

Март 2015

Наръчник за *artus*[®] HI Virus-1 RG RT-PCR кит



24 (Каталожен номер 4513263)



96 (Каталожен номер 4513265)

Версия 1

IVD

Количествено определяне за ин витро диагностична употреба

Да се използва с Rotor-Gene[®] Q инструменти



REF

4513263, 4513265



1049310EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R5

MAT

1049310EN



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Иновативни технологии за експериментален анализ

QIAGEN е водещ доставчик на иновативни технологии за експериментален анализ, предоставящ възможности за изолиране и определяне съдържанието на биологични проби от всякакъв произход. Нашите модерни, висококачествени продукти и услуги гарантират успех от пробата до самия резултат.

QIAGEN поставя стандарти за:


- Пречистване на ДНК, РНК и протеини
- Анализ на нуклеинови киселини и белтъци
- Микро РНК изследвания и РНК интерференция
- Автоматизация на експерименталните технологии

Мисията ни е да ви помогнем да постигнете изключителни успехи и научни постижения. За повече информация посетете www.qiagen.com.

Съдържание

Съдържание на кита	4
Символи	4
Съхранение	5
Предназначение	5
Ограничения при използване на продукта	6
Предупреждения и предпазни мерки	6
Контрол на качеството	7
Въведение	8
Принцип	8
Информация за патогена	8
Работни характеристики	9
Оборудване и реактиви, които трябва да се осигурят от потребителя	18
Важни забележки	19
Общи предпазни мерки	19
Събиране на проби, съхранение и транспортиране	19
Изолиране на РНК	21
Вътрешна контрола	22
Задаване на праг на PCR анализа	22
Количествено определяне	23
Протокол: PCR и анализ на данните	24
Ръководство за отстраняване на проблеми	34
Референции	37
Информация за поръчки	38

Съдържание на кита

artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит		(24)	(96)
Каталожен номер		4513263	4513265
Брой реакции		24	96
Син	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 реакции	8 x 12 реакции
Виолетов	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 реакции	8 x 12 реакции
Червен	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Червен	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Червен	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Червен	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Зелен	HI Virus-1 RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Бял	Вода (PCR клас)	1000 μl	1000 μl
	Наръчник	 1	1

* Стандарт за количествено определяне.

† Вътрешна контрола.

Символи



Съдържа реактиви, достатъчни за <N> теста



Използвай с



Медицинско средство за ин витро диагностициране



Каталожен номер



Номер на партида

	Номер на материал
	Компоненти
	Съдържа
	Номер
	Гуанидин хидрохлорид
	Номер на компонента за световна търговия
	Температурно ограничение
	Производител
	Консултирайте се с инструкциите за употреба
	Важна забележка

Съхранение

Компонентите на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит трябва да се съхраняват при температури от -30°C до -15°C и те трябва да се поддържат постоянни до изтичането на срока на годност, посочен на етикета. Повтарящо се размразяване и замразяване (повече от два пъти) трябва да се избягва, тъй като това ще намали чувствителността на реактивите за анализа. Ако реактивите се използват епизодично, те трябва да се съхраняват замразени на порции. Съхранението при температури между 2°C и 8°C не трябва да продължава повече от 5 часа.

Предназначение

artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит се използва за *in vitro* тестове за размножаване на нуклеинови киселини с цел количествено определяне на РНК на човешки имунодефицитен вирус тип 1 (HIV-1) в човешка плазма. Този диагностичен кит за тестове се използва чрез прилагане на обратна транскрипционна полимеразна верижна реакция (RT-PCR) и е конфигуриран за приложение с Rotor-Gene Q инструменти. С теста може

да се определи количеството РНК на вирус HIV-1 над обхвата от 120 – 1 x 10⁸ HIV-1 IU/ml. Плазмени проби, съдържащи Група М Подтипове А–Н са валидирани за използване при анализа.

i *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит не може да се използва с Rotor-Gene Q 2plex инструменти.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит е предназначен за използване паралелно с клиничната картина и другите лабораторни маркери за прогнозиране на заболяването и за употреба като помощно средство при оценката на вирусния отговор на антиретровирусното лечение, измерено чрез промени в EDTA плазмените нива на РНК на вируса HIV-1. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит не е предвиден за използване като скринингов тест за HIV или като диагностичен тест за потвърждение наличието на инфекция с вирус HIV.

Ограничения при използване на продукта

Всички реактиви могат да се използват само за ин витро диагностика.

Продуктът трябва да се използва от персонал, специално инструктиран и обучен за извършване само на ин витро диагностични процедури.

Изисква се точно спазване на указанията от ръководството за потребителя за получаване на оптимални PCR резултати.

Трябва да се обръща внимание на сроковете на годност, принтирани върху кутията и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност.

Въпреки, че са редки, мутациите в силно запазени региони на вирусния геном, покрити от праймерите и/или сондите на кита могат да бъдат причина за получаване на резултат с понижени количествени стойности или да не се установи наличието на вируса в тези случаи. Валидността и представянето на дизайна на анализа се преразглеждат периодично.

Предупреждения и предпазни мерки

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация прочетете съответните таблици с данни за безопасността на материалите (SDSs). Те са достъпни „on-line“ в удобни и компактни PDF файлове на адрес www.qiagen.com/safety. Там Вие можете да откриете, разгледате и принтирате SDS таблица за всеки QIAGEN® кит и компонент на кит.

Изхвърляйте пробите и отпадъците от анализите в съответствие с местните процедури и наредби за безопасност.

Контрол на качеството

В съответствие ISO сертифицираната система за контрол на качеството на QIAGEN, всяка партида от *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит се тества според предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на продукта.

Въведение

artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит представлява готова за използване система за откриване на РНК на вирус HIV-1 чрез прилагане на полимеразна верижна реакция (PCR) с Rotor-Gene Q инструменти. HI Virus-1 RG Master A и B съдържат реактиви и ензими за обратна транскрипция и специфично размножаване на 93 bp регион на генома на вирус HIV-1, и за директно откриване на специфичния апликон (amplicon) във флуоресцентен канал „Cycling Green“ на инструмент Rotor-Gene Q или Rotor-Gene 6000, или канал „Cycling A.FAM™“ (източник 470 nm, детектор 510 nm) на инструмент Rotor-Gene 3000.

В допълнение, *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит съдържа втора хетероложна система за размножаване за установяване на възможно PCR инхибиране. Това се открива с вътрешна контрола (IC) във флуоресцентен канал „Cycling Orange“ на Rotor-Gene Q или Rotor-Gene 6000, или канал „A.ROX™“ (източник 585 nm, детектор 610 nm) на инструмент Rotor-Gene 3000. Лимитът на детекция на аналитичния HI Virus-1 RT-PCR (вижте “Аналитична чувствителност”, стр. 9) не е намален. Доставени са външни положителни контроли (HI Virus-1 RG QS 1–4), които дават възможност за определяне на количеството РНК на вируса. За повече информация, вижте “Количествено определяне”, стр. 23.

Принцип

Откриването на патогена чрез полимеразна верижна реакция (PCR) се основава на размножаване на специфични региони на патогенния геном. С помощта на PCR апаратите размноженият продукт се открива в реално време чрез флуоресцентни багрила. Те обикновено са свързани към олигонуклеотидни сонди, които се обвиват по специфичен начин към размножения продукт. Наблюдаването на флуоресцентния интензитет по време на PCR опит (т.е. в реално време) позволява откриването и количественото определяне на акумулирания продукт без да се налага отново да се отварят реакционните епруветки след PCR опита.*

Информация за патогена

Човешкият имунодефицитен вирус (HIV) е ретро вирус, който причинява синдром на придобита имунна недостатъчност (AIDS). Вирусът HIV, който предизвиква инфекции при хората е два типа HIV-1 и HIV-2. Те се различават по своята вирулентност и разпространение. Най-често докладваните случаи на синдром на придобита имунна недостатъчност AIDS в света се дължат на вирус от типа HIV-1. Заразяване с вируса HIV се получава от инфектирана кръв, вагинални течности, майчино мляко и други телесни течности. В тези телесни течности HIV вируса присъства

като свободни вирусни частици и вирус в заразени имунни клетки. Трите основни пътя на предаване са незащитен сексуален контакт, замърсени игли и предаване от заразена майка на нейното бебе при раждането или от майчиното мляко.

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

Вирусът HIV първоначално заразява клетките на имунната система на човека като помощните Т клетки (по-специално CD4⁺). Инфектирането с вируса HIV води до ниски нива на CD4⁺ Т клетки. Когато броят на CD4⁺ Т клетките спадне под критичното ниво, тогава се изгубва осигуряваният от клетките имунитет и тялото прогресивно става по-податливо на опортюнистични инфекции (чести и тежко протичащи инфекции).

Симптомите на синдрома на придобита имунна недостатъчност AIDS се проявяват при напреднал етап на вирусната инфекция с HIV, когато увредената имунна система не може да се бори с опортюнистичните инфекции. На този етап, при заразените човек все повече се развиват симптоми, предизвикани от такива инфекции. Най-честите инфекции включват хронична диария *Cryptosporidia*, цитомегаловирус-индуцирана инфекция на очите, пневмоцистна пневмония, токсоплазмоза и туберкулоза, както и инфекции с бактерии от *Mycobacterium avium* комплекса. В допълнение, често се наблюдава развитие на различни типове рак, като инвазивен цервикален рак, саркома на Капоза или лимфома. Към момента, няма лекарство за синдрома на придобита имунна недостатъчност AIDS, и се смята, че повечето HIV заразени лица вероятно ще умрат от болести, свързани със синдрома на придобита имунна недостатъчност AIDS. Обаче, напредъка в HIV/AIDS терапията, включително тези, които се борят със самия вирус, както и тези, които предотвратяват или лекуват опортюнистичните инфекции, драстично подобряват очакванията за продължителността на живота и качеството на живот на много HIV/AIDS пациенти.

Работни характеристики

Аналитична чувствителност

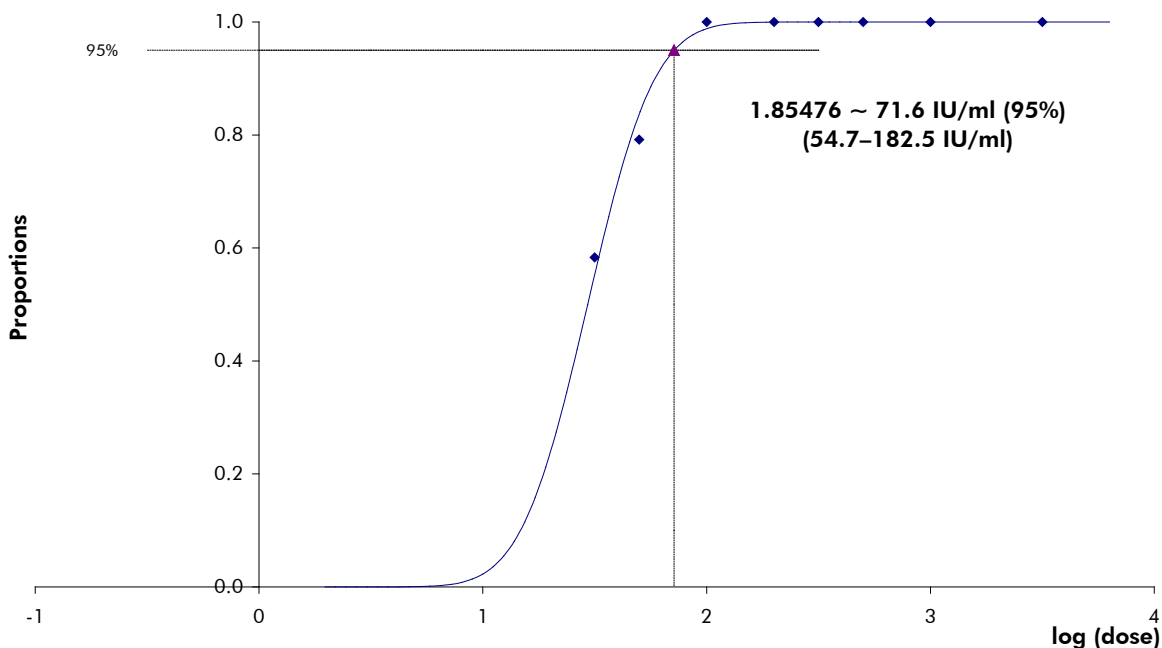
Лимитът на аналитична детекция както и лимитът на аналитична детекция от гледна точка на пречистването (граница на чувствителност) бяха оценени за *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* кит. Лимитът на аналитична детекция от гледна точка на пречистването беше определен чрез използване на HIV положителни клинични проби в комбинация с определен метод на екстракция. За разлика от него, лимитът на аналитична детекция е определен независимо от метода на екстракция като се прилага стандарт с известна концентрация.

За определяне на аналитичната чувствителност на *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* кит бяха използвани стандартни разредени серии от 0.0316 до 31.6 IU*/µl и те бяха анализирани с Rotor-Gene 3000 инструмент в комбинация с *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* кит. Тестовете бяха проведени

през 3 различни дни с по 8 повторения. Резултатите бяха определени с probit анализ. Лимитът на аналитична чувствителност на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит в комбинация с инструмент Rotor-Gene 3000 е 4.5 IU/μl (p = 0.05). Това означава, че има 95% вероятност да се открият 4.5 IU/μl.

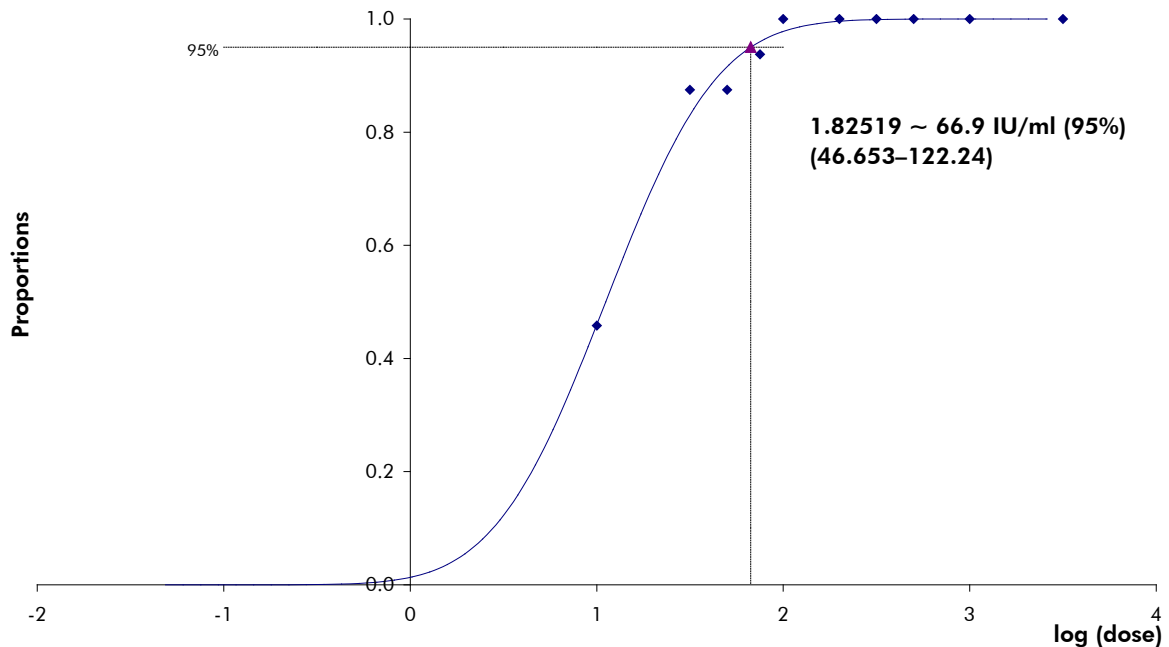
* Стандартът е ин витро транскрибирана РНК концентрацията, на която е калибрирана чрез прилагане на Вторият международен HIV стандарт (WHO).

Аналитичната чувствителност от гледна точка на пречистването (QIAamp® DSP Virus кит, QIAGEN) на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит с Rotor-Gene инструменти беше определена чрез използване на разредени серии на вирусна РНК съгласно Вторият международен стандарт за HIV-1 при спазване на технологията на размножаване на нуклеинова киселина (NAT) от проби (NIBSC Code 97/650) от 10 до 3160 HIV IU/ml напръскани в клинични плазмени проби. Те бяха подложени на процес на извличане на РНК като се използва QIAamp DSP Virus кит (QIAGEN, обем на екстракция: 0.5 ml, обем на елуиране: 25 μl). Всяка от разредените проби беше анализирана с *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит в три различни дни с по 8 повторения. Резултатите бяха определени чрез probit анализ. Графична илюстрация на probit анализ е показана на Фигура 1. Лимитът на аналитична детекция с оглед на пречистването на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит в комбинация с инструмент Rotor-Gene 3000 е 71.6 IU/ml (p = 0.05). Това означава, че има 95% вероятност да бъдат отчетени 71.6 IU/ml.



Фигура 1. **Probit** анализ: **HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000)**. Аналитична чувствителност от гледна точка на пречистването (QIAamp DSP Virus кит, QIAGEN) на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит, използван с инструмент Rotor-Gene 3000.

Лимитът на аналитична детекция от гледна точка на пречистването на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит в комбинация с Rotor-Gene Q/6000 инструмент е 66.9 IU/ml ($p = 0.05$). Това означава, че има 95% вероятност да се отчетат 66.9 IU/ml.



Фигура 2. Probit анализ: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). Аналитична чувствителност от гледна точка на пречистването (QIAamp DSP Virus кит, QIAGEN на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит с инструмент Rotor-Gene 6000.

Специфичност

Спецификата на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит преди всичко се осигурява от избора на праймери и сонди, както и от установените строги условия на реакцията. Праймерите и сондите бяха проверени за възможни хомологии към всички секвенции в публикуваните генетични банки чрез сравнителен анализ. По този начин е осигурена откриваемостта на всички съответстващи генотипове чрез сравняване на базите с данни и чрез PCR опит с инструменти Rotor-Gene със следните генотипове (вижте Таблица 1).

Нещо повече, спецификата беше валидирана със 100 различни HIV отрицателни плазмени проби. Те не генерират сигнали с HIV специфични праймери и сонди, които са включени в HI Virus-1 RG Master.

Потенциална кръстосана реактивност на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит беше тествана с контролните групи, посочени в Таблица 2. Никой от тестваните патогени не беше реактивен. Не се наблюдаваше кръстосана реактивност със смесени инфекции.

Таблица 1. Тестване на спецификата на съответните генотипове

Вирус	Генотип	Източник	HIV (FAM)	Вътрешна контрола (ROX)
HI Virus-1	A	NIBSC*	+	+
HI Virus-1	B	NIBSC	+	+
HI Virus-1	C	NIBSC	+	+
HI Virus-1	D	NIBSC	+	+
HI Virus-1	E	NIBSC	+	+
HI Virus-1	F	NIBSC	+	+
HI Virus-1	G	NIBSC	+	+
HI Virus-1	H	NIBSC	+	+

* Национален институт за Биологични стандарти и контрол, Хертфордшир.

Таблица 2. Тестване на спецификата на кита с потенциално кръстосано реагиращи патогени

Контролна група	HIV (Cycling Green или Cycling A.FAM)	Вътрешна контрола (Cycling Orange или Cycling A.ROX)
Вирус Хепатит А	–	+
Вирус Хепатит В	–	+
Вирус Хепатит С	–	+
Човешки херпес вирус 1 (Херпес симплекс вирус 1)	–	+
Човешки херпес вирус 2 (Херпес симплекс вирус 2)	–	+
Човешки херпес вирус 3 (Вирус Варицела зостер)	–	+
Човешки херпес вирус 5	–	+

(Цитомегаловирус)

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 2. Продължение

Контролна група	HIV (Cycling Green или Cycling A.FAM)	Вътрешна контрола (Cycling Orange или Cycling A.ROX)
Човешка Т клетъчна левкемия	–	+
Вирусен тип 1 и 2		
Ентеровирус	–	+
Парвовирус В19	–	+
Жълта треска	–	+
<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>	–	+

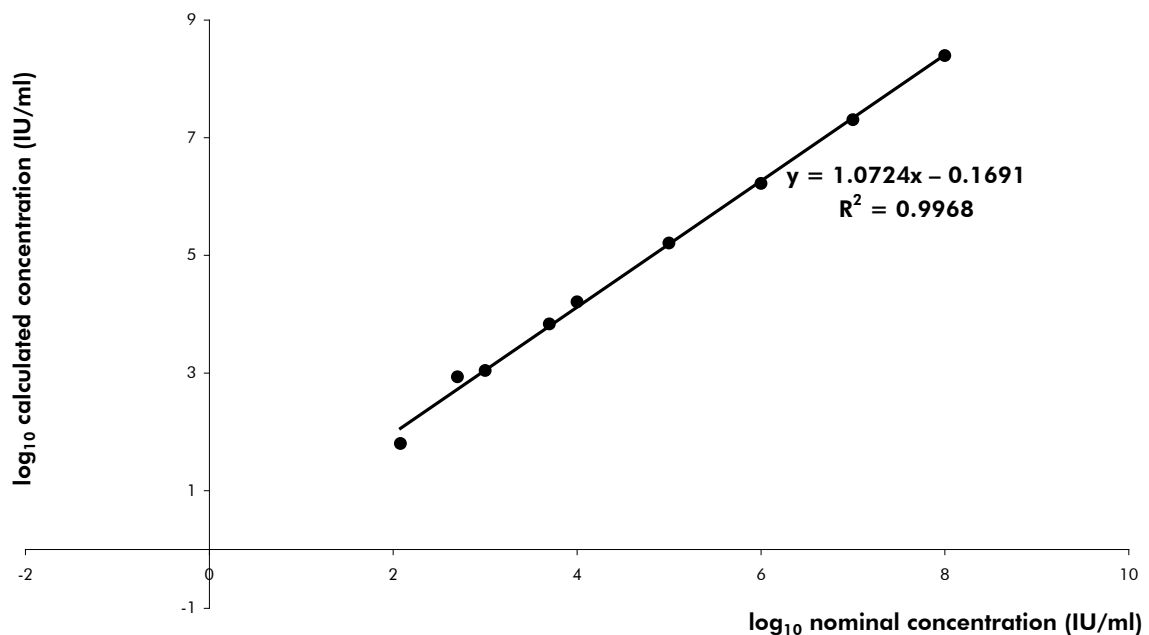
Линеен обхват

Линейният обхват (аналитично измерване) на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит беше определен чрез анализиране на разредени серии HIV ин витро копия от 1×10^8 IU/ μ l до 1 IU/ μ l. Разредените серии бяха калибрирани съгласно WHO Международният стандарт за РНК на вирус HIV.

Всяка разредена проба беше тествана с повторения ($n = 8$) като беше използван *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит с Rotor-Gene инструменти.

Линейният обхват на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит е определен да покрива концентрации от 5 IU/ μ l до поне 1×10^8 IU/ μ l.

Линейният обхват от гледна точка на пречистването на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит беше определен чрез анализиране на разредени серии от OptiQuant HIV-1 панел за количествено определяне на РНК от 1×10^8 IU/ml до 120 IU/ml. Пречистването е извършено с повторения с използване на QIAamp DSP Virus кит (обем на екстракция: 0.5 ml, обем на елуиране: 25 μ l). Всяка от деветте проби беше анализирана с използване на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. Линейният обхват от гледна точка на пречистването на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит е определен да покрива концентрации от 120 IU/ml до поне 1×10^8 IU/ml (вижте Фигура 3).



Фигура 3. Линеен обхват на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. Изчисление на линейният обхват. Правата линия беше определена чрез линейна регресия на \log_{10} изчислени концентрации с \log_{10} номинални концентрации. Уравнението на регресионната линия е изписано на фигурата.

Точност

Данните за точността на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит при работа с Rotor-Gene инструменти дават възможност за определяне на общата вариация на анализа. Общата вариация се състои от интра-анализна променливост (променливост на множеството резултати от проби с еднаква концентрация при провеждане на един експеримент), интер-анализна променливост (променливост на множество резултати от анализ, генериран на различни инструменти от един и същи тип от различни оператори в една лаборатория) и интер-партидна променливост (променливост на множеството резултати от анализ, при който са използвани различни партии). Получените данни са използвани за определяне на стандартното отклонение, вариацията и коефициента на вариация за дадения патоген и PCR обработка на вътрешна контрола. Данните за точността на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит са събрани като е приложен стандарта за количествено определяне на най-ниската концентрация (QS 4; 10 IU/μl). Тестовете бяха проведени с 8 повторения. Данните за точността бяха изчислени на базата на C_T стойностите на кривите на намножаване (C_T: праг на цикъла, вижте Таблица 3). Въз основа на тези резултати, общото статистическо разпределение на дадена проба с посочената концентрация е 1.66% (C_T) и 2.15% (C_T) за откриване на вътрешната контрола. Тези стойности бяха базирани на съвкупността на всички единични стойности на определените променливи.

Таблица 3. Данни за точността на основата на C_T стойности

	C _T стойност	Стандартно отклонение	Коефициент на вариация (%)
Интра-анализна променливост: HI Virus-1 RG QS 4	35.62	0.45	1.26
Интра-анализна променливост: Вътрешна контрола	31.24	0.18	0.58
Интер-анализна променливост: HI Virus-1 RG QS 4	35.75	0.56	1.55
Интер-анализна променливост: Вътрешна контрола	31.65	0.36	1.13
Интер-партидна променливост: HI Virus-1 RG QS 4	35.40	0.61	1.73
Интер-партидна променливост: Вътрешна контрола	31.20	0.55	1.76
Total variance: HI Virus-1 RG QS 4	35.58	0.59	1.66
Обща вариация: Вътрешна контрола	31.40	0.67	2.15

Безпроблемна работа на кита

Потвърждението на безпроблемната работа позволява определяне на общия процент на възникване на проблеми при *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR китове. За да се потвърди безпроблемната работа на кита, 100 отрицателни към вирус HIV плазмени проби бяха напръскани в 4.5 IU/μl елуиран обем от контролна РНК на вирус HIV (приблизителна тройна концентрация на лимита на аналитична чувствителност). След извличането чрез използване на QIAamp DSP Virus кит, тези проби бяха анализирани с *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. При всичките проби с HIV вирус процентът на поява на проблеми беше 0%. В допълнение, безпроблемната работа на вътрешната контрола беше оценена чрез пречистване и анализиране на 100 отрицателни към Хепатит С плазмени проби. Общият процент на отчитане на проблеми беше 0%. Не се наблюдаваха инхибирания. Поради това, твърдим, че процентът на безпроблемна работа на *artus* HCV RG RT-PCR кит е $\geq 99\%$.

Възпроизводимост

Данните за възпроизводимостта позволяват да се извършва периодична оценка на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит както и да се сравнява неговата ефикасност с тази на други продукти. Тези данни са получени чрез участие в установени програми за пригодност.

Диагностична оценка

artus HI Virus-1 RG RT-PCR китът беше оценен в изследване. С цел сравняване на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит с COBAS® TaqMan® HIV-1 тест бяха анализирани 241 плазмени проби със задна дата. Всички плазмени проби преди това са били анализирани с положителна или отрицателна оценка като е използван COBAS® TaqMan® HIV-1 тест рутинно извършване на диагностика.

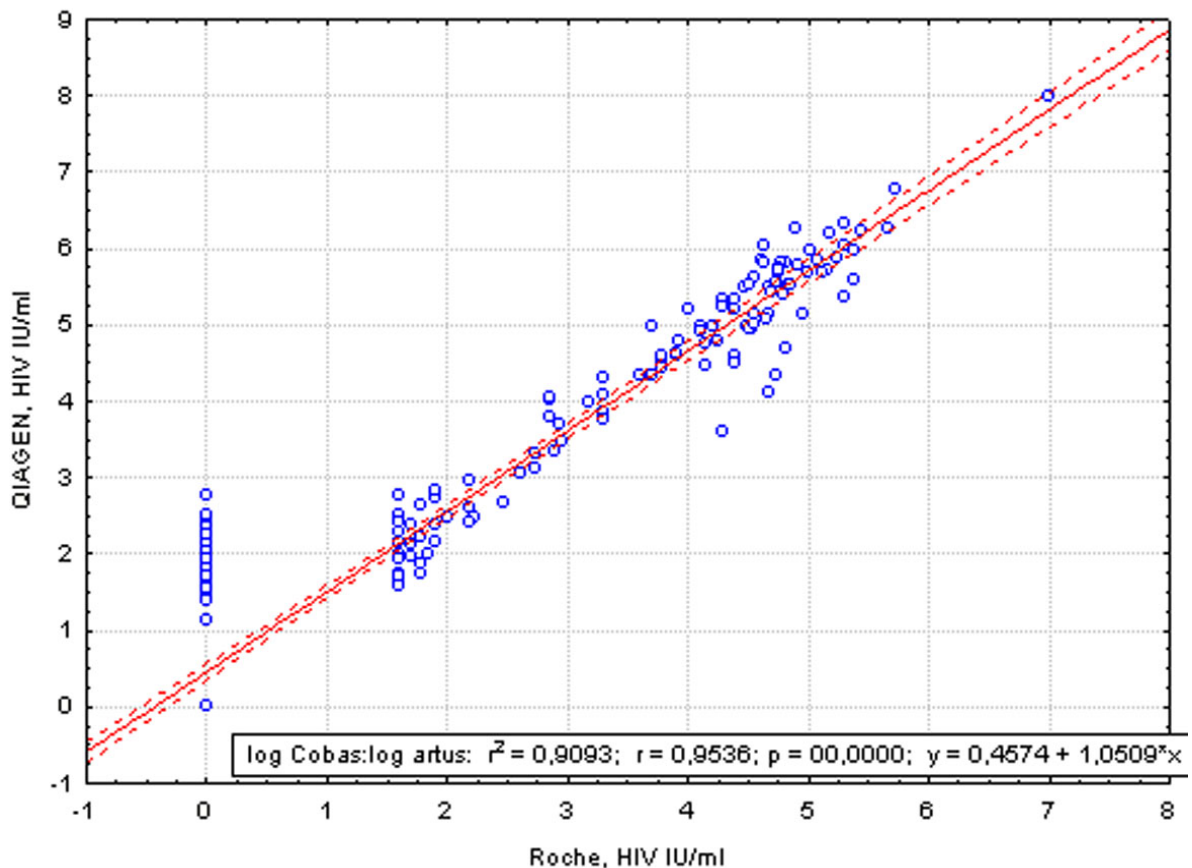
Изолирана беше РНК на вирус HIV за тестване на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит като беше използван QIAamp DSP Virus кит, и анализът беше извършен на Rotor-Gene 6000 инструмент. За сравнително изследване с COBAS TaqMan HIV-1 тест, РНК на вирус HIV беше анализирана според инструкциите, дадени от производителя, предоставени с пакета. Получените резултати чрез *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит бяха сравнени с тези от COBAS TaqMan HIV-1 теста (вижте Таблица 4 и Фигура 4).

105 от 126 проби с положителен резултат от теста с COBAS TaqMan HIV-1 също показаха положителен резултат с *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. 113 от 115 проби с отрицателен резултат от теста с COBAS TaqMan HIV-1 също показаха отрицателен резултат с *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. Всичките 137 проби, които показаха отрицателен резултат от теста с COBAS TaqMan HCV също показана отрицателен резултат с *artus* HCV RG RT-PCR кит.

Ако вземем резултатите от теста с COBAS TaqMan HIV-1 като референция, диагностичната чувствителност е 98.1%, и диагностичната специфичност е 84.3%.

Таблица 4. Резултати от 241 EDTA плазмени проби, анализирани със задна дата

		COBAS TaqMan HIV-1 тест		
		+	-	Общо
artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit	+	105	21	126
	-	2	113	115



Фигура 4. Сравнение на COBAS TaqMan HIV-1 тест (Roche, HIV; с пречистване на пробите чрез COBAS AmpliPrep система) с artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит (QIAGEN, HIV; с пречистване на пробите с използване на QIAamp DSP Virus кит). Връзката на количествените резултати от двете системи за тестване (Таблица 4) беше анализирана чрез линейна регресия. Резултатите от двата кита са показани в XY (разпределение) графика с log–log скала.

Оборудване и реактиви, които трябва да се осигурят от потребителя

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация прочетете съответните таблици с данни за безопасността на материалите (SDSs), предоставени от доставчика на продукта.

- Кит за изолиране на РНК (вижте [“Изолиране на РНК”](#), стр. 21)
- Пипети (регулируеми)*
- Стерилни пипетни типчета с филтри
- Вортекс смесител *
- Настолна центрофуга * с ротор за 2 ml реакционни епруветки
- Rotor-Gene Q или Rotor-Gene инструмент*† с флуоресцентни канали за Cycling Green и Cycling Orange или с флуоресцентни канали за Cycling A.FAM и Cycling A.ROX.
- Rotor-Gene Q софтуерна версия 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 софтуерна версия 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 софтуерна версия 6.0.23) или по-нова
- Стрипчета и капачки, 0.1 ml, за използване с 72-ямков ротор (каталожен номер 981103 или 981106)
- Алтернативно: PCR епруветки, 0.2 ml, за използване с 36-ямков ротор (каталожен номер 981005 или 981008)
- Охладителен блок (Блок за зареждане на 72 x 0.1 ml епруветки, каталожен номер 9018901, или Блок за зареждане на 96 x 0.2 ml епруветки, каталожен номер 9018905).

* Уверете се, инструментите са били проверени и калибрирани според препоръките на производителя.

† *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит не трябва да се използва с Rotor-Gene Q 2plex инструменти.


Важни забележки

Общи предпазни мерки


Потребителят винаги трябва да отделя внимание на следното:

- Да използва стерилни пипетни филтърни типчета.
- Да съхранява и изважда положителни материали (проби, положителни контроли и апликони) отделно от всички други реактиви и да ги добавя към реакционната смес в пространствено отделено съоръжение.
- Размразявайте всички компоненти при стайна температура (15–25°C) преди да започнете опита
- Когато се размразят, смесете компонентите (чрез повтарящо се накапване нагоре надолу или чрез импулсно смесване с Вортекс) и центрофугирайте за кратко.
- Работете бързо и пазете компонентите върху лед или в охладителен блок (72/96-ямков блок за зареждане).

Събиране на проби, съхранение и транспортиране

 Всички проби трябва да се възприемат като потенциално заразен материал.

Само следните проби са разрешени, за които трябва стриктно да се спазват следните правила и инструкции за събиране, транспортиране и съхранение.

 Текущите проучвания сочат EDTA или цитратна плазма като най-подходящи пробни материали за откриване на вирус HIV. Затова, ние Ви препоръчваме да използвате тези материали с *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* кит.

Вътрешното валидиране на *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* кит беше извършено чрез използване на човешки EDTA плазмени проби. Други пробни материали не са валидирани. Моля, използвайте само препоръчаният кит за изолиране на РНК (вижте “Изолиране на РНК”, стр. 21) за подготовка на проби.

При използването на определени материали за проби трябва да се спазват точно конкретните инструкции относно събиране, транспортиране и съхранение.

Вземане на проби

Всяко изтегляне на кръв причинява нараняване на кръвоносните съдове (артерии, вени, капиляри). Трябва да се използва само безвреден и стерилен материал. Предлагат се подходящи консумативи за еднократна употреба за вземане на кръв. За венозни пункции не трябва да се

използват игли за капиляри, тъй като те са прекалено фини. Венозната кръв трябва да се изтегля от подходящи участъци, близо до сгъвката на лакътя, предмишницата или задната част на ръката. Кръвта трябва да се взема в стандартни епруветки за събиране на проби (с червена капачка, Sarstedt или подобни епруветки, предлагани от друг производител). Трябва да се изтегля 5–10 ml EDTA кръв. Епруветките да се разклащат над главата директно след вземането на пробата (8 пъти, без да разбърквате).

i Не трябва да се използват проби от хепаринизирани лица (виж “Интерфериращи вещества”, стр. 20).

Съхранение на пробите

Цялата кръв трябва да се раздели на плазма и клетъчни компоненти чрез центрофугиране за 20 минути при 800–1600 x g в рамките на 6 часа. Изолираната плазма трябва да се прехвърли в стерилни полипропиленови епруветки. Чувствителността на анализа може да бъде намалена, ако замразите пробите по навик или ги съхранявате за по-дълъг период от време. Вирусната РНК в капсулата е стабилна за дни, ако се съхранява при 4°C, за седмици, ако се съхранява при –20°C, и дори за месеци и години, ако се съхранява при –70°C.*

Транспортиране на пробите

Пробите по принцип трябва да се транспортират в нечуплив транспортен контейнер. По този начин може да се избегне потенциалната опасност от изтичане на заразен материал. Пробите трябва да се транспортират като се спазват местните и национални инструкциите за транспортиране на патогенен материал.†

Пробите трябва да се транспортират в рамките на 6 часа. Ние не Ви препоръчваме да съхранявате пробите там, където те са били взети. Възможно е пробите да се изпращат по пощата, като се спазват законовите инструкции за транспортиране на патогенен материал. Ние Ви препоръчваме да изпращате пробите по куриер. Кръвните проби трябва да се транспортират охладени (2–8°C), а отделената плазма дълбоко замразена (–15 до –30°C).

Интерфериращи вещества

Повишените нива на билирубин (≤ 15 mg/dl) и липиди (≤ 800 mg/dl) и хемолитични проби не оказват влияние върху системата. Хепаринът (≥ 10 IU/ml) оказва въздействие върху PCR. Пробите, които са събрани в епруветки, съдържащи хепарин като антикоагулант, не трябва да се използват. Също така, не трябва да се използват проби от хепаринизирани пациенти.

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

† Международна асоциация на въздушните превозвачи (IATA). Наредби и указания за превоз на опасни товари.

Изолиране на РНК

QIAamp DSP Virus кит (QIAGEN, каталожен номер 60704) е валидиран за пречистване на РНК на вируса от човешка плазма за използване с *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит. Извършете пречистването на вирусната РНК според инструкциите, дадени в наръчника *QIAamp DSP Virus Kit*.

i Използването на преносител на РНК е критично за ефикасността на извличането и следователно за добива на ДНК/РНК. За да се повиши стабилността на преносителя на РНК, доставен в QIAamp DSP Virus кита, ние препоръчваме да работите според информацията за разтваряне и съхранение на преносителя на РНК, дадена в ръководството с инструкции (“Подготвяне на реактиви и буфери”).

Преди началото на всяко извличане, трябва да се приготви прясна смес от лизисен буфер и преносител на РНК (и вътрешна контрола, където е приложимо, вижте “Вътрешна контрола”, по-надолу) според схемата на накапване в Таблица 5.

Таблица 5. Схема на накапване, която се използва с QIAamp DSP Virus кит

Брой на пробите	1	12
Лизисен буфер (AL)*	550 µl	6600 µl
Преносител на РНК (1 µg/µl)	6.2 µl	74.4 µl
Общ обем	556.2 µl	6674.4 µl
Обем за извличане	500 µl	500 µl each

* Съдържа гуанидин хидрохлорид; вижте наръчника за *QIAamp DSP Virus* кит за информация, свързана с безопасността.

i Използвайте прясно приготвената смес от лизисен буфер и преносител на РНК за извличане веднага. Не можете да съхранявате тази смес.

i Вътрешната контрола на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит може да се използва директно при процедурата за изолиране (вижте “Вътрешна контрола”, по-надолу).

Вътрешна контрола

Доставена е вътрешна контрола (HI Virus-1 RG IC). По този начин потребителят може едновременно да контролира процедурата за изолиране на РНК и да проверява за възможно PCR инхибиране. За тази цел, добавете вътрешната контрола към изолираното вещество в съотношение от 0.1 µl на 1 µl елуиран обем. Например, чрез използване на QIAamp DSP Virus кит, РНК се елуира в 60 µl буфер за елуиране (AVE). Следователно, първоначално трябва да се добавят 6 µl от вътрешната контрола.

i Вътрешната контрола и преносителят на РНК (вижте „[Изолиране на РНК](#)“ стр.20) трябва да се добавят само към сместа от лизисен буфер и материала на пробата или директно към лизисния буфер.

Вътрешната контрола не трябва да се добавя директно към материала на пробата. Ако я добавяте към лизисния буфер, моля да отбележите, че сместа от вътрешна контрола и лизисен буфер-преносител на РНК трябва да е пряко приготвена и да се използва веднага (съхраняването на сместа на стайна температура или в хладилник само за няколко часа може да доведе до проблем с вътрешната контрола и намалена ефикасност на извличането).

i Не добавяйте вътрешната контрола и преносителят на РНК директно към пробата.

Вътрешната контрола може евентуално да се използва за проверка на вероятно PCR инхибиране. За тази цел, добавете вътрешната контрола директно към сместа от HI Virus-1 RG Master A и HI Virus-1 RG Master B, както е описано в стъпка 2b на протокола (страница 254).

Задаване на праг на PCR анализа

Оптималните прагови настройки за дадена комбинация на Rotor-Gene Q инструмент и *artus* RG PCR кит трябва да се определи емпирично чрез тестване на всяка отделна комбинация, тъй като тя е относителна стойност, зависеща от общия диагностичен работен поток. Като стартова точка, за праг може да се зададе първоначална стойност от 0.04 за анализиране на първия PCR опит, но тази стойност трябва да се настрои много точно в сравнителен анализ на следващите опити от работния поток. Прагът трябва да се настрои ръчно точно над фоновия сигнал на отрицателните контроли и отрицателните проби. Значимата прагова стойност, изчислена при тези експерименти е много вероятно да работи при повечето бъдещи опити, но потребителят въпреки това трябва периодично да преглежда генерираната прагова стойност. Праговата стойност обикновено е в диапазона от 0.03–0.05 и трябва да се закръглява до не повече от три знака след десетичната запетая.

Количествено определяне

Приложените стандарти за количествено определяне (HI Virus-1 RG QS 1–4) се обработват като предходните пречистени проби и за тях се използва същия обем (20 µl). За генериране на стандартна крива с Rotor-Gene Q инструменти, трябва да се използват всичките четири количествени стандарта и да се дефинират в диалоговата кутия “Редактиране на проби” като стандарти със съответните специфични концентрации (вижте ръководството за потребителя на инструмента).

i Стандартите за количествено определяне са дефинирани като IU/µl.* Трябва да се приложи следната формула за конвертиране на стойностите, определени чрез използване на стандартна крива в IU/ml от материала на пробата:

$$\text{Резултат (IU/ml)} = \frac{\text{Резултат (IU/µl)} \times \text{Елуиран обем (µl)}}{\text{Обем на пробата (ml)}}$$

По принцип първоначалният обем на пробата трябва да се въведе в посочената по-нагоре формула. Това трябва да се има предвид, когато обема на пробата е бил променен преди извличането на нуклеинова киселина (например, намаляване на обема при центрофугиране и увеличаване на обема при добавяне на допълнителен обем, необходим за изолиране).

Коефициент на преобразуване

1 IU/ml отговаря на 0.50 копия/ml за откриване на РНК на вирус HIV-1 с инструмент Rotor-Gene Q в комбинация с ръчна подготовка на проби с използване на QIAamp DSP Virus кит. Коефициентът на преобразуване е приближение основано на усреднен фактор в динамичния обхват на анализа.

* Стандартът е калибриран като е използван Първият международен стандарт за вирус HIV (WHO).

Протокол: PCR и анализ на данните

Важни точки преди да стартиране

- Преди да започнете процедурата, прочетете “Важни забележки”, стр. 19–23.
- Отделете време, за да се запознаете с Rotor-Gene Q преди да стартирате протокола. Прочетете ръководството за потребителя на инструмента.
- Уверете се, че поне един стандарт за количествено определяне, както и поне една отрицателна контрола (вода, PCR клас) са включени към PCR опита. За да генерирате крива на стандартите, използвайте всичките четири стандарта за количествено определяне, които са доставени (HI Virus-1 RG QS 1–4) при всеки PCR опит.

Действия, които трябва да извършвате преди стартиране

- Уверете се, че охладителният блок (аксесоар към Rotor-Gene Q инструмента) е предварително охладен до температури 2–8°C.
- Преди всяко използване, всички реактиви трябва да се размразят напълно, да се смесят (чрез повтарящо се накапване нагоре надолу или чрез бърза обработка с Вортекс) и да се центрофугират за кратко.

Процедура

1. Поставете необходимия брой PCR епруветки в адаптерите на охладителния блок.
2. Ако използвате вътрешна контрола за следене на процедурата по изолиране на РНК и за проверка за вероятни PCR инхибирания, следвайте стъпка 2a. Ако използвате вътрешна контрола изключително и само за проверка за вероятни PCR инхибирания, следвайте стъпка 2b
- 2a. Вече е добавена вътрешна контрола към изолирания материал (вижте “Вътрешна контрола”, стр. 22). В този случай, подгответе мастер микс според Таблица 6.

Реакционната смес обикновено съдържа всичките компоненти, които са необходими за PCR опит с изключение на пробата.

Таблица 6. Подготовка на мастер микс (вътрешна контрола, използвана за следене изолирането на РНК и проверка за PCR инхибиране)

Брой на пробите	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	0 µl	0 µl
Общ обем	30 µl	360 µl

- 2b. Вътрешната контрола трябва да се добави директно към сместа от HI Virus-1 Master A и HI Virus-1 Master B. В този случай, подгответе мастер микс според Таблица 7.**

Реакционната смес обикновено съдържа всичките компоненти, които са необходими за PCR опит с изключение на пробата.

Таблица 7. Подготовка на мастер микс (вътрешна контрола, използвана само за проверка за PCR инхибиране)

Брой на пробите	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	2 µl	24 µl
Общ обем	32 µl*	384 µl*

* Увеличеният обем поради добавяне на вътрешната контрола не се взема под внимание при подготовката на PCR анализа. Чувствителността на системата за откриване не е нарушена.

- 3. Накапете по 30 µl от сместа „мастер микс“ във всяка PCR епруветка. След това добавете 20 µl от елуираната РНК проба (вижте Таблица 8). Съответно, трябва да се използват 20 µl от поне един от стандартите за количествено определяне (HI Virus-1 RG QS 1–4) като положителна контрола и 20 µl вода (Вода, PCR клас) като отрицателна контрола.**

Таблица 8. Подготовка на PCR опит

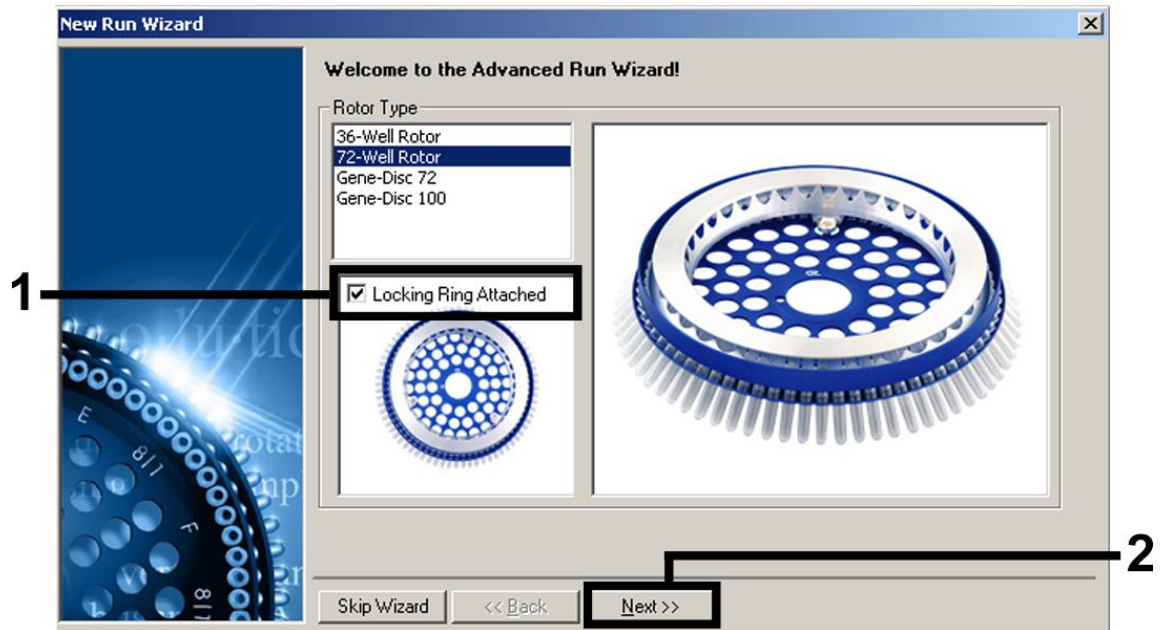
Брой на пробите	1	12
Смес „Master mix“	30 µl	30 µl each
Проба	20 µl	20 µl each
Общ обем	50 µl	50 µl each

4. Затворете PCR епруветките. Уверете се, че заключващият пръстен (аксесоар на Rotor-Gene инструмент) е поставен отгоре на ротора, за да възпрепятства инцидентно отваряне на епруветките по време на опита.
5. За откриване на РНК на вирус HIV-1, създайте температурен профил като спазвате следните стъпки.

Задаване на общите параметри на опита	Фигури 5, 6, 7
Обратно транскрибиране на РНК	Фигура 8
Първоначално активиране на ензим за горещ старт	Фигура 9
Намножаване на комплементарна ДНК	Фигура 10
Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал	Фигура 11
Стартиране на опита	Фигура 12

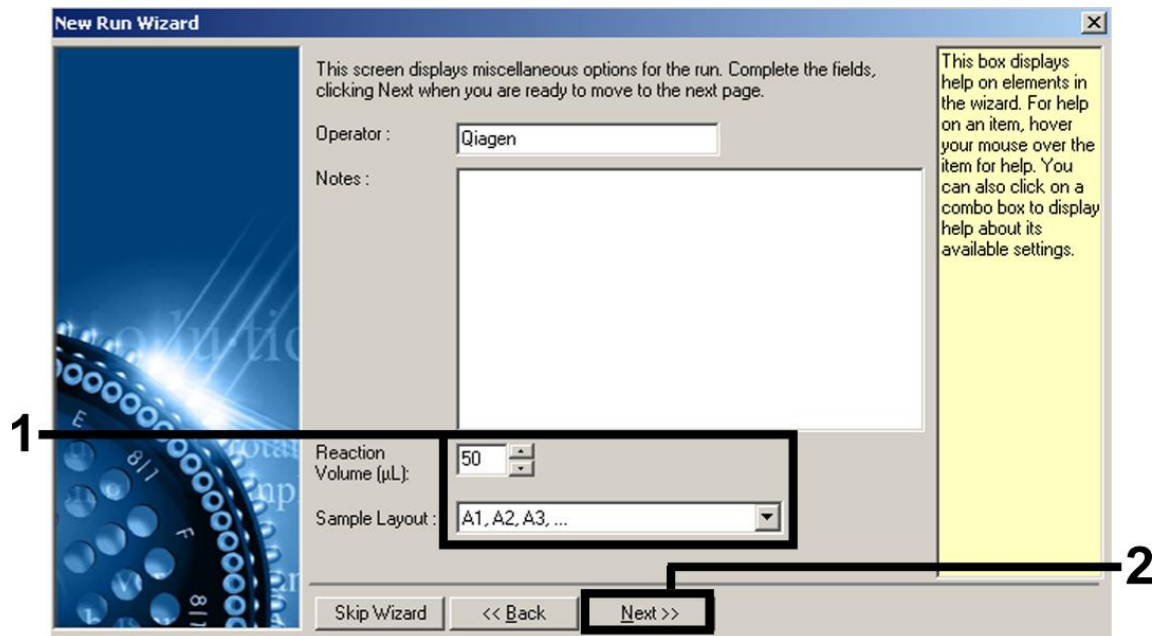
Всички спецификации се отнасят за Rotor-Gene Q софтуерна версия 1.7.94, Rotor-Gene 6000 софтуерни версии 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, и Rotor-Gene 3000 софтуерна версия 6.0.23. При нужда от допълнителна информация за програмиране на Rotor-Gene инструменти можете да прочетете ръководството за потребителя на инструмента. На илюстрациите тези настройки са оградени с удебелени черни линии. Включени са илюстрации за Rotor-Gene Q инструменти. Когато се изискват различни стойности за Rotor-Gene 3000, тези разлики са описани в текста.

6. Първо, отворете диалоговия прозорец “New Run Wizard” (Фигура 5). Маркирайте кутийката “Locking Ring Attached” с отметка и кликнете върху “Next”.



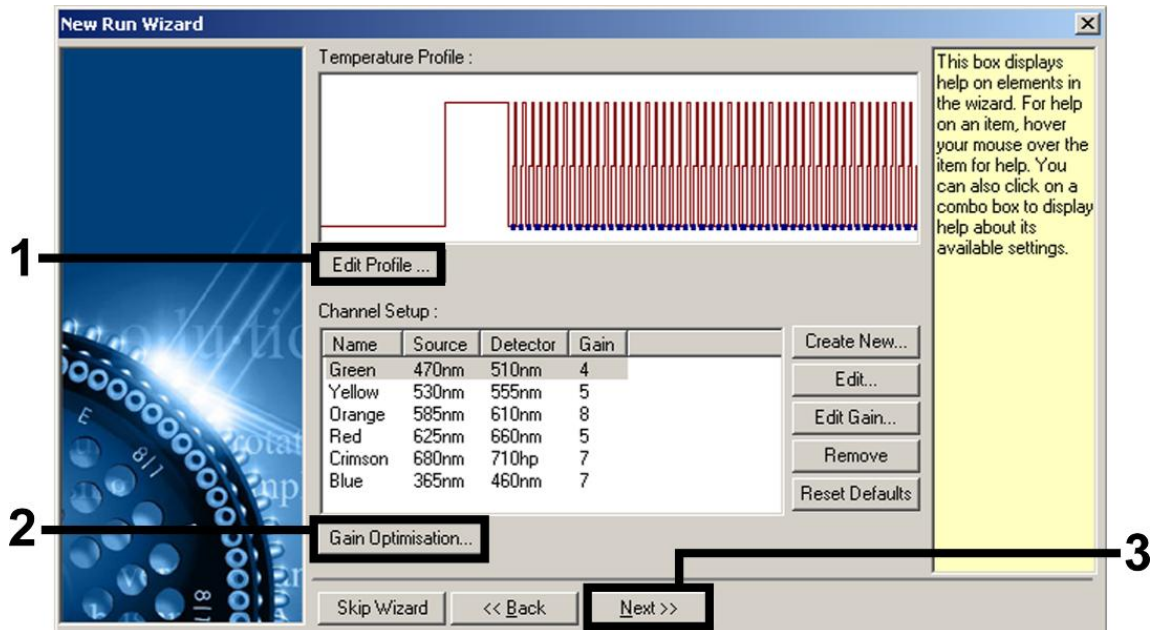
Фигура 5. Диалогов прозорец „New Run Wizard”

7. Изберете 50 за PCR реакционен обем и кликнете върху “Next” (Фигура 6).

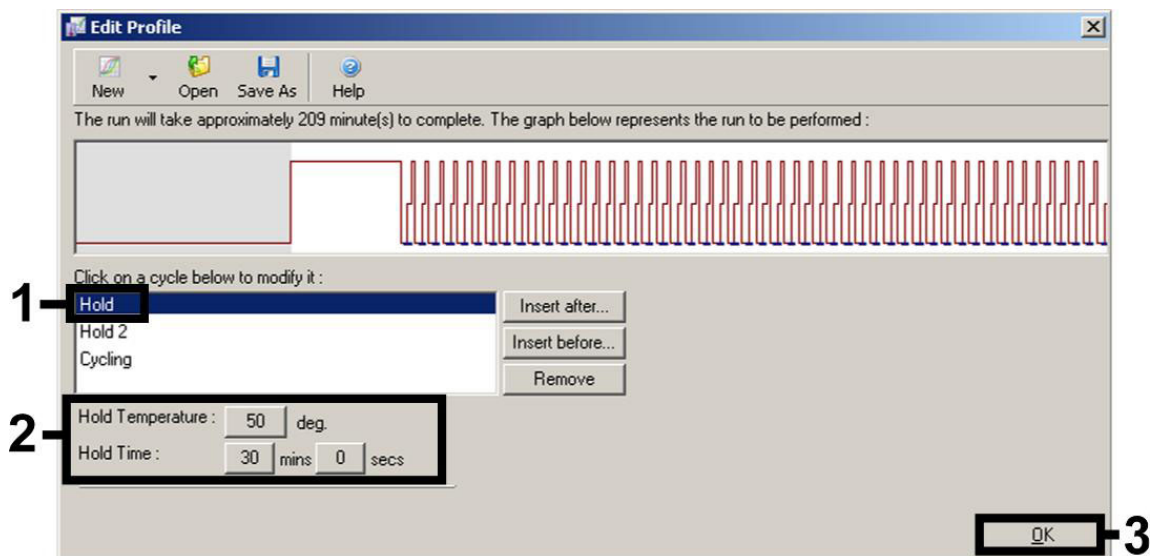


Фигура 6. Задаване на общи параметри на опита.

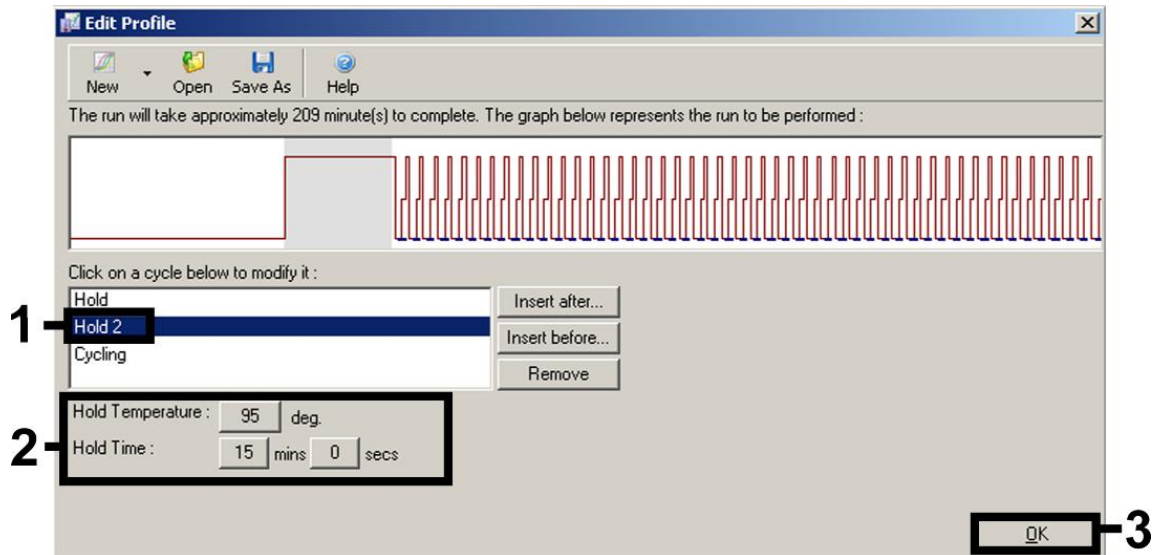
8. Кликнете върху бутона “Edit Profile” в следващия диалогов прозорец “New Run Wizard” (Фигура 7), и програмирайте температурния профил както е показано на Фигурите 7–10).



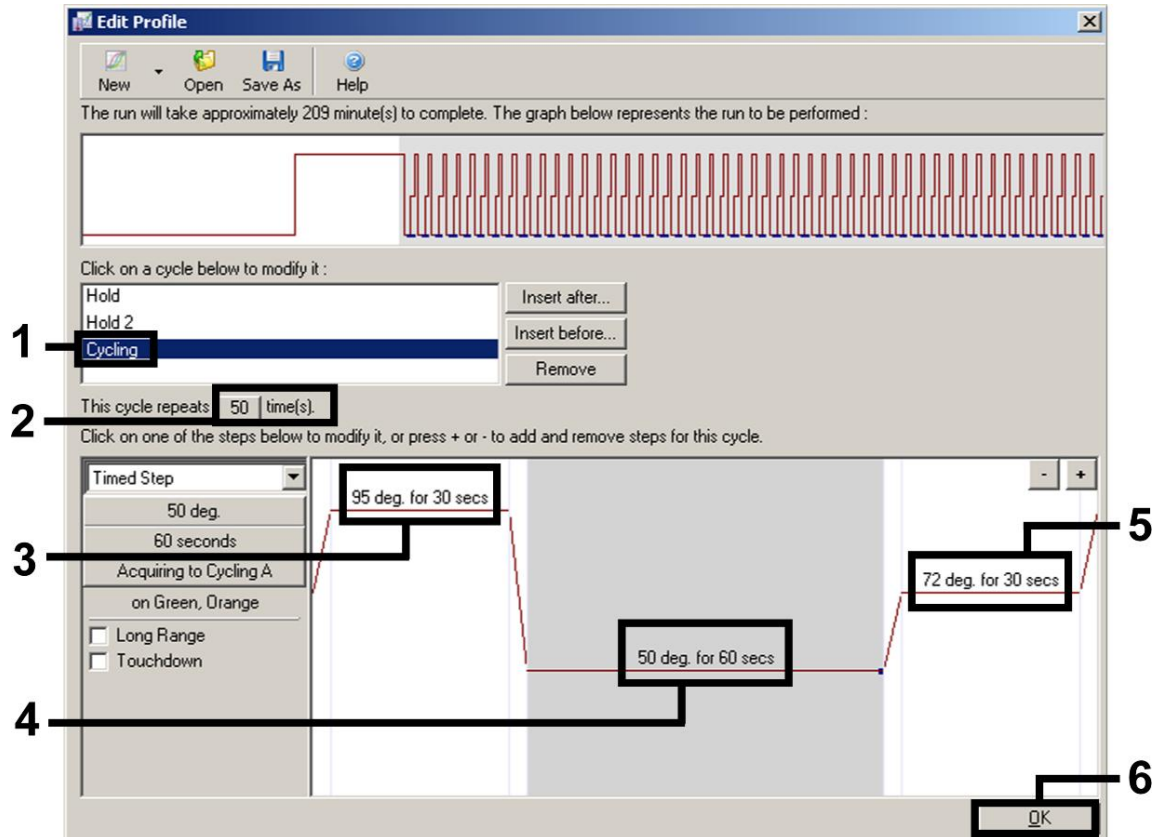
Фигура 7. Редактиране на профила.



Фигура 8. Обратно транскрибиране на РНК

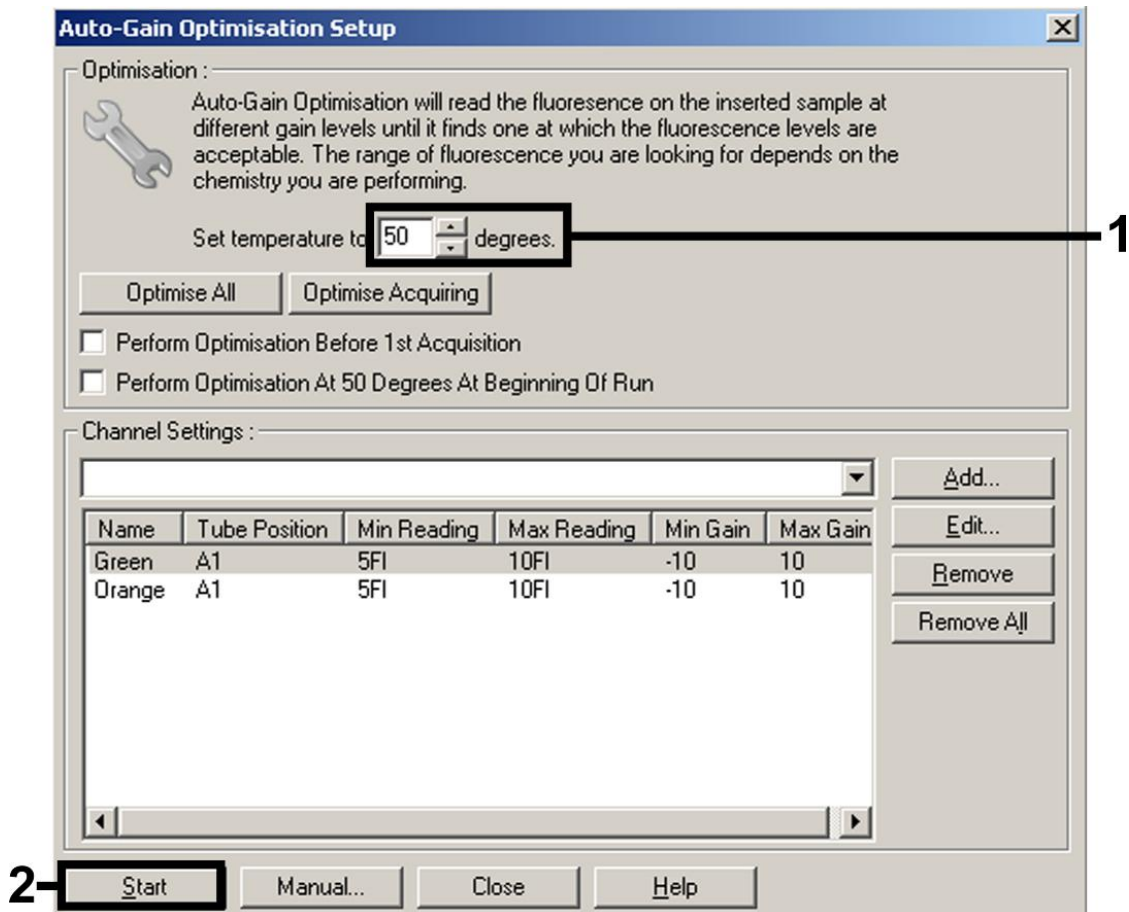


Фигура 9. Първоначално активиране на ензима за бърз старт hot-start enzyme.



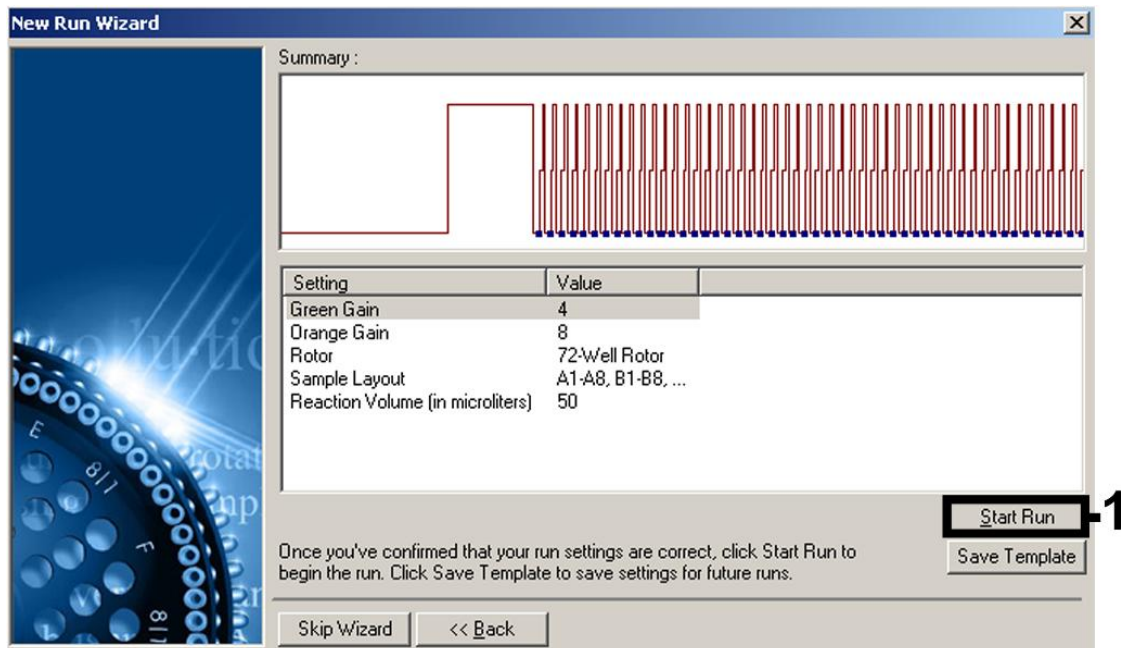
Фигура 10. Намножаване на комплементарна ДНК (cDNA). Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, софтуерът ще определи флуоресцентните багрила като "FAM/Sybr, ROX".

9. Обхватът на детекция на флуоресцентните канали трябва да се определи според флуоресцентните интензитети в PCR епруветките. Кликнете върху “Gain Optimisation” в диалоговия прозорец “New Run Wizard” (вижте Фигура 7), за да отворите диалоговия прозорец “Auto-Gain Optimisation Setup”. Задайте 50 градуса за температура за калибриране, която отговаря на температурата за полепване в програмата за размножаване (Фигура 11).



Фигура 11. Регулиране на чувствителността на флуоресцентния канал. Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, софтуерът ще определи флуоресцентните багрила като “FAM/Sybr” и “ROX”.

10. Получените стойности, определени при калибрирането на канала се запазват автоматично и се появяват в списък в последния прозорец на менюто от програмната процедура (Фигура 12). Кликнете върху “Start Run”.



Фигура 12. Стартиране на опита. Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, софтуерът ще определи флуоресцентните багрила като “FAM/Sybr” и “ROX”.

11. Възможно е да получите следните резултати (11a, 11b и 11c)

Примери на положителни и отрицателни PCR реакции са дадени на Фигура 13 и Фигура 14.

Таблица 9 дава насоки за тълкуване на получените количествени резултати.

- 11a. Отчетен е сигнал във флуоресцентен канал Cycling Green.

Резултатът от опита е положителен: пробата съдържа РНК на вирус HIV-1.

В този случай, откриването на сигнал в канал Cycling Orange не е задължително, тъй като високите първоначални концентрации на РНК на вирус HIV-1 (положителен сигнал в канал Cycling Green) може да доведе до намален сигнал или липса на флуоресцентен сигнал от вътрешната контрола в канал Cycling Orange (състезание).



Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, съответните канали са Cycling A.FAM за положителен сигнал и Cycling A.ROX за вътрешната контрола.

11b. Във флуоресцентен канал Cycling Green не се открива сигнал. В същото време се появява сигнал от вътрешната контрола в канал Cycling Orange.

В пробата не се открива РНК на вирус HIV-1. Тя трябва да се счита за отрицателна.

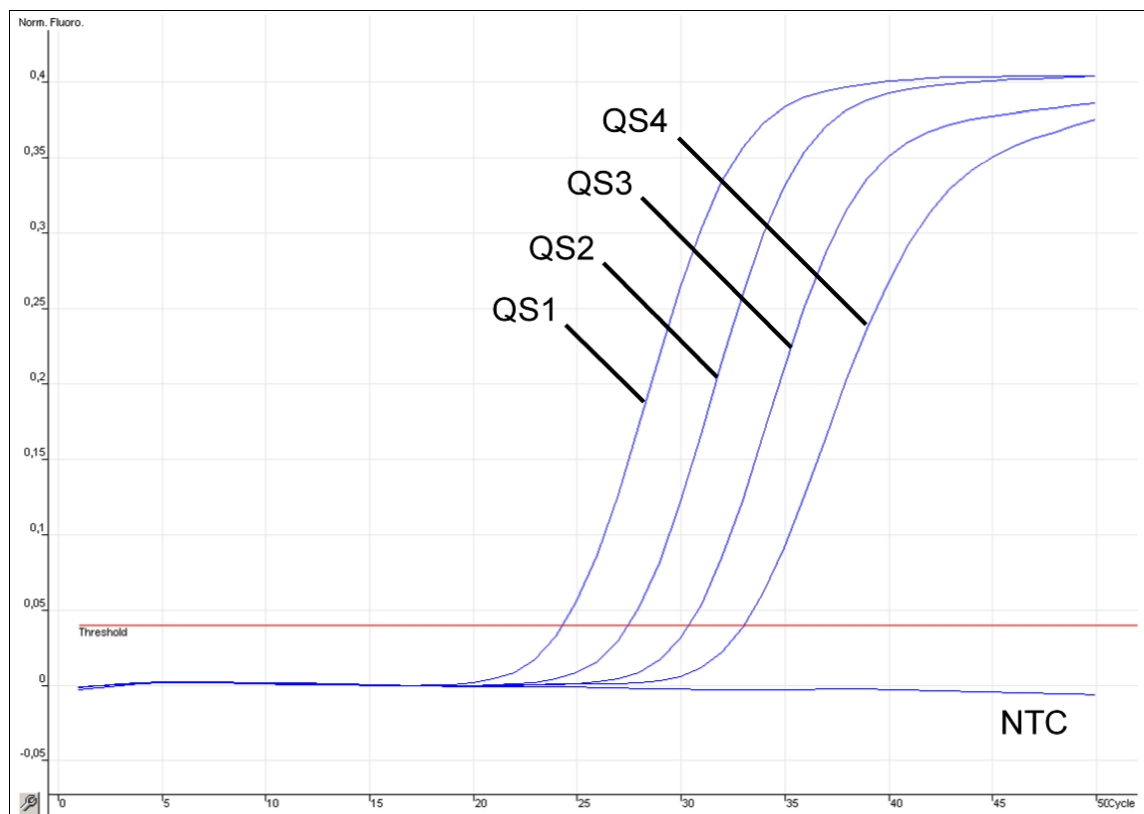
В случай на отрицателен към вирус HI Virus-1 опит RT-PCR, отчетеният сигнал от вътрешната контрола изключва възможността за RT-PCR инхибиране.

i Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, съответните канали са Cycling A.ROX за вътрешната контрола и липсва сигнал за Cycling A.FAM.

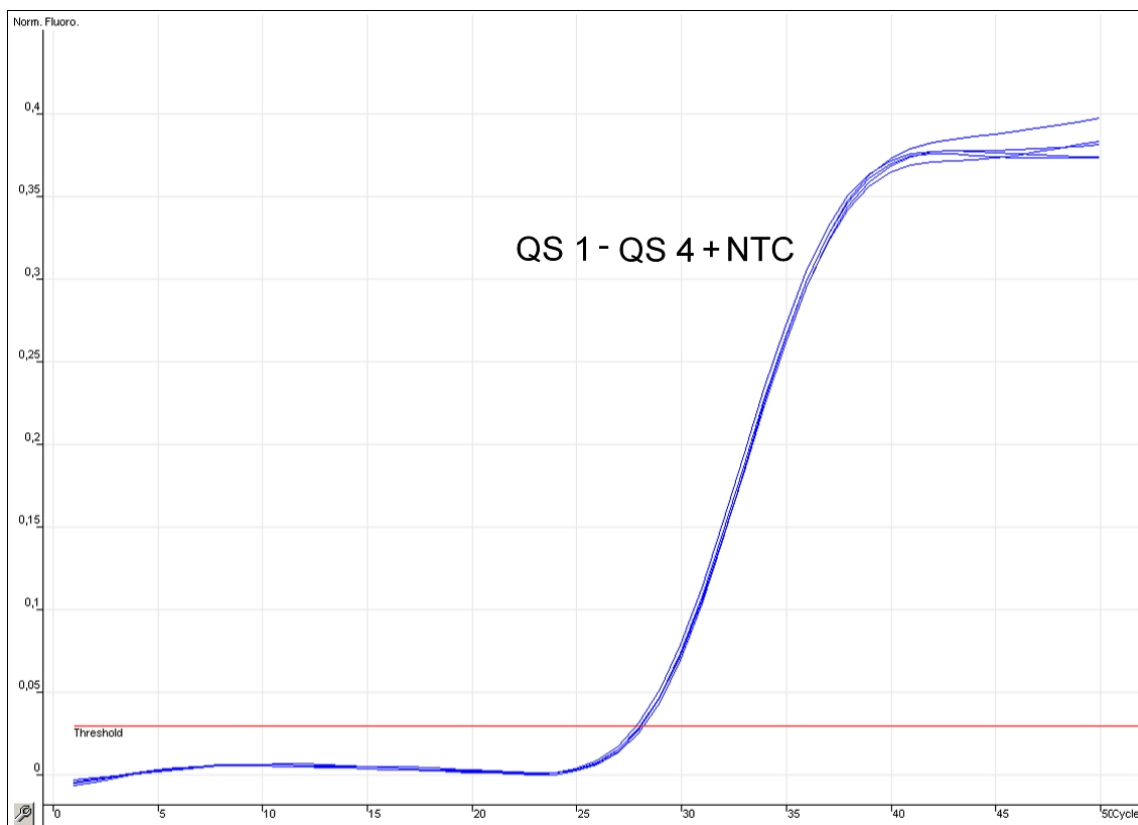
11c. Не се отчита сигнал в канал Cycling Green или в канал Cycling Orange. Не може да се направи оценка на резултата.

Информация за източниците на грешки и начините за тяхното отстраняване може да бъде намерена в “Ръководство за отстраняване на проблеми”, стр. 34.

i Отбележете, че при инструментите Rotor-Gene 3000, съответните канали са Cycling A.FAM и Cycling A.ROX.



Фигура 13. Откриване на стандартите за количествено определяне (HI Virus-1 RG QS 1–4) във флуоресцентен канал Cycling Green. NTC: контрола без матрица (отрицателна контрола).



Фигура 14. Откриване на вътрешната контрола (IC) във флуоресцентен канал Cyclus Orange с едновременно намножаване на стандартите за количествено определяне (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: контрола без матрица (отрицателна контрола).

Таблица 9. Тълкуване на резултатите за количествено определяне






Резултат	Тълкувание
РНК на вирус HIV >72 IU/ml	Резултатът е в границите на определения обхват на теста. Вероятността за откриване на РНК на вирус HIV е по-голяма от 95%. Положителните резултати от теста са статистически сигурни.
РНК на вирус HIV <72 IU/ml	Резултатът е извън определения обхват на теста. Възпроизвеждането на положителният резултат не е сигурно.
РНК на вирус HIV не е открита	Не беше установено наличие на РНК на вирус HIV.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Този ръчник може да Ви бъде полезен за решаването на проблеми, които възникват. За повече информация вижте също интернет страницата с често задавани въпроси, поддържана от нашия технически център: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените от техническия център на QIAGEN винаги с радост ще отговорят на Вашите въпроси, свързани с информацията и протокола в този ръчник или за иновативните технологии за експериментален анализ (вижте “Информация за контакти“ на последната страница или посетете www.qiagen.com).






Коментари и предложения

Липсва сигнал от положителните контроли (HI Virus-1 RG QS 1–4) във флуоресцентен канал **Cycling Green** или **Cycling A.FAM**

- a) Избраният флуоресцентен канал за PCR анализ на данните не отговаря на протокола  За анализиране на данните изберете флуоресцентен канал **Cycling Green** или **Cycling A.FAM** за аналитичен RT-PCR за вирус HI Virus-1 и флуоресцентен канал **Cycling Orange** или **Cycling A.ROX** за RT-PCR обработка на вътрешната контрола.
- b) Неправилно програмиране на температурният профил на инструмент Rotor-Gene  Сравнете температурният профил с протокола. Вижте “Протокол: PCR и анализ на данните”, стр. 24.
- c) Неправилна конфигурация на PCR  Проверете и сравнете Вашите работни стъпки със схемата на накапване и повторете PCR обработката, ако е необходимо. Вижте “Протокол: PCR и анализ на данните”, стр. 24.
- d) Условието на съхранение на един или повече компоненти на кита не отговарят на инструкциите, дадени в “Съхранение” (стр. 5)  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.
- e) Срокът на годност на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит е изтекъл  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.

Коментари и предложения

Наличие на слаб сигнал или липса на сигнал от вътрешната контрола във флуоресцентен канал „Cycling Orange“ или „Cycling A.ROX“ и същевременно липса на сигнал в канал „Cycling Green“ или „Cycling A.FAM“.

- a) Условието за PCR опита не отговарят на протокола  Проверете PCR условията (вижте по-нагоре) и повторете PCR опита с коригираните настройки, ако е необходимо.
- b) PCR е инхибиран  Уверете се, че Вие прилагате препоръчаният метод на изолиране и стриктно спазвате инструкциите на производителя.
- c) РНК беше изгубена при извличането  Ако е добавена вътрешна контрола при извличането, липсата на сигнал от вътрешната контрола сочи, че РНК е изгубена по време на извличането. Уверете се, че прилагате препоръчания метод на изолиране (вижте [„Изолиране на РНК“](#), стр. 21) и стриктно спазвате инструкциите на производителя.
- d) Условието за съхранение на един или няколко компонента от кита не отговарят на инструкциите, дадени в параграф „Съхранение“ (стр. 5)  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.
- e) Срокът на годност на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит е изтекъл  Проверете условията на съхранение и срока на годност (вижте етикета на кита) на реактивите и използвайте нов кит, ако е необходимо.

Коментари и предложения

Сигнали от отрицателните контроли във флуоресцентен канал **Cycling Green** или **Cycling A.FAM** на аналитичния PCR

- a) Замърсяване при подготовката на PCR
- ⓘ Повторете PCR опита с нови реактиви с повторения
 - ⓘ Ако е възможно, затваряйте PCR епруветките веднага след добавянето на пробите, които ще се тестват.
 - ⓘ Уверете се, че сте накапали положителните контроли последни
 - ⓘ Уверете се, че работното място и инструментите се почистват периодично.
- b) Замърсяване по време на извличането
- ⓘ Повторете извличането и PCR опита с пробата, която трябва да се тества като използвате нови реактиви.
 - ⓘ Уверете се, че работното място и инструментите се почистват периодично.

Референции

Фирма QIAGEN поддържа обширна, актуална база с данни в интернет с научни публикации, използващи QIAGEN продукти. Опциите за подробно търсене Ви позволяват да откривате статиите, от които се нуждаете, или чрез обикновено търсене с помощта на клавиатурата, или чрез точно посочване на приложението, зоната за търсене, заглавието и т.н.

За да видите пълният списък на референциите, влезте в базата с данни на QIAGEN на адрес www.qiagen.com/RefDB/search.asp, обърнете се към техническия сервиз на QIAGEN, или към местния дистрибутор.

Информация за поръчки

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR кит (24)	За 24 реакции: 2 мастера, 4 стандарта за количествено определяне, Вътрешна контрола, Вода (PCR клас)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR кит (96)	За 96 реакции: 2 мастера, 4 стандарта за количествено определяне, Вътрешна контрола, Вода (PCR клас)	4513265
QIAamp DSP Virus кит — за пречистване на вирусни нуклеинови киселини от човешка плазма за ин витро диагностични цели		
QIAamp DSP Virus кит	За 50 подготовки: QIAamp MinElute® центрофужни колони, буфери, реактиви, епруветки, колонни разширители и вакуумни конектори VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx — за IVD-валидиран PCR анализ в реално време за клинични приложения		
Rotor-Gene Q MDx 5plex система	PCR апарат за използване в реално време с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex платформа	PCR апарат за използване в реално време с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени.	9002022

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM система	PCR апарат за използване в реално време и Анализатор на разделянето с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс HRM канал, лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM платформа	PCR апарат за използване в реално време и Анализатор на разделянето с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс HRM канал, лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex система	PCR апарат за използване в реално време с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен и пурпурен), включително лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex платформа	PCR апарат за използване в реално време с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен и пурпурен), включително лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени	9002042

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
Rotor-Gene Q — за изключителни PCR резултати в реално време		
Rotor-Gene Q 5plex система	PCR апарат за използване в реално време с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9001640
Rotor-Gene Q 5plex платформа	PCR апарат за използване в реално време с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени.	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM система	PCR апарат за използване в реално време и Анализатор на разделянето с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс HRM канал, лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM платформа	PCR апарат за използване в реално време и Анализатор на разделянето с висока резолюция с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс HRM канал, лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени.	9001580

Продукт	Съдържание	Каталожен номер
Rotor-Gene Q 6plex система	PCR апарат за използване в реално време с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда, инсталиране и обучение	9001660
Rotor-Gene Q 6plex платформа	PCR апарат за използване в реално време с 6 канала (син, зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен), лаптоп компютър, софтуер, аксесоари, 1-годишна гаранция на частите и труда. Инсталирането и обучението не са включени.	9001590
Rotor-Gene Q аксесоари		
Блок за зареждане на 72 x 0.1 ml епруветки	Алуминиев блок за ръчно настройване на реакцията с пипети с един канал в 72 x 0.1 ml епруветки	9018901
Блок за зареждане на 96 x 0.2 ml епруветки	Алуминиев блок за ръчно настройване на реакцията в стандартни 8 x 12 масиви като се използват 96 x 0.2 ml епруветки	9018905
Стрипчета и капачки, 0.1 ml (250)	250 стрипчета с по 4 епруветки и капачки за 1000 реакции	981103
Стрипчета и капачки, 0.1 ml (2500)	10 x 250 стрипчета с по 4 епруветки и капачки за 10,000 реакции	981106
PCR епруветки, 0.2 ml (1000)	1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции	981005
PCR епруветки, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 тънкостенни епруветки за 1000 реакции	981008

За актуална информацията за лиценза и специфични за продукта оповестявания, вижте съответния наръчник за QIAGEN кита или ръководството за употреба. Наръчниците за китове QIAGEN и ръководствата за експлоатация са достъпни на интернет страницата www.qiagen.com. Също така, Вие можете да изпратите запитване до техническия сервиз на QIAGEN или към местния дистрибутор.

Тази страница нарочно е оставена празна.

Закупуването на този продукт Ви позволява да го използвате за извършване на ин витро човешка диагностика. С неговото закупуване не се предоставя общ патент или други лицензи, освен специфичните права на използване, произтичащи от покупката.

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

artus HI Virus-1 RG RT-PCR кит и QIAamp DSP Virus кит са диагностични китове с CE-маркировка според Европейската директива за ин витро диагностика 98/79/EC. Тези продукти не се предлагат в някои страни.

Ограничено лицензионно споразумение

Със закупуването и използването на този продукт всеки купувач или потребител на *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит се съгласява за следното:

1. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR кит може да се използва само в съответствие с Наръчника за *artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit* и да се използва само с компонентите, съдържащи се в кита. QIAGEN не предоставя лиценз за никое от своите интелектуални права за използване или включване на компонентите на този кит към други компоненти, които не са включени в този кит, както е описано в Наръчника за *artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit* и в допълнителните протоколи налични на www.qiagen.com.
2. При всякакви други условия, различни от изрично посочените в лицензите, QIAGEN не дава гаранция, че този кит и/или неговата употреба(и) няма да наруши правата на трети лица.
3. Този кит и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повече от веднъж, да се почистват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всякакви други лицензи, преки или косвени, освен тези, които са изрично одобрени.
5. Купувачът или потребителят на кита се съгласява да не предприема или да позволява на някой друг да предприема стъпки, които биха довели до или до улесняване на каквито и да било действия, посочени като забранени по-нагоре. QIAGEN е в правото си да налага забрани по този ограничен лиценз във всеки съд, и ще си възстановява всички съдебни разходи и разходи за разследвания, включително хонорари на адвокати, при действия за изпълнение на настоящото лицензно споразумение или за защита на своите интелектуални права, свързани с този кит и/или неговите компоненти.

Актуални условия на лицензите можете да намерите на www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, Всички права са запазени.

www.qiagen.com

Австралия ■ Телефон за поръчки 1-800-243-800 ■ Факс 03-9840-9888 ■ Технически сервиз 1-800-243-066

Австрия ■ Телефон за поръчки 0800-28-10-10 ■ Факс 0800-28-10-19 ■ Технически сервиз 0800-28-10-11

Белгия ■ Телефон за поръчки 0800-79612 ■ Факс 0800-79611 ■ Технически сервиз 0800-79556

Бразилия ■ Телефон за поръчки 0800-557779 ■ Факс 55-11-5079-4001 ■ Технически сервиз 0800-557779

Канада ■ Телефон за поръчки 800-572-9613 ■ Факс 800-713-5951 ■ Технически сервиз 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Китай ■ Телефон за поръчки 86-21-3865-3865 ■ Факс 86-21-3865-3965 ■ Технически сервиз 800-988-0325

Дания ■ Телефон за поръчки 80-885945 ■ Факс 80-885944 ■ Технически сервиз 80-885942

Финландия ■ Телефон за поръчки 0800-914416 ■ Факс 0800-914415 ■ Технически сервиз 0800-914413

Франция ■ Телефон за поръчки 01-60-920-926 ■ Факс 01-60-920-925 ■ Технически сервиз 01-60-920-930 ■ Телефон за получаване на оферти 01-60-920-928

Германия ■ Телефон за поръчки 02103-29-12000 ■ Факс 02103-29-22000 ■ Технически сервиз 02103-29-12400

Хонг Конг ■ Телефон за поръчки 800 933 965 ■ Факс 800 930 439 ■ Технически сервиз 800 930 425

Ирландия ■ Телефон за поръчки 1800 555 049 ■ Факс 1800 555 048 ■ Технически сервиз 1800 555 061

Италия ■ Телефон за поръчки 800-789-544 ■ Факс 02-334304-826 ■ Технически сервиз 800-787980

Япония ■ Телефон 03-6890-7300 ■ Факс 03-5547-0818 ■ Технически сервиз 03-6890-7300

Южна Корея ■ Телефон за поръчки 080-000-7146 ■ Факс 02-2626-5703 ■ Технически сервиз 080-000-7145

Люксембург ■ Телефон за поръчки 8002-2076 ■ Факс 8002-2073 ■ Технически сервиз 8002-2067

Мексико ■ Телефон за поръчки 01-800-7742-639 ■ Факс 01-800-1122-330 ■ Технически сервиз 01-800-7742-436

Холандия ■ Телефон за поръчки 0800-0229592 ■ Факс 0800-0229593 ■ Технически сервиз 0800-0229602

Норвегия ■ Телефон за поръчки 800-18859 ■ Факс 800-18817 ■ Технически сервиз 800-18712

Сингапур ■ Телефон за поръчки 1800-742-4362 ■ Факс 65-6854-8184 ■ Технически сервиз 1800-742-4368

Испания ■ Телефон за поръчки 91-630-7050 ■ Факс 91-630-5145 ■ Технически сервиз 91-630-7050

Швеция ■ Телефон за поръчки 020-790282 ■ Факс 020-790582 ■ Технически сервиз 020-798328

Швейцария ■ Телефон за поръчки 055-254-22-11 ■ Факс 055-254-22-13 ■ Технически сервиз 055-254-22-12

Великобритания ■ Телефон за поръчки 01293-422-911 ■ Факс 01293-422-922 ■ Технически сервиз 01293-422-999

САЩ ■ Orders 800-426-8157 ■ Факс 800-718-2056 ■ Технически сервиз 800-DNA-PREP (800-362-7737)

