

artus[®] HCV RG RT-PCR Kit — Instrukcja obsługi



24 (nr katalogowy 4518263)



96 (nr katalogowy 4518265)

Wersja 1



Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q



4518263, 4518265



1049309PL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R5

MAT

1049309PL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń, które umożliwiają izolację i detekcję zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie — od pobrania próbki do otrzymania wyniku.

Firma QIAGEN wyznacza standardy w:


- procedurach oczyszczania DNA, RNA i białek;
- oznaczeniach kwasów nukleinowych i białek;
- badaniach microRNA oraz RNAi;
- automatyzacji technologii postępowania z próbkami i wykonywania oznaczeń.

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia wybitnych sukcesów i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Zawartość zestawu	4
Symbole	4
Przechowywanie	5
Przeznaczenie	5
Ograniczenia w zakresie stosowania produktu	6
Kontrola jakości	6
Ostrzeżenia i środki ostrożności	6
Wstęp	7
Zasada działania	7
Informacje o patogenie	7
Parametry skuteczności	8
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	18
Ważne informacje	19
Ogólne środki ostrożności	19
Pobieranie, przechowywanie i transport próbek	19
Izolacja RNA	21
Kontrola wewnętrzna	21
Oznaczenie ilościowe	22
Protokół: Reakcja PCR i analiza danych	23
Rozwiązywanie problemów	33
Literatura	36
Informacje dotyczące zamawiania	37

Zawartość zestawu

artus HCV RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Nr katalogowy		4518263	4518265
Liczba reakcji		24	96
Niebieski	Hep. C Virus RG Master A	2 x 12 reakcji	8 x 12 reakcji
Fioletowy	Hep. C Virus RG Master B	2 x 12 reakcji	8 x 12 reakcji
Czerwony	Hep. C Virus RG QS 1* (10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	Hep. C Virus RG QS 2* (10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	Hep. C Virus RG QS 3* (10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	Hep. C Virus RG QS 4* (10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Zielony	Hep. C Virus RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Biały	Woda (odpowiednia do PCR)	1000 μl	1000 μl
	Instrukcja obsługi	 1	1

* Quantitation standard — wzorzec ilościowy.

† Internal control — kontrola wewnętrzna.

Symbole



<N>

Zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N> testów



Termin ważności












Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro



Numer katalogowy



Numer serii

	Numer materiału
	Składniki
	Zawiera
	Liczba
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Ważna informacja

Przechowywanie

Składniki zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit należy przechowywać w temperaturze od -30°C do -15°C , w której zachowują stabilność aż do daty ważności podanej na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania ($>2x$), ponieważ może to doprowadzić do obniżenia czułości oznaczeń. Jeśli składniki będą używane tylko sporadycznie, należy zamrozić je w porcjach. Czas przechowywania w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ nie powinien przekraczać 5 godzin.

Przeznaczenie

Zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit to test amplifikacji kwasu nukleinowego in vitro przeznaczony do ilościowego oznaczania RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus, HCV) w ludzkim osoczu. Ten diagnostyczny zestaw testowy wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) i jest skonfigurowany do użytku z aparatami Rotor-Gene Q. Test umożliwia ilościowe oznaczenie RNA wirusa HCV w zakresie $65 - 1 \times 10^6$ IU HCV/ml.

 Zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit nie można używać z aparatami Rotor-Gene Q 2plex.

Zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit, w połączeniu z danymi dotyczącymi stanu klinicznego i innych markerów laboratoryjnych, służy do określenia rokowania choroby oraz pomocniczo do oceny odpowiedzi wirusologicznej na leczenie przeciwwretrowirusowe mierzonej poprzez zmiany stężenia RNA wirusa HCV w osoczu EDTA. Zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit nie jest przeznaczony do stosowania jako test przesiewowy pod kątem obecności wirusa HCV ani jako test diagnostyczny w celu potwierdzenia zakażenia wirusem HCV.

Ograniczenia w zakresie stosowania produktu

Wszystkie odczynniki są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Z produktu może korzystać jedynie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie procedur diagnostycznych *in vitro*.

W celu osiągnięcia optymalnych wyników reakcji PCR należy ściśle przestrzegać instrukcji obsługi.

Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

Choć występują rzadko, mutacje w obrębie wysoce konserwatywnych rejonów genomu wirusowego, do których przyłączają się startery i/lub sonda zestawu, mogą w takich przypadkach być przyczyną niedoszacowania miana wirusa lub niewykrycia obecności wirusa. Wiarygodność i skuteczność oznaczenia są regularnie weryfikowane.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia powtarzalnej jakości produktu.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym, kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN®.

Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Wstęp

Zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit jest gotowym do użycia systemem przeznaczonym do wykrywania RNA wirusa HCV za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction, PCR) w aparatach Rotor-Gene Q. Mieszanki Hep. C Virus RG Master A i B zawierają odczynniki i enzymy do reakcji odwrotnej transkrypcji i swoistej amplifikacji regionu o długości 240 bp (base pair, para zasad) genomu wirusa HCV oraz do bezpośredniego wykrywania swoistego amplikonu w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green) aparatu Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene 6000 lub kanale A.FAM™ (źródło 470 nm, detektor 510 nm) aparatu Rotor-Gene 3000.

Ponadto zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit zawiera drugi, heterologiczny system amplifikacji, który służy do detekcji potencjalnej inhibicji reakcji PCR. Wykrywa się ją jako kontrolę wewnętrzną (internal control, IC) w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym (Cycling Orange) aparatu Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene 6000 lub kanale A.ROX™ (źródło 585 nm, detektor 610 nm) aparatu Rotor-Gene 3000. Granica wykrywalności testu analitycznego RT-PCR pod kątem wirusa HCV (patrz część „Czułość analityczna”, strona 8) nie ulega obniżeniu. Dostarczone zewnętrzne kontrole pozytywne (Hep. C Virus RG QS 1–4) umożliwiają określenie ilości wirusowego RNA. Więcej informacji zawiera część „Oznaczenie ilościowe”, strona 22.

Zasada działania

Wykrywanie patogenu za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) opiera się na amplifikacji określonych regionów jego genomu. W przypadku PCR w czasie rzeczywistym (tzw. real-time PCR) amplifikowany produkt jest wykrywany za pomocą barwników fluorescencyjnych. Zwykle są one przyłączone do sond oligonukleotydowych, które wiążą się swoiście z amplifikowanym produktem. Monitorowanie natężenia fluorescencji podczas przebiegu reakcji PCR (tzn. w czasie rzeczywistym) umożliwia wykrycie i oznaczenie ilościowe gromadzącego się produktu bez konieczności ponownego otwierania próbek po zakończeniu reakcji PCR**.

Informacje o patogenie

Wirusowe zapalenie wątroby typu C to zapalenie wątroby wywołane wirusem zapalenia wątroby typu C. W przeciwieństwie do pozostałych wirusów wywołujących wirusowe zapalenie wątroby typu A, B, D lub E, zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) prowadzi, w znaczącej liczbie przypadków, do przewlekłej choroby wątroby. Zakażenie wirusem HCV zwykle nie daje objawów przez stosunkowo długi czas. Z tego względu większość

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

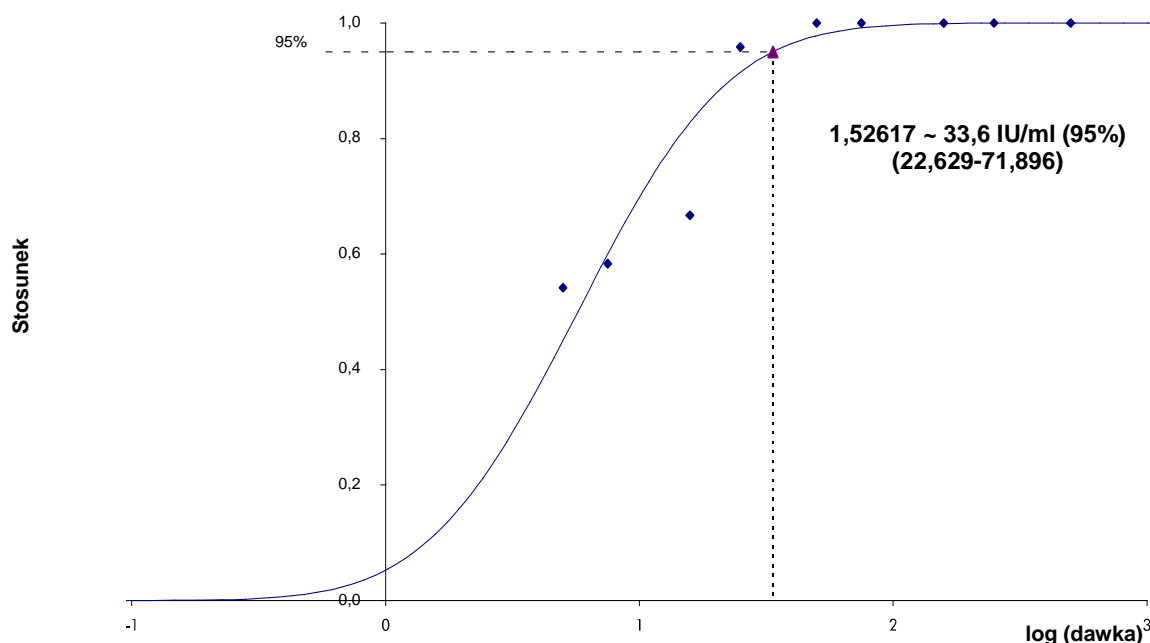
pacjentów nie jest świadoma zakażenia wirusem HCV. Leczenie jest jednak najbardziej skuteczne w najwcześniejszych stadiach choroby. Aktualnie jedynym skutecznym lekiem o udowodnionym działaniu jest interferon α (w połączeniu z rybawiryną). Wiadomo jednak również, że tylko niektórzy pacjenci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C reagują na terapię interferonem. Z tego względu w niektórych przypadkach to drogie leczenie pacjenta może być niekorzystne i wywołać poważne skutki uboczne, takie jak osłabienie układu odpornościowego, prowadzące do pogorszenia objawów (np. opryszczki wargowej, półpaśca).

Parametry skuteczności

Czułość analityczna

W celu oceny czułości analitycznej zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit przygotowano serię rozcieńczeń wzorca kopii RNA otrzymanych w wyniku transkrypcji *in vitro* o stężeniach od 10 IU/ μ l do stężenia nominalnego 0,0316 IU/ μ l, a następnie przeanalizowano za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Testy wykonywano w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono poprzez analizę probitową. Analityczna granica wykrywalności zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit to 0,19 IU/ μ l ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95-procentowe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa przy stężeniu 0,19 IU/ μ l.

Czułość analityczną uwzględniającą stopień oczyszczenia próbki (QIAamp[®] DSP Virus Kit) dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit na aparatach Rotor-Gene wyznaczono, wykorzystując serię rozcieńczeń międzynarodowego standardu kwasu nukleinowego RNA wirusa HCV Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) w stężeniu od 500 do stężenia nominalnego 5 IU HCV/ml dodanego do próbek klinicznych osocza. Z próbek tych wyizolowano RNA za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,5 ml, objętość elucji: 25 μ l). Każde z 9 rozcieńczeń przeanalizowano za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono poprzez analizę probitową. Ryc. 1 zawiera graficzne przedstawienie analizy probitowej. Analityczna granica wykrywalności z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit w połączeniu z aparatami Rotor-Gene Q wynosi 33,6 IU/ml ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95-procentowe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa przy stężeniu 33,6 IU/ml.



Ryc. 1. Analiza probitowa: HCV (Rotor-Gene 3000). Czulość analityczna z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit stosowanego na aparacie Rotor-Gene 3000.

Swoistość

Swoistość zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wynika przede wszystkim z doboru starterów i sond oraz z zachowania rygorystycznych warunków reakcji. Startery i sondy sprawdzono za pomocą analizy porównawczej sekwencji pod kątem możliwego występowania obszarów homologicznych ze wszystkimi sekwencjami opublikowanymi w bankach genów. W ten sposób zapewniono wykrywalność wszystkich odnośnych podtypów i genotypów.

Ponadto swoistość testu poddano walidacji za pomocą 100 różnych próbek osocza negatywnych względem wirusa HCV. Nie generowały one żadnego sygnału ze swoistymi dla HCV starterami i sondami, wchodzącymi w skład mieszanin Hep. C Virus RG Masters.

Potencjalną reaktywność krzyżową zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit przebadano za pomocą grupy kontrolnej wymienionej w tabeli 2. Żaden z badanych patogenów nie był reaktywny. Reakcja krzyżowa nie wystąpiła w przypadku zakażeń mieszanych.

Tabela 1. Badanie swoistości odnośnych genotypów

Wirus	Genotyp	Źródło	HCV (Cycling Green/A.FAM) (zielony kanał fluorescencyjny/ A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (Cycling Orange/A.ROX) (pomarańczowy kanał fluorescencyjny/ A.FAM)
Wirus zapalenia wątroby typu C	1	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	2	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	3	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	4	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	5	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+
Wirus zapalenia wątroby typu C	6	NIBSC, HemaCare, Uniwersytet w Essen	+	+

Tabela 2. Test swoistości zestawu z patogenami mogącymi wywołać reakcję krzyżową

Grupa kontrolna	HCV (Cycling Green/A.FAM) (zielony kanał fluorescencyjny/ A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (Cycling Orange/A.ROX) (pomarańczowy kanał fluorescencyjny/ A.FAM)
Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1	–	+
Wirus zapalenia wątroby typu A	–	+
Wirus zapalenia wątroby typu B	–	+
Ludzki herpeswirus typu 1 (wirus opryszczki pospolitej 1)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 2 (wirus opryszczki pospolitej 2)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 3 (wirus ospy wietrznej i półpaśca)	–	+
Ludzki herpeswirus typu 5 (cytomegalowirus)	–	+
Ludzki wirus białaczki z komórek T typu 1 i typu 2	–	+
Ludzki herpeswirus typu 6A	–	+
Ludzki herpeswirus typu 6B	–	+
Ludzki herpeswirus typu 8 (wirus mięsaka Kaposiego)	–	+
Enterowirus	–	+
Parwovirus B19	–	+
Wirus dengi	–	+

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Tabela 2. Ciąg dalszy

Grupa kontrolna	HCV (zielony kanał fluorescencyjny (Cycling Green)/ A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (pomarańczowy kanał fluorescencyjny (Cycling Orange)/ A.ROX)
Wirus żółtej gorączki	–	+
<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>	–	+

Zakres liniowy

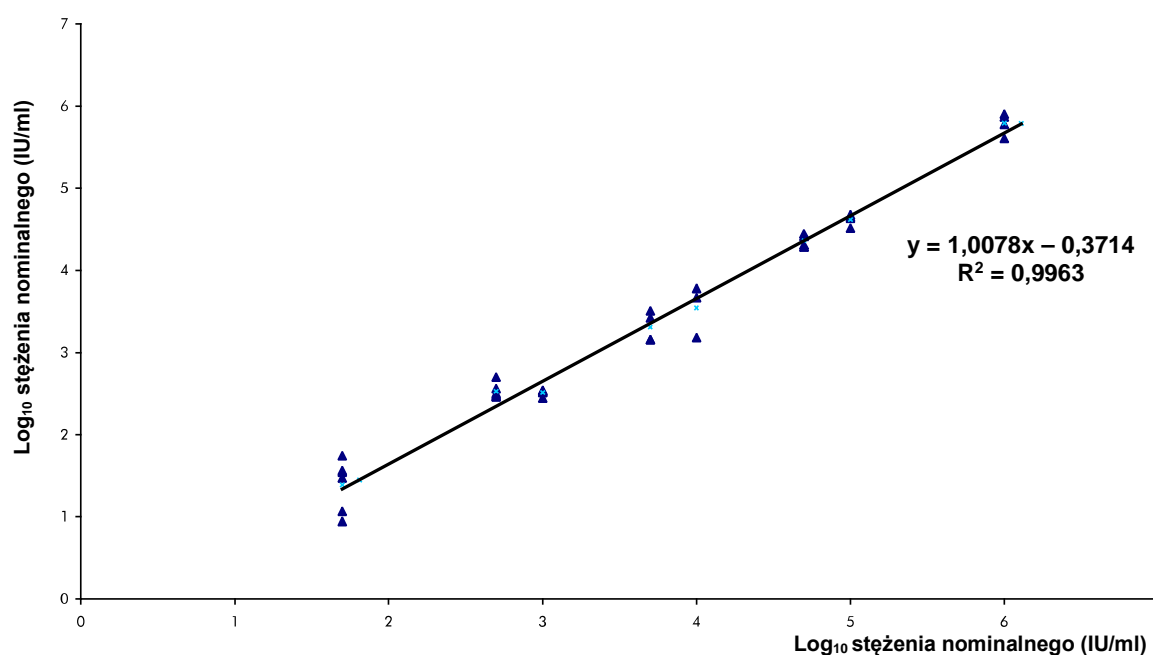
Zakres liniowy (pomiar analityczny) zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wyznaczono, analizując serię rozcieńczeń transkryptu wirusa HCV otrzymanego *in vitro* w stężeniach od 1×10^7 IU/ μ l do 1 IU/ μ l. Serię rozcieńczeń skalibrowano względem międzynarodowego standardu kwasu nukleinowego RNA wirusa HCV Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Każde rozcieńczenie badano w powtórzeniach (n = 8) za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit stosowanego na aparatach Rotor-Gene.

Zakres liniowy zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wyznaczono tak, aby obejmował stężenia od 1 IU/ μ l do co najmniej 1×10^7 IU/ μ l.

Zakres liniowy z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wyznaczono, analizując próbki od firmy Acrometrix. Oczyszczanie przeprowadzono w powtórzeniach (n = 6) dla stężeń od 50 IU/ml do 10^3 IU/ml oraz w powtórzeniach (n = 4) dla stężeń od 5×10^3 IU/ml

do 10^6 IU/ml za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit (objętość próbki do izolacji: 0,5 ml, objętość elucji: 25 μ l). Każdą z próbek poddano analizie za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit na aparatach Rotor-Gene. Zakres liniowy z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wyznaczono tak, aby obejmował stężenia od 65 IU/ml do co najmniej 10^6 IU/ml (patrz Ryc. 2).



Ryc. 2. Zakres liniowy zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Obliczenie zakresu liniowego z uwzględnieniem stopnia oczyszczenia próbki. Prostą wyznaczono metodą regresji liniowej dla log₁₀ z obliczonych stężeń w funkcji log₁₀ nominalnych stężeń. Równanie linii regresji podano na rycinie.

Precyzja

Dane dotyczące precyzji zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit stosowanego na aparatach Rotor-Gene pozwalają określić całkowitą wariancję oznaczenia. Na całkowitą wariancję składa się zmienność wewnątrz oznaczenia (zmienność wielu wyników dla próbek o tym samym stężeniu podczas jednego badania), zmienność pomiędzy różnymi oznaczeniami (zmienność wielu wyników dla oznaczenia otrzymanych na różnych aparatach tego samego typu przez różnych operatorów w obrębie jednego laboratorium) oraz zmienność pomiędzy poszczególnymi partiami (zmienność wielu wyników dla oznaczenia uzyskanych za pomocą zestawów z różnych partii). Uzyskane dane posłużyły do określenia odchylenia standardowego, wariancji i współczynnika zmienności dla reakcji PCR swoistej patogenowo oraz reakcji PCR dla kontroli wewnętrznej.

Dane precyzji dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit uzyskano z wykorzystaniem wzorca ilościowego o najniższym stężeniu (QS 4; 10 IU/ μ l).

Test przeprowadzono w 8 powtórzeniach. Dane precyzji obliczono na podstawie wartości C_T krzywych amplifikacji (C_T : cykl progowy, patrz Tabela 3). Ponadto dane precyzji dla wyników ilościowych w IU/ μ l zostały wyznaczone z wykorzystaniem odpowiednich wartości C_T (patrz Tabela 4). W oparciu o te wyniki całkowity rozrzut statystyczny dla dowolnej próbki o podanym powyżej stężeniu wynosi 1,52% (C_T) lub 25,71% (stężenie) i 0,75% (C_T) dla detekcji kontroli wewnętrznej. Powyższe wartości są oparte na całości wszystkich pojedynczych wartości o określonych zmiennościach.

Tabela 3. Dane precyzji na podstawie wartości C_T

	Wartość C_T	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności (%)
Zmienność wewnątrz oznaczenia: Hep. C Virus RG QS 4	32,81	0,09	0,28
Zmienność wewnątrz oznaczenia: Hep. C Virus RG IC	30,04	0,08	0,27
Zmienność pomiędzy oznaczeniami: Hep. C Virus RG QS 4	32,14	0,5	1,57
Zmienność pomiędzy oznaczeniami: Hep. C Virus RG IC	30,23	0,22	0,71
Zmienność pomiędzy testami z różnych partii: Hep. C Virus RG QS 4	32,56	0,48	1,46
Zmienność pomiędzy testami z różnych partii: Hep. C Virus RG IC	30,28	0,24	0,78
Całkowita wariancja: Hep. C Virus RG QS 4	32,41	0,49	1,52
Całkowita wariancja: Hep. C Virus RG IC	30,29	0,29	0,75

Tabela 4. Dane precyzji na podstawie wyników ilościowych (w IU/ μ l)

	Odchylenie standardowe	Wariancja	Współczynnik zmienności (%)
Zmienność wewnątrz oznaczenia: Hep. C Virus RG QS 4	0,64	0,41	6,34
Zmienność pomiędzy oznaczeniami: Hep. C Virus RG QS 4	1,00	1,00	9,93
Zmienność pomiędzy testami z różnych partii: Hep. C Virus RG QS 4	3,92	15,34	37,35
Całkowita wariancja: Hep. C Virus RG QS 4	2,63	6,93	25,71

Odporność

Weryfikacja odporności testu pozwala na wyznaczenie całkowitej częstości niepowodzeń dla zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Do 100 próbek osocza negatywnych względem wirusa HCV dodano objętość elucji o stężeniu 2 IU/ μ l RNA kontrolnego wirusa HCV (w przybliżeniu trzykrotność stężenia dla granicy czułości analitycznej). Po izolacji za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit próbki te zbadano za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Częstość niepowodzeń dla wszystkich próbek HCV wyniosła 0%. Ponadto sprawdzono odporność kontroli wewnętrznej, oczyszczając i analizując 100 próbek osocza negatywnych względem wirusa HCV. Całkowita częstość niepowodzeń wyniosła 0%. Nie zaobserwowano inhibicji reakcji. Wynika z tego, że odporność zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wynosi $\geq 99\%$.

Odtwarzalność

Dane dotyczące odtwarzalności umożliwiają ocenę regularności działania zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit, jak również porównanie wydajności w stosunku do innych produktów. Dane te uzyskuje się, uczestnicząc w ustalonych programach badań biegłości.

Ocena diagnostyczna

Przeprowadzono badanie oceniające zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Porównując zestaw *artus* HCV RG RT-PCR Kit do testu COBAS[®] TaqMan[®] HCV Test, poddano analizie retrospektywnej 276 próbek osocza. Wszystkie próbki osocza uprzednio poddano analizie w celu rutynowej diagnostyki za pomocą testu COBAS TaqMan HCV Test i określono, czy są pozytywne, czy negatywne.

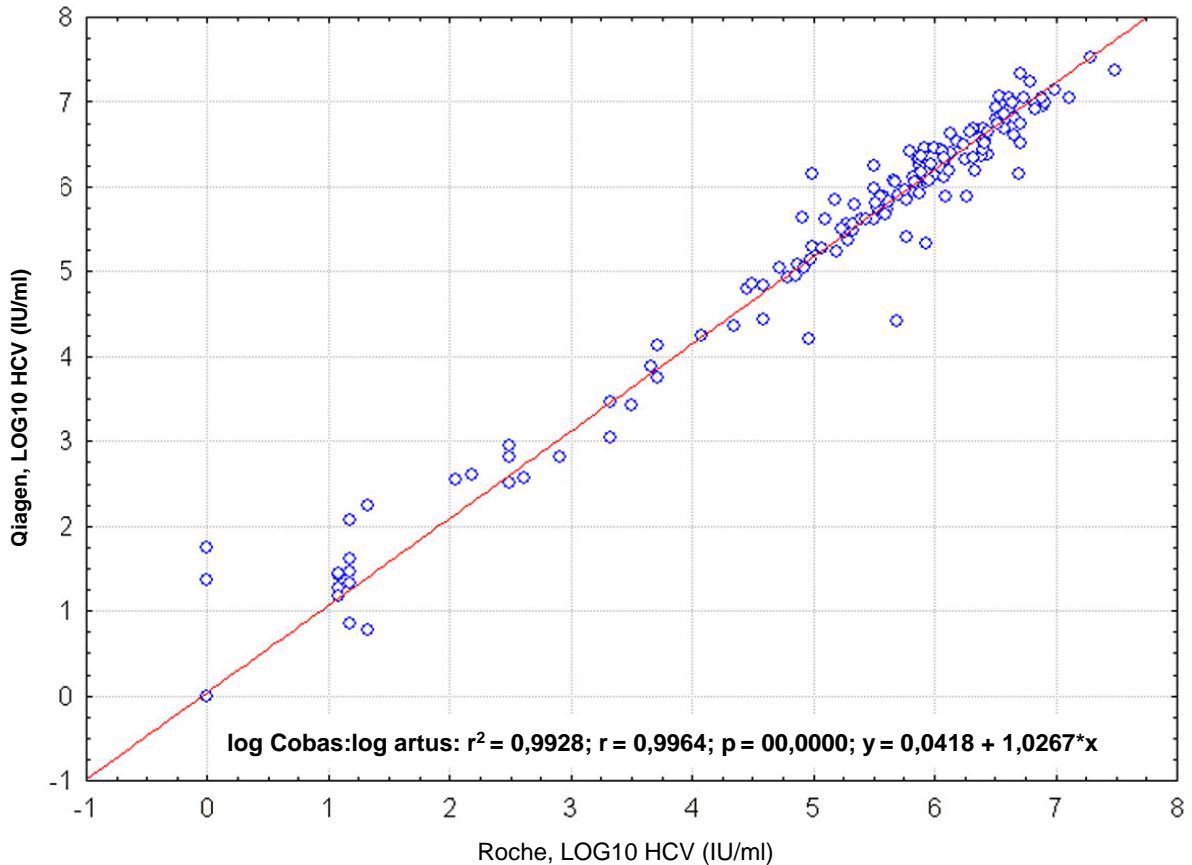
RNA wirusa HCV do badania zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit wyizolowano za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit, a analizę przeprowadzono na aparacie Rotor-Gene 6000. W celu przeprowadzenia badań porównawczych z testem COBAS TaqMan HCV Test RNA wirusa HCV poddano analizie zgodnie z instrukcjami producenta znajdującymi się na ulotce dołączonej do opakowania. Wyniki uzyskane za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit porównano z wynikami testu COBAS TaqMan HCV Test (patrz Tabela 5 i Ryc. 3).

Dla 137 spośród 139 próbek, które w teście COBAS TaqMan HCV Test dały wynik pozytywny, otrzymano wynik pozytywny również za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Dla wszystkich 137 próbek, które w teście COBAS TaqMan HCV Test dały wynik negatywny, otrzymano wynik negatywny również za pomocą zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit.

W przypadku traktowania wyników testu COBAS TaqMan HCV Test jako odniesienia czułość diagnostyczna wynosi 100%, a swoistość diagnostyczna 98,6%.

Tabela 5. Wyniki otrzymane dla 276 próbek osocza EDTA poddanych analizie retrospektywnej

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



Ryc. 3. Porównanie testu COBAS TaqMan HCV Test (Roche, HCV; z oczyszczaniem próbek za pomocą systemu COBAS AmpliPrep) z zestawem *artus* HCV RG RT-PCR Kit (QIAGEN, HCV; z oczyszczaniem próbek za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit). Korelację wyników ilościowych z obu systemów testowych (Tabela 5) przeanalizowano metodą regresji liniowej. Wyniki otrzymane za pomocą obu zestawów przedstawiono na wykresie XY (punktowym) ze skalą log-log.

Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

- Zestaw do izolacji RNA (patrz część „Izolacja RNA”, strona 21)
- Pipety (z regulacją)*
- Jałowe końcówki do pipet z filtrami
- Wytrząsarka*
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 2 ml
- Aparat Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene*[†] z zielonym (Cycling Green) i pomarańczowym (Cycling Orange) kanałem fluorescencyjnym lub kanałami fluorescencyjnymi A.FAM i A.ROX
- Oprogramowanie aparatu Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q w wersji 1.7.94 lub wyższej (oprogramowanie aparatu Rotor-Gene 6000 w wersji 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; oprogramowanie aparatu Rotor-Gene 3000 w wersji 6.0.23)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, do stosowania w rotorze 72-Well Rotor (nr kat. 981103 lub 981106)
- Zamiennie: PCR Tubes, 0.2 ml, do stosowania w rotorze 36-Well Rotor (nr kat. 981005 lub 981008)
- Blok chłodzący (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, nr kat. 9018901, lub Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, nr kat. 9018905)

* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

[†] Zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit nie można używać z aparatami Rotor-Gene Q 2plex.

Ważne informacje

Ogólne środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące kwestie:

- Używać jałowych końcówek do pipet z filtrami.
- Materiały pozytywne (próbki materiałów, kontrole pozytywne i amplikony) przechowywać i ekstrahować oddzielnie względem innych odczynników i dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w osobnym miejscu.
- Przed rozpoczęciem oznaczenia całkowicie rozmrozić wszystkie odczynniki w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszać składniki (kilka razy pipetując w górę i w dół lub wytrząsając pulsacyjnie), a następnie krótko odwirować.
- Pracować szybko i trzymać składniki na lodzie lub w bloku chłodzącym (72/96-dołkowy blok ładowania).

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek

i Wszystkie próbki należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.

Próbkami mogą być jedynie poniższe materiały. Należy ściśle przestrzegać poniższych zasad i instrukcji szczegółowych dotyczących pobierania, transportu i przechowywania tych materiałów.

i Aktualne badania wskazują na to, że najbardziej odpowiednim materiałem próbki do wykrywania wirusa HCV jest osocze EDTA lub osocze z dodatkiem cytrynianu. Z tego względu zalecamy używanie tych materiałów z zestawem *artus* HCV RG RT-PCR Kit.

Walidację wewnętrzną zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit przeprowadzono za pomocą próbek ludzkiego osocza z EDTA. Inne materiały próbek nie zostały zwalidowane. Do przygotowania próbek należy używać jedynie zalecanego zestawu do izolacji RNA (patrz część „Izolacja RNA”, strona 21).

Stosując niektóre materiały jako próbki, należy ściśle przestrzegać szczególnych instrukcji dotyczących pobierania, transportu i przechowywania.

Pobieranie materiału klinicznego jako próbek

Każde pobranie krwi powoduje uszkodzenie naczyń krwionośnych (tętnic, żył, naczyń włosowatych). Należy korzystać tylko z niezakaźnych i jałowych materiałów. Do pobierania krwi dostępny jest odpowiedni sprzęt jednorazowego użytku. Do nakłucia żyły nie należy stosować zbyt cienkich igieł. Krew żylną należy pobierać z odpowiednich miejsc zgięcia łokciowego, przedramienia lub grzbietu ręki. Krew należy pobierać do standardowych probówek do pobierania krwi (czerwona zatyczka, Sarstedt lub odpowiednik

innego producenta). Należy pobrać objętość 5–10 ml krwi na EDTA. Probówki należy wymieszać, obracając je bezpośrednio po pobraniu krwi (8 x, nie wstrząsać).

i Nie należy używać próbek pobranych od osób przyjmujących heparynę (patrz część „Substancje zakłócające”, strona 20).

Przechowywanie próbek

Krew pełną należy rozdzielić na osocze i składniki komórkowe, wirując ją przez 20 minut przy 800–1600 x g w ciągu 6 godzin. Wyizolowane osocze należy przenieść do jałowych probówek polipropylenowych. Rutynowe mrożenie próbek lub przechowywanie ich przez dłuższy czas może zmniejszyć czułość oznaczenia. Wirusowe RNA w otoczce zachowuje stabilność przez kilka dni w przypadku przechowywania w temperaturze 4°C, kilka tygodni w przypadku przechowywania w temperaturze –20°C, a nawet kilka miesięcy w przypadku przechowywania w temperaturze –70°C*.

Transport próbek

Podstawową zasadą jest transportowanie materiału w odpornym na rozbitcie pojemniku. W ten sposób można zapobiec potencjalnemu niebezpieczeństwu zakażenia spowodowanego wyciekiem materiału. Próbki należy transportować zgodnie z lokalnymi i krajowymi zaleceniami dotyczącymi transportu materiału zakaźnego†.

Próbki należy przetransportować w ciągu 6 godzin. Nie zaleca się przechowywania próbek w miejscu, gdzie zostały pobrane. Można przesyłać próbki pocztą, pod warunkiem przestrzegania przepisów prawa dotyczących transportu materiału zakaźnego. Zaleca się przesyłanie próbek kurierem. Próbki krwi należy transportować schłodzone (2–8°C), a oddzielone osocze — głęboko zamrożone (–15 do –30°C).

Substancje zakłócające

Podwyższony poziom bilirubiny (≤ 15 mg/dl) i lipidów (≤ 800 mg/dl) oraz próbki zhemolizowane nie zakłócają działania systemu. Heparyna (≤ 10 IU/ml) ma wpływ na reakcję PCR. Nie należy używać próbek pobranych do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant. Nie należy również korzystać z próbek pobranych od pacjentów przyjmujących heparynę.

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

† Międzynarodowe Zrzeszenie Przewoźników Powietrznych (International Air Transport Association, IATA). Przepisy dotyczące transportu materiałów niebezpiecznych w międzynarodowym transporcie lotniczym (Dangerous Goods Regulations).

Izolacja RNA

Zestaw QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, nr kat. 60704) został zwalidowany do oczyszczania wirusowego RNA z ludzkiego osocza, do użytku z zestawem *artus* HCV RG RT-PCR Kit. Oczyszczanie wirusowego RNA należy wykonywać zgodnie z dokumentem *QIAamp DSP Virus Kit — Instrukcja obsługi* (QIAamp DSP Virus Kit Handbook).

i Użycie nośnika RNA ma kluczowe znaczenie dla wydajności izolacji i, co za tym idzie, dla uzysku DNA/RNA. Aby zwiększyć stabilność nośnika RNA dostarczonego z zestawem QIAamp DSP Virus Kit, zalecamy postępowanie zgodnie z informacjami dotyczącymi rekonstrukcji i przechowywania nośnika RNA podanymi w instrukcji obsługi („Przygotowywanie odczynników i buforów”).

i Kontroli wewnętrznej zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit można używać bezpośrednio w procedurze izolacji (patrz część „Kontrola wewnętrzna” poniżej). Podczas oczyszczania należy pamiętać o przetworzeniu negatywnej próbki osocza. Na podstawie odpowiadającego jej sygnału kontroli wewnętrznej dokonuje się oceny oczyszczania.

Kontrola wewnętrzna

Dostarczana jest kontrola wewnętrzna (Hep. C Virus RG IC). Pozwala ona użytkownikowi kontrolować procedurę izolowania RNA i sprawdzać przebieg reakcji PCR pod kątem ewentualnej inhibicji. Takie zastosowanie wymaga dodania kontroli wewnętrznej do procedury izolacji w stosunku 0,1 µl na 1 µl objętości elucji. Na przykład w przypadku korzystania z zestawu QIAamp DSP Virus Kit proces elucji RNA zachodzi w 60 µl buforu do elucji (AVE). Z tego względu początkowo należy dodać 6 µl kontroli wewnętrznej.

i Kontrolę wewnętrzną i nośnik RNA (patrz „Izolacja RNA” powyżej) należy dodawać wyłącznie do mieszaniny buforu do lizy i materiału próbki lub bezpośrednio do buforu do lizy.

Kontroli wewnętrznej nie wolno dodawać bezpośrednio do materiału próbki. W przypadku dodawania kontroli wewnętrznej do buforu do lizy należy zauważyć, że mieszaninę kontroli wewnętrznej i buforu do lizy-nośnika RNA należy przygotować na świeżo i niezwłocznie użyć (przechowywanie mieszaniny w temperaturze pokojowej lub w lodówce przez zaledwie kilka godzin może doprowadzić do nieprawidłowego działania kontroli wewnętrznej i obniżenia wydajności izolacji).


i Nie dodawać kontroli wewnętrznej i nośnika RNA bezpośrednio do materiału próbki.

Opcjonalnie kontroli wewnętrznej można użyć wyłącznie do kontroli przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji. Takie zastosowanie wymaga

dodania kontroli wewnętrznej bezpośrednio do mieszaniny Hep. C Virus RG Master A i Hep. C Virus RG Master B, zgodnie z instrukcjami opisanymi w kroku 2b protokołu (strona 24).

Oznaczenie ilościowe

Dostarczone wzorce ilościowe (Hep. C Virus RG QS 1–4) są traktowane jak wcześniej oczyszczone próbki i stosowana jest ta sama objętość (20 µl). Aby wyznaczyć krzywą wzorcową w aparatach Rotor-Gene Q, należy użyć wszystkich 4 wzorców ilościowych i zdefiniować je w oknie dialogowym „Edit Samples” (Edytuj próbki) jako wzorce o określonych stężeniach (patrz instrukcja obsługi aparatu).

 Standardy ilościowe są zdefiniowane w IU/µl*. Aby przekształcić wartości wyznaczone z krzywej wzorcowej na IU/ml materiału próbki, należy skorzystać z poniższego wzoru:

$$\text{Wynik (IU/ml)} = \frac{\text{Wynik (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Objętość elucji (}\mu\text{l)}}{\text{Objętość próbki (ml)}}$$

Zasadą jest wstawienie początkowej objętości próbki do powyższego wzoru. Należy tak postąpić, jeśli przed izolacją kwasu nukleinowego zmiana uległa objętość próbki (np. zmniejszyła się w wyniku odwirowania lub zwiększyła się przez dodanie objętości wymaganej do izolacji).

* Wzorzec skalibrowano względem 1. międzynarodowego standardu dla wirusa HCV określonego przez Światową Organizację Zdrowia (WHO).

Protokół: Reakcja PCR i analiza danych

i Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem procedury należy zapoznać się z sekcją „Ważne informacje” na stronach 19–22.
- Przed rozpoczęciem protokołu zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q. Patrz instrukcja obsługi aparatu.
- Upewnić się, że do każdej reakcji PCR dołączono co najmniej jeden wzorzec ilościowy, jak również co najmniej jedną kontrolę negatywną (woda odpowiednia do PCR). W celu utworzenia krzywej wzorcowej do każdej reakcji PCR należy użyć wszystkich 4 dostarczonych wzorców ilościowych (Hep. C Virus RG QS 1–4).

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że blok chłodzący (akcesorium aparatu Rotor-Gene Q) jest wstępnie schłodzony do temperatury 2–8°C.
- Przed rozpoczęciem całkowicie rozmrozić, wymieszać (kilka razy pipetując w górę i w dół lub szybko wytrząsając) i krótko odwirować wszystkie odczynniki.

Procedura

1. Umieścić żadaną liczbę probówek PCR w adapterach bloku chłodzącego.
2. W przypadku używania kontroli wewnętrznej do monitorowania procedury izolacji RNA i sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji przejdź do kroku 2a. W przypadku używania kontroli wewnętrznej wyłącznie do sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji przejdź do kroku 2b.
- 2a. Kontrolę wewnętrzną dodano już do procedury izolacji (patrz część „Kontrola wewnętrzna”, strona 21). W takim przypadku przygotuj mieszaninę Master mix zgodnie z tabelą 6.

Mieszanina reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR z wyjątkiem próbki.

Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny Master mix (kontrola wewnętrzna używana do monitorowania izolacji RNA i sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji)

Liczba próbek	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 µl	144 µl
Hep. C Virus RG Master B	18 µl	216 µl
Hep. C Virus RG IC	0 µl	0 µl
Całkowita objętość	30 µl	360 µl

- 2b. Wymagane jest dodanie kontroli wewnętrznej bezpośrednio do mieszaniny Hep. C Virus Master A i Hep. C Virus Master B. W takim przypadku należy przygotować mieszaninę Master mix zgodnie z tabelą 7.**

Mieszanina reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR z wyjątkiem próbki.

Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny Master mix (kontrola wewnętrzna używana wyłącznie do sprawdzania przebiegu reakcji PCR pod kątem potencjalnej inhibicji)

Liczba próbek	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 µl	144 µl
Hep. C Virus RG Master B	18 µl	216 µl
Hep. C Virus RG IC	2 µl	24 µl
Całkowita objętość	32 µl	384 µl

* Wzrost objętości spowodowany dodaniem kontroli wewnętrznej jest pomijany podczas przygotowania testu PCR. Nie obniża to czułości systemu detekcji.

- 3. Za pomocą pipety przenieś 30 µl mieszaniny Master mix do każdej probówki PCR. Następnie dodaj 20 µl próbki RNA po elucji (patrz Tabela 8). Analogicznie jako kontroli pozytywnej należy użyć 20 µl co najmniej jednego z wzorców ilościowych (Hep. C Virus RG QS 1–4), a jako kontroli pozytywnej 20 µl wody (woda odpowiednia do PCR).**

Tabela 8. Przygotowanie reakcji PCR

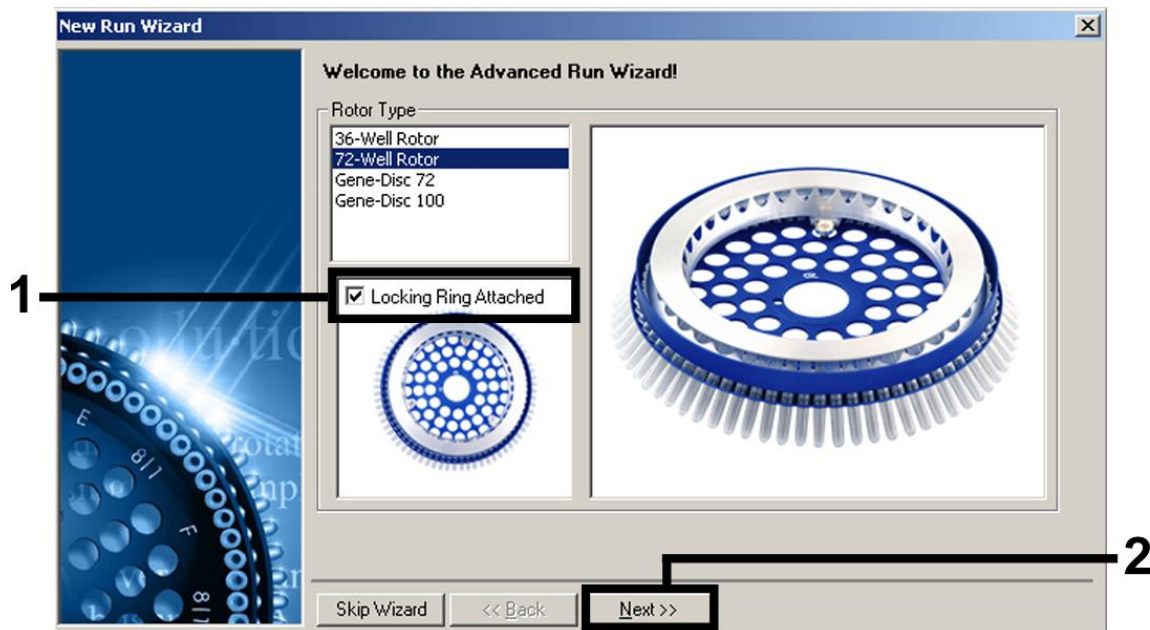
Liczba próbek	1	12
Mieszanina Master mix	30 µl	30 µl na każdą
Próbka	20 µl	20 µl na każdą
Całkowita objętość	50 µl	50 µl na każdą

- Zamknij probówki PCR. Upewnij się, że pierścień blokujący (akcesorium do aparatu Rotor-Gene) jest umieszczony na górze rotora, aby zapobiec przypadkowemu otwarciu się probówek podczas cyklu.**
- W celu detekcji RNA wirusa HCV utwórz profil temperaturowy, wykonując poniższe kroki.**

Ustawianie ogólnych parametrów badania	Ryc. 4, 5, 6
Odwrotna transkrypcja RNA	Ryc. 7
Wstępna aktywacja enzymu typu hot-start	Ryc. 8
Amplifikacja cDNA	Ryc. 9
Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego	Ryc. 10
Rozpoczynanie reakcji	Ryc. 11

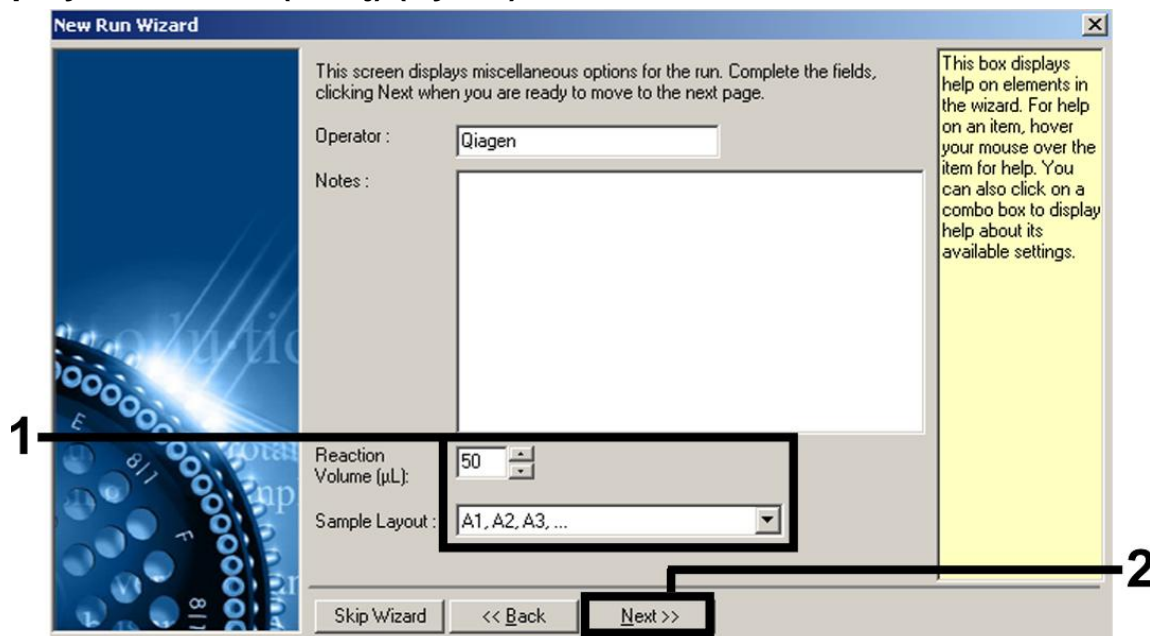
Wszystkie specyfikacje odnoszą się do oprogramowania aparatu Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q w wersji 1.7.94, oprogramowania aparatu Rotor-Gene 6000 w wersji 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 i oprogramowania aparatu Rotor-Gene 3000 w wersji 6.0.23. Dalsze informacje na temat programowania aparatów Rotor-Gene można znaleźć w instrukcjach obsługi aparatów. Na ilustracjach ustawienia te otoczono grubą, czarną ramką. Przedstawione ilustracje dotyczą aparatów Rotor-Gene Q. Tam, gdzie dla aparatu Rotor-Gene 3000 wymagane są inne wartości, różnice te opisano w tekście.

6. Najpierw otwórz okno dialogowe „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu) (Ryc. 4). Zaznacz pole wyboru „Locking Ring Attached” (Pierścień blokujący zamocowany) i kliknij przycisk „Next” (Dalej).



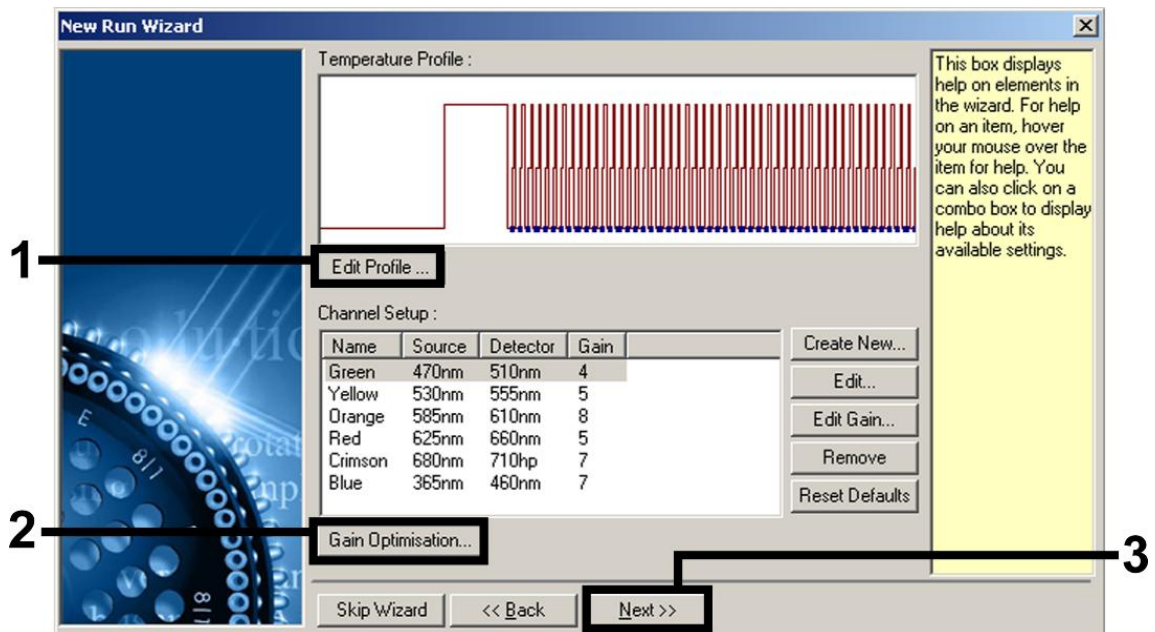
Ryc. 4. Okno dialogowe „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu).

7. Wybierz wartość 50 dla objętości reakcji PCR, a następnie kliknij przycisk „Next” (Dalej) (Ryc. 5).

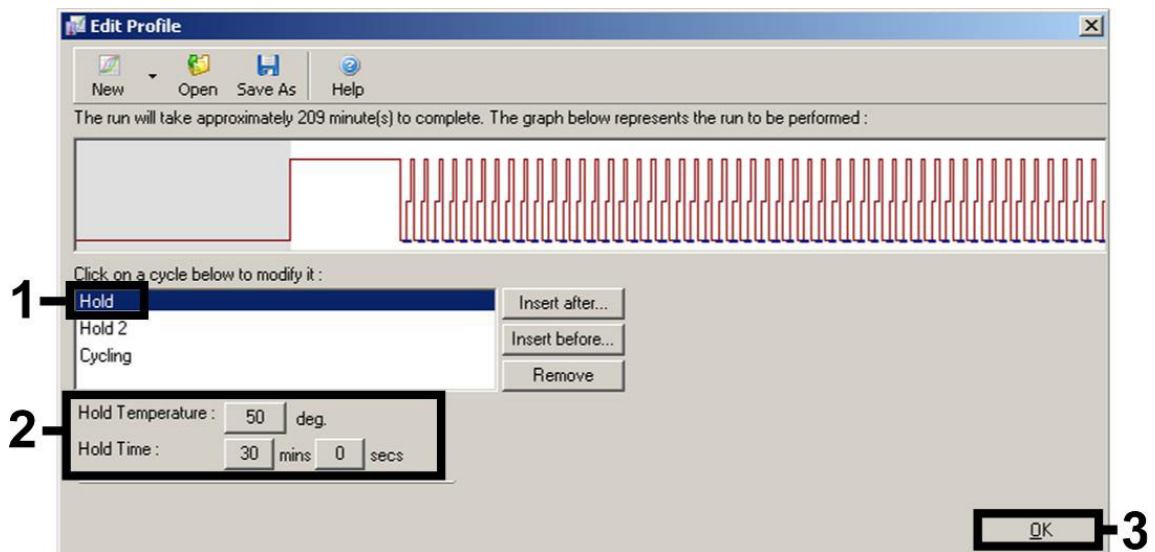


Ryc. 5. Ustawianie ogólnych parametrów badania.

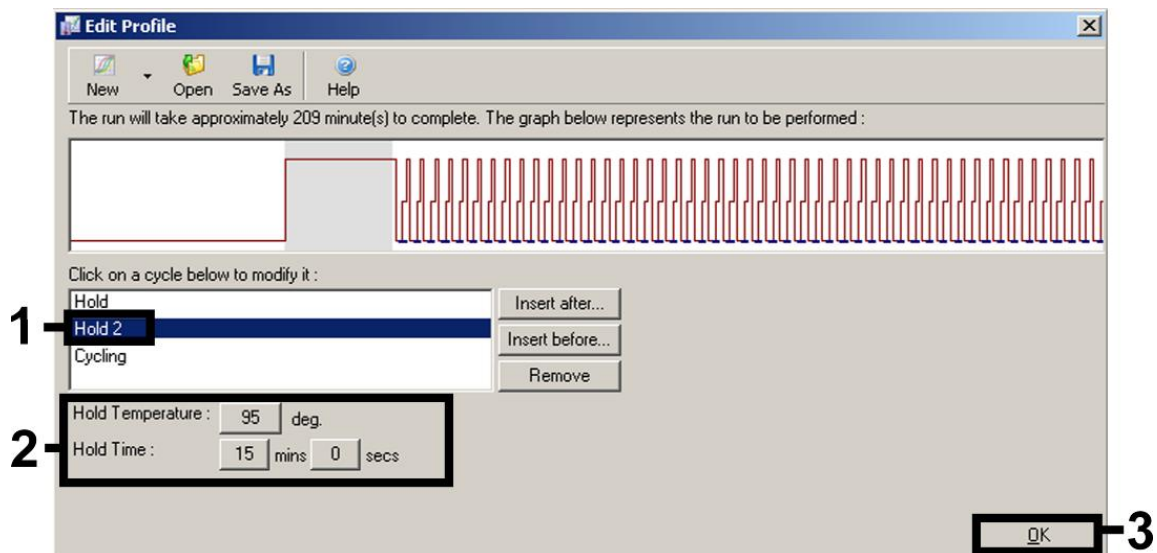
8. Kliknij przycisk „Edit Profile” (Edytuj profil) w kolejnym oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu) (Ryc. 6), a następnie zaprogramuj profil temperaturowy w sposób przedstawiony na Ryc. 6–9.



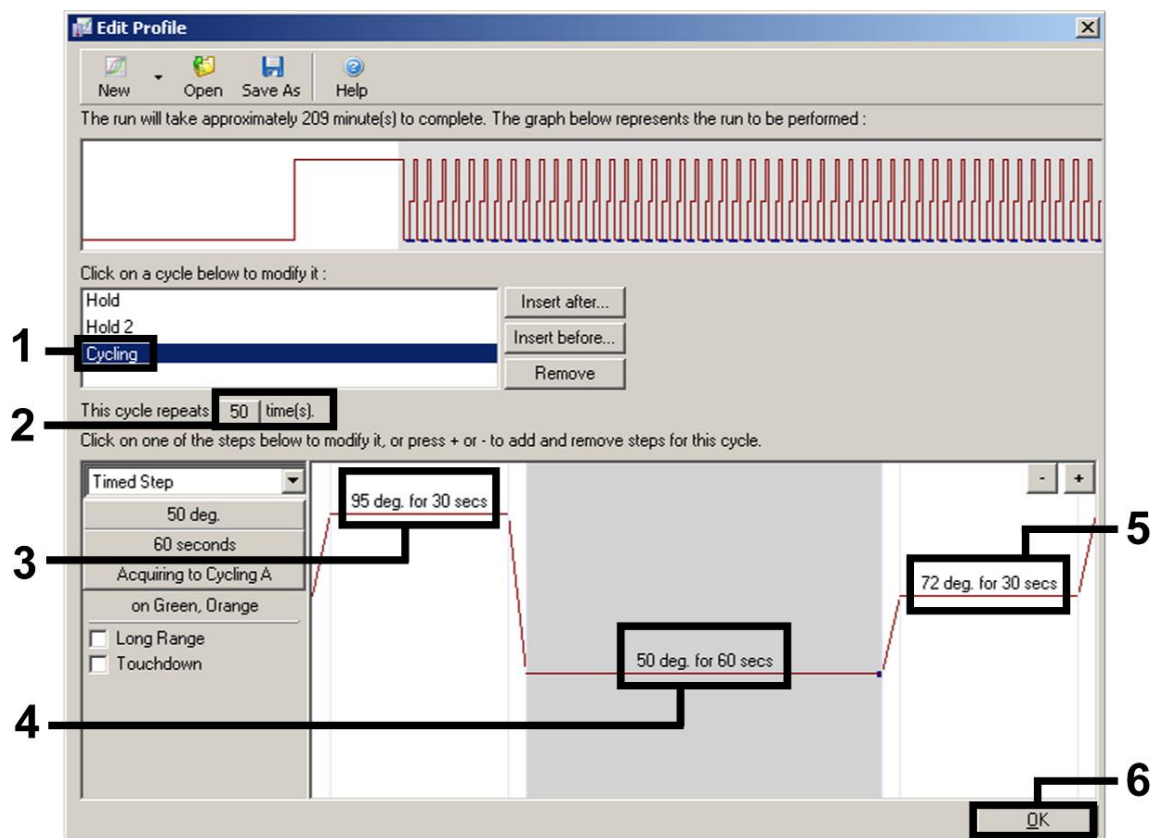
Ryc. 6. Edycja profilu.



Ryc. 7. Odwrotna transkrypcja RNA.



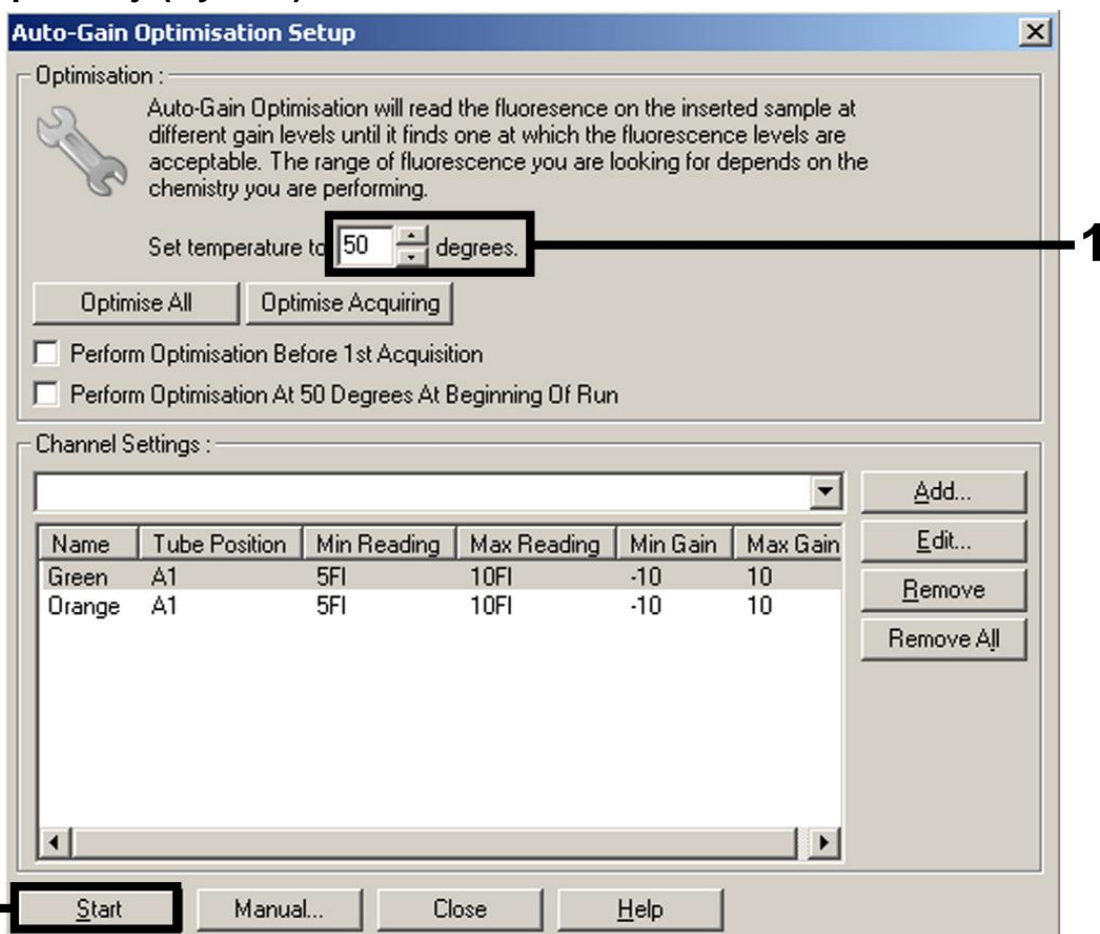
Ryc. 8. Wstępna aktywacja enzymu typu hot-start.



Ryc. 9. Amplifikacja cDNA. Należy zauważyć, że w aparacie Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako „FAM/Sybr, ROX”.

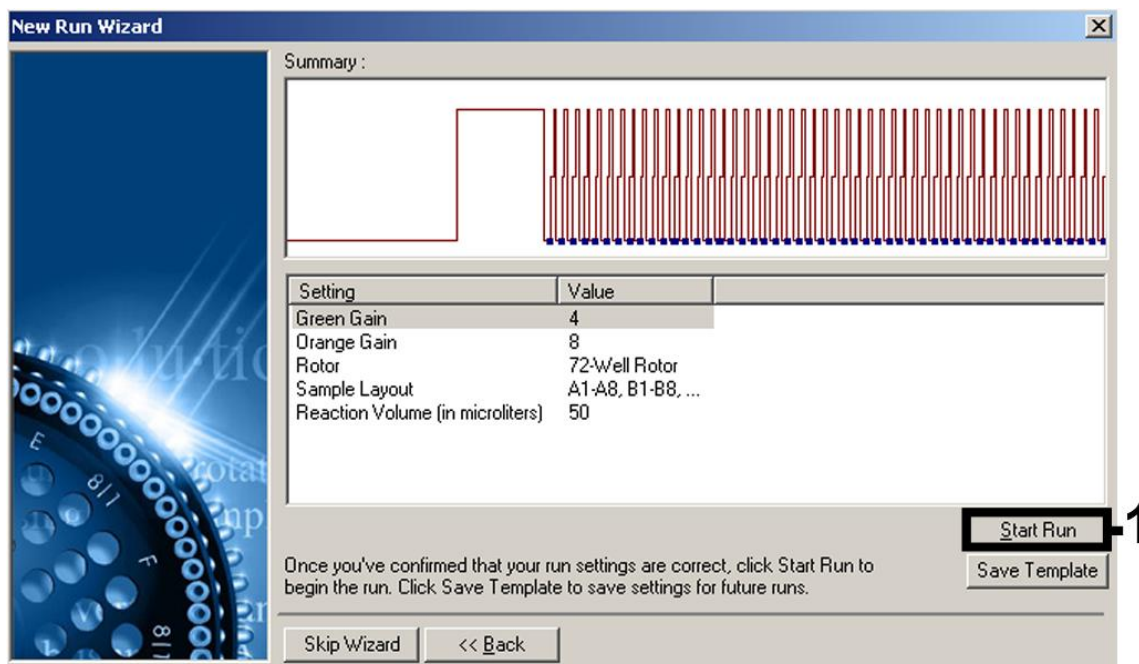
9. Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych należy określić na podstawie natężenia fluorescencji w probówkach PCR. Kliknij przycisk „Gain Optimisation” (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu) (patrz Ryc. 6), aby otworzyć okno dialogowe „Auto-Gain Optimisation Setup” (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego). Ustaw temperaturę kalibracji na 50 stopni, aby odpowiadała ona

temperaturze podczas etapu przyłączania starterów programu amplifikacji (Ryc. 10).



Ryc. 10. Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego. Należy zauważyć, że w aparacie Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako „FAM/Sybr” i „ROX”.

10. Wartości wzmocnienia określone podczas kalibracji kanału są zapisywane automatycznie i wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania (Ryc. 11). Kliknij przycisk „Start Run” (Rozpocznij reakcję).



Ryc. 11. Rozpoczącie reakcji. Należy zauważyć, że w aparacie Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako „FAM/Sybr” i „ROX”.

11. Po zakończeniu reakcji przeanalizuj dane. Możliwe są następujące wyniki (11a, 11b i 11c).

Przykłady pozytywnych i negatywnych reakcji PCR podano na Ryc. 12 i Ryc. 13.

W Tabeli 9 przedstawiono wytyczne dotyczące interpretacji wyników ilościowych.

11a. Wykryto sygnał w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green).

Pozytywny wynik analizy: próbka zawiera RNA wirusa HCV.

W takim przypadku detekcja sygnału z kanału pomarańczowego (Cycling Orange) nie ma znaczenia, ponieważ wysokie wyjściowe stężenie RNA wirusa HCV (pozytywny sygnał w kanale zielonym (Cycling Green)) może prowadzić do obniżenia sygnału fluorescencyjnego lub jego braku dla kontroli wewnętrznej w kanale pomarańczowym (Cycling Orange) (w mechanizmie kompetycyjnym).



Należy zauważyć, że w przypadku aparatu Rotor-Gene 3000 w kanale A.FAM wykrywany jest sygnał pozytywny, a w kanale A.ROX wykrywany jest sygnał dla kontroli wewnętrznej.

11b. Brak sygnału w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green).

W tym samym czasie w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym (Cycling Orange) otrzymano sygnał z kontroli wewnętrznej.

W próbce nie wykryto RNA wirusa HCV. Wynik można uznać za negatywny.

W przypadku negatywnego wyniku reakcji RT-PCR pod kątem wirusa HCV wykryty sygnał z kontroli wewnętrznej wyklucza możliwość inhibicji reakcji RT-PCR.

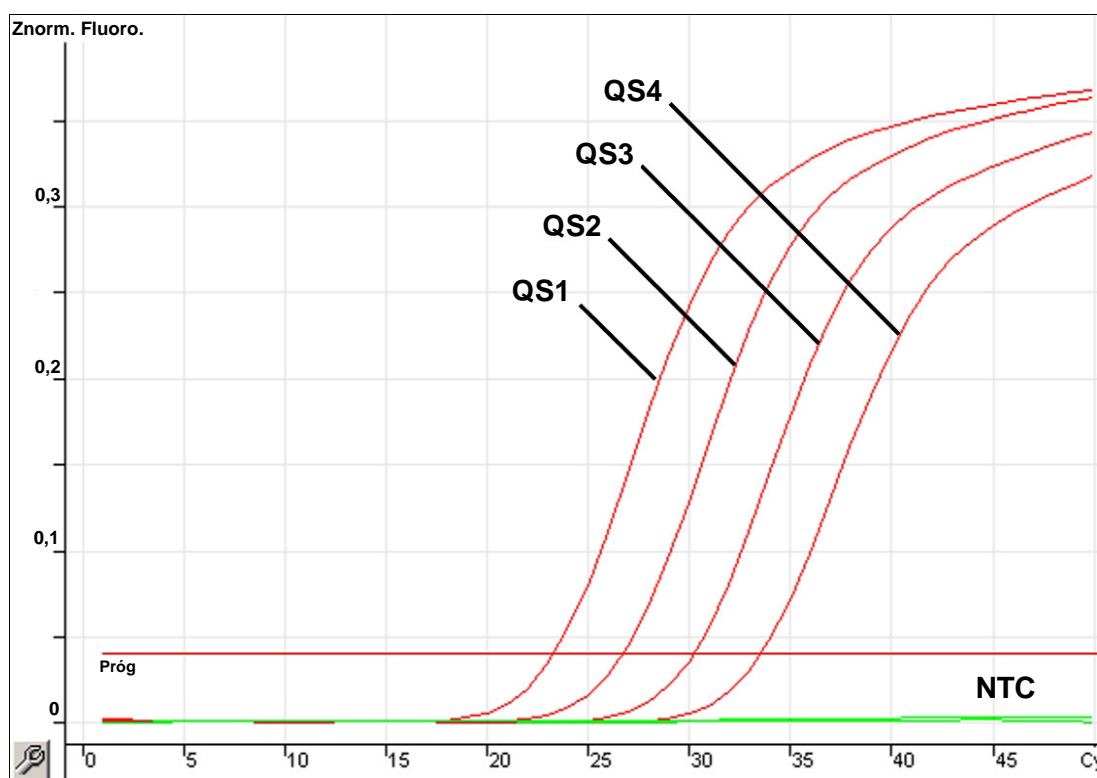
i Należy zauważyć, że w przypadku aparatu Rotor-Gene 3000 w kanale A.ROX wykrywany jest sygnał z kontroli wewnętrznej, a w kanale A.FAM obserwowany jest brak sygnału.

11c. Brak sygnału w zielonym (Cycling Green) i pomarańczowym (Cycling Orange) kanale fluorescencyjnym.

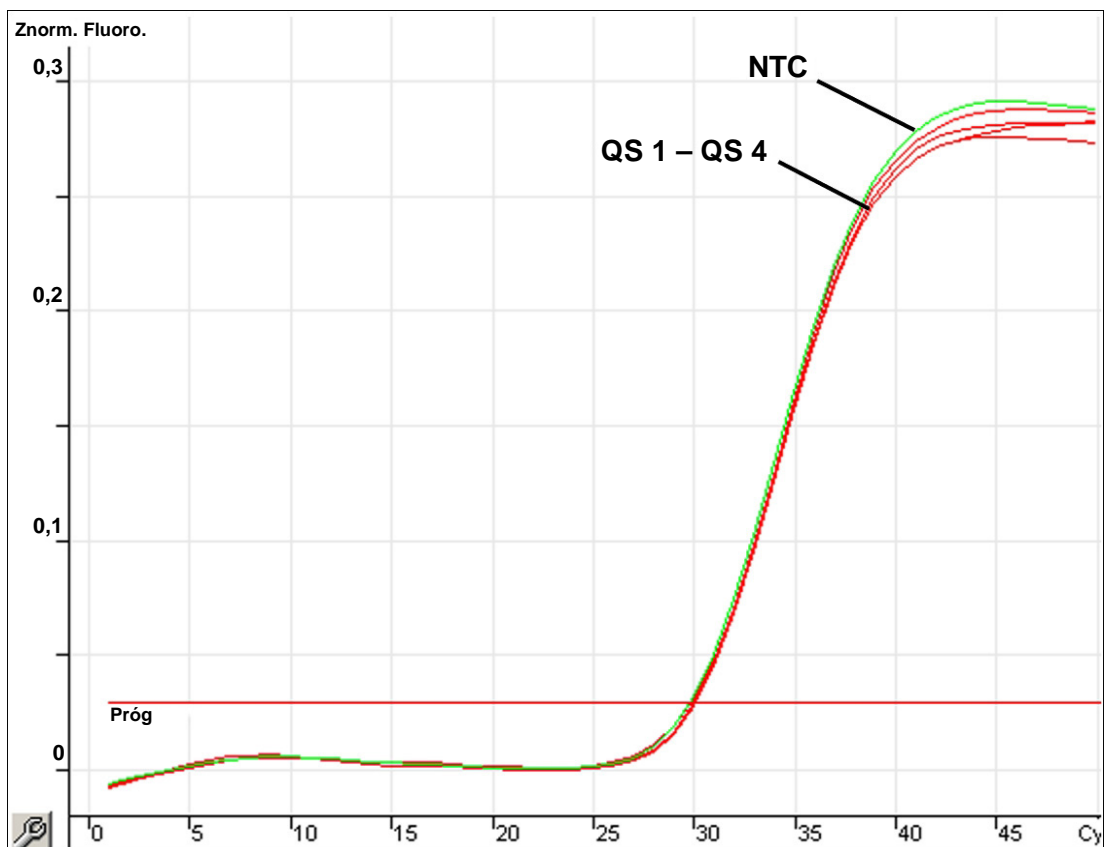
Wynik jest niejednoznaczny.

Informacje dotyczące przyczyn błędów i ich rozwiązywania można znaleźć w części „Rozwiązywanie problemów”, strona 33.

i Należy zauważyć, że w przypadku aparatu Rotor-Gene 3000 odpowiednie kanały to kanał A.FAM i kanał A.ROX.



Ryc. 12. Detekcja wzorców ilościowych (Hep. C Virus RG QS 1–4) w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green). NTC: No template control (kontrola bez matrycy) (kontrola negatywna).



Ryc. 13. Detekcja kontroli wewnętrznej (internal control, IC) w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym (Cycling Orange) z równoczesną amplifikacją wzorców ilościowych (Hep. C Virus RG QS 1–4). NTC: No template control (kontrola bez matrycy) (kontrola negatywna).

Tabela 9. Interpretacja wyników ilościowych





Wynik	Interpretacja
HCV RNA >34 IU/ml	Wynik mieści się w określonym zakresie testu. Prawdopodobieństwo wykrycia RNA wirusa HCV jest >95%. Pozytywny wynik testu jest potwierdzony statystycznie.
HCV RNA <34 IU/ml	Wynik wykracza poza określony zakres testu. Nie można zapewnić odtwarzalności pozytywnych wyników.
Negatywny wynik RNA wirusa HCV	Nie wykryto RNA wirusa HCV.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i testów (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki

Brak sygnału dla kontroli pozytywnych (Hep. C Virus RG QS 1–4) w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green) lub kanale A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Wybrany do analizy danych PCR kanał fluorescencyjny nie spełnia wymagań protokołu |  Do analizy danych wybrać zielony kanał fluorescencyjny (Cycling Green) lub kanał A.FAM dla analitycznej reakcji RT-PCR pod kątem wirusa HCV oraz pomarańczowy kanał fluorescencyjny (Cycling Orange) lub kanał A.ROX dla kontroli wewnętrznej reakcji RT-PCR. |
| b) Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperaturowego w aparacie Rotor-Gene |  Porównać profil temperaturowy z protokołem. Patrz „Protokół: Reakcja PCR i analiza danych”, strona 23. |
| c) Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR |  Sprawdzić etapy procedury według schematu odmierzania pipetą i w razie potrzeby powtórzyć reakcję PCR. Patrz „Protokół: Reakcja PCR i analiza danych”, strona 23. |
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego z odczynników wchodzących w skład zestawu nie były zgodne z zaleceniami zawartymi w części „Przechowywanie” (strona 5) |  Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |

Komentarze i wskazówki

- e) Upłynęła data ważności zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.

Słaby sygnał lub brak sygnału z kontroli wewnętrznej w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym (Cycling Orange) lub kanale A.ROX przy równoczesnym braku sygnału w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green) lub kanale A.FAM

- a) Warunki reakcji PCR nie są zgodne z protokołem
- ⓘ Sprawdzić warunki reakcji PCR (patrz wyżej) i, w razie potrzeby, powtórzyć PCR z prawidłowymi parametrami.
- b) Wystąpiła inhibicja reakcji PCR
- ⓘ Upewnić się, że stosowana jest zalecana metoda izolacji, i ściśle przestrzegać instrukcji producenta.
- ⓘ Upewnić się, że podczas izolacji RNA wykonano zalecany krok dodatkowego wirowania przed elucją w celu usunięcia wszelkich pozostałości etanolu (patrz część „Izolacja RNA”, strona 21).
- c) Podczas izolacji utracono RNA
- ⓘ Jeśli do izolacji dodano kontrolę wewnętrzną, brak sygnału z kontroli wewnętrznej może wskazywać na utratę RNA podczas izolacji. Upewnić się, że stosowana jest zalecana metoda izolacji (patrz „Izolacja RNA”, strona 21) i ściśle przestrzegać instrukcji producenta.
- d) Warunki przechowywania co najmniej jednego z odczynników wchodzących w skład zestawu nie były zgodne z zaleceniami zawartymi w części „Przechowywanie” (strona 5)
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.

Komentarze i wskazówki

- e) Upłynęła data ważności zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.

Sygnaly dla kontroli negatywnych w zielonym kanale fluorescencyjnym (Cycling Green) lub kanale A.FAM podczas analitycznej reakcji PCR

- a) Podczas przygotowywania reakcji PCR doszło do zanieczyszczenia próbki
- ⓘ Powtórzyć reakcję PCR z nowymi odczynnikami w powtórzeniach.
- ⓘ Jeśli to możliwe, zamknąć probówki PCR niezwłocznie po dodaniu próbki badanej.
- ⓘ Upewnić się, że kontrole pozytywne są dodawane za pomocą pipety jako ostatnie.
- ⓘ Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.
- b) Podczas izolacji doszło do zanieczyszczenia
- ⓘ Powtórzyć izolację i reakcję PCR próbki badanej, korzystając z nowych odczynników.
- ⓘ Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.

Literatura

Firma QIAGEN udostępnia obszerną, aktualną internetową bazę danych publikacji naukowych dotyczących produktów QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania umożliwiają znajdowanie potrzebnych artykułów według słów kluczowych lub zastosowań, obszarów badań, tytułów itp.

W celu uzyskania listy pozycji literaturowych należy odwiedzić internetową bazę danych firmy QIAGEN pod adresem www.qiagen.com/RefDB/search.asp lub skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem firmy QIAGEN.

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: 2 mieszaniny Masters, 4 wzorce ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4518263
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (96)	Na 96 reakcji: 2 mieszaniny Masters, 4 wzorce ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4518265
Zestaw QIAamp DSP Virus Kit — do oczyszczania wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiego osocza do celów diagnostycznych in vitro.		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 przygotowań: kolumny wirówkowe QIAamp MinElute®, bufony, odczynniki, probówki, przedłużacze kolumn i złącza VacConnectors	60704
Aparat Rotor-Gene Q MDx i akcesoria		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, instalację i przeszkolenie	9002023

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Aparat do reakcji PCR w czasie rzeczywistym z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Aparat do reakcji PCR w czasie rzeczywistym z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji jednokanałową pipetą w 72 probówkach 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji w standardowej matrycy 8 x 12 przy użyciu 96 probówek 0,2 ml	9018905

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 10 000 reakcji	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 cienkościennych probówek na 1000 reakcji	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 cienkościennych probówek na 1000 reakcji	981008

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Strona celowo pozostawiona pusta

Nabycie tego produktu umożliwia nabywcy stosowanie go na potrzeby usług diagnostycznych in vitro świadczonych dla pacjentów. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkownika wynikającym z nabycia produktu.

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

Umowa ograniczonej licencji

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie przez nabywcę lub użytkownika zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit zgody na następujące warunki:

1. Zestawu *artus* HCV RG RT-PCR Kit można używać wyłącznie zgodnie z dokumentem *artus HCV RG RT-PCR Kit — Instrukcja obsługi* i tylko razem ze składnikami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu, z wyjątkiem przypadków opisanych w dokumencie *artus HCV RG RT-PCR Kit — Instrukcja obsługi* oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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)

