

Marec 2015

Príručka súpravy *artus*[®] HCV RG RT-PCR Kit



24 (katalógové č. 4518263)



96 (katalógové č. 4518265)

Verzia 1

IVD

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s nástrojmi Rotor-Gene[®] Q Instruments

CE
0197

REF

4518263, 4518265

HB

1049309SK



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

NEMECKO

R5

MAT

1049309SK



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

QIAGEN stanovuje normy v:


- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Obsah

Obsah súpravy	4
Symboly	4
Skladovanie	5
Účel použitia	5
Obmedzenia používania produktu	6
Kontrola kvality	6
Varovania a preventívne opatrenia	6
Úvod 7	
Princíp	7
Informácie o patogéne	7
Charakteristiky účinnosti	8
Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ	17
Dôležité poznámky	18
Všeobecné bezpečnostné opatrenia	18
Odber, skladovanie a preprava vzoriek	18
Izolovanie RNA	19
Interný kontrolný roztok	20
Kvantifikácia	20
Protokol: PCR analýza údajov	22
Spríevodca riešením problémov	32
Referenčná literatúra	35
Informácie o objednávaní	36

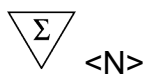
Obsah súpravy

artus HCV RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Katalógové č.		4518263	4518265
Počet reakcií		24	96
Modrá	Hep. C Virus RG Master A	2 x 12 reakcie	8 x 12 reakcie
Fialová	Hep. C Virus RG Master B	2 x 12 reakcie	8 x 12 reakcie
Červená	Hep. C Virus RG QS 1* (10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	Hep. C Virus RG QS 2* (10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	Hep. C Virus RG QS 3* (10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Červená	Hep. C Virus RG QS 4* (10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Zelená	Hep. C Virus RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Biela	Voda (stupeň PCR)	1000 μl	1000 μl
	Príručka	 1	1

* Kvantitatívny štandard.

† Interný kontrolný roztok.

Symbols



Obsahuje reagentie postačujúce pre <N> testov



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu

	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca
	Prečítajte si návod na použitie
	Dôležitá poznámka

Skladovanie

Komponenty súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit by sa mali skladovať pri teplote -30 °C až -15 °C . Nemalo by dôjsť k opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu (> 2 x), pretože tým sa môže znížiť senzitivita testu. Ak sa reagenty nepoužívajú nepretržite, mali by sa zamraziť v alikvótach. Skladovanie pri teplote $2 - 8\text{ °C}$ by nemalo byť dlhšie ako 5 hodín.

Účel použitia

Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit je in vitro test na amplifikáciu nukleovej kyseliny na kvantitatívne vyjadrenie RNA vírusu hepatitídy C (HCV) v ľudskej plazme. Tento diagnostický test využíva polymerázovú reťazovú reakciu s reverznou transkripciou (RT-PCR) a je nakonfigurované pre nástroje Rotor-Gene Q Instruments. Test dokáže kvantitatívne vyjadriť HCV RNA v rozsahu $65 - 1 \times 10^6$ HCV IU/ml.

 Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa nemôže používať s nástrojmi Rotor-Gene Q 2plex Instruments.

Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit je určená na použitie spolu s klinickým obrazom a inými laboratórnymi markermi na určenie prognózy ochorenia a na použitie ako pomôcka pri vyhodnocovaní vírusovej reakcie na antiretrovirálnu liečbu podľa meraní zmien v úrovniach HCV RNA plazmy EDTA. Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit nie je určená na použitie ako skriningový test pre HCV alebo ako diagnostický test na potvrdenie prítomnosti infekcie HCV.

Obmedzenia používania produktu

Všetky reagenty sa môžu použiť len pri diagnostike in vitro.

Tento výrobok používa personál, ktorý absolvoval špeciálne školenie ohľadom diagnostických postupov in vitro.

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov PCR je potrebné presne dodržiavať používateľskú príručku.

Pozornosť by sa mala venovať dátumom expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Aj keď je to zriedkavé, môže dôjsť v prípade mutácií vo vysoko zakonzervovaných častiach vírusového genómu, ktorý pokrývajú priméry súpravy a/alebo sonda k stanoveniu malého množstva alebo k zlyhaniu detegovania prítomnosti vírusu. Validita a účinnosť dizajnu testu sa v pravidelných intervaloch revidujú.

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

Varovania a preventívne opatrenia

Počas práce s chemikáliami nosíte vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačit' KBÚ pre každú súpravu QIAGEN® a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

Úvod

Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa skladá zo systému pripraveného na použitie na detegovanie HCV RNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na nástrojoch Rotor-Gene Q Instruments. Hep. C Virus RG Master A a B obsahuje reagentie a enzýmy na reverznú transkripciu a špecifickú amplifikáciu regiónu a 240 bp genómu HCV a na priamu detekciu špecifického amplikónu vo fluorescenčnom kanáli farby Cycling Green na nástroji Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 alebo Cycling A.FAM™ (zdroj 470 nm, detektor 510 nm) nástroja Rotor-Gene 3000.

Okrem toho obsahuje súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit druhý heterológny amplifikačný systém na identifikovanie možnej inhibície PCR. Tá sa zistí ako interný kontrolný roztok (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange nástroja Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 alebo A.ROX™ (zdroj 585 nm, detektor 610 nm) nástroja Rotor-Gene 3000. Detekčný limit analytického HCV RT-PCR (pozri „Analytická senzitivita“, strana 8) sa nezníži. Dodajú sa externé pozitívne kontrolné roztoky (Hep. C Virus RG QS 1–4), ktoré umožňujú stanovenie množstva vírusovej RNA. Ďalšie informácie nájdete v časti „Kvantifikácia“, strana 20.

Princíp

Detekcia patogénov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je založená na amplifikácii špecifických regiónov genómu patogénu. Pri real-time PCR sa amplifikovaný produkt deteguje prostredníctvom fluorescenčných farbív. Tie sú zvyčajne spojené so sondami oligonukleotidov, ktoré sa špecificky viažu na amplifikovaný produkt. Monitorovanie intenzity fluorescencie počas PCR cyklu (t. j. v reálnom čase) umožňuje detekciu a vyčíslenie akumulujúceho sa produktu bez nutnosti opätovného otvorenia reakčných skúmaviek po PCR cykle.*

Informácie o patogéne

Hepatitída C je zápal pečene spôsobený vírusom s rovnakým názvom. Na rozdiel od iných vírusov hepatitídy A, B, D alebo E vedie infekcia vírusom hepatitídy C (HCV) vo veľkom počte prípadov k chronickému ochoreniu pečene. Infekcia HCV sa často počas relatívne dlhého času neprejavuje žiadnymi symptómami. Z tohto dôvodu väčšina pacientov o tejto infekcii nevie. Liečba je ale najúčinnějšía v skorších fázach ochorenia. Momentálne je jedinou dokázanou účinnou liečbou interferón α (v kombinácii s ribavirínom). Je tiež známe, že len na interferónovú liečbu reagujú niektorí pacienti s chronickou hepatitídou typu C. Preto za určitých okolností môže byť táto nákladná liečba pacienta nepriaznivá a môže mať vážne vedľajšie účinky, ako je oslabenie imunitného systému, ktoré vedie k exacerbáciám (napr. herpes na perách, pásový opar).

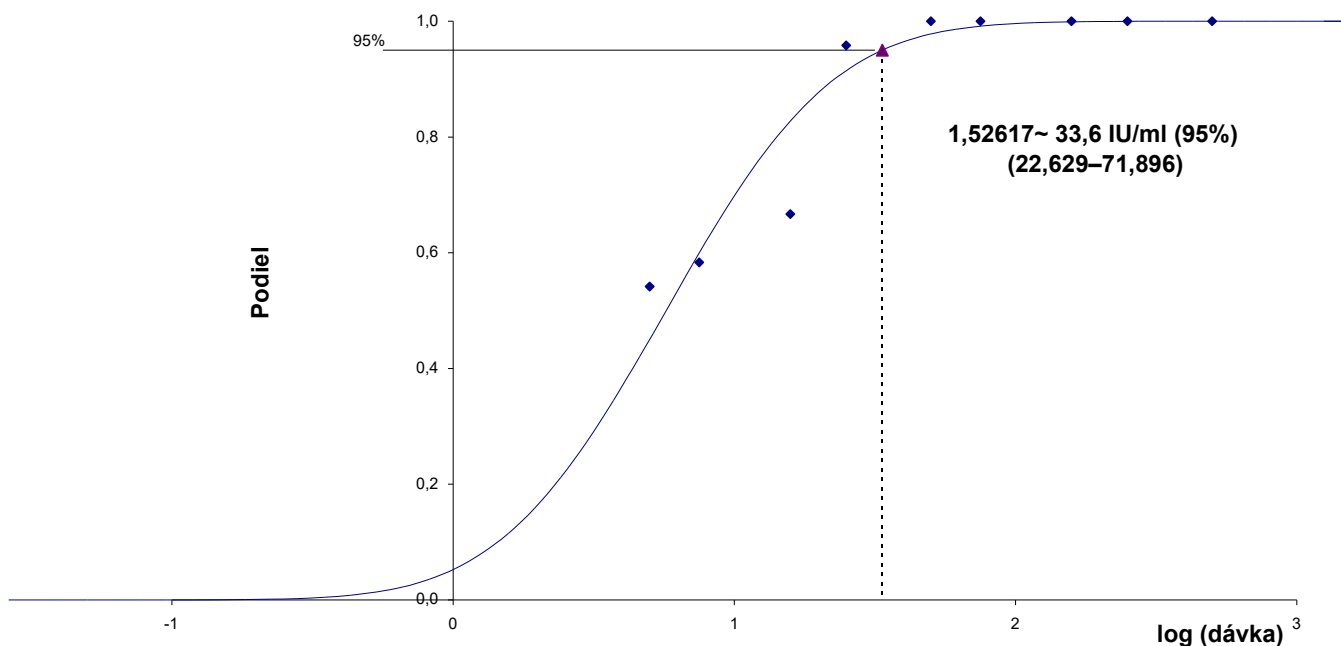
* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

Charakteristiky účinnosti

Analytická senzitivita

Na určenie analytickej senzitivity súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa pripravili štandardné série riadenia z 10 IU/ μ l na nominálne 0,0316 IU/ μ l in vitro kópie prepísanej RNA a analyzovali sa pomocou súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Testovanie sa uskutočnilo počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Analytický detekčný limit súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit je 0,19 IU/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 0,19 IU/ μ l.

Analytická senzitivita vzhľadom na purifikáciu (súprava QIAamp[®] DSP Virus Kit) súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments sa určila pomocou sérií riedení medzinárodnej normy WHO pre HCV RNA z 500 na nominálnych 5 HCV IU/ml pridaných do klinických vzoriek plazmy. Tie boli vystavené extrakcii RNA pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit (extrakčný objem: 0,5 ml, elučný objem: 25 μ l). Každé z 9 riedení sa analyzovalo pomocou súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Grafické zobrazenie probit analýzy nájdete na obrázku 1. Analytický detekčný limit s ohľadom na purifikáciu súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit v kombinácii s nástrojmi Rotor-Gene Instruments je 33,6 IU/ml ($p = 0,05$). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 33,6 IU/ml.



Obrázok 1. Probit analýza: HCV (Rotor-Gene 3000). Analytická senzitivita vzhľadom na purifikáciu (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit na nástroji the Rotor-Gene 3000.

Špecifická

Špecifická súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa zabezpečí predovšetkým výberom primérov a sond, ako aj výberom prísnych podmienok reakcie. U primérov a sond sa skontrolovali prípadné homológie pre všetky sekvencie uvedené v génovej banke pomocou sekvenčnej porovnávacej analýzy. Tak sa zabezpečila detekovateľnosť všetkých relevantných podtypov a genotypov .

Okrem toho sa špecifická overila pomocou 100 rôznych HCV negatívnych vzoriek plazmy. Nedošlo u nich k vygenerovaniu žiadnych signálov s primérami a sondami špecifickými pre HCV, ktoré sú zahrnuté v Hep. C Virus RG Masters.

Potenciálna krížová -reaktivita súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa testovala pomocou kontrolnej skupiny uvedenej v tabuľke 2. Žiadny z testovaných patogénov nebol reaktívny. U zmiešaných infekcií sa neobjavili žiadne krížové reaktivity.

Tabuľka 1. Testovanie špecificity relevantných genotypov

Vírus	Genotyp	Zdroj	HCV (Cycling Green/ A.FAM)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange/ A.ROX)
Vírus hepatitídy C	1	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+
Vírus hepatitídy C	2	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+
Vírus hepatitídy C	3	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+
Vírus hepatitídy C	4	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+
Vírus hepatitídy C	5	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+
Vírus hepatitídy C	6	NIBSC, HemaCare, Univerzita v Essene	+	+

Tabuľka 2. Testovanie špecificity súpravy s potenciálne krížovo reaktívnymi patogénmi

Kontrolná skupina	HCV (Cycling Green/ A.FAM)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange/ A.ROX)
Vírus ľudskej imunodeficiencie 1	–	+
Vírus hepatitídy A	–	+
Vírus hepatitídy B	–	+
Ľudský herpetický vírus 1 (vírus herpes simplex 1)	–	+
Ľudský herpetický vírus 2 (vírus herpes simplex 2)	–	+
Ľudský herpetický vírus 3 (vírus varicella-zoster)	–	+
Ľudský herpetický vírus 5 (cytomegalovírus)	–	+

Tabuľka pokračuje na nasledujúcej strane

Tabuľka 2. Pokračovanie

Kontrolná skupina	HCV (Cycling Green/ A.FAM)	Interný kontrolný roztok (Cycling Orange/ A.ROX)
Lymfotropný vírus T-buniek ľudí typu 1 a typu 2	–	+
Ľudský herpetický vírus 6A	–	+
Ľudský herpetický vírus 6B	–	+
Ľudský herpetický vírus 8 (Kaposiho sarkóm)	–	+
Enterovírus	–	+
Parvovírus B19	–	+
Horúčka Dengue	–	+
Žltá zimnica	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

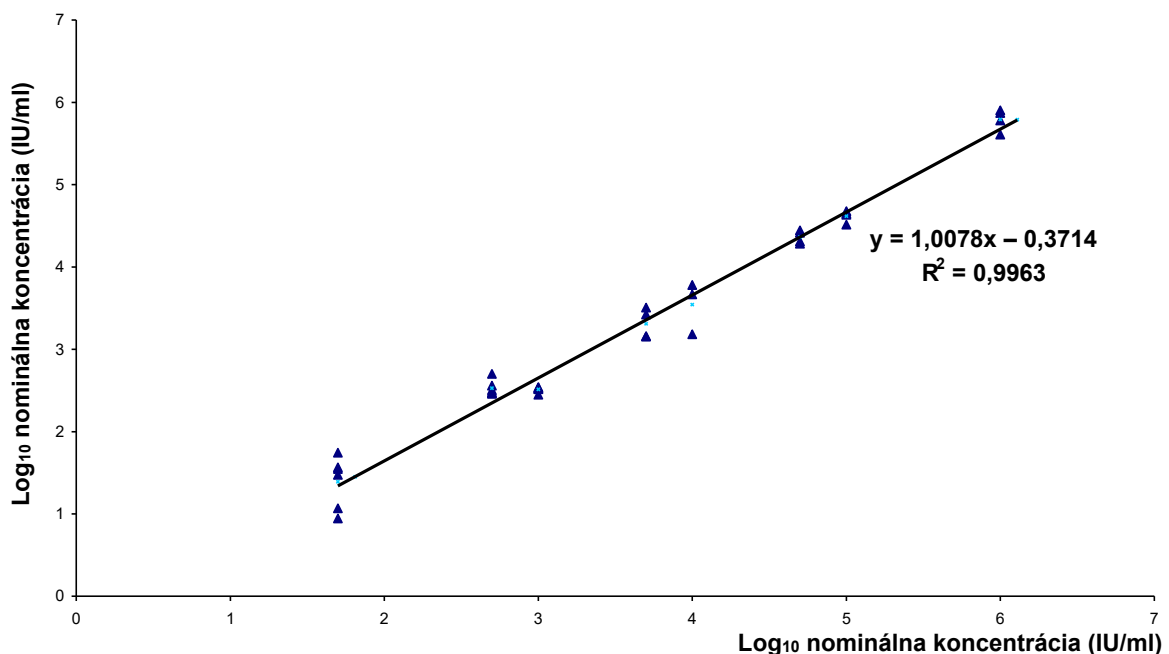
Lineárny rozsah

Lineárny rozsah (analytické meranie) súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa určil analyzovaním série riedení in vitro transkripcie HCV od 1×10^7 IU/ μ l do 1 IU/ μ l. Série riedení sa kalibrovali podľa medzinárodnej normy WHO pre HCV RNA.

Každé riedenie sa testovalo v kópiách (n = 8) pomocou súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments.

Lineárny rozsah súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa určil tak, aby pokryl koncentrácie od 1 IU/ μ l do minimálne 1 x 10⁷ IU/ μ l.

Lineárny rozsah vzhľadom na purifikáciu súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa určil analyzovaním vzoriek z kontroly Acrometrix. Purifikácia sa uskutočnila v kópiách (n = 6) z 50 IU/ml na 10³ IU/ml a v kópiách (n = 4) z 5 x 10³ IU/ml na 10⁶ IU/ml pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit (extrakčný objem: 0,5 ml, elučný objem: 25 μ l). Každá vzorka sa analyzovala pomocou súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments. Lineárny rozsah vzhľadom na purifikáciu súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa určil tak, aby pokryl koncentrácie od 65 IU/ μ l do minimálne 10⁶ IU/ μ l (pozri obrázok 2).



Obrázok 2. Lineárny rozsah súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Výpočet lineárneho rozsahu vzhľadom na purifikáciu. Rovná priamka sa určila pomocou lineárnej regresie koncentrácií vypočítaných pomocou logaritmu log₁₀ s nominálnymi koncentraciami log₁₀. Rovnica regresnej priamy je zobrazená na obrázku.

Presnosť

Údaje o presnosti súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments umožňujú určenie celkový rozptyl testu. Celkový rozptyl sa skladá z rozptylu v rámci testu (rozptyl niekoľkých výsledkov vzoriek s rovnakou koncentraciou v rámci jedného experimentu), rozptylu medzi testami (rozptyl viacerých výsledkov testu, ktoré vygenerovali rôzni operátori v jednom laboratóriu na rôznych nástrojoch rovnakého typu) a rozptylu medzi dávkami (rozptyl viacerých výsledkov testu pomocou rôznych dávok).

Získané údaje sa použili na určenie štandardnej odchýlky, rozptylu a koeficientu rozptylu pre konkrétny patogén a interný kontrolný roztok PCR.

Údaje o presnosti súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa zozbierali pomocou kvantitatívnej normy najnižšej koncentrácie (QS 4; 10 IU/ μ l). Testovanie sa uskutočnilo s 8 kópiami. Údaje o presnosti sa vypočítali na základe hodnôt C_T amplifikačných kriviek (C_T : prahový cyklus, pozri tabuľku 3). Okrem toho sa údaje o presnosti pre kvantitatívne výsledky v IU/ μ l určili pomocou príslušných hodnôt C_T (pozri tabuľku 4). Na základe týchto výsledkov je celkové štatistické rozšírenie danej vzorky s uvedenou koncentráciou na zistenie interného kontrolného roztoku 1,52 % (C_T) alebo 25,71 % (koncentrácia) a 0,75 % (C_T). Tieto hodnoty sú založené na súhrne všetkých jednotlivých hodnôt stanovených rozptylov.

Tabuľka 3. Údaje o presnosti na základe hodnôt C_T

	Hodnota C_T	Štandardná odchýlka	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: Hep. C Virus RG QS 4	32,81	0,09	0,28
Rozptyl v rámci testu: Hep. C Virus RG IC	30,04	0,08	0,27
Rozptyl medzi testami: Hep. C Virus RG QS 4	32,14	0,5	1,57
Rozptyl medzi testami: Hep. C Virus RG IC	30,23	0,22	0,71
Rozptyl medzi dávkami: Hep. C Virus RG QS 4	32,56	0,48	1,46
Rozptyl medzi dávkami: Hep. C Virus RG IC	30,28	0,24	0,78
Celkový rozptyl: Hep. C Virus RG QS 4	32,41	0,49	1,52
Celkový rozptyl: Hep. C Virus RG IC	30,29	0,29	0,75

Tabuľka 4. Údaje o presnosti na základe kvantitatívnych výsledkov (v IU/μl)

	Štandardná odchýlka	Rozptyl	Koeficient rozptylu (%)
Rozptyl v rámci testu: Hep. C Virus RG QS 4	0,64	0,41	6,34
Rozptyl medzi testami: Hep. C Virus RG QS 4	1,00	1,00	9,93
Rozptyl medzi dávkami: Hep. C Virus RG QS 4	3,92	15,34	37,35
Celkový rozptyl: Hep. C Virus RG QS 4	2,63	6,93	25,71

Robustnosť

Overenie robustnosti umožňuje stanovenie celkovej miery zlyhania súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Do 100 negatívnych HCV vzoriek plazmy sa pridalo 2 IU/μl objemu eluátu RNA kontrolného roztoku HCV (približne trojnásobná koncentrácia analytickej hranice senzitivity). Po extrakcii pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit sa tieto vzorky analyzovali pomocou súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Pre všetky HCV vzorky bola miera zlyhania 0 %. Okrem toho sa pomocou purifikácie a analýzy 100 negatívnych HCV vzoriek plazmy vyhodnotila masívnosť interného kontrolného roztoku. Celková miera zlyhania bola 0 %. Inhibície neboli spozorované. Robustnosť súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit je ≥ 99 %.

Reprodukovateľnosť

Údaje o reprodukovateľnosti umožňujú pravidelné zhodnotenie účinnosti súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit, ako aj porovnanie efektívnosti s ostatnými výrobkami. Tieto údaje boli získané počas účasti v uznávaných odborných programoch.

Diagnostické vyhodnotenie

Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit bola vyhodnotená v štúdií. Porovnanie súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit s testom COBAS® TaqMan® HCV Test, retrospektívne sa zanalyzovalo 276 vzoriek plazmy. Všetky vzorky plazmy boli predtým pomocou testu COBAS TaqMan HCV Test pri bežnej diagnostike analyzované ako pozitívne alebo negatívne.

V rámci testovania súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit izolovala RNA HCV a na nástroji Rotor-Gene 6000 Instrument sa uskutočnila analýza. Na komparatívne testovanie pomocou testu COBAS TaqMan HCV Test sa podľa pokynov výrobcu uvedených na

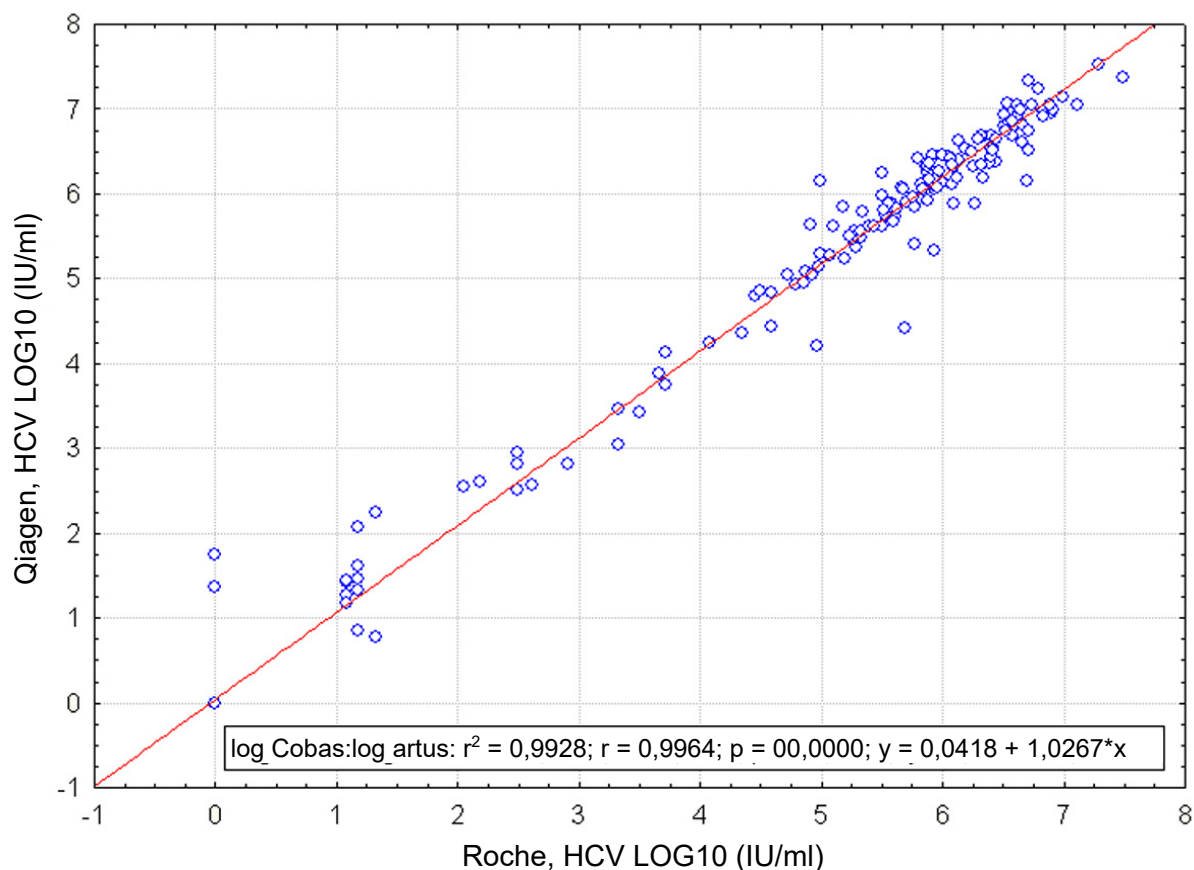
príbalovom letáku vykonala analýza RNA HCV. Výsledky získané pomocou súpravy *artus* HCV RG PCR Kit sa porovnali s výsledkami testu COBAS TaqMan HCV Test (pozri tabuľku 5 a obrázok 3).

137 zo 139 vzoriek, ktoré boli testované ako pozitívne testom COBAS TaqMan HCV Test, boli pozitívne aj pri testovaní súpravou *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Všetky zo 137 vzoriek, ktoré boli testované ako negatívne testom COBAS TaqMan HCV Test, boli negatívne aj pri testovaní súpravou *artus* HCV RG RT-PCR Kit.

Ak sa výsledky testu COBAS TaqMan HCV Test berú ako referenčné, je diagnostická senzitivita 100 % a diagnostická špecificita dosahuje 98,6 %.

Tabuľka 5. Výsledky 276 analyzovaných retrospektívnych vzoriek plazmy EDTA

				COBAS TaqMan HCV Test		
				+	-	Celkom
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit			+	137	2	139
			-	0	137	137



Obrázok 3. Porovnanie testu COBAS TaqMan HCV Test (Roche, HCV; s purifikáciou vzorky pomocou systému COBAS AmpliPrep) so súpravou *artus* HCV RG RT-PCR Kit (QIAGEN, HCV; s purifikáciou vzorky pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit). Korelácia kvantitatívnych výsledkov z obidvoch testovacích systémov (tabuľka 5) sa analyzovala pomocou lineárnej regresie. Výsledky z obidvoch súprav sú zobrazené v grafe XY (rozptyl) s loglog mierkou.

Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

- Súprava na izolovanie RNA (pozri „Izolovanie RNA“, strana 19)
- Pipety (nastaviteľné)*
- Sterilné špičky pipiet s filtrami
- Vírivý mixér*
- Stolná centrifúga* s rotorom na reakčné skúmavky s objemom 2 ml
- Nástroj Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene Instrument**† s fluorescenčnými kanálmi pre farbivá Cycling Green a Cycling Orange alebo s fluorescenčnými kanálmi pre farbivo Cycling A.FAM a Cycling A.ROX
- Verzia softvéru 1.7.94 alebo vyššia (verzia softvéru 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 nástroja Rotor-Gene 6000; verzia softvéru 6.0.23 nástroja Rotor-Gene 3000) nástroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q
- Skúmavky a uzávery Strip Tubes and Caps, 0.1 ml na použitie s rotorom 72-well rotor (kat. č. 981103 alebo 981106)
- Prípadne: Skúmavky PCR Tubes, 0.2 ml na použitie s rotorom 36-well rotor (kat. č. 981005 alebo 981008)
- Chladiaci blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901 alebo Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. č. 9018905)

* Zabezpečte, aby sa nástroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.

† Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa nemôže používať s nástrojmi Rotor-Gene Q 2plex Instruments.

Dôležité poznámky

Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Používateľ by mal vždy dodržiavať tieto kroky:

- Používajte sterilné špičky pipiet s filtrami.
- Pozitívne materiály (vzorky, pozitívne kontrolné roztoky a amplikóny) skladujte a extrahujte oddelene od všetkých ostatných reagensí a pridávajte ich do reakčnej zmesi v oddelenom priestore.
- Pred začatím testu všetky komponenty dôkladne rozmrazte na izbovú teplotu (15 – 25 °C).
- Po rozmrazení komponenty zmiešajte (opakovaným pipetovaním hore a dole alebo pulzným vírivým miešaním) a krátko vložte do centrifúgy.
- Pracujte rýchlo a komponenty držte na ľade alebo v chladiacom bloku (72/96-jamkový zavádzací blok).

Odber, skladovanie a preprava vzoriek

i So všetkými vzorkami je potrebné zaobchádzať ako s potenciálne infekčným materiálom.

Povolený je len tento materiál vzoriek, pri ktorom je potrebné prísne dodržiavať tieto pravidlá a konkrétne pokyny týkajúce sa odberu, prepravy a skladovania.

i Súčasné štúdie hovoria o tom, že EDTA alebo citrátová plazma je najvhodnejším materiálom vzoriek na detekciu HCV. Preto odporúčame použiť so súpravou *artus* HCV RG RT-PCR Kit tieto materiály.

Interná validácia súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa uskutočnila s využitím ľudských vzoriek EDTA plazmy. Ostatné materiály vzoriek nie sú validované. Pri príprave vzorky používajte len odporúčanú súpravu na izoláciu RNA (pozri „Izolovanie RNA“, strana 19).

Pri použití určitých materiálov sa musia dodržiavať konkrétne pokyny týkajúce sa odberu, prepravy a skladovania.

Odber vzorky

Pri každom odbere krvi dochádza k poraneniu krvných ciev (artérie, žily, kapiláry). Mal by sa používať len neškodný a sterilný materiál. Na odber krvi sú k dispozícii vhodné jednorazové pomôcky. Na prepichnutie žily by sa nemali používať jemné kapilárne ihly. Odber krvi zo žily by mal prebiehať na vhodných miestach ohybu lakťa, predlaktia alebo zadnej strany ruky. Krv je potrebné odobrať pomocou štandardných skúmaviek na odber vzoriek (červený uzáver, skúmavka Sarstedt alebo ekvivalentná skúmavka od iného výrobcu). Malo by sa odobrať 5 – 10 ml krvi EDTA. Skúmavky by sa mali premiešať nad hlavou priamo po odbere vzorky (8 x, netrepať).

i Vzorky od ľudí užívajúcich heparín sa nesmú používať (pozri „Interferujúce látky“, strana 19).

Skladovanie vzoriek

Plná krv by sa mala centrifugáciou trvajúcou 20 minút pri rýchlosti 800 – 1600 x g za 6 hodín oddeliť na plazmu a bunkové komponenty. Izolovaná plazma sa musí preniesť do sterilných polypropylénových skúmaviek. Senzitivita testu môže byť nižšia, ak vzorky bežne zmrazujete alebo ich na dlhší čas uskladníte. Opuzdrená vírusová RNA je stabilná niekoľko dní, ak sa skladuje pri teplote 4 °C, týždne, ak sa skladuje pri teplote -20 °C a dokonca mesiace až roky, ak sa skladuje pri teplote -70 °C.*

Preprava vzoriek

Materiál vzorky by sa mal v princípe prepravovať v nerozbitnej prepravnej nádobe. Tak je možné predísť potenciálnemu nebezpečenstvu nákazy v prípade úniku. Vzorky by sa mali prepravovať podľa miestnych a vnútroštátnych nariadení pre prepravu patogénneho materiálu.†

Vzorky by sa mali odoslať do 6 hodín. Neodporúča sa skladovať vzorky na mieste odberu. Vzorky sa môžu poslať poštou podľa právnych nariadení pre prepravu patogénneho materiálu. Odporúčame poslať vzorky kuriérom. Vzorky krvi by sa mali odoslať chladené (2 – 8 °C) a oddelená plazma by mala byť hlboko zmrazená (-15 až -30 °C).

Interferujúce látky

Zvýšené hladiny bilirubínu (≤ 15 mg/dl) a lipidov (≤ 800 mg/dl) a hemolytické vzorky nemajú na systém žiadny vplyv. Heparín (≤ 10 mg/dl) ovplyvňuje PCR. Vzorky odobraté do skúmaviek, ktoré obsahujú heparín ako antikoagulant, by sa používať nemali. Takisto sa nesmú používať vzorky od pacientov, ktorým sa podáva heparín.

Izolovanie RNA

Súprava QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. č. 60704) sa validuje na purifikáciu vírusovej RNA z ľudskej plazmy na použitie so súpravou *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Purifikáciu vírusovej RNA vykonajte v súlade s pokynmi v príručke súpravy *QIAamp DSP Virus Kit*.

i Použitie nosnej RNA je dôležité pre efektívnosť extrakcie a následne pre získanú DNA/RNA. Na zvýšenie stability nosnej RNA získanej súpravou QIAamp DSP Virus Kit odporúčame postupovať podľa informácií o zriedení a skladovaní nosnej RNA, ktoré sú uvedené v návode („Príprava reagentov a pufrov“).

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

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

i Interný kontrolný roztok súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit sa môže použiť priamo počas procesu izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“ nižšie). Zabezpečte spoločné spracovanie negatívnej vzorky plazmy počas purifikácie. Jej príslušný signál interného kontrolného roztoku slúži ako základ hodnotenia purifikácie

Interný kontrolný roztok

Dodáva sa interný kontrolný roztok (Hep. C Virus RG IC). Tá umožňuje používateľovi regulovať proces izolácie RNA aj skontrolovať možnú inhibíciu PCR. Na toto použitie pridajte interný kontrolný roztok do izolácie v pomere 0,1 μ l na 1 μ l elučného objemu. Napríklad pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit sa RNA eluuje v 60 μ l pufru Elution Buffer (AVE). Preto by sa na začiatku malo pridať 6 μ l interného kontrolného roztoku.

i Interný kontrolný roztok a nosná RNA (potri „Izolovanie RNA“ vyššie) by sa mali pridať len do zmesi pufru lýzy a materiálu vzorky alebo priamo do pufru lýzy.

Interný kontrolný roztok sa nesmie pridať priamo do materiálu vzorky. Po pridaní do pufru lýzy nezabudnite, že je potrebné pripraviť čerstvú zmes interného kontrolného roztoku a pufru nosnej RNA lýzy, ktorá sa musí okamžite použiť (skladovanie zmesi pri izbovej teplote alebo v mrazničke aj keď len na niekoľko hodín môže viesť ku chybe internej kontroly a zníženej efektívnosti extrakcie).

i Nepridávajte interný kontrolný roztok a nosnú RNA priamo do materiálu vzorky.

Interný kontrolný roztok sa môže voliteľne použiť výhradne na kontrolu možnej inhibície PCR. Pri tomto použití pridajte interný kontrolný roztok priamo do zmesi vírusu Hep. C Virus RG Master A a Hep. C Virus RG Master B podľa popisu v kroku 2b protokolu (strana 23).

Kvantifikácia

Priložené kvantitatívne štandardy (Hep. C Virus RG QS 1–4) sa považujú za predtým purifikované vzorky a použije sa rovnaký objem vzorky (20 μ l). Na vygenerovanie štandardnej krivky na nástrojoch Rotor-Gene Q Instruments by sa mali použiť všetky 4 kvantitatívne štandardy, ktoré by sa mali definovať v dialógovom poli „Edit Samples“ (Upraviť vzorky) ako normy s konkrétnymi koncentráciami (pozri používateľskú príručku nástroja).

ⓘ Kvantitatívne štandardy sú definované ako IU/μl.* Táto rovnica sa musí použiť na premenu hodnôt stanovených pomocou štandardnej krivky do IU/ml materiálu vzorky:

$$\text{výsledok (IU/ml)} = \frac{\text{výsledok (IU/}\mu\text{l)} \times \text{elučný objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorky (ml)}}$$

Z princípu by sa mal pôvodný objem vzorky zadať do vyššie uvedenej rovnice. Toto je potrebné zvážiť, ak sa objem vzorky pred extrakciou nukleovej kyseliny zmenil (napr. zníženie objemu v centrifúge alebo zvýšenie objemu pridaním objemu potrebného na izolovanie).

* Štandard bol kalibrovaný pomocou 1. medzinárodnej normy HCV (WHO).

Protokol: PCR analýza údajov

i Dôležité body pred začatím činnosti

- Pred začatím procesu si prečítajte „Dôležité poznámky“, strany 18 – 20.
- Vyhradte si dostatok času a oboznámte sa s nástrojom Rotor-Gene Q Instrument pred začatím protokolu. Pozri používateľskú príručku nástroja .
- Uistite sa, že cyklus PCR zahŕňa aspoň jeden kvantitatívny štandard, ako aj jednu negatívny kontrolný roztok (voda, stupeň PCR). Na vygenerovanie štandardnej krivky použite všetky 4 dodané kvantitatívne štandardy (Hep. C Virus RG QS 1–4) pre každý cyklus PCR.

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Uistite sa, že chladiaci blok (príslušenstvo nástroja Rotor-Gene Q Instrument) je vopred vychladený na 2 – 8 °C.
- Pred každým použitím sa musia všetky reagenty úplne rozmraziť, zmiešať (opakovaným pipetovaním nahor a nadol alebo rýchlym vortexovaním) a nakrátko centrifugovať.

Postup

1. Umiestnite želaný počet skúmaviek PCR do adaptérov chladiaceho bloku.
2. Ak používate interný kontrolný roztok na monitorovanie izolačného procesu RNA a na kontrolu možnej inhibície PCR, postupujte krokom 2a. Ak používate interný kontrolný roztok len na kontrolu inhibície PCR, postupujte krokom 2b.
- 2a. Interný kontrolný roztok už bola pridaná do izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, strana 20). V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa tabuľky 6.

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 6. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý na monitorovanie izolácie RNA a na kontrolu inhibície PCR)

Počet vzoriek	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 μ l	144 μ l
Hep. C Virus RG Master B	18 μ l	216 μ l
Hep. C Virus RG IC	0 μ l	0 μ l
Celkový objem	30 μl	360 μl

- 2b. Interný kontrolný roztok sa musí pridať priamo do zmesi vírusu Hep. C Virus Master A a Hep. C Virus Master B. V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa tabuľky 7.**

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 7. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý len na kontrolu inhibície PCR)

Počet vzoriek	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 μ l	144 μ l
Hep. C Virus RG Master B	18 μ l	216 μ l
Hep. C Virus RG IC	2 μ l	24 μ l
Celkový objem	32 μl	384 μl

* Zväčšenie objemu spôsobené pridaním interného kontrolného roztoku sa pri príprave PCR testu zanedbá. Senzitivita detekčného systému sa tým nezníži.

- 3. Napipetujte 30 μ l hlavnej zmesi do každej PCR skúmavky. Potom pridajte 20 μ l eluovanej DNA vzorky (pozri tabuľku 8). Zodpovedajúco sa musí 20 μ l minimálne jedného kvantitatívneho štandardu (Hep. C Virus RG QS 1–4) použiť ako pozitívny kontrolný roztok a 20 μ l vody (voda, stupeň PCR) ako negatívny kontrolný roztok.**

Tabuľka 8. Príprava PCR testu

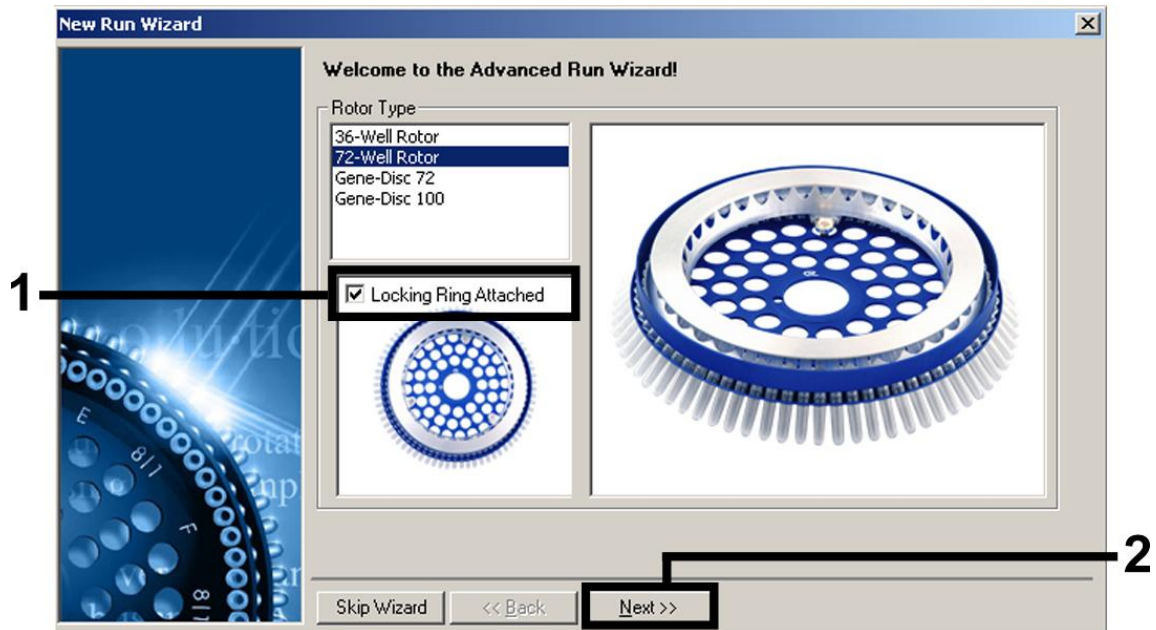
Počet vzoriek	1	12
Hlavná zmes	30 μ l	30 μ l každá
Vzorka	20 μ l	20 μ l každá
Celkový objem	50 μl	50 μl každá

4. **Zatvorte PCR skúmavky. Uistite sa, že poistný krúžok (príslušenstvo nástroja Rotor-Gene) je umiestnený na vrchu rotora, aby sa zabránilo náhodnému otvoreniu skúmaviek počas cyklu.**
5. **Na detekciu HCV RNA vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.**

Nastavenie všeobecných parametrov testu	Obrázky 4, 5, 6
Reverzná transkripcia RNA	Obrázok 7
Prvotná aktivácia enzýmu hot-start	Obrázok 8
Amplifikácia cDNA	Obrázok 9
Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála	Obrázok 10
Spustenie cyklu	Obrázok 11

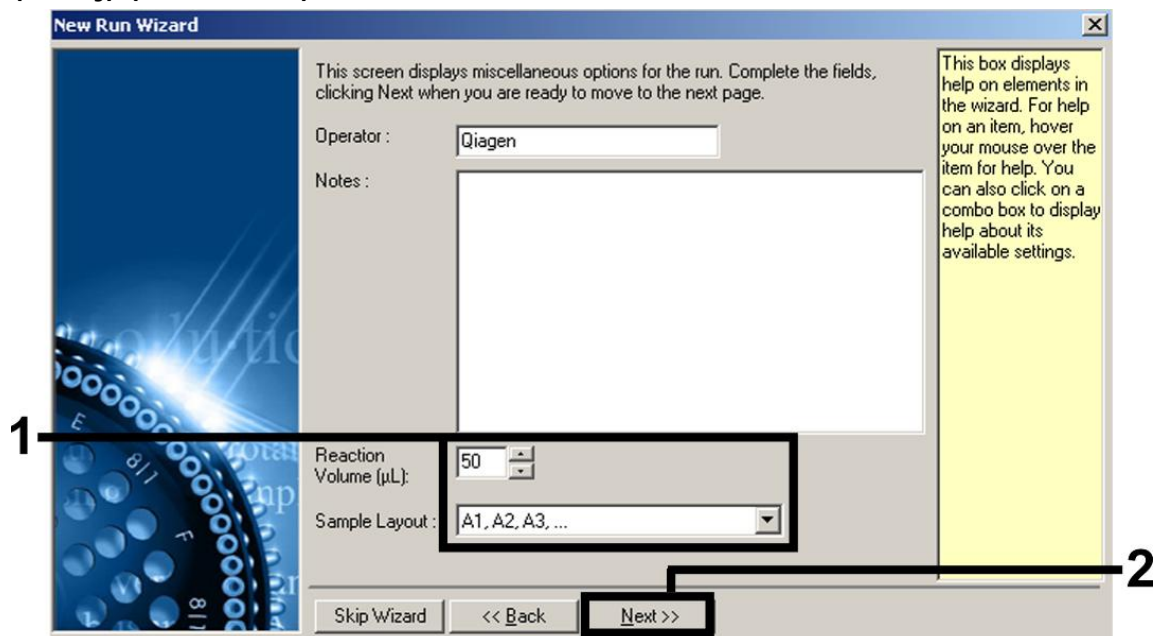
Všetky špecifikácie odkazujú na verziu softvéru 1.7.94 nástroja Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, verzie softvéru 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 nástroja Rotor-Gene 6000 a verziu softvéru 6.0.23 nástroja Rotor-Gene 3000. Ďalšie informácie o programovaní nástrojov Rotor-Gene Instruments nájdete v používateľskej príručke nástroja. Na ilustráciách sú tieto nastavenia softvéru orámované čiernou tučnou farbou. Ilustrácie sú zahrnuté pre nástroje Rotor-Gene Q Instruments. Ak sú pre nástroj Rotor-Gene 3000 potrebné rôzne hodnoty, sú tieto rozdiely popísané v texte.

6. Najprv otvorte dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (obrázok 4). Skontrolujte pole „Locking Ring Attached“ (Tesniaci krúžok pripevnený) a kliknite na „Next“ (Ďalej).



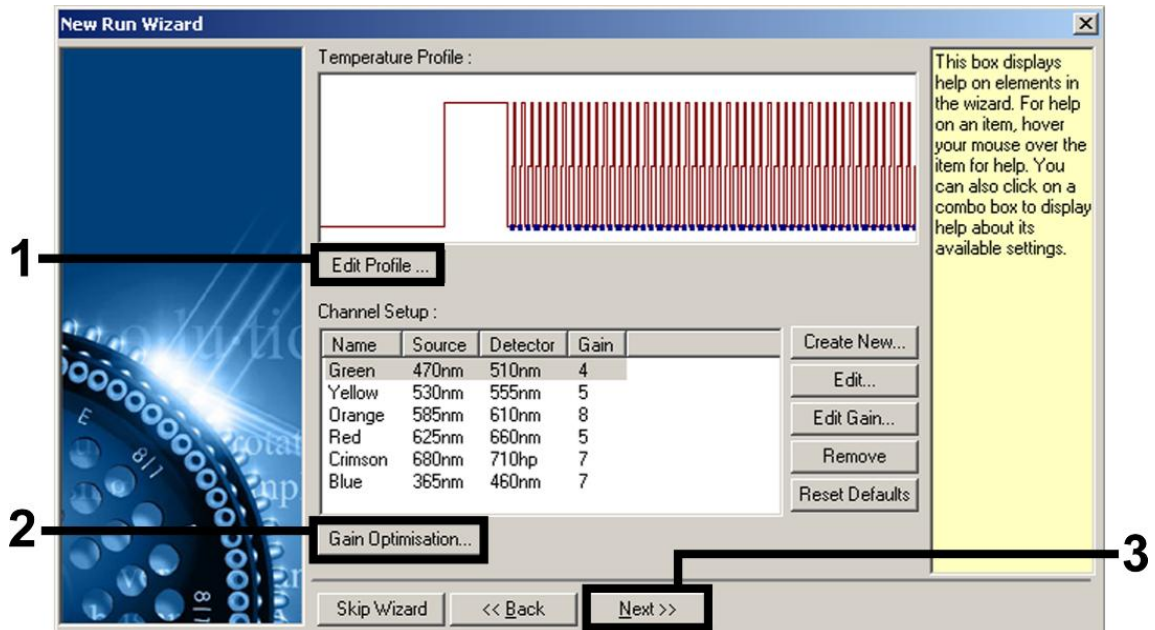
Obrázok 4. Dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom).

7. Vyberte hodnotu 50 pre PCR reakčný objem a kliknite na „Next“ (Ďalej) (obrázok 5).

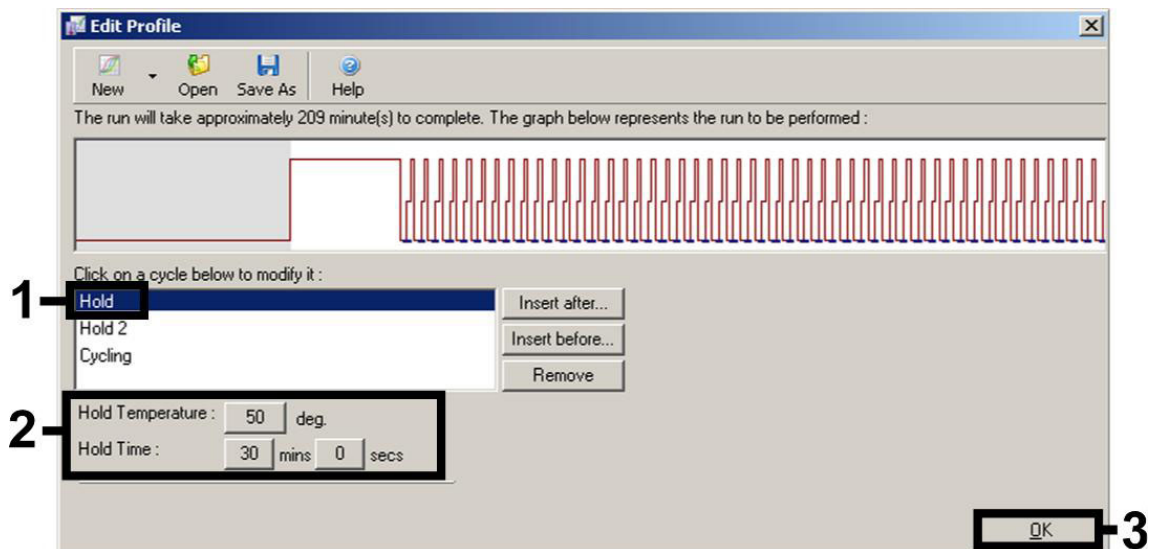


Obrázok 5. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

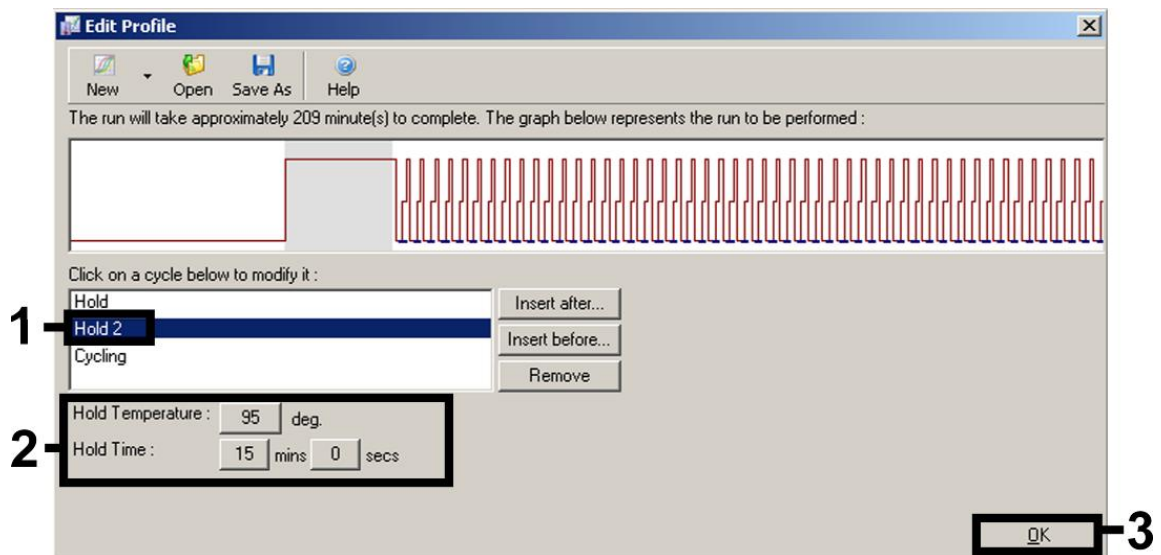
8. Kliknite na tlačidlo „Edit Profile“ (Upraviť profil) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (obrázok 6) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené na obrázkoch 6–9.



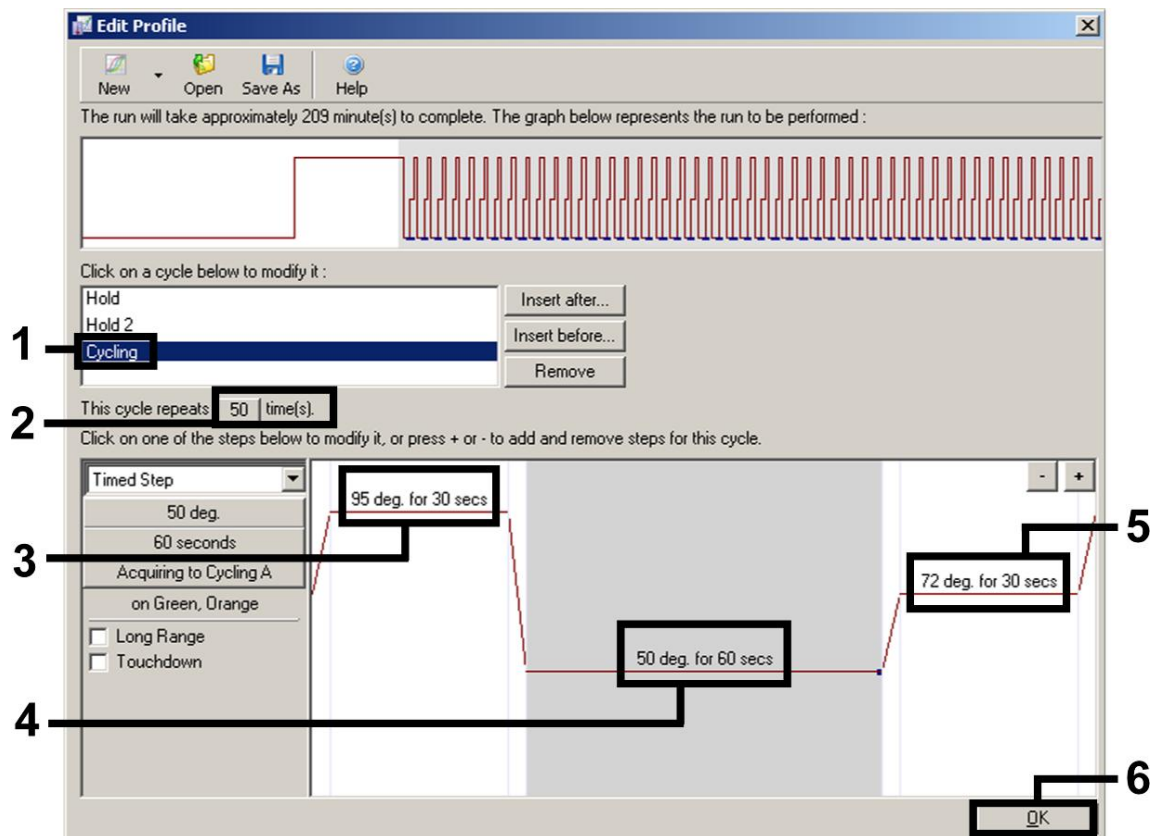
Obrázok 6. Úprava profilu.



Obrázok 7. Reverzná transkripcia RNA.

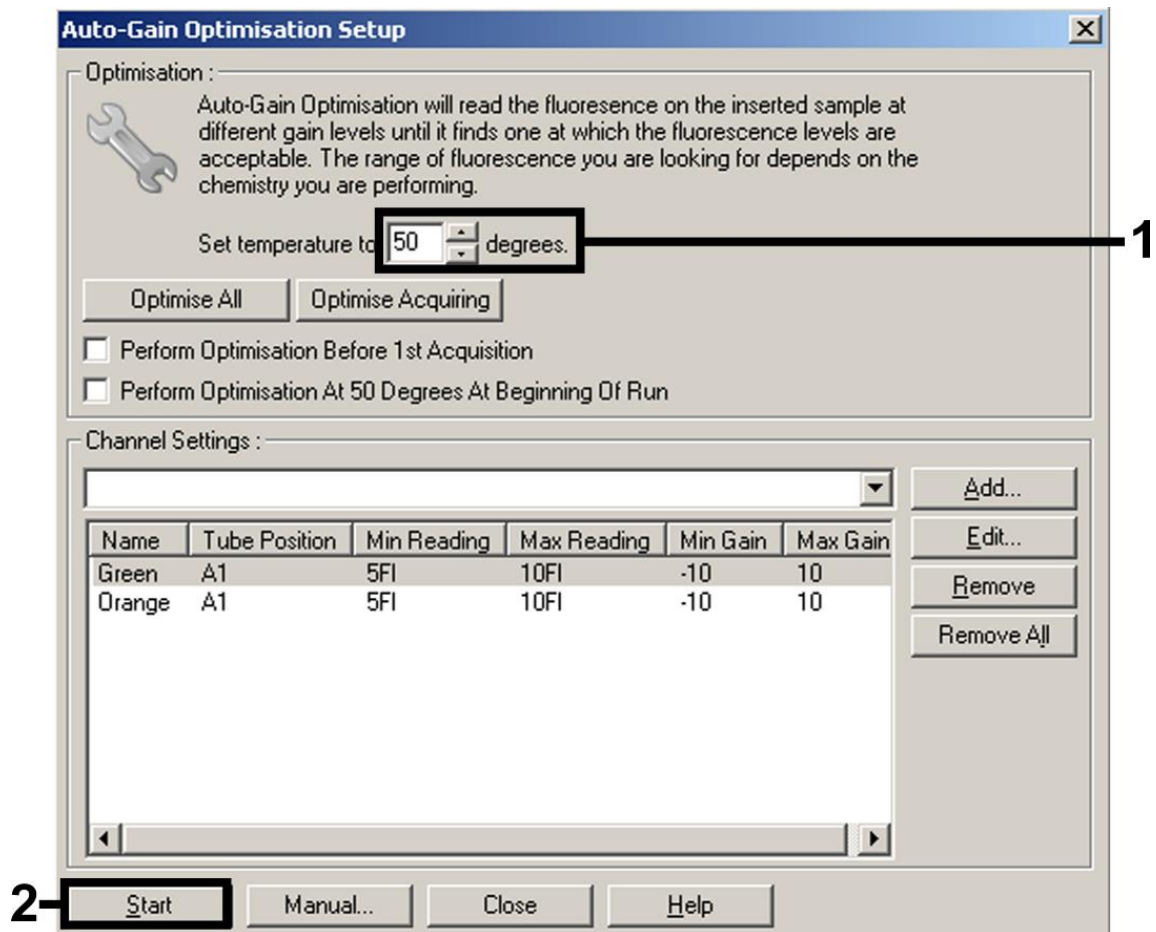


Obrázok 8. Prvotná aktivácia enzýmu hot-start.



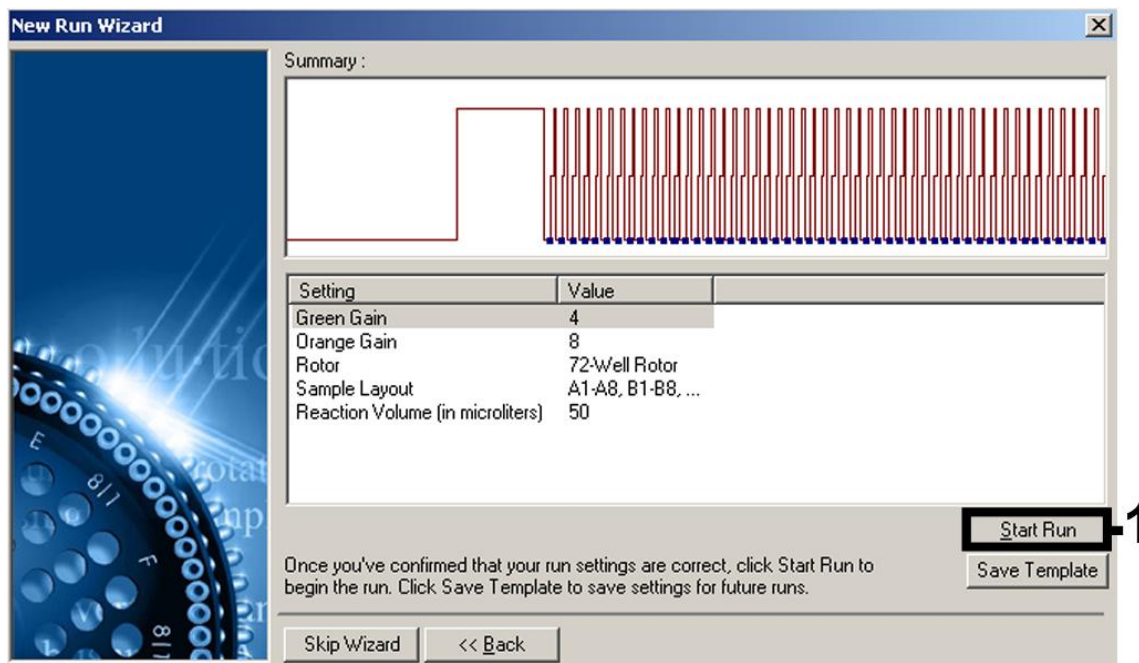
Obrázok 9. Amplifikácia cDNA. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr, ROX“.

9. Detekčný rozsah fluorescenčných kanálov sa musí určiť podľa intenzity fluorescence v skúmavkách PCR. Kliknutím na „Gain Optimisation“ (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (obrázok 6) otvoríte dialógové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie zisku). Kalibračnú teplotu nastavte na hodnotu 50, aby sa zhodovala s teplotou temperovania amplifikačného programu (obrázok 10).



Obrázok 10. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr“ a „ROX“.

10. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania (obrázok 11). Kliknite na „Start Run“ (Spustiť cyklus).



Obrázok 11. Spustenie cyklu. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr“ a „ROX“.

11. Po dokončení cyklu údaje zanalyzujte. Sú možné tieto výsledky (11a, 11b a 11c).

Príklady pozitívnych a negatívnych PCR reakcií sú uvedené na obrázku 12 a obrázku 13.

V tabuľke 9 sú uvedené odporúčania na interpretáciu kvantitatívnych výsledkov.

- 11a. Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Green sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje HCV RNA.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Orange nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie HCV RNA (pozitívny signál v kanáli Cycling Green) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Orange (konkurencia).



Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 je Cycling A.FAM relevantný kanál pre pozitívny signál a Cycling A.ROX je relevantný kanál pre interný kontrolný roztok.

11b. Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Orange.

Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu HCV RNA. Môže sa považovať za negatívnu.

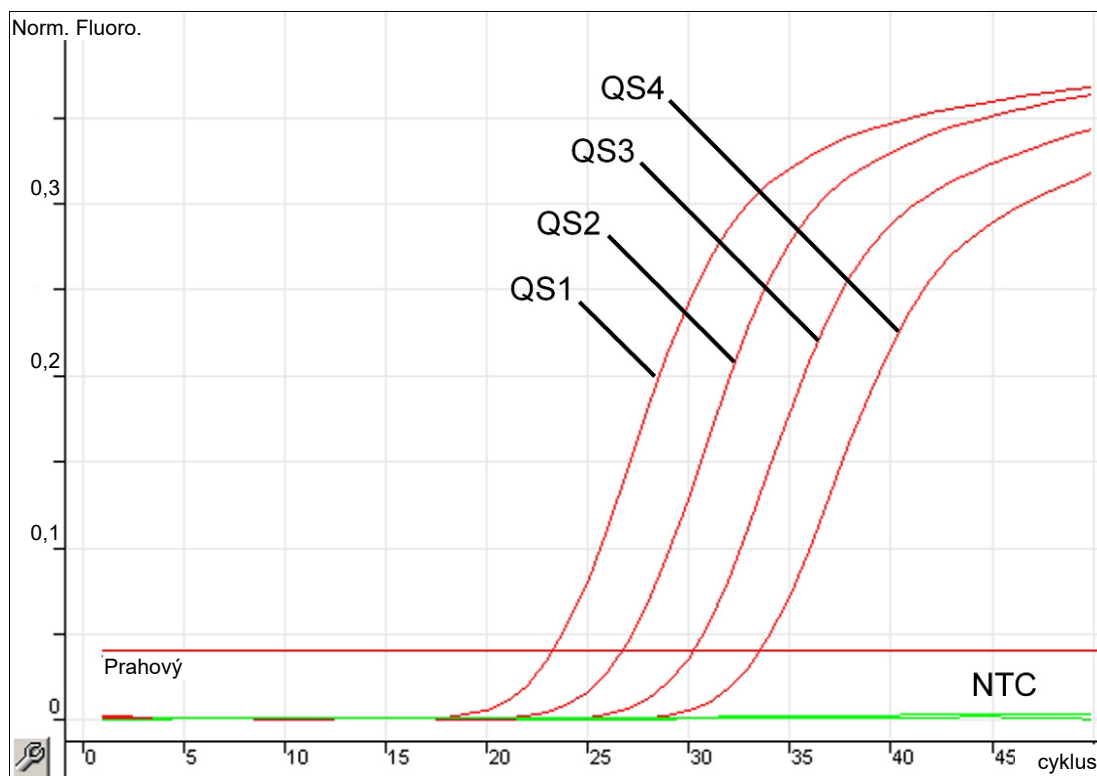
V prípade negatívneho testu HCV RT-PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície RT-PCR.

i Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 je Cycling A.ROX relevantný kanál pre interný kontrolný roztok a nedostatok signálu pre Cycling A.FAM.

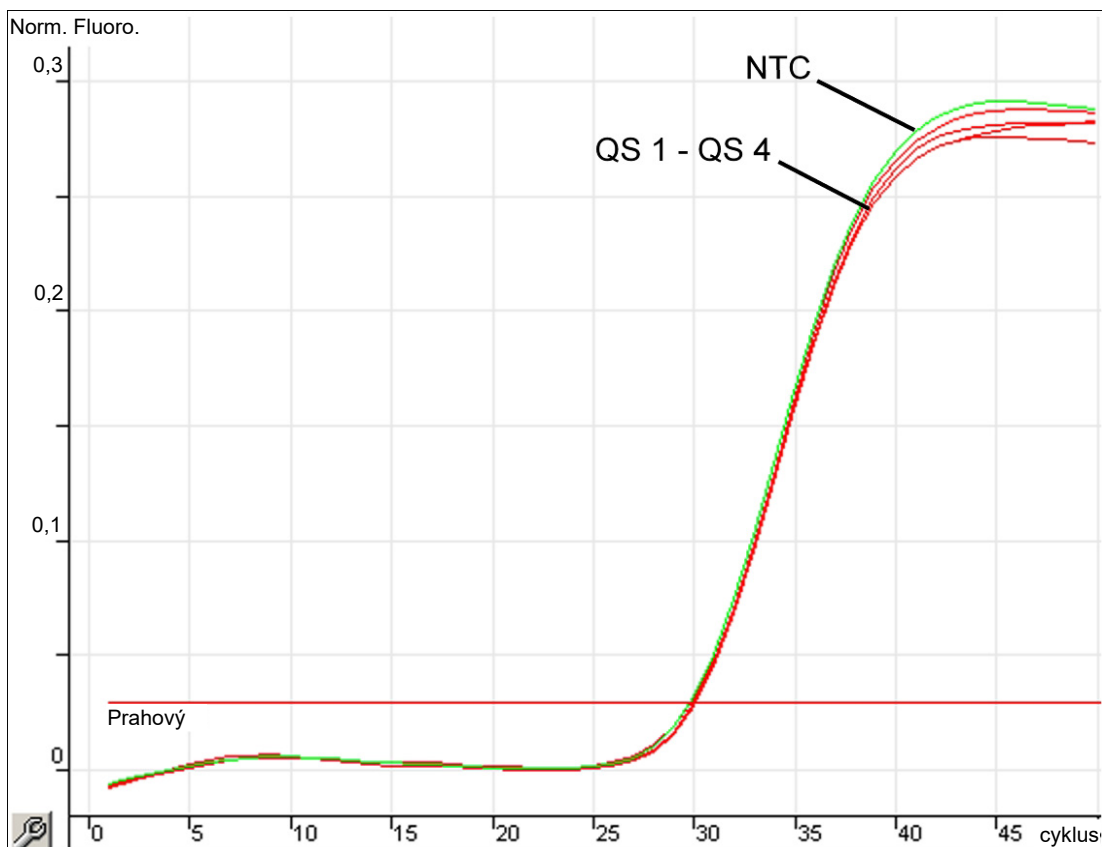
11c. V kanáli Cycling Green alebo Cycling Orange sa nezistil žiadny signál. Nie je možné vyvodit' žiadny výsledok.

Informácie týkajúce sa zdrojov chýb a ich riešení nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“, strana 32.

i Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 sú relevantné kanály Cycling A.FAM a Cycling A.ROX.



Obrázok 12. Detekcia kvantitatívnych štandardov (Hep. C Virus RG QS 1–4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).



Obrázok 13. Detekcia interného kontrolného roztoku (IC) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange so súčasou amplifikáciou kvantitatívnych štandardov (Hep. C Virus RG QS 1–4). NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).

Tabuľka 9. Interpretácia kvantitatívnych výsledkov






Výsledok	Interpretácia
HCV RNA >34 IU/ml	Výsledok je v stanovenom rozsahu testu. Pravdepodobnosť detekcie HCV RNA je > 95 %. Pozitívny výsledok testu je štatisticky zabezpečený.
HCV RNA <34 IU/ml	Výsledok je mimo stanoveného rozsahu testu. Reprodukovateľnosť pozitívneho výsledku nie je zabezpečená.
HCV RNA negatívna	Nebola zistená žiadna HCV RNA.

Sprievodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na zadnej strane alebo na www.qiagen.com).







Komentáre a návrhy

Žiadny signál s pozitívnymi kontrolnými roztokmi (Hep. C Virus RG QS 1–4) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM

- a) Vybraný fluorescenčný kanál na analýzu PCR údajov nie je v súlade s protokolom  Na analýzu údajov vyberte fluorescenčný kanál Cycling Green alebo Cycling A.FAM pre analytický test HCV RT-PCR a fluorescenčný kanál Cycling Orange A.ROX pre RT-PCR interného kontrolného roztoku.
- b) Nesprávne naprogramovanie teplotného profilu nástroja Rotor-Gene Instrument  Porovnajte teplotný profil s protokolom. Pozrite si časť „Protokol: PCR analýza údajov“ na strane 22.
- c) Nesprávna konfigurácia PCR  Skontrolujte svoje pracovné kroky pomocou pipetovacej schémy a PCR v prípade potreby zopakujte. Pozrite si časť „Protokol: PCR analýza údajov“ na strane 22.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Slabý alebo žiadny signál interného kontrolného roztoku vo fluorescenčnom kanáli Cycling Orange alebo Cycling A.ROX a súčasná absencia signálu v kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM

- a) Podmienky PCR nie sú v súlade s protokolom  Skontrolujte podmienky PCR (pozri vyššie) a v prípade potreby PCR zopakujte so správnymi nastaveniami.
- b) PCR bolo inhibované  Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
-  Uistite sa, že počas izolovania RNA bola uskutočnená dodatočná centrifugácia pred elúciou, pomocou ktorej sa odstránil všetok zvyškový etanol (pozri časť „Izolovanie RNA“, strana 19).
- c) Počas extrakcie sa stratila RNA  Ak sa do extrakcie pridala interná kontrola, absentujúci signál interného kontrolného roztoku môže znamenať stratu RNA počas extrakcie. Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania (pozri časť „Izolovanie RNA“, strana 19) a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Signály s negatívnymi kontrolnými roztokmi vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM analytickej PCR

a) Počas prípravy PCR došlo ku kontaminácii

① Zopakujte PCR s novými reagensiami v kópiách.

① Ak je to možné, zatvorte PCR skúmavky hneď po pridaní vzorky na testovanie.

① Pozitívny kontrolný roztok napipetujte ako poslednú.

① Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a nástroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

b) Počas extrakcie došlo ku kontaminácii

① Zopakujte extrakciu a PCR vzorky na testovanie pomocou nových reagensí.

① Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a nástroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

Referenčná literatúra

Spoločnosť QIAGEN vedie rozsiahlu aktuálnu on-line databázu vedeckých publikácií využívajúcich produkty QIAGEN. Komplexné možnosti vyhľadávania umožnia nájsť potrebné články, a to buď jednoduchým vyhľadávaním podľa kľúčových slov, alebo zadaním aplikácie, oblasti výskumu, názvu atď.

Úplný zoznam referenčnej literatúry nájdete v on-line Referenčnej databáze QIAGEN na stránke www.qiagen.com/RefDB/search.asp, prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Informácie o objednávaní

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (24)	Pre 24 reakcií: 2 mastre, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR)	4518263
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (96)	Pre 96 reakcií: 2 mastre, 4 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR)	4518265
Súprava QIAamp DSP Virus Kit – na purifikáciu vírusových nukleových kyselín z ľudskej plazmy na účely in vitro diagnostiky		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 preparátov: Kolóny QIAamp MinElute® Spin Columns, pufre, reagensie, skúmavky, nadstavce kolón a konektory VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx a príslušenstvo		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002032

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR nástroj so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR cyklovač so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstva: zahŕňa jednoročnú záruku na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie	9002043
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie s jednokanálovou pipetou do skúmaviek 72 x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie v štandardnom teste 8 x 12 pomocou skúmaviek 96 x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 pásov so 4 skúmavkami a uzávermi na 1000 reakcií	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 pásov so 4 skúmavkami a uzávermi na 10 000 reakcií	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií	981008

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Táto strana je zámerne prázdna

Nákup tohto výrobku umožňuje kupujúcemu používať výrobok na vykonávanie diagnostických krokov pre ľudskú in vitro diagnostiku. Týmto nie je priznaný žiadny všeobecný patent alebo iné oprávnenie žiadneho druhu ako toto konkrétne právo na používanie vyplývajúce z nákupu.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, ROX™ (Life Technologies Corporation); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy *artus* HCV RG RT-PCR Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *artus* HCV RG RT-PCR Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *artus HCV RG RT-PCR Kit* a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke k súprave *artus HCV RG RT-PCR Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese www.qiagen.com.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolajú vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na adrese www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN. Všetky práva vyhradené.

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)

