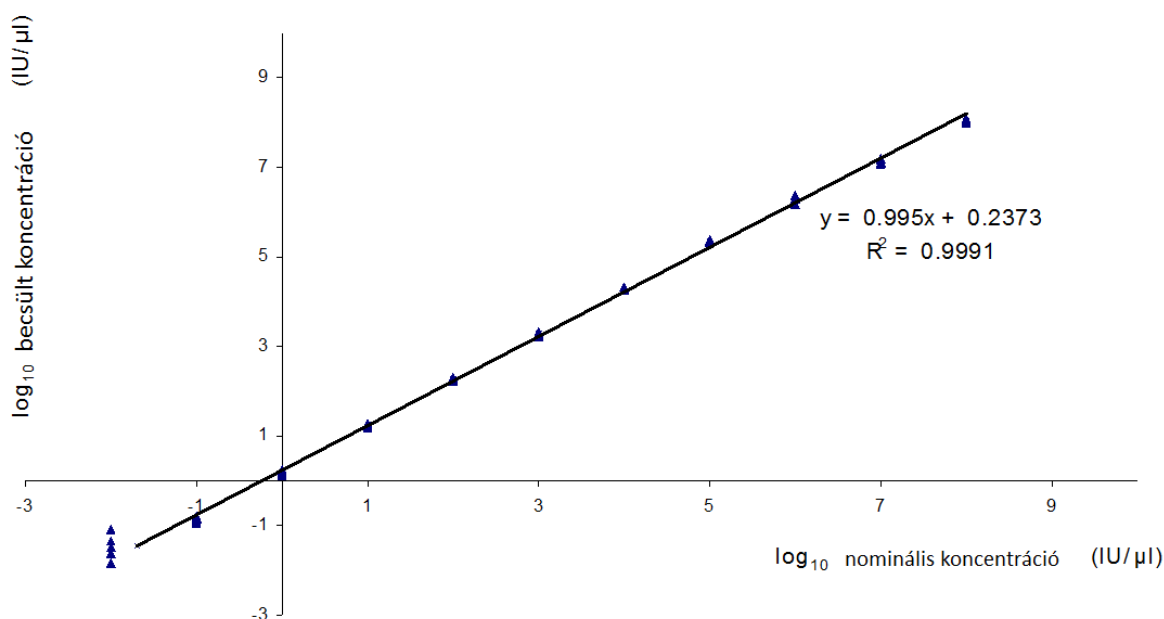
Minden egyes hígítást ismétlésekben teszteltek ( $n = 8$  a  $\geq 1 \times 10^0$  IU/ $\mu$ l koncentrációban;  $n = 16$  a  $< 1 \times 10^0$  IU/ $\mu$ l koncentrációban) az *artus* HBV RG PCR Kit és Rotor-Gene készülék kombinált használatával.

**2. táblázat: A kit specificitásának vizsgálata potenciális keresztreaktív patogénekkal**

<b>Kontroll csoport</b>	<b>HBV (Cycling Green vagy Cycling A.FAM)</b>	<b>Belső kontroll (Cycling Yellow vagy Cycling A.JOE)</b>
Humán herpeszvírus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Humán herpeszvírus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Humán herpeszvírus 3 (Varicella-zoster vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 4 (Epstein-Barr vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 5 (Cytomegalovírus)	–	+
Humán herpeszvírus 6	–	+
Humán immunodeficiencia vírus 1	–	+
Hepatitis A vírus	–	+
Hepatitis C vírus	–	+
Parvovírus B19	–	+
Sárgaláz vírus	–	+
Humán T sejtes leukémia vírus 1- es és 2-es típus	–	+
Coxsackie vírus B3	–	+
Dengue vírus 1–4	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+

Az *artus* HBV RG PCR Kit lineáris tartománya a 0.02 IU/μl-től legalább 1 x 10<sup>8</sup> IU/μl koncentrációig terjed (2. ábra).

Feltételezve, hogy a QIAamp DSP Virus Kit-et használják a DNS extrakcióra, az *artus* HBV RG PCR Kit által lefedett lineáris tartomány 1.1 IU/ml-től legalább 4 x 10<sup>9</sup> IU/ml koncentrációig terjed.



**2. ábra: Az *artus* HBV RG PCR Kit lineáris tartománya.** Lineáris tartomány számítása. Az egyenes vonalat a számított koncentráció log<sub>10</sub>-ének lineáris regressziójával határozták meg, amelyet a nominális koncentráció a log<sub>10</sub> értékéhez hasonlítottak (R<sup>2</sup>). A regressziós egyenes egyenletét az ábra tartalmazza.

## Pontosság

Az *artus* HBV RG PCR Kit precíziós adatai által meghatározhatjuk a vizsgálatok teljes variabilitásának összegét. A teljes variabilitás a vizsgálaton belüli variabilitásból (intra-assay variability) (azonos koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), a vizsgálatok közötti variabilitásból (inter-assay variability) (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több operator által végzett vizsálatok eredményeinek variabilitása) és a gyártási tételek közötti variabilitásból (inter-batch variability) (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett vizsgálatok eredményeinek variabilitása) áll. A mért adatok alapján meghatározásra került a patogén-specifikus, illetve a belső kontroll PCR eredmények szórása, varianciája és variációs koefficiense.

Az *artus* HBV RG PCR Kit pontossági adatait a legkisebb koncentrációjú kvantitációs standard (QS 5; 10 IU/μl) használatával határozták meg. A vizsgálatot 8 párhuzamos mintával végezték. A pontossági adatokat az amplifikációs görbe CT-értéke alapján határozták meg (C<sub>T</sub>: küszöbciklus, lásd 3. táblázat, 13. oldal). A kvantitatív eredmények pontossági adatait IU/μl egységben határozták meg a megfelelő C<sub>T</sub> használatával (4. táblázat). A fenti eredmények alapján az átfogó (össz) statisztikai eltérése az adott mintának 1.29% (C<sub>T</sub>) vagy 8.99% (koncentráció), és 1.87% (C<sub>T</sub>) a belső kontroll detektálásakor. Ezek az értékek összes – egyedileg meghatározott – variabilitási értékek kombinációján alapszanak.

**3. táblázat: C<sub>T</sub> értékeken alapuló pontossága adatok**

	<b>Standard deviáció</b>	<b>Variancia</b>	<b>Variációs koefficiens (%)</b>
Vizsgálaton belüli variabilitás: HBV RG/TM QS 5	0.09	0.01	0.32
Vizsgálaton belüli variabilitás: Belső kontroll	0.10	0.01	1.06
Vizsgálatok közötti variabilitás: HBV RG/TM QS 5	0.14	0.02	0.49
Vizsgálatok közötti variabilitás: Belső kontroll	0.29	0.08	1.00
Gyártási tételek közötti variabilitás: HBV RG/TM QS 5	0.38	0.15	1.39
Gyártási tételek közötti variabilitás: Belső kontroll	0.62	0.39	2.23
Teljes variancia: HBV RG/TM QS 5	0.36	0.13	1.29
Teljes variancia: Belső kontroll	0.52	0.27	1.87

**4. táblázat: Kvantitatív eredményeken alapuló pontossága adatok (IU/μl)**

	<b>Standard deviáció</b>	<b>Variancia</b>	<b>Variációs koefficiens (%)</b>
Vizsgálaton belüli variabilitás: HBV RG/TM QS 5	0.93	0.87	9.28
Vizsgálatok közötti variabilitás: HBV RG/TM QS 5	0.79	0.63	7.92
Gyártási tételek közötti variabilitás: HBV RG/TM QS 5	1.03	1.05	10.21
Teljes variancia: HBV RG/TM QS 5	0.90	0.81	8.99

## Robusztusság

Az *artus* HBV RG PCR Kit robusztusságának ellenőrzése lehetővé teszi a kit teljes hibaszázalékának meghatározását. A robusztusság ellenőrzéséhez, 100 darab HBV negatív plazma mintát 0.05 IU/μl elúciós térfogatú HBV kontroll DNS-el kezeltek (az analitikai kimutatási határ háromszoros koncentrációja). A QIAamp DSP Virus Kit-el történő extrakció után (lásd "**DNS kivonás**", 18. oldal), a mintákat az *artus* HBV RG PCR Kit segítségével vizsgálták. Minden HBV minta esetében a hibaszázalék 0% volt. A belső kontroll robusztusságának értékelése a 100 HBV negatív plazma minta tisztítása és vizsgálata alapján történt. Így az *artus* HBV RG PCR Kit robusztussága  $\geq 99\%$ .

## Reprodukálhatóság

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

## Diagnosztikai kiértékelés

Két független laboratórium tanulmányában az *artus* HBV RG PCR Kit-et a COBAS® TaqMan® HBV Assay-el hasonlították össze. Erre a célra 287 visszakereshető és már meglévő plazma mintákat teszteltek.

Az *artus* HBV RG PCR Kit teszteléséhez a HBV DNS-t QIAamp DSP Virus Kit-el izolálták és a vizsgálatot Rotor-Gene 3000 készüléken végezték el. A COBAS TaqMan HBV Assay-el történő összehasonlító vizsgálathoz a HBV DNS izolálását a gyártó előírásainak megfelelően végezték el. A kapott eredmények felhasználásával az *artus* HBV RG PCR Kit-et összehasonlították a COBAS TaqMan HBV Assay-vel.

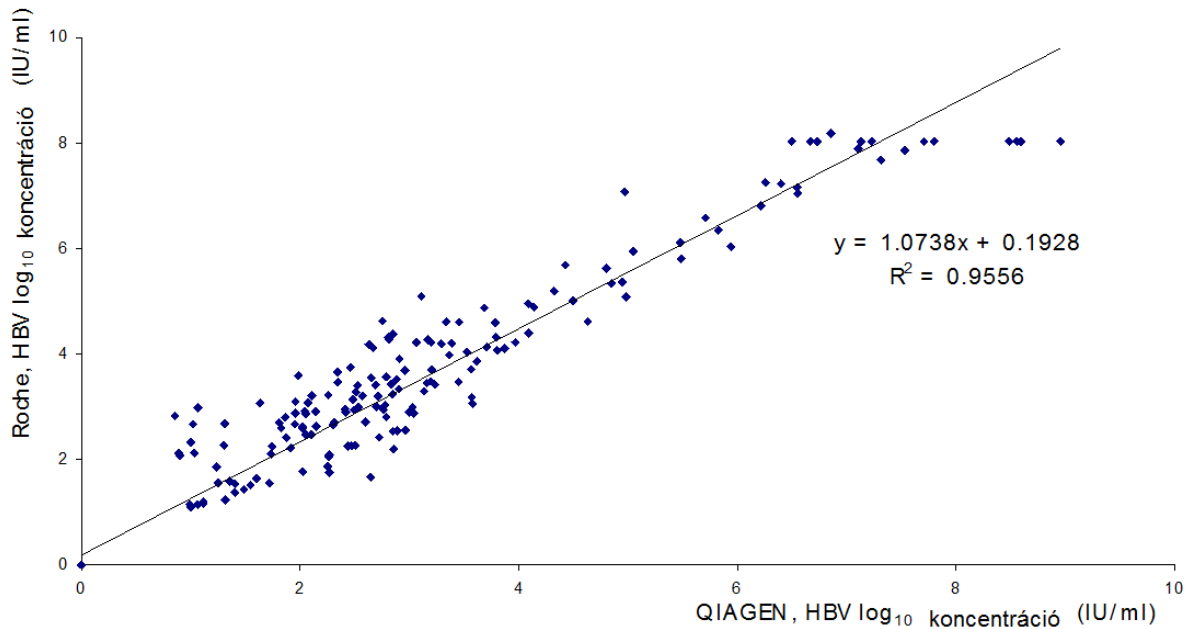
A COBAS TaqMan HBV Assay, mint referencia assay-ből gyűjtött adatokat összehasonlítva, az *artus* HBV RG PCR Kit diagnosztikai érzékenysége 100%, míg az összes plazma minta teljes egészére meghatározott diagnosztikai specificitás 97%. Az eredményeket az 5. táblázat mutatja.

### 5. táblázat: Összehasonlító validációs tanulmány eredményei

		COBAS TaqMan HBV Assay		
		+	-	Teljes
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit	+	186	3	189
	-	0	98	98

A 3 nem egyező minta további tesztelése megerősítette az *artus* HBV RG PCR Kit eredményeit. Ezért abból lehet kiindulni, hogy az eltérés alapja az *artus* HBV RG PCR Kit nagyobb érzékenységéből adódik.

Mind a két rendszer kvantitatív eredményeinek összefüggését lineáris regresszióval elemezték. Mindkét kit összehasonlítási eredményét a 3. ábra mutatja.



**3. ábra: COBAS TaqMan HBV Assay (Roche, HBV; High Pure system használatra a minta tisztításhoz) összehasonlítása az *artus* HBV RG PCR Kit-el (QIAGEN, HBV; QIAamp DSP Virus Kit használatra a minta tisztításához).** Mind a két rendszer kvantitatív eredményeinek összefüggését lineáris regresszióval elemezték (5. táblázat). (Mindkét kitből az eredményeket az XY tengelyen, log-log skálán ábrázolták.)

## A felhasználó által biztosítandó eszközök és reagensek

Kémiai anyagokkal történő munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információ érdekében tájékozódjon a megfelelő biztonsági adatlapokból (safety data sheets, SDSs), melyek a termék forgalmazójánál elérhetőek.

- DNS izoláló kit (lásd “**DNS kivonás**”, 18. oldal)
- Pipetták (állítható)\*
- Filterrel rendelkező steril pipetta hegyek
- Vortex mixer\*
- Asztali centrifuga\* 2 ml reakció csöves rotorral
- Rotor-Gene Q vagy Rotor-Gene készülék\* Cycling Green és Cycling Yellow vagy Cycling A.FAM és Cycling A.JOE fluoreszcens csatornákkal
- Rotor-Gene Q szoftver verzió 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 szoftver verzió 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 szoftver verzió 6.0.23) vagy újabb
- Strip csövek és tetők, 0.1 ml, 72-well rotor használatokor (kat.szám 981103 vagy 981106)
- Vagy: PCR csövek, 0.2 ml, 36-well rotor használatokor (kat.szám 981005 vagy 981008)
- Hűtoblokk (Adapter blokk 72 x 0.1 ml csövek, kat.szám 9018901, vagy Adapter blokk 96 x 0.2 ml csövek, kat.szám 9018905)

\* Bizonyosodjon meg róla, hogy a készülék a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizve és kalibrálva legyen.



# Fontos megjegyzések


## Általános óvintézkedések

A felhasználó mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Használjon szűrős, steril pipettákat.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakciómixhez térben elkülönített helyen adja hozzá.
- Olvassa fel az összes komponenst szobahőmérsékleten (15-25°C) a vizsgálat előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket (fel-le pipetázással, vagy vortex-el) és röviden centrifugálja le
- Dolgozzon gyorsan és tartsa a PCR reagenseket bemérés előtt jégen vagy a hűtőblokkban (72/96-well adapter blokk).

## Minta gyűjtés, tárolás és szállítás

 Minden mintát potenciálisan fertőzött anyagként kell kezelni.


 Jelenlegi tanulmányok alapján az EDTA-s vagy citrátos plazmát tekintik a legmegfelelőbb minta-anyagnak a HBV detektálásához. Ezért az ilyen típusú minták használatát javasoljuk az *artus* HBV RG PCR Kit-hez.

Az *artus* HBV RG PCR Kit belső validálási folyamatát humán EDTA-s plazma mintákkal végezték. Más minta-anyag nem lett validálva. Kérjük, kizárólag a javasolt izoláló kitet használja (lásd **“DNS kivonás”**, 18. oldal) a minta előkészítéséhez.

Más minta-anyag használatakor különösen a gyűjtésre, szállításra és tárolásra vonatkozó utasításokat szigorúan be kell tartani.

## Mintagyűjtés

Minden egyes vérvétel a véredények (artériák, vénák, kapillárisok) sérülését okozhatja. Kizárólag ártalmatlan és steril anyagok használhatóak. A vérvételre eldobható eszközök álljanak rendelkezésre. A véna szúráshoz nem szabad túl vékony kapilláris tűt használni. Vénás vérvételt a könyökhajlat, alkar, vagy kézfej megfelelő részén kell elvégezni. A vért szabványos mintagyűjtő csőbe kell levenni (piros kupak, Sarsted vagy azzal megegyező más gyártó csövébe). 5–10 ml EDTA-s vérmennyiséget kell levenni. A csöveket közvetlenül a mintavétel után meg kell forgatni (8x, ne rázzuk).

 A heparin terápiát kapó páciensek mintáját nem lehet használni. (lásd **“Interferáló anyagok”**, alább).

## Minta tárolása

A teljes vért 6 órán belül plazmára és sejtes elemekre kell választani 20 perces 800-1600 x g-n történő centrifugálással. Az elválasztott plazmát egy steril polipropilén csőbe helyezjük át. Az assay érzékenysége csökkenhet, ha a mintát rutinszerűen lefagyasztja vagy hosszabb ideig tárolja. A kapszulált vírus DNS napokig stabil marad 4°C-on, –20°C-on való tárolás esetén hetekig is, –70°C-on történő tároláskor hónapokig, évekig is stabil maradhat.\*

## Minta szállítása

A minta-anyag szállítása törésálló szállítótartályban történjen. Így a fertőződés lehetséges veszélye, valamint a minta szivárgása is elkerülhető. A mintát a patogén anyag helyi és nemzetközi előírásainak megfelelően kell szállítani. †

A mintát 6 órán belül szállítsuk el a feldolgozás helyére. Nem javasoljuk a minta tárolását a mintagyűjtés helyén. Ha a minta beküldése postai úton is lehetséges kövesse a jogi utasításokat a patogén anyag szállítására vonatkozóan. A minta szállításához futárt javasolunk. A vérmintákat hűtve (2–8°C), az elválasztott plazmát fagyasztva (–15 to –30°C) kell szállítani.

## Interferáló anyagok

Az emelkedett bilirubin szint ( $\leq 15$  mg/dl) és lipidek ( $\leq 800$  mg/dl), valamint a hemolitikus minták nem befolyásolják a rendszert. A heparin ( $\geq 10$  IU/ml) a PCR-t befolyásolja. Heparinos antikoagulációs mintavételi csőbe gyűjtött mintát ne dolgozzunk fel. Heparinizált betegtől származó mintát se használjuk.

## DNS kivonás

A QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, kat.szám 60704) a humán plazmából történő virális DNS izolálására validált kit, az *artus* HBV RG PCR Kit-el együtt használatos. A virális DNS tisztítását az *QIAamp DSP Virus Kit Kézikönyvének* utasításai alapján végezzük.

\* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations.

ⓘ A hordozó (carrier) RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és ennek következtében a DNS/RNS kinyerésre. A hordozó RNS stabilitásának növelését a QIAamp DSP Virus Kit-el biztosíthatjuk, valamint a hordozó RNS feloldásához és tárolásához kövesse a megadott használati utasításokat (“Reagensek és pufferek elkészítése”).

ⓘ Az *artus* HBV RG PCR Kit belső kontrollját az izolálási eljárásban közvetlenül is lehet használni (lásd “**Belső kontroll**”, alább). Győződjön meg arról, hogy a negatív plazma mintát együtt dolgozzák fel a tisztítási lépésben. Az ezeknek megfelelő belső kontroll jelei a tisztítás értékelésének alapjául szolgálnak.

## Belső kontroll

A belső kontrollt (HBV RG/TM IC) a kit tartalmazza. Így lehetővé válik a felhasználó számára a DNS izolálási eljárás és a lehetséges PCR gátlás ellenőrzése. Ennek az ellenőrzésére adja a belső kontrollt az izolálendő mintához 0.1 µl per 1 µl elúciós térfogat arányban. Például, a QIAamp DSP Virus Kit használatakor a DNS-t 60 µl Elution Buffer (AVE)-be eluáljuk. Ennél fogva először 6 µl belső kontrollt adjunk az mintához. A belső kontroll mennyisége kizárólag az elúciós térfogattól függ.

ⓘ A belső kontrollt és a hordozó RNS-t (lásd a “**DNS kivonás**” fejezetet, 18. oldal) csak a lízispuffer és a minta keverékéhez vagy közvetlenül a lízispufferhez kell adni.

A belső kontrollt ne adja hozzá közvetlenül a mintához. Ha a lízispufferhez hozzáadta, fontos megjegyezni, hogy a belső kontroll és lízispuffer-hordozó RNS keverékét mindig frissen készítse elő és azonnal használja fel (a keverék szobahőmérsékleten, vagy hűtőben történő pár órányi tárolása is a belső kontroll hibáját okozza és az extrakció hatékonyságát csökkenti).

ⓘ Közvetlenül ne adja hozzá a mintához belső kontrollt és a hordozó RNS-t.

Hogy megbizonyosodjunk a tisztítás sikerességéről, a tisztítás során (QIAamp DSP Virus Kit) Rotor-Gene Q készüléken feldolgozott negatív plazma minta belső kontroll  $C_T$  értékének el kell érnie a  $C_T = 29 \pm 3$  értéket (Küszöb/threshold: 0.03) Az adatok szórása a készülék és a tisztítás varianciáján alapul. Magasabb érték vagy eltérés tisztítási problémára utal. Ebben az esetben a tisztítást kell ellenőrizni és amennyiben szükséges további alkalommal validálni. További kérdéseivel és felmerülő problémáival kérjük, hogy a QIAGEN technikai támogatásához forduljon.

A belső kontrollt használhatja kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésre is. Ehhez a felhasználáshoz a belső kontrollt közvetlenül a HBV RG/TM Master mixhez adja, a 2b lépésben leírt protokoll alapján (22. oldal).

## A küszöbérték beállítása a PCR elemzéshez

Az optimális küszöbérték beállítása egy adott Rotor-Gene Q készülék és *artus* RG PCR Kit kombinációjában tapasztalati úton történik minden egyes egyéni kombináció tesztelésével, mivel ez egy relatív érték, ami a diagnosztikai munkafolyamattól függ. Kiindulásként a küszöbértéket be lehet állítani egy 0.04 előzetes értékre az első PCR futás elemzéséhez, de ezt az értéket állítani kell a munkafolyamat következő futásának összehasonlító elemzésében. A küszöbértéket manuálisan is beállíthatjuk a negatív kontroll és negatív minta háttérzaja fölé. Az átlag küszöbérték értékei ezekből a kísérletekből számítva a jövőbeli futások legnagyobb részében megfelelő lesz, azonban a felhasználónak időnként felül kell vizsgálnia a generált küszöbértékeket. Az küszöbérték általában 0.03–0.05 közötti tartományban fog mozogni és legfeljebb három tizedesjegyre kell kerekíteni.

## Kvantitatív analízis

A kitben lévő kvantifikációs standardokat (HBV RG/TM QS 1–5) előzetesen tisztított mintaként kell kezelni és azzal megegyező térfogatban használni (20 µl). A standard görbe Rotor-Gene készüléken történő létrehozásához mind az 5 kvantifikációs standard használata szükséges és az "Edit Samples" (Minták szerkesztése) párbeszédablakban standardként állítsa be a meghatározott koncentrációkkal (lásd készülék felhasználói kézikönyve).

**i** A kvantifikációs standardok IU/µl egységben vannak megadva.\* A standard görbe által meghatározott értékeket az alábbi egyenlet segítségével lehet átszámolni a minták IU/ml értékeire:

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

Felhívjuk figyelmét, hogy a fenti egyenletben a kezdeti minta térfogatával kell számolni. Ezt figyelembe kell venni, amikor a minta térfogata – különösen a nukleinsav extrakció során – megváltozik (pl. centrifugálásnál csökken a térfogat vagy növekedhet a térfogat az izolálási mennyiség eléréséhez szükséges extra térfogat hozzáadásával).

\* A standardok az Első Nemzetközi HBV standard (WHO) használatra során lettek kalibrálva.

# Protokoll: PCR és Adatelemzés

## **i** A kezdés előtti fontos lépések

- Mielőtt elkezdené az eljárást olvassa el a “**Általános óvintézkedések**” részt, 17–**Fehler! Textmarke nicht definiert..** oldal.
- Szánjon időt arra, hogy megismerje a Rotor-Gene Q készüléket mielőtt elkezdené a protokollt. Nézze meg a készülék használati utasítását.
- PCR futásonként legalább egy pozitív kontroll és egy negatív kontroll (PCR tisztaságú víz) szükséges. Standard görbe létrehozásához minden egyes PCR futáshoz mind az 5 kvantifikációs standardot (HBV RG/TM QS 1–5) használja.

## Teendők a kezdés előtt

- Győződjön meg róla, hogy a hűthető adapter (Rotor-Gene Q készülék tartozéka) előhűtött állapotban van: 2-8°C-on.
- Minden használat előtt az összes reagenst teljesen fel kell olvasztani, össze kell keverni (ismételt fel és le pipetázással vagy gyors vortexeléssel), és röviden centrifugálni.

## A folyamat

1. Helyezze el a kívánt mennyiségű PCR csövet a hűtőblokk adaptereibe.
2. Amennyiben a belső kontrollt a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR inhibíció ellenőrzésére szeretné használni, kövesse a 2a lépést. Ha a belső kontrollt kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésre használná, kövesse a 2b lépésben leírtakat.
- 2a. A belső kontroll már az izoláláshoz lett adva (lásd “Belső kontroll”, 19. oldal). Ebben az esetben a master mixet a 6. táblázatnak megfelelően készítse el.

**6. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használata a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR inhibíció ellenőrzésére)**

Mintaszám	1	12
HBV RG/TM Master	30 µl	360 µl
HBV RG/TM IC	0 µl	0 µl
<b>Teljes térfogat</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>

- 2b. A belső kontrollt közvetlenül a HBV RG/TM Master mixhez kell adni. Ebben az esetben a master mixet a 7. táblázatnak megfelelően készítse el.**

A reakció mix a PCR-hez szükséges minden komponenst tartalmazza, kivéve a mintát.

**7. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használata kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésére)**

<b>Mintaszám</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HBV RG/TM Master	30 µl	360 µl
HBV RG/TM IC	2 µl	24 µl
<b>Teljes térfogat</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>

\* A PCR assay előkészítése során a belső kontroll hozzáadásával okozott térfogatnövekedés elhanyagolható. A detektáló rendszer érzékenysége ezáltal nem romlik.

- 3. Pipettázon 30 µl master mixet minden egyes PCR csőbe. Majd adjon hozzá 20 µl-t a DNS minta eluátumból ismételt fel és le történő pipettázás mellett (lásd 8. táblázat). Ennek megfelelően használjon legalább egy 20 µl-nyi kvantifikációs standardot (HBV RG/TM QS 1–5) mint pozitív kontrollt és 20 µl vizet (Water, PCR-tisztaságú) mint negatív kontrollt.**

**8. táblázat: PCR assay elkészítése**

<b>Mintaszám</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
<b>Master mix</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl per reakció</b>
<b>Minta</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl per reakció</b>
<b>Teljes térfogat</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl per reakció</b>

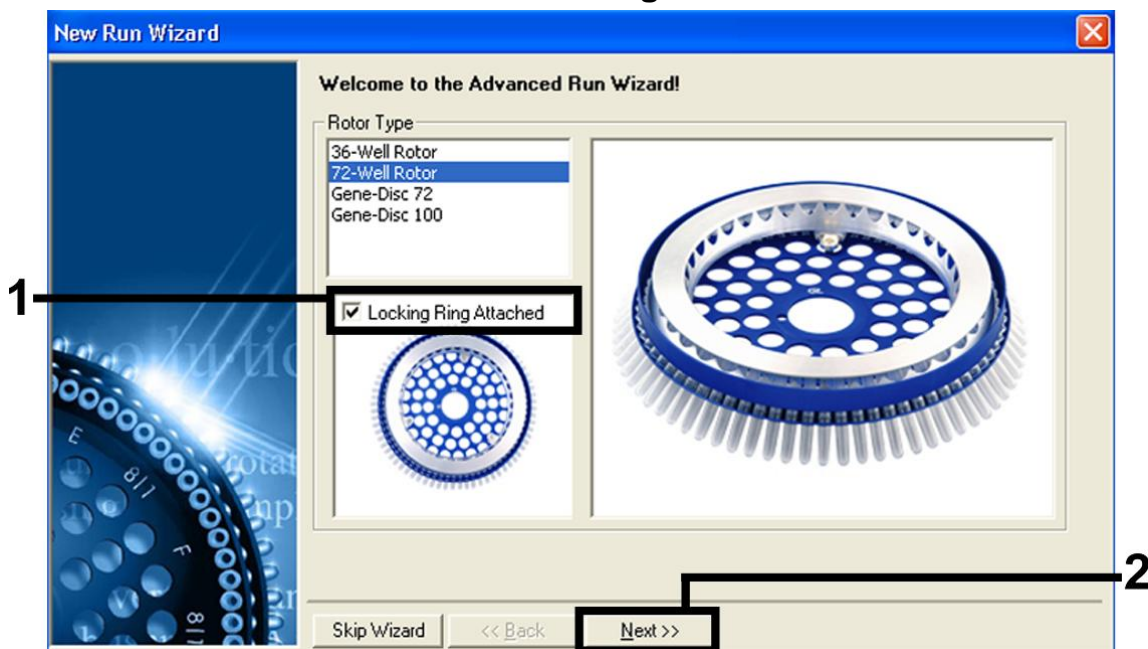
- 4. Zárja le a PCR csöveket. Győződjön meg róla, hogy a zárógyűrű (a Rotor-Gene Q készülék tartozéka) a rotor tetején helyezkedik el, hogy megakadályozza a csövek véletlenszerű kinyílását a futás alatt.**

5. A HBV DNS detektálására készítsen el egy hőmérséklet profilt az alábbi lépések alapján.

Általános assay paraméterek beállítása	4, 5, 6. ábra
A hot-start enzim kezdeti aktiválása	7. ábra
DNS amplifikáció	8. ábra
Fluoreszcens csatornák érzékenységeinek beállítása	9. ábra
A futás indítása	10. ábra

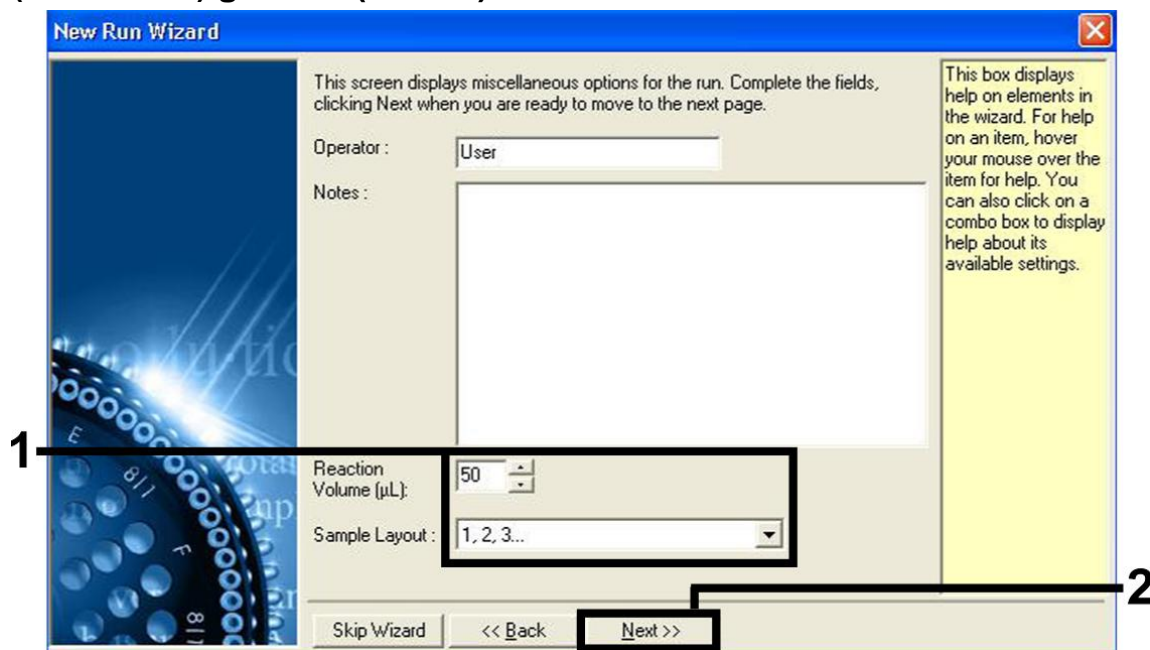
Minden specifikáció a Rotor-Gene Q szoftver 1.7.94 verziójához, Rotor-Gene 6000 szoftver 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 verzióikhoz és a Rotor-Gene 3000 szoftver 6.0.23 verziójához ajánlott. További programozási információt a Rotor-Gene készülékhez annak használati útmutatójában talál. Ezeket a beállításokat az illusztrációban vastag, fekete kerettel jelöltük. Az illusztrációk a Rotor-Gene Q készüléket tartalmazzák. Ahol a Rotor-Gene Q 3000 készülékhez más értékek szükségesek, azokat a szövegben feltüntettük.

6. Először nyissa meg a “New Run Wizard” Új Futás párbeszéd ablakot (4. ábra). Pipálja be a “Locking Ring Attached” (Záró gyűrű rögzítve) sort és kattintson a “Next” Következő gombra.



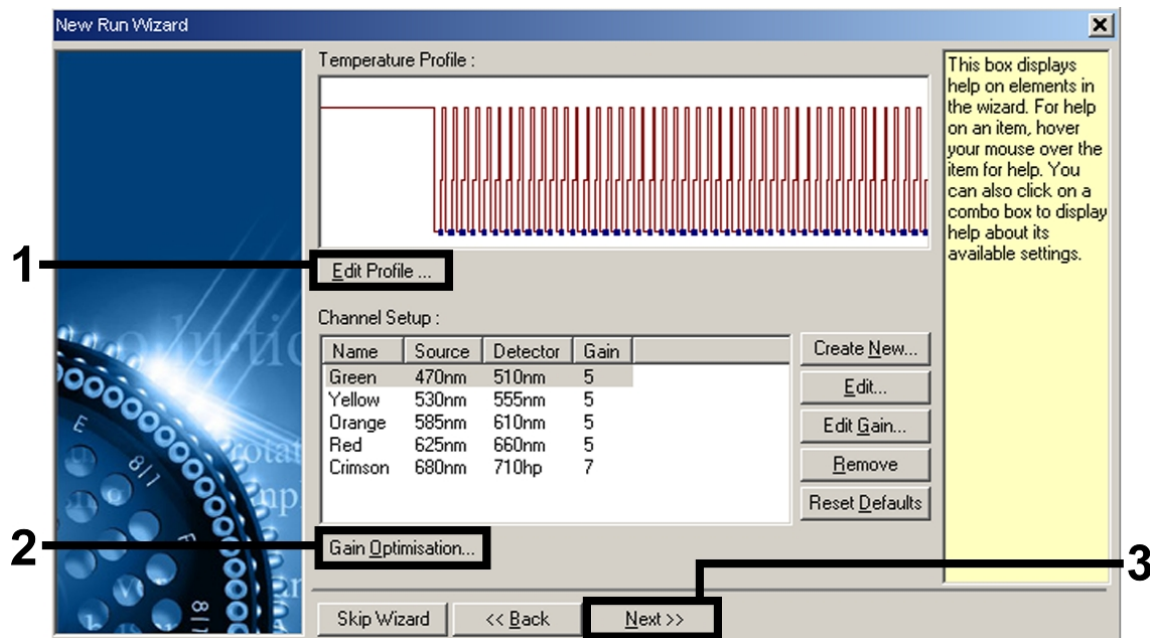
4. ábra: Az új futás párbeszédablak.

7. Válassza a PCR-hez a 50 (µl) reakció térfogatot és kattintson a “Next” (Következő) gombra (5. ábra).



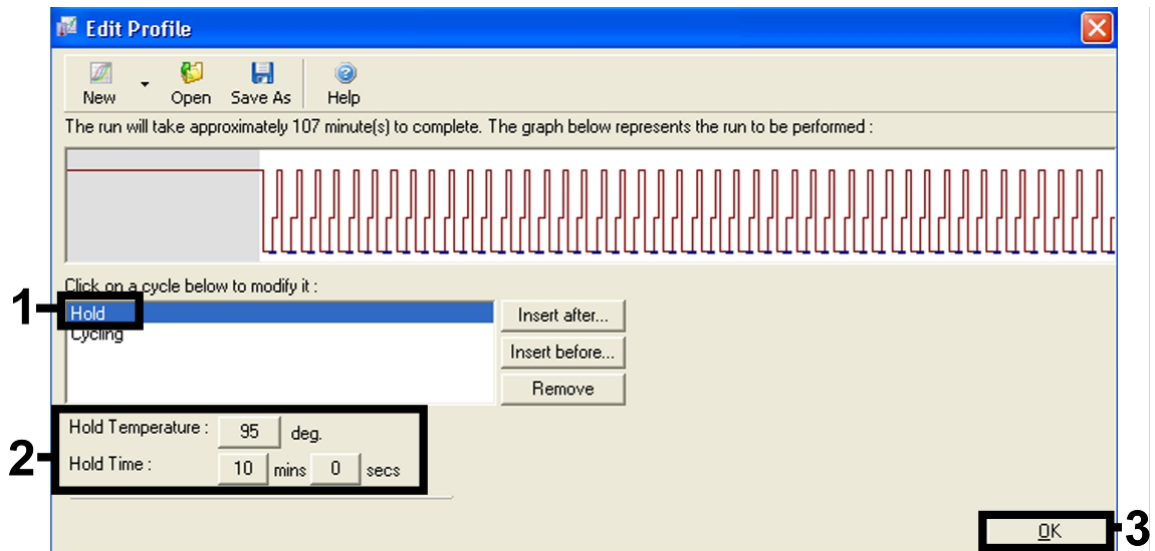
5. ábra: Assay paraméterek általános beállítása.

8. Kattintson az “Edit Profile” (Profil szerkesztése) gombra a “New Run Wizard” (Új futás varázsló) párbeszédablakban (6. ábra), és programozza a hőmérsékleti profilt, amint azt a 6–8. ábra mutatja.

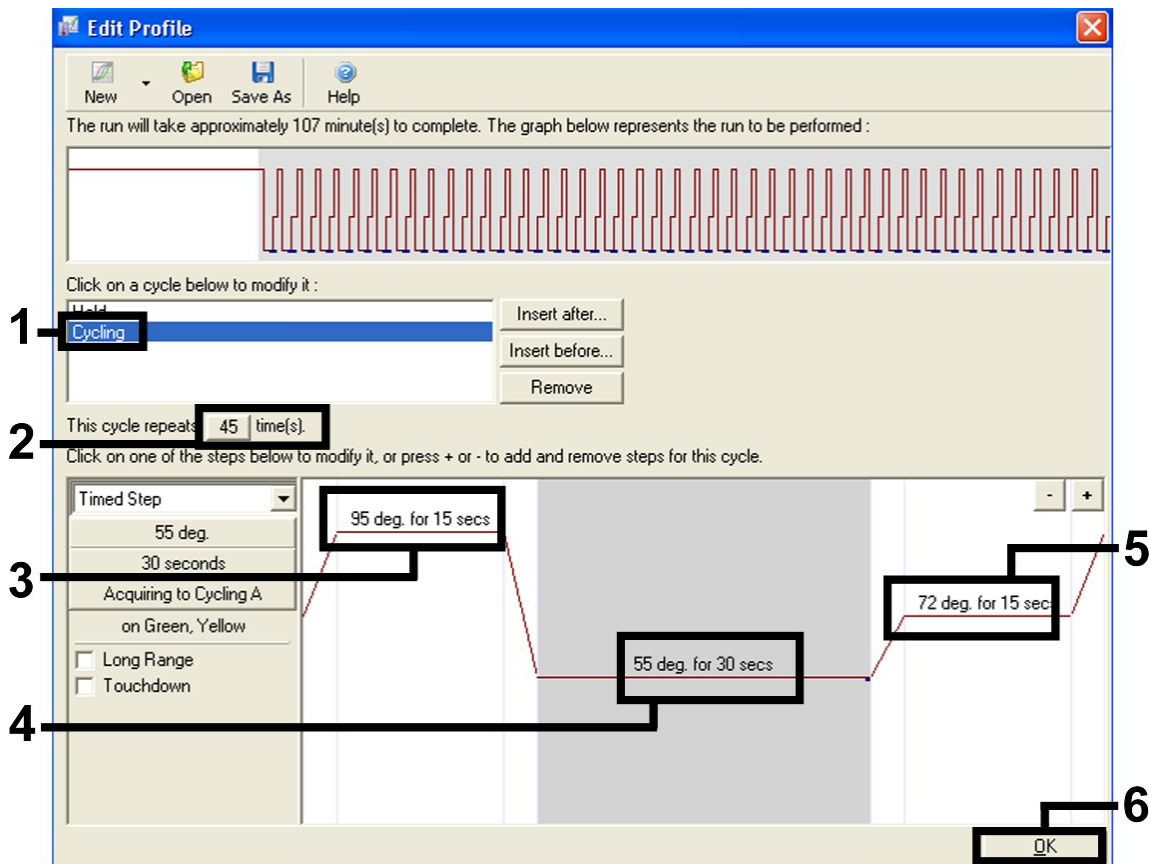


6. ábra: Profil szerkesztése.





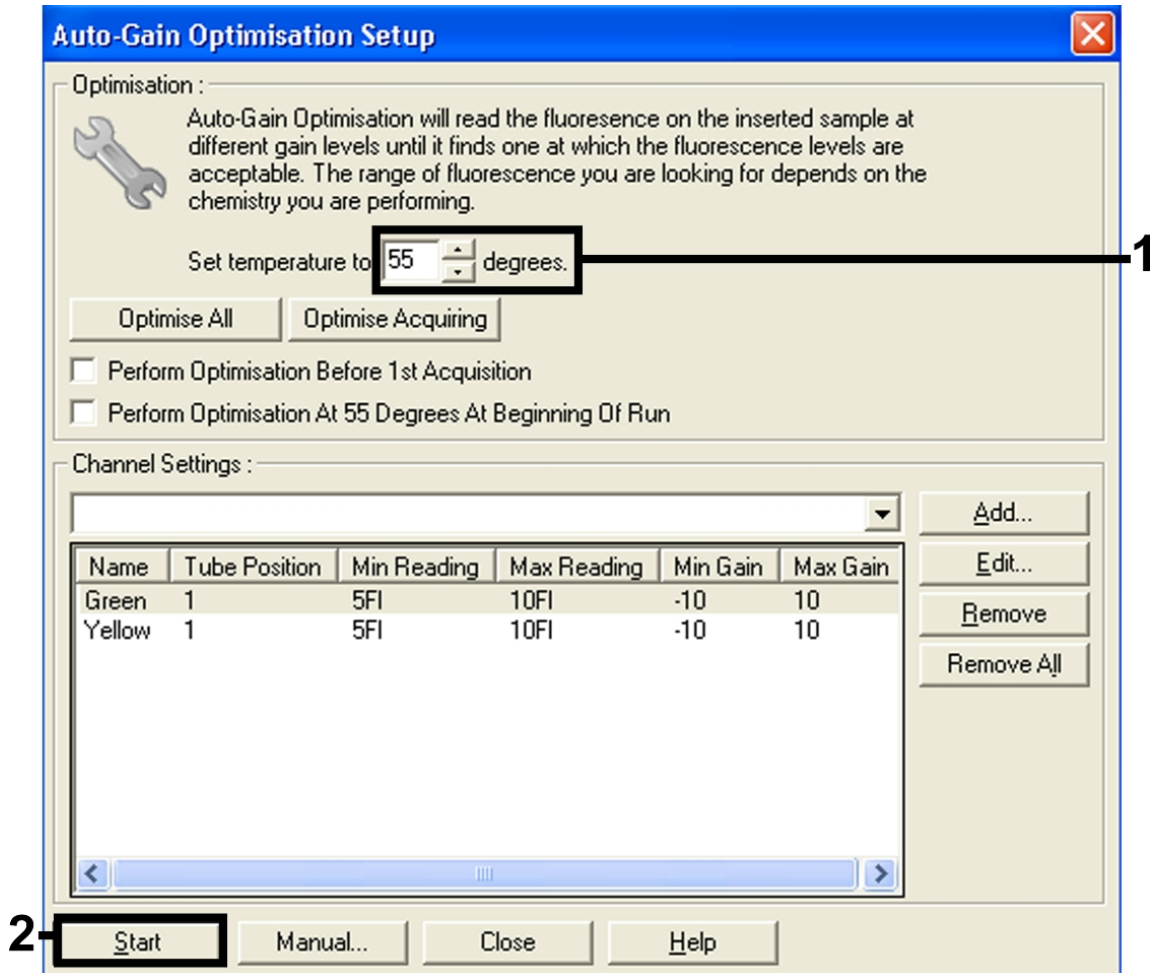
7. ábra: Hot-start enzim kezdeti aktiválása.



8. ábra: DNS amplifikálás. Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 készüléken a szoftver a fluoreszcens festéket "FAM/Sybr, JOE"-ként fogja definiálni.

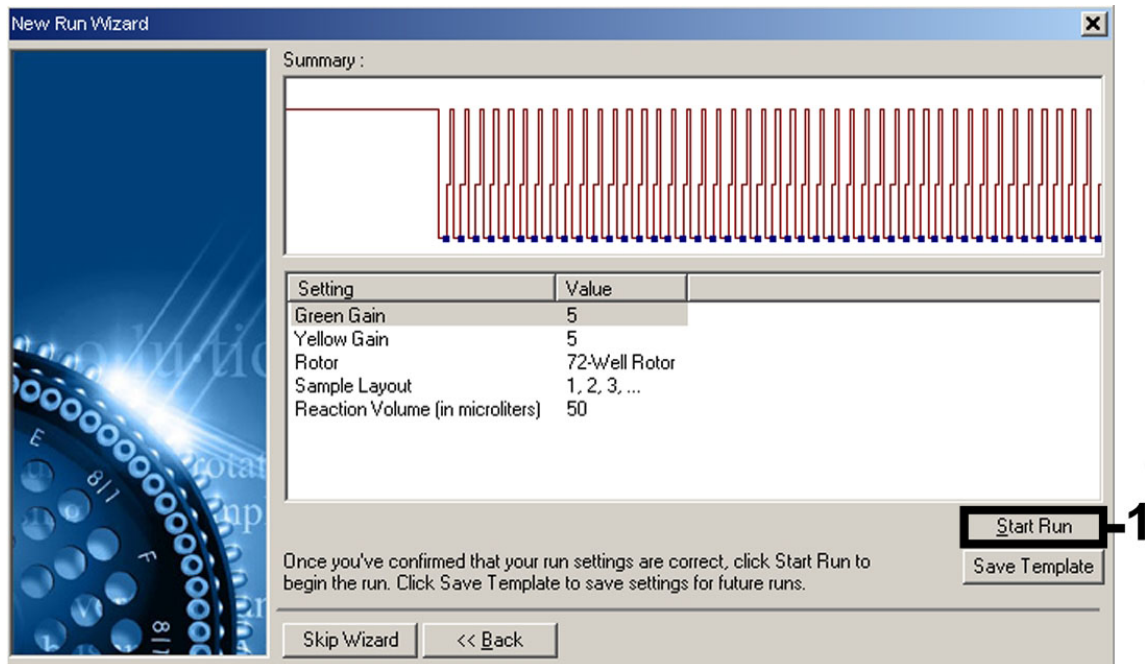
9. **A fluoreszcens csatornák érzékelési tartományát a PCR-csőekben található fluoreszcencia intenzitása alapján kell meghatározni. Kattintson a "Gain Optimisation" (Nyereség/Erősítés optimalizálás) gombra a „New Run Wizard” párbeszédablakban (lásd 6. ábra) majd nyissa meg az "Auto-Gain Optimisation Setup" (Automatikus jeloptimalizálás beállítása) párbeszédablakot. Állítsa a kalibrációs**

**hőmérsékletet 55 (“degree”; fokra), hogy megegyezzen az  
amplifikációs program “annealing” hőmérsékletével (9. ábra).**



**9. ábra: A fluoreszcens csatorna érzékenységének beállítása.** Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 készüléken a szoftver a fluoreszcens festéket “FAM/Sybr, JOE”-ként fogja definiálni.

10. A csatorna kalibrációval meghatározott értékek automatikusan mentésre kerülnek és a programozási eljárás utolsó menü ablakában vannak listázva (10. ábra). Kattintson a “Start Run” (Futtatás indítása) gombra.



10. ábra: Futtatás indítása. Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 készüléken a szoftver a fluoreszcens festéket “FAM/Sybr, JOE”-ként fogja definiálni.

11. Miután a futás befejeződött elemezze az adatokat. A következő eredmények (11a, 11b és 11c) lehetségesek.

Példák pozitív és negatív PCR reakcióra a 11. ábrán és a 12. ábrán láthatóak.

- 11a. A jel detektálása a “Cycling Green” fluoreszcens csatornában történik.

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

Ebben az esetben a jel detektálása a “Cycling Yellow” csatornában elhanyagolható, míg a HBV DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a “Cycling Green” csatornában) a belső kontroll fluoreszcens jelének csökkenését vagy hiányát eredményezheti a “Cycling Yellow” csatornában (kompetíció).

ⓘ Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 készüléken a pozitív jelet detektáló csatorna Cycling A.FAM és a belső kontrollt detektáló csatorna a Cycling A.JOE.

**11b. A “Cycling Green” fluoreszcens csatornában nincs detektált jel. Ugyanakkor, ezzel egyidőben megjelenik a belső kontroll fluoreszcens jele a “Cycling Yellow” csatornában. A mintában HBV DNS nem detektálható. Negatívnak tekinthető.**

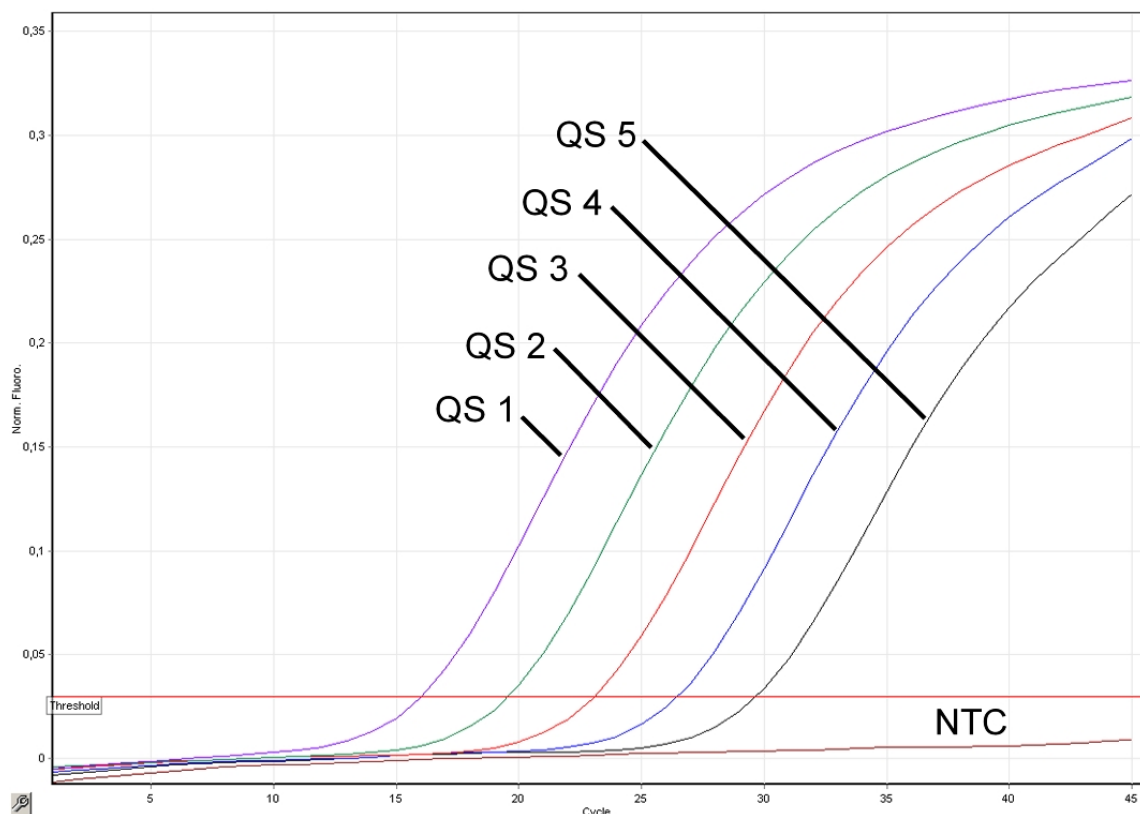
A negatív HBV PCR esetében a belső kontroll detektált jele alapján kizárható a PCR gátlás lehetősége.

**i** Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 Cycling A.JOE csatornája a belső kontroll detektálására szolgál, míg a jel hiányát a Cycling A.FAM csatornában érzékeljük.

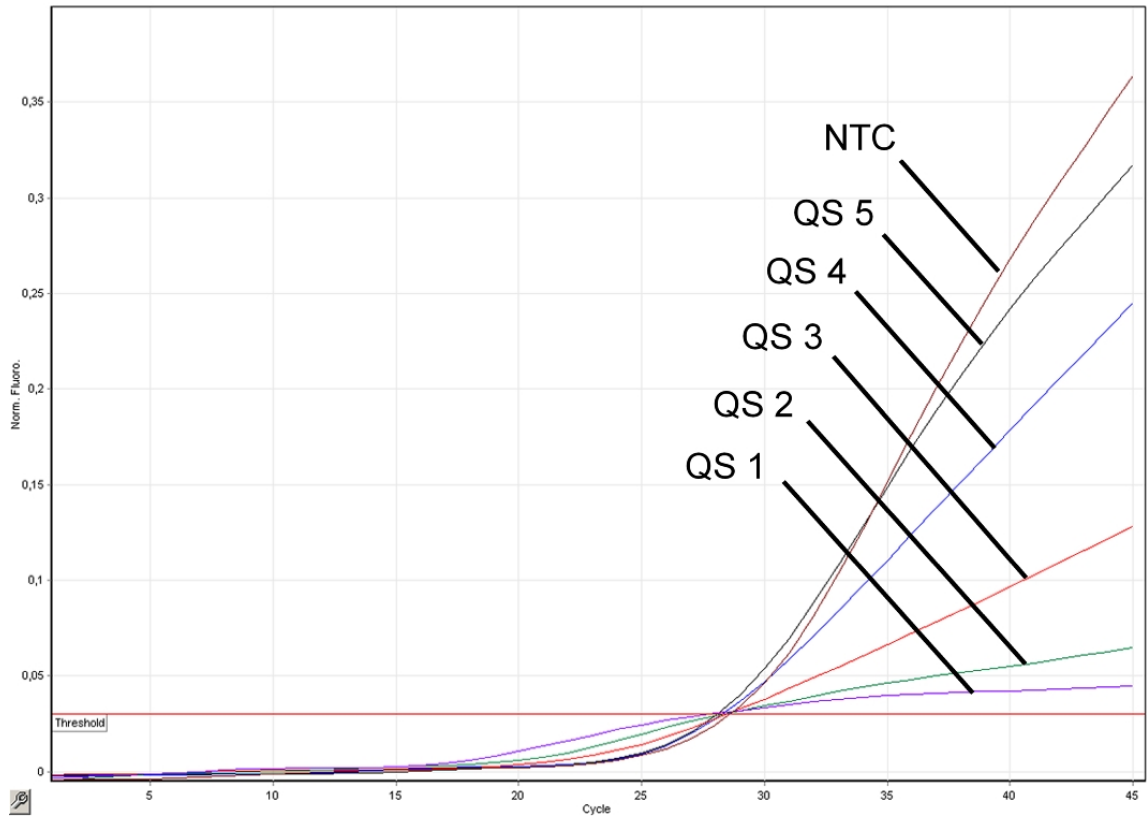
**11c. Nincs detektált jel a “Cycling Green” vagy a “Cycling Yellow” csatornában. Nem lehet eredményre következtetni.**

A hibaforrásokat és ezek megoldására vonatkozó információkat a “**Hibaelhárítási útmutatóban**” találja, 30. oldal.

**i** Megjegyzés: a Rotor-Gene 3000 készülék releváns csatornái Cycling A.FAM és Cycling A.JOE.



**11. ábra: Kvantifikációs standardok detektálása (HBV RG/TM QS 1–5) a “Cycling Green” fluoreszcens csatornában. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll).**



**12. ábra: Belső kontroll detektálása (IC) a “Cycling Yellow” fluoreszcens csatornájában a kvantifikációs standardok (HBV RG/TM QS 1–5) egyidejű amplifikálásával. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll).**






## Hibaelhárítási útmutató

Jelen Hibaelhárítási útmutató hasznos lehet bármilyen felmerülő probléma megoldása esetén. További információért látogasson el a Műszaki Támogatói Központunk "Frequently Asked Questions" (FAQ; Gyakran ismételt kérdések) oldalára: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). A QIAGEN Technikai Szolgálatál lévő kutatók a szívesen válaszolnak különböző kérdésekre és/vagy a kézikönyvben található protokollokra irányuló megkeresésekre, valamint egyéb minta és detektáló technológiákkal kapcsolatos kérdésekre (az elérhetőségekhez látogasson el [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) weboldalra).






### Megjegyzések és javaslatok

---

#### **Nincs detektált jel a pozitív kontrollokban (HBV RG/TM QS 1–5) a "Cycling Green" vagy "Cycling A.FAM" fluoreszcens csatornában.**

- a) A PCR adatok elemzéséhez választott fluoreszcens csatorna nem felel meg a protokollnak  Az adatelemzéshez válassza ki a "Cycling Green" vagy "Cycling A.FAM" fluoreszcens csatornát a HBV analitikai PCR-hez és "Cycling Yellow" vagy "Cycling A.JOE" fluoreszcens csatornát a belső kontroll PCR -hez.
- b) A Rotor-Gene készülék hőmérséklet profiljának helytelen programozása  Hasonlítsa össze a hőmérséklet profilt a protokollal. Lásd "**Protokoll: PCR és Adatelemzés**", 21. oldal.
- c) PCR reakció helytelen konfigurálása  Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási vázlat alapján és ismételje meg a PCR futtatást, amennyiben szükséges. Lásd "**Protokoll: PCR és Adatelemzés**", 21. oldal.
- d) A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a "Reagensek tárolása és kezelése" részben leírt útmutatások szerint történt (5. oldal)  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejárat idejét (Lásd a kit jelzése alapján) és használjon új kitet, ha szükséges.
- e) Az *artus* HBV RG PCR Kit lejárt  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejárat idejét (Lásd a kit jelzéseinél) és használjon új kitet, ha szükséges.

**A “Cycling Yellow” vagy “Cycling A.JOE” fluoreszcens csatornában a QIAamp DSP Virus Kit segítségével tisztított negatív plazma minta belső kontroll jele gyenge vagy egyáltalán nem detektálható ( $C_T = 29 \pm 3$ ; threshold, 0.03), ezzel egyidejűleg azonban a “Cycling Green” vagy “Cycling A.FAM” csatornában jel detektálható.**

- a) A PCR körülményei nem felelnek meg a protokollnak  Ellenőrizze a PCR körülményeket (lásd fentebb) és ismételje meg a PCR futtatást a helyes beállításokkal, amennyiben szükséges.
- b) A PCR gátolt  Bizonyosodjon meg róla, hogy a javasolt izoláló módszert használta és pontosan követte a gyártó utasításait.
- c) Az extrakció során a DNS elveszett  Amennyiben a belső kontroll hozzá lett adva az extrakcióhoz, a belső kontroll meglévő jele utalhat a DNS elvesztésére az extrakciós lépés alatt. Győződjön meg arról, hogy a javasolt izolálási módszer szerint járt el (lásd **“DNS kivonás”**, 18. oldal) és pontosan követte a gyártó utasításait.
- d) A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a “Tárolás” fejezetben leírt útmutatások szerint történt (5. oldal)  Kérjük, ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejáratát (lásd a kit jelzéseinél), használjon új kitet, amennyiben szükséges.
- e) Az *artus* HBV RG PCR Kit lejárt  Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejáratát (Lásd a kit jelzése alapján) és használjon új kitet, ha szükséges.

**Az analitikai PCR “Cycling Green” vagy “Cycling A.FAM “ fluoreszcens csatornában detektált jel a negatív kontrollok esetén.**

- a) Szennyeződés történt a PCR előkészítése során
- ① Ismétlje meg a PCR futást insmétlésben új reagensekkel.
  - ① Amennyiben lehetséges, zárja le a PCR csövet közvetlenül a vizsgálati minta hozzáadása után.
  - ① A pozitív kontrollt szigorúan a végén pipettázza az elegyhez.
  - ① Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörténik.
- b) Szennyeződés történt az extrakció során
- ① Ismétlje meg az extrakciót és a PCR futást a vizsgálni kívánt mintával új reagenseket használva.
  - ① Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörténik.



## Referenciák

A QIAGEN a QIAGEN termékeket felhasználó tudományos publikációkból kitéjedt, naprakész online adatbázist tart fenn. Átfogó keresési lehetőséget kínál, hogy megtalálja a szükséges közleményt, akár egy egyszerű kulcsszóra vagy specifikus alkalmazásra, kutatási területre, vagy címre stb. keres rá.

A teljes referencia listához látogasson el a QIAGEN Referencia Adatbázisához, [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) vagy lépjen kapcsolatba a QIAGEN Technikai Segítségnyújtással vagy a helyi forgalmazóval.

## Rendelési információk

<b>Termék</b>	<b>A kit tartalma</b>	<b>Kat.szám</b>
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (24)	For 24 reactions: Master, 5 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4506263
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96)	For 96 reactions: Master, 5 Quantitation Standards, Internal Control, Water (PCR grade)	4506265
QIAamp DSP Virus Kit — for purification of viral nucleic acids from human plasma for in vitro diagnostic purposes		
QIAamp DSP Virus Kit	For 50 preps: QIAamp MinElute <sup>®</sup> Spin Columns, Buffers, Reagents, Tubes, Column Extenders, and VacConnectors	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx — for IVD-validated real-time PCR analysis in clinical applications</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002033

<b>Termék</b>	<b>A kit tartalma</b>	<b>Kat.szám</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR cycler with 2 channels (green, yellow), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002013

<b>Termék</b>	<b>A kit tartalma</b>	<b>Kat.szám</b>
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002012
<b>Rotor-Gene Q — for outstanding performance in real-time PCR</b>		
Rotor-Gene Q 5plex System	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001660

<b>Termék</b>	<b>A kit tartalma</b>	<b>Kat.szám</b>
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Real-time PCR cycler with 2 channels (green, yellow), laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001550
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform	Real-time PCR cycler and High Resolution Melt analyzer with 2 channels (green, yellow) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories, 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001560
<b>Rotor-Gene Q accessories</b>		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction setup with a single-channel pipet in 72 x 0.1 ml tubes	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction set-up in a standard 8 x 12 array using 96 x 0.2 ml tubes	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips of 4 tubes and caps for 1000 reactions	981103

<b>Termék</b>	<b>A kit tartalma</b>	<b>Kat.szám</b>
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips of 4 tubes and caps for 10,000 reactions	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 thin-walled tubes for 1000 reactions	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 thin-walled tubes for 1000 reactions	981008

A naprakész licenz információkért és a termék specifikus nyilatkozatokért tanulmányozza át a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvét. A QIAGEN kitek kézikönyvei és használati útmutatói a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oldalon megtalálhatóak vagy a QIAGEN Technikai szolgálatától vagy a helyi forgalmazótól kérhetők.

Ennek a terméknek a megvásárlása feljogosítja a vevőt a kit humán in vitro diagnosztikai szolgáltatás teljesítményszinten való használatra. A vásárlással megszerzett használati jogon kívül semmilyen általános szabadalmi vagy bármilyen más licenz engedélyre nem jogosít ez a megállapodás.

Védjegyek: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

Az *artus* HBV RG PCR Kit és a QIAamp DSP Virus Kit az 98/79/EC Európai In Vitro Diagnosztikai Direktíva szerint CE jelöléssel ellátott diagnosztikai kitek. Nem minden országban elérhetők.

#### **Korlátozott Licenz megállapodás**

Az *artus* HBV RG PCR Kit terméknek a használatával bármely a kit-et beszerző és használó kinyilvánítja beleegyezését a következő feltételekbe:

1. Az *artus* HBV RG PCR Kit a hozzá adott *artus HBV RG PCR Kit Handbook*-ban szereplő protokollokkal összhangban és csak a készletben található elemekkel együtt használható. A QIAGEN valamennyi szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják és beleépítsék a készletben lévő elemeket a készletben nem megtalálható elemekkel, kivéve abban az esetben, ha az szerepel a termékhez biztosított *artus HBV RG PCR Kit Handbook*-ban és a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oldalról elérhető protokollokban.
2. A kifejezett licenszekon kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a készlet és/vagy ennek használata harmadik fél jogait nem sérti.
3. A kit és összetevőinek licensze csak egyszeri használatra érvényes, nem szabad azt újra felhasználni, felújítani vagy újra értékesíteni.
4. A QIAGEN egyértelműen elutasít minden más (kifejezett vagy hallgatólagosan beleértett) licenszet, amelyet külön nem nyilvánított ki.
5. A kit vevője és felhasználója elfogadja, hogy sem ő maga nem teszi és senki másnak sem engedélyez semmilyen lépést, amely a fenti pontokban tiltott cselekményre vezet vagy elősegíti azt. A korlátozott licenc egyezménybe foglalt korlátozásokat a QIAGEN bármely bíróságon keresztül érvényesítheti, továbbá a licenz megszegőjét a nyomozati és bírósági eljárás teljes költségének megtérítésére kötelezheti, beleértve az ügyvédi díjakat is abban az eljárásban, amelynek célja a korlátozott licenz, valamint a kit-hez és összetevőikhez kapcsolódó szellemi tulajdonjog betartatása.

A legfrissebb licenz feltételekért látogassa meg a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) honlapot.

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Brazil** ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

**Italy** ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

