

# Příručka pro sadu *artus*<sup>®</sup> HI Virus-1 RG RT-PCR



24 (katalogové č. 4513263)



96 (katalogové č. 4513265)

Verze 1



In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene<sup>®</sup> Q



4513263, 4513265



1049310CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724

Hilden, NĚMECKO

R5



1049310CS



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

### **QIAGEN určuje standardy:**

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.


Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



# Obsah

Složení sady	6
<b>Symboly</b>	<b>6</b>
<b>Uchovávání</b>	<b>7</b>
<b>Zamýšlené použití</b>	<b>7</b>
<b>Omezení pro použití produktu</b>	<b>8</b>
<b>Varování a bezpečnostní opatření</b>	<b>8</b>
<b>Řízení jakosti</b>	<b>8</b>
<b>Úvod</b>	<b>9</b>
Princip	9
Informace o patogenu	9
Charakteristiky chování	10
<b>Vybavení a reagentie, které má zajistit uživatel</b>	<b>19</b>
<b>Důležité poznámky</b>	<b>20</b>
Všeobecná bezpečnostní opatření	20
Odběr, skladování a přeprava vzorků	20
Izolace RNA	22
Interní kontrola	22
Nastavení mezní hodnoty pro PCR analýzu	23
Kvantifikace	23
<b>Protokol: PCR a analýza dat</b>	<b>25</b>
<b>Řešení problémů</b>	<b>35</b>
<b>Literatura</b>	<b>38</b>
<b>Informace o způsobu objednávání</b>	<b>39</b>

## Složení sady

<b>artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit</b>		<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>Katalogové č.</b>		<b>4513263</b>	<b>4513265</b>
<b>Počet reakcí</b>		<b>24</b>	<b>96</b>
Modrá	HI Virus-1 RG Master A (směs HI Virus-1 RG Master A)	2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Fialová	HI Virus-1 RG Master B (směs HI Virus-1 RG Master B)	2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Červená	HI Virus-1 RG QS 1* (1 x 10 <sup>4</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Červená	HI Virus-1 RG QS 2* (1 x 10 <sup>3</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Červená	HI Virus-1 RG QS 3* (1 x 10 <sup>2</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Červená	HI Virus-1 RG QS 4* (1 x 10 <sup>1</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Zelená	HI Virus-1 RG IC <sup>†</sup>	<b>IC</b> 1000 μl	2 x 1000 μl
Bílá	Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	1000 μl	1000 μl
	Příručka	 1	1

\* Kvantifikační standard.

† Interní kontrola.

## Symbols



Obsahuje reagentie pro <N> testů



Použijte do













Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Katalogové číslo



Číslo šarže

	Číslo materiálu
	Díly
	Obsahuje
	Počet
	Guanidin hydrochlorid
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Další informace viz návod k použití
	Důležitá poznámka

## Uchovávání

Komponenty sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se skladují při teplotě  $-30\text{ °C}$  až  $-15\text{ °C}$  a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení ( $> 2x$ ), snižuje se tím senzitivita analýzy. Pokud se reagentie mají používat pouze občasně, je nutné je zmrazit v alikvotních množstvích. Uchovávání při  $2\text{--}8\text{ °C}$  by nemělo překročit dobu pěti hodin.

## Zamýšlené použití

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci RNA viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) v lidské plazmě. Tato diagnostická sada využívá polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí (RT-PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji Rotor-Gene Q. Test kvantifikuje RNA viru HIV-1 v rozsahu  $120\text{--}1 \times 10^8$  IU/ml HIV-1. Pro použití v analýze byl validován vzorek plazmy obsahující subtypy A–H skupiny M.

**i** Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se nesmí používat s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR je určena k použití ve spojení s klinickou prezentací a dalšími laboratorními ukazateli pro stanovení prognózy onemocnění a slouží jako pomůcka při posuzování virologické odpovědi na léčbu antiretrovirotiky hodnocené podle změn hladiny RNA viru HIV-1 v EDTA plazmě. Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR není míněna jako screeningový test na HIV ani jako diagnostický test k potvrzení přítomnosti infekce HIV.

## Omezení pro použití produktu

Všechny reagensie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagensie s prošlou trvanlivostí.

V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

## Varování a bezpečnostní opatření

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN® a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

## Řízení jakosti

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

## Úvod

Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR je systém k přímému použití pro průkaz RNA viru HIV-1 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístrojích Rotor-Gene Q. Směsi HI Virus-1 RG Master A a B obsahují reagentie a enzymy pro reverzní transkripci a specifickou amplifikaci úseku 93 bp genomu viru HIV-1 a také bezprostřední detekci specifického amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000, případně kanálu Cycling A.FAM™ (zdroj 470 nm, detektor 510 nm) přístroje Rotor-Gene 3000.

Kromě toho sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange přístroje Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene 6000, případně kanálu A.ROX™ (zdroj 585 nm, detektor 610 nm) přístroje Rotor-Gene 3000. Limit detekce analytické RT-PCR HI Virus-1 (viz „Analytická senzitivita“, strana 10) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (HI Virus-1 RG QS 1–4), s jejichž pomocí lze určit množství virové RNA. Další informace viz “Kvantifikace”, strana 23.

## Princip

Průkaz původce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je založen na amplifikaci specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se vážou specificky na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat reakční zkumavky.\*

## Informace o patogenu

Virus lidské imunodeficiency (HIV) je retrovirus, který způsobuje syndrom získané imunodeficiency (AIDS). Infekce u lidí způsobují dva typy viru HIV – HIV-1 a HIV-2 –, které se liší virulencí i prevalencí. Většina hlášených případů onemocnění AIDS ve světě je přisuzována typu HIV-1. Infekce virem HIV se přenáší infikovanou krví, vaginálním sekretem, mateřským mlékem a dalšími tělesnými tekutinami. V těchto tělesných tekutinách se HIV nachází jak ve formě volných virových částic, tak vázaný v infikovaných buňkách imunitního systému. Tři hlavní cesty přenosu jsou nechráněný pohlavní styk, kontaminované jehly a přenos na dítě z nakažené matky při porodu nebo mateřským mlékem.

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



Virus HIV napadá v první řadě buňky imunitního systému člověka, jako například pomocné T lymfocyty (konkrétně CD4<sup>+</sup>). Infekce virem HIV vede k nízké hladině T lymfocytů CD4<sup>+</sup>. Klesne-li počet T lymfocytů CD4<sup>+</sup> T pod kritickou hladinu, dochází ke ztrátě buněčné imunity a tělo začíná být stále náchylnější k oportunním infekcím.

V pokročilých stádiích infekce HIV, kdy oslabený imunitní systém již nedokáže oportunním infekcím vzdorovat, se rozvíjí symptomy onemocnění AIDS. V této fázi se u nakaženého člověka vlivem podobných infekcí objevuje stále více symptomů. Nejběžnější infekce zahrnují chronický průjem způsobený *Cryptosporidií*, oční infekce způsobené cytomegalovirem, pneumocystovou pneumonií, toxoplasmózu a tuberkulózu, ale také infekce vyvolané zástupci komplexu *Mycobacterium avium*. Kromě toho je často pozorovaným symptomem rozvoj různých typů nádorových onemocnění, například invazivní rakovina děložního hrdla, Kaposiho sarkom nebo lymfom. V současnosti neexistuje lék na AIDS, proto se má za to, že většina lidí infikovaných virem HIV nakonec umírá v důsledků onemocnění spojených s AIDS. Nicméně pokroky, kterých bylo dosaženo v léčbě HIV/AIDS a které zahrnují nejen terapie namířené proti vlastnímu viru, ale také prevenci a léčbu oportunních infekcí, velmi výrazně prodloužily život mnohých pacientů s HIV/AIDS a zlepšily jeho kvalitu.

## Charakteristiky chování

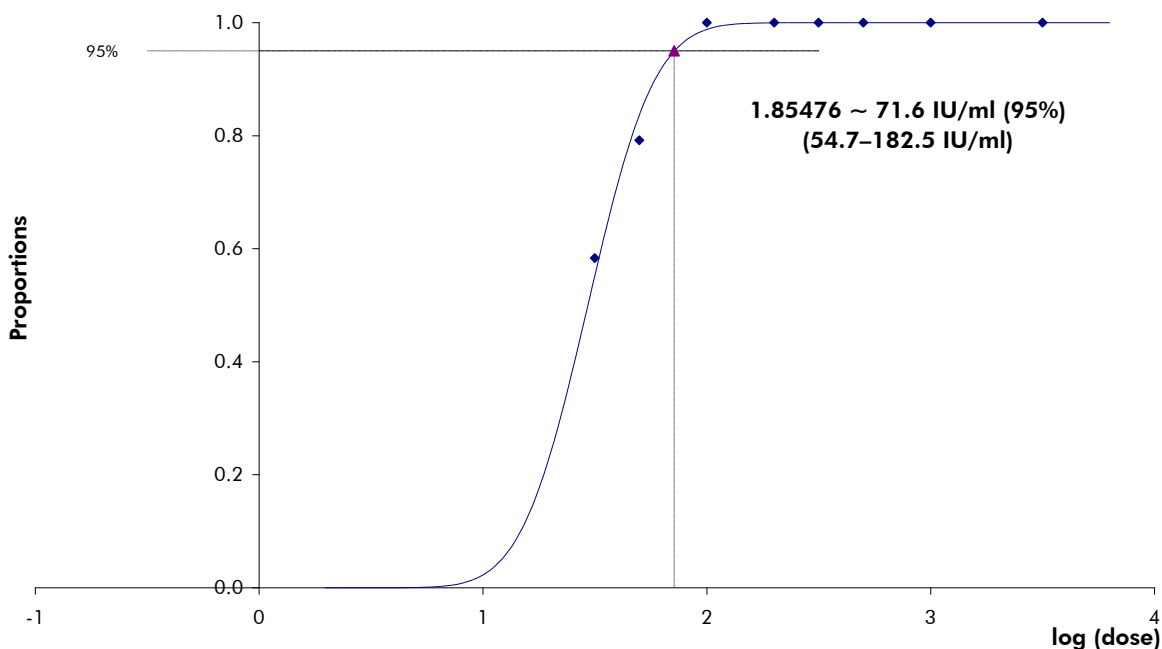
### Analytická senzitivita

Pro validaci sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byl určen jak analytický limit detekce, tak analytický limit detekce s přihlédnutím k izolaci (limit senzitivity). Analytický limit detekce s ohledem na izolaci byl určen na základě HIV pozitivních klinických vzorků s využitím konkrétní metody izolace. Analytický limit detekce byl naproti tomu determinován na základě standardu známé koncentrace a nezávisle na metodě izolace.

Pro určení analytické senzitivity sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla vytvořena řada ředění od 0,0316 do nominálně 31,6 IU\*/ $\mu$ l. Ta byla následně analyzována za použití sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR v přístroji Rotor-Gene 3000. Experimenty byly provedeny ve 3 různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Analytický limit detekce sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene 3000 je 4,5 IU/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). To znamená, že je s 95% pravděpodobností detekováno 4,5 IU/ $\mu$ l.

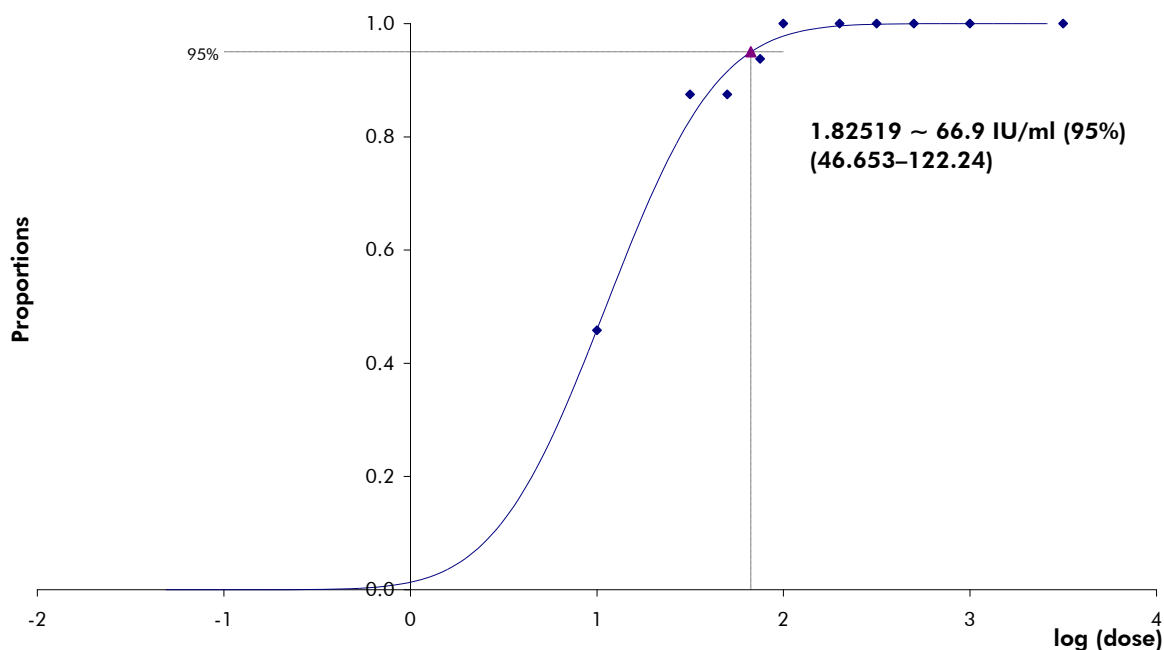
\* Standardem je in vitro transkribovaná RNA, jejíž koncentrace byla kalibrována pomocí 2. mezinárodního standardu HIV organizace WHO (2nd International HIV Standard).

Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus, QIAGEN) sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na přístroji Rotor-Gene byla určena řadou ředění 2. mezinárodního standardu organizace WHO pro RNA HIV-1 určeného pro analýzy využívající technologie amplifikace nukleových kyselin (NAT; kód NIBSC 97/650) od 10 do 3160 IU/ml HIV v klinických vzorcích plazmy. Tyto vzorky byly podrobeny izolaci RNA pomocí sady QIAamp DSP Virus (QIAGEN; extrakční objem: 0,5 ml, eluční objem: 25 µl). Každé ředění bylo analyzováno za užití sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ve 3 různých dnech formou osminásobných určení. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy naleznete v obrázku 1. Analytický limit detekce s ohledem na izolaci sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene 3000 je 71,6 IU/ml ( $p = 0,05$ ). To znamená, že 71,6 IU/ml bude detekováno s 95% pravděpodobností.



**Obrázek 1. Probitová analýza: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000).** Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIAamp DSP Virus, QIAGEN) sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na přístroji Rotor-Gene 3000.

Analytický limit detekce s ohledem na izolaci sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR v kombinaci s přístrojem Rotor-Gene Q/6000 je 66,9 IU/ml ( $p = 0,05$ ). To znamená, že 66,9 IU/ml bude detekováno s 95% pravděpodobností.



**Obrázek 2. Probitová analýza: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000).** Analytická senzitivita s ohledem na izolaci (sada QIAamp DSP Virus, QIAGEN) sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na přístroji Rotor-Gene 6000.

## Specifická

Specifická sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě srovnávací sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Detekovatelnost všech relevantních genotypů tak byla zajištěna na základě sladění databáze a běhu PCR na přístrojích Rotor-Gene s následujícími genotypy (viz tabulka 1).

Specifická byla navíc validována pomocí 100 různých HIV negativních vzorků plazmy, které spolu se specifickými primery a sondami pro HIV zahrnutými ve směsi HI Virus-1 RG Master nevytvářely žádný signál.

Potenciální křížová reaktivita sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla testována pomocí kontrolní skupiny uvedené v tabulce 2. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

**Tabulka 1. Testování specifity relevantních genotypů**

<b>Virus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Zdroj</b>	<b>HIV (FAM)</b>	<b>Interní kontrola (ROX)</b>
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	+	+

\* National Institute for Biological Standards and Control (Národní institut pro biologické standardy a kontroly), Hertfordshire.

**Tabulka 2. Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních patogenů**

<b>Kontrolní skupina</b>	<b>HIV (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)</b>	<b>Interní kontrola (Cycling Orange nebo Cycling A.ROX)</b>
Virus hepatitidy A	–	+
Virus hepatitidy B	–	+
Virus hepatitidy C	–	+
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+

Tabulka pokračuje na další straně

**Tabulka 2. Pokračování**

Kontrolní skupina	HIV (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)	Interní kontrola (Cycling Orange nebo Cycling A.ROX)
Lidský virus leukémie T-buněk typu 1 a 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Žlutá horečka	–	+
<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>	–	+

### Lineární oblast kvantifikace

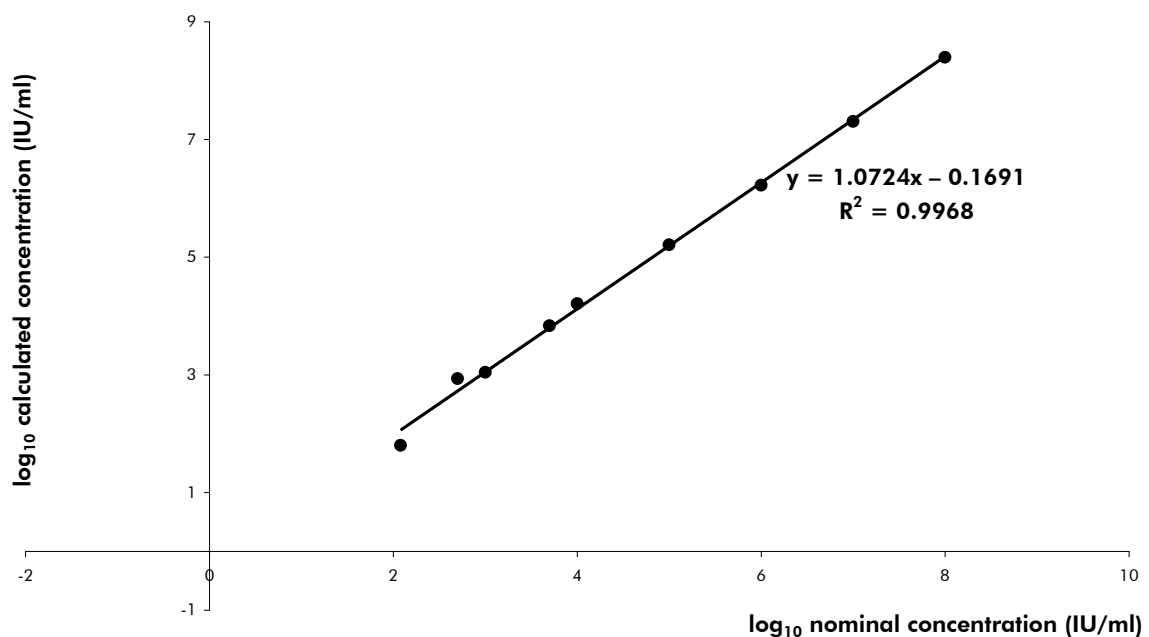
Lineární oblast kvantifikace (analytické měření) sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla určena analýzou řady ředění in vitro transkriptu HIV v rozsahu koncentrace od  $1 \times 10^8$  IU/μl do 1 IU/μl. Řada ředění byla kalibrována pomocí

mezinárodního standardu RNA HIV organizace WHO (WHO International HIV RNA Standard).

Každá fáze ředění byla testována v replikátech ( $n = 8$ ) pomocí sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na přístroji Rotor-Gene.

Lineární oblast kvantifikace sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se tudíž vztahuje na koncentrace od 5 IU/ $\mu$ l do minimálně  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l.

Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla určena analýzou řady ředění OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel v rozsahu koncentrace od  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l do 120 IU/ $\mu$ l. Izolace byla provedena v replikátech pomocí sady QIAamp DSP Virus (extrakční objem: 0,5 ml, eluční objem: 25  $\mu$ l). Každý z 9 vzorků byl analyzován pomocí sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se tudíž vztahuje na koncentrace od 120 IU/ml do minimálně  $10^8$  IU/ml (viz obrázek 3).



**Obrázek 3. Lineární oblast kvantifikace sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.** Výpočet lineární oblasti kvantifikace. Přímka byla stanovena lineární regrese log<sub>10</sub> vypočítaných koncentrací s log<sub>10</sub> nominálními koncentracemi. Rovnice regresních přímek je zahrnuta v obrázku.

## Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, které byly získány s využitím přístrojů Rotor-Gene, umožňují určit celkovou variabilitu testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z intraassay variability (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z interassay variability (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a

z interbatch variability (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Získaná data byla použita k vypočítání standardní odchylky, variance a koeficientu variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR interní kontroly.

Údaje o přesnosti byly pro sadu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR stanoveny na základě kvantifikačního standardu s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 IU/μl). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě  $C_T$  hodnot amplifikačních křivek ( $C_T$ : prahový cyklus, viz tabulka 3). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 1,66% ( $C_T$ ) a 2,15% ( $C_T$ ) pro průkaz interní kontroly. Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

**Tabulka 3. Data o přesnosti na základě hodnot  $C_T$**

	Hodnota $C_T$	Směrodatná odchylka	Koeficient variace (%)
Variabilita v rámci jednoho pokusu: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Variabilita v rámci jednoho pokusu: Interní kontrola	31,24	0,18	0,58
Variabilita mezi různými pokusy: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Variabilita mezi různými pokusy: Interní kontrola	31,65	0,36	1,13
Variabilita mezi různými šaržemi: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73
Variabilita mezi různými šaržemi: Interní kontrola	31,20	0,55	1,76
Celková variabilita: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Celková variabilita: Interní kontrola	31,40	0,67	2,15

## Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 100 HIV negativních vzorků plazmy bylo smíšeno s 4,5 IU/μl elučního objemu kontrolní RNA HIV (trojnásobná koncentrace analytické hranice senzitivity). Po izolaci pomocí sady QIAamp DSP Virus byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Četnost chyb pro HIV činila u všech vzorků 0 %. Robustnost interní kontroly byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 100 HIV negativních vzorků plazmy. Celková četnost chyb činila 0%. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR činí tedy  $\geq 99$  %.

## Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

## Diagnostické hodnocení

Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla hodnocena v jedné studii. Při srovnání sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se sadou COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HIV-1 Test bylo retrospektivně analyzováno 241 vzorků plazmy. Všechny vzorky plazmy byly pomocí sady COBAS TaqMan HIV-1 Test původně analyzovány s pozitivním nebo negativním výsledkem v rámci rutinní diagnostiky.

RNA HIV určená pro testování se sadou *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla izolována pomocí sady QIAamp DSP Virus. Analýza byla provedena v přístroji Rotor-Gene 6000. Pro srovnávací testy s COBAS TaqMan HIV-1 Test byla RNA HIV izolována podle údajů výrobce uvedených v příbalových informacích. Výsledky získané pomocí sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byly porovnány s výsledky sady COBAS TaqMan HIV-1 Test (viz tabulka 4 a obrázek 4).

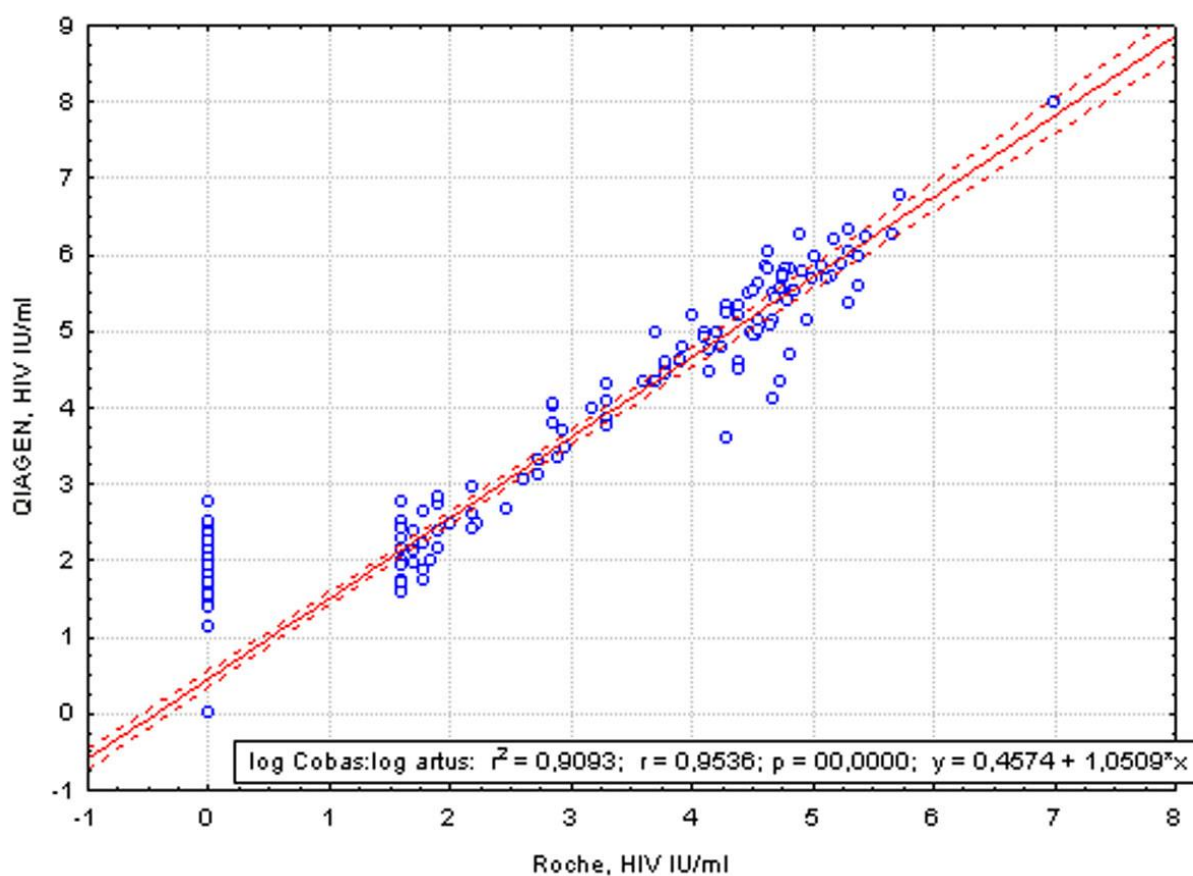
105 ze 126 vzorků, které byly se sadou COBAS TaqMan HIV-1 Test testovány pozitivně, prokázalo pozitivní výsledek i se sadou *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 113 ze 115 vzorků, které byly se sadou COBAS TaqMan HIV-1 Test testovány negativně, vyšlo negativně i se sadou *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Použijeme-li výsledky sady COBAS TaqMan HIV-1 Test jako referenci, diagnostická senzitivita je 98,1% a diagnostická specifická 84,3%.



Tabulka 4. Výsledky analýzy 241 retrospektivních vzorků EDTA plazmy

		COBAS TaqMan HIV-1 Test		
		+	-	Celkem
<b>artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit</b>	+	105	21	126
	-	2	113	115



Obrázek 4. Porovnání sady COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche, HIV; purifikace vzorku provedena s využitím systému COBAS AmpliPrep) se sadou artus HI Virus-1 RG RT-PCR (QIAGEN, HIV; purifikace vzorku provedena s využitím sady QIAamp DSP Virus). Korelace kvantitativních výsledků obou testovacích systémů (tabulka 4) byla analyzována pomocí lineární regrese. Výsledky obou sad jsou znázorněny v rozptylovém diagramu XY se stupnicí log/log.

## Vybavení a reagensie, které má zajistit uživatel

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

- Sada k izolaci RNA (viz „Izolace RNA“, strana 22)
- Pipety (nastavitelné)\*
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Třepačka vortex\*
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2ml reakční zkumavky
- Přístroj Rotor-Gene Q nebo Rotor-Gene\*<sup>†</sup> s fluorescenčními kanály Cycling Green a Cycling Orange nebo s fluorescenčními kanály Cycling A.FAM a Cycling A.ROX
- Verze softwaru Rotor-Gene Q 1.7.94 (verze softwaru Rotor-Gene 6000: 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; verze softwaru Rotor-Gene 3000: 6.0.23) a vyšší
- Zkumavky v stripech s uzávěry, 0,1 ml, pro použití s 72jamkovým rotorem (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- Alternativně: Zkumavky PCR, 0,2 ml, pro použití s 36jamkovým rotorem (kat. čís. 981005 nebo 981008)
- Chladicí blok (vkládací blok 72 x 0,1ml zkumavky, kat. čís. 9018901, nebo vkládací blok 96 x 0,2ml zkumavky, kat. čís. 9018905)

\* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

<sup>†</sup> Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se nesmí používat s přístroji Rotor-Gene Q 2plex.

## Důležité poznámky

### Všeobecná bezpečnostní opatření

Vždy dbejte na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, pozitivní kontroly a amplifikáty) do reakční směsi na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo pulzní třepačka) a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle a udržujte komponenty na ledu nebo v chladicím bloku (72- / 96jamkový vkladací blok).

### Odběr, skladování a přeprava vzorků

**i** Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Přípustné jsou pouze následující materiály vzorků, u kterých je nezbytné přesně dodržovat následující předpisy pro odběr, skladování a přepravu.

**i** Dosud známé údaje prokazují EDTA nebo citrátovou plazmu jako nevhodnější vzorek pro průkaz HIV. Doporučujeme tedy používat tyto materiály se sadou *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Interní validace sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR byla provedena pomocí vzorků lidské EDTA plazmy. Jiné materiály vzorků nejsou validovány. Pro přípravu vzorku používejte pouze doporučenou sadu k izolaci RNA (viz „Izolace RNA“, strana 22).

Při užití některých materiálů vzorků je nezbytné dodržovat následující předpisy pro odběr, skladování a přepravu.

#### Odběr vzorků

Každý odběr krve je podmíněn narušením krevních cest (tepny, žíly, kapiláry). Používat se smí pouze nezávadný a sterilní materiál. Pro odběr krve by měly být k dispozici odpovídající jednorázové pomůcky. K punkci žil by se neměly používat příliš jemné kanyly. Odběr žilní krve by měl být proveden na vhodných místech v oblasti loketní jamky, předloktí nebo na hřbetu ruky. Krev odeberte do standardních odběrových zkumavek (červený uzávěr, Sarstedt nebo ekvivalentní zkumavky jiných výrobců). Odeberte 5–10 ml EDTA krve. Zkumavky by měly být bezprostředně po odběru promíchány opakovaným obracením (8x, netřepat).

**i** Vzorky osob, kterým byl podán heparin, se nesmí používat (viz „Látky narušující **stanovení**“, strana 21).

### **Skladování vzorků**

Plná krev by měla být během 6 hodin rozdělena na plazmu a buněčné elementy centrifugací při 800–1600 x g po dobu 20 minut. Oddělená plazma musí být převedena do sterilní polypropylenové zkumavky. Výkonnost testu může být opakovaným zmrazováním nebo delším skladováním vzorků narušena. RNA obsaženou ve viru lze při 4 °C skladovat po dobu několika dní, při –20 °C několik týdnů a při –70 °C měsíce až roky.\*

### **Přeprava vzorků**

Vzorky by měly být přepravovány zásadně v nerozbitných transportních nádobách, aby se zabránilo eventuálnímu nebezpečí infekce při úniku vzorku. Vzorky musí být zasílány podle platných místních a státních předpisů pro přepravu látek vyvolávajících nákazu.†

Přeprava nesmí trvat déle než šest hodin. Skladování na místě odběru se nedoporučuje. Transport poštou je možný, musí se však dbát na zákonné předpisy. Doporučujeme přepravu kurýrem. Krevní vzorky by měly být zasílány chlazené (2–8 °C) a oddělená plazma hluboce zmrazená (–15 až –30 °C).

### **Látky narušující stanovení**

Zvýšené hodnoty bilirubinu ( $\geq 15$  mg/dl) a lipidů ( $\geq 800$  mg/dl) stejně jako hemolytické vzorky systém neovlivňují. Heparin ( $\geq 10$  IU/ml) reakci PCR nepříznivě ovlivňuje. Vzorky, které byly odebrány do zkumavek, které obsahují heparin jako antikoagulant, nesmí být použity. Stejně tak se nesmí používat vzorky heparinizovaných osob.

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

† International Air Transport Association (Mezinárodní asociace leteckých dopravců) (IATA). Dangerous Goods Regulations (Předpisy pro přepravu nebezpečného zboží).

## Izolace RNA

Sada QIAamp DSP Virus (QIAGEN, kat. čís. 60704) je validována pro purifikaci virové RNA z lidské plazmy pro použití se sadou *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Purifikaci virové RNA proveďte podle pokynů v příručce pro sadu QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

**i** Užití nosičové RNA má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím i pro výtěžek DNA/RNA. Pro větší stabilitu nosičové RNA dodávané spolu se sadou QIAamp DSP Virus postupujte podle údajů o rekonstituci a skladování nosičové RNA uvedených v návodu k použití („Preparing reagents and buffers“).

Před začátkem každé izolace musí být připravena čerstvá směs lyzačního pufru a nosičové RNA (příp. i interní kontroly, viz „Interní kontrola“ dále) podle pipetovacího schématu uvedeného v tabulce 5:

Tabulka 5. Pipetovací schéma pro použití se sadou QIAamp DSP Virus

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr (AL)*	550 µl	6600 µl
Nosičová RNA (1 µg/µl)	6,2 µl	74,4 µl
celkový objem	556,2 µl	6674,4 µl
Objem na izolaci	500 µl	po 500 µl

\* Obsahuje guanidin hydrochlorid; bezpečnostní informace viz příručka pro sadu QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

**i** Čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a nosičové RNA použijte ihned k izolaci. Skladování směsi není možné.

**i** Interní kontrolu sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR lze vložit přímo do izolace (viz „Interní kontrola“ níže).

## Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává interní kontrola (HI Virus-1 RG IC). Uživatel má tak možnost kontrolovat jak izolaci RNA, tak také možnou inhibici PCR. Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci interní kontrolu v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Jestliže používáte například sadu QIAamp DSP Virus a eluujete RNA v 60 µl elučního pufru (AVE), přidejte na začátku 6 µl interní kontroly.

**i** Interní kontrola a nosičová RNA (viz „Izolace RNA“, strana 22) by měly být přidávány pouze ke směsi lyzačního pufru a vzorku nebo přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Upozorňujeme, že při přidávání k lyzačnímu pufru musíte směs interní kontroly a lyzačního pufru / nosičové RNA připravit vždy čerstvou a ihned použít (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k selhání interní kontroly a ke snížení efektivity izolace).

**i** Interní kontrolu a nosičovou RNA nepipetujte přímo do vzorku.

Volitelně lze interní kontrolu použít výhradně ke kontrole možné inhibice PCR. V tomto případě přidejte interní kontrolu přímo ke směsi HI Virus-1 RG Master A a HI Virus-1 RG Master B, jak popisuje krok 2b protokolu (strana 26).

## Nastavení mezní hodnoty pro PCR analýzu

Optimální nastavení mezní hodnoty pro danou kombinaci přístroje Rotor-Gene Q a sady *artus* RG PCR by mělo být empiricky stanoveno testováním každé individuální kombinace, protože se jedná o relativní hodnotu závislou na celkovém diagnostickém pracovním postupu. Pro začátek může být mezní hodnota nastavena na úvodní hodnotu 0,04 pro analýzu prvního PCR běhu. Tato hodnota by ale měla být doladěna v komparativní analýze dalších běhů v pracovním schématu. Mezní hodnota by měla být nastavena manuálně těsně nad signál pozadí negativních kontrol a negativních vzorků. Průměrná mezní hodnota vypočítaná z těchto pokusů by měla s velkou pravděpodobností platit i pro většinu následujících běhů. Uživatel by přesto měl generované mezní hodnoty pravidelně kontrolovat. Mezní hodnota se pohybuje obvykle mezi 0,03–0,05 a měla by se zaokrouhlovat na maximálně tři desetinná místa.

## Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (HI Virus-1 RG QS 1–4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Standardní křivku na přístroji Rotor-Gene Q vytvoříte tak, že použijete všech 4 kvantifikačních standardů, definujete je v dialogovém okně „Edit Samples“ (Upravit vzorky) jako standardy a zadáte odpovídající koncentrace (viz uživatelská příručka k přístroji).

① Kvantifikační standardy jsou definovány jako IU/μl.\* Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na IU/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{Výsledek (IU/ml)} = \frac{\text{výsledek (IU/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

### **Konverzní faktor**

1 IU/ml odpovídá 0,50 kopie/ml pro průkaz RNA viru HIV-1 na přístroji Rotor-Gene Q při ruční přípravě vzorků pomocí sady QIAamp DSP Virus. Konverzní faktor představuje přibližnou hodnotu na základě průměrného faktoru v celém dynamickém rozsahu analýzy.

\* Standard byl kalibrován pomocí mezinárodního standardu HIV (WHO; „International HIV Standard“).

# Protokol: PCR a analýza dat

## Důležité body před zahájením

- Před začátkem procesu si přečtěte „Důležité poznámky“, strany 20–23.
- Před zahájením protokolu si najdete čas a seznamte se s přístrojem Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Dbejte na to, aby byl do každého běhu PCR zahrnut alespoň jeden kvantifikační standard a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR). Pro vytvoření standardní křivky použijte u každého běhu PCR všechny 4 kvantifikační standardy (HI Virus-1 RG QS 1–4) dodávané spolu s produktem.

## Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8 °C.
- Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

## Postup

- 1. Umístěte požadovaný počet zkumavek PCR do adaptérů chladicího bloku.**
- 2. Chcete-li pomocí interní kontroly sledovat jak izolaci RNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Chcete-li interní kontrolu použít výhradně ke kontrole inhibice PCR, postupujte podle kroku 2b.**
- 2a. Interní kontrola již byla přidána k izolaci (viz „Interní kontrola“, strana 22). V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 6.**

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.



**Tabulka 6. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá ke sledování izolace RNA a ke kontrole inhibice PCR)**

Počet vzorků	1	12
HI Virus-1 RG Master A (směs HI Virus-1 RG Master A)	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B (směs HI Virus-1 RG Master B)	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC (interní kontrola HI Virus-1 RG)	0 µl	0 µl
<b>celkový objem</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>

- 2b. Interní kontrola musí být přidána přímo ke směsi HI Virus-1 Master A a HI Virus-1 Master B. V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 7.**

Reakční směs obvykle obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě vzorku.

**Tabulka 7. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá výhradně ke kontrole inhibice PCR)**

Počet vzorků	1	12
HI Virus-1 RG Master A (směs HI Virus-1 RG Master A)	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B (směs HI Virus-1 RG Master B)	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	2 µl	24 µl
<b>celkový objem</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl*</b>

\* Zvýšení objemu podmíněné přidáním interní kontroly se při přípravě reakce PCR nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není omezena.

- 3. Odměřte pipetou do každé zkumavky PCR 30 µl směsi Master Mix. Poté přidejte 20 µl eluátu z izolace RNA (viz tabulka 8). Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 20 µl alespoň jednoho**

kvantifikačního standardu (HI Virus-1 RG QS 1–4) a jako negativní kontrolu 20 µl vody v kvalitě vhodné pro PCR (Water, PCR grade).

**Tabulka 8. Příprava PCR reakce**

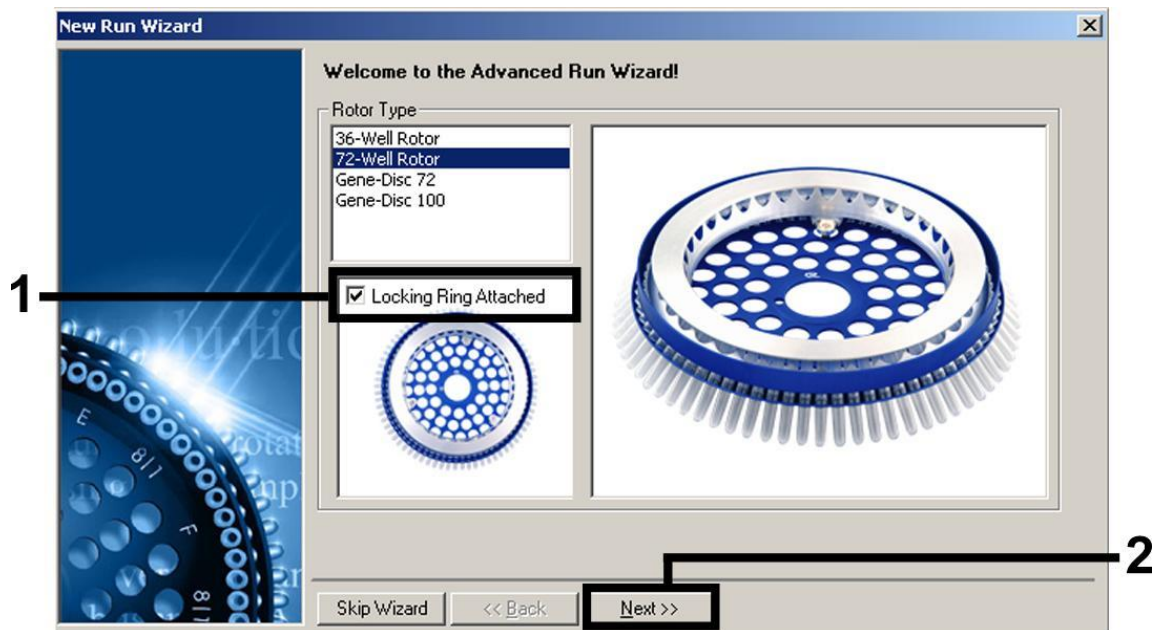
Počet vzorků	1	12
Master Mix	30 µl	po 30 µl
Vzorek	20 µl	po 20 µl
<b>celkový objem</b>	<b>50 µl</b>	<b>po 50 µl</b>

4. Uzavřete zkumavky PCR. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen Locking Ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.
5. Pro detekci RNA HIV-1 vytvořte teplotní profil podle následujících kroků.

<b>Nastavení obecných parametrů</b>	<b>Obrázky 5, 6, 7</b>
<b>Reverzní transkripce RNA</b>	<b>Obrázek 8</b>
<b>Počáteční aktivace Hot Start enzymu</b>	<b>Obrázek 9</b>
<b>Amplifikace cDNA</b>	<b>Obrázek 10</b>
<b>Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů</b>	<b>Obrázek 11</b>
<b>Spuštění běhu</b>	<b>Obrázek 12</b>

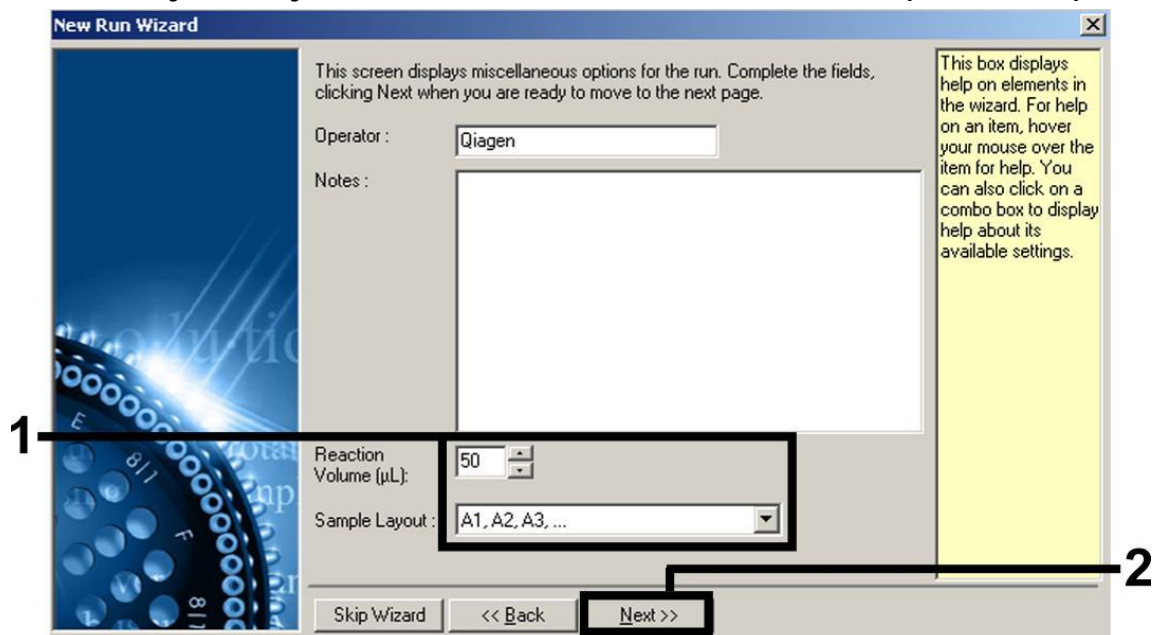
Veškeré údaje se vztahují na software Rotor-Gene Q verze 1.7.94, software Rotor-Gene 6000 verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 a software Rotor-Gene 3000 verze 6.0.23. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky. Ilustrace se vztahují k přístrojům Rotor-Gene Q. Vyžaduje-li přístroj Rotor-Gene 3000 jiné hodnoty, rozdíly jsou popsány v textu.

6. Nejdříve otevřete okno “New Run Wizard” (obrázek 5). Zaškrtněte rámeček “Locking Ring Attached” (Přípevněn pojistný prstenec) a klikněte na “Next” (Další).



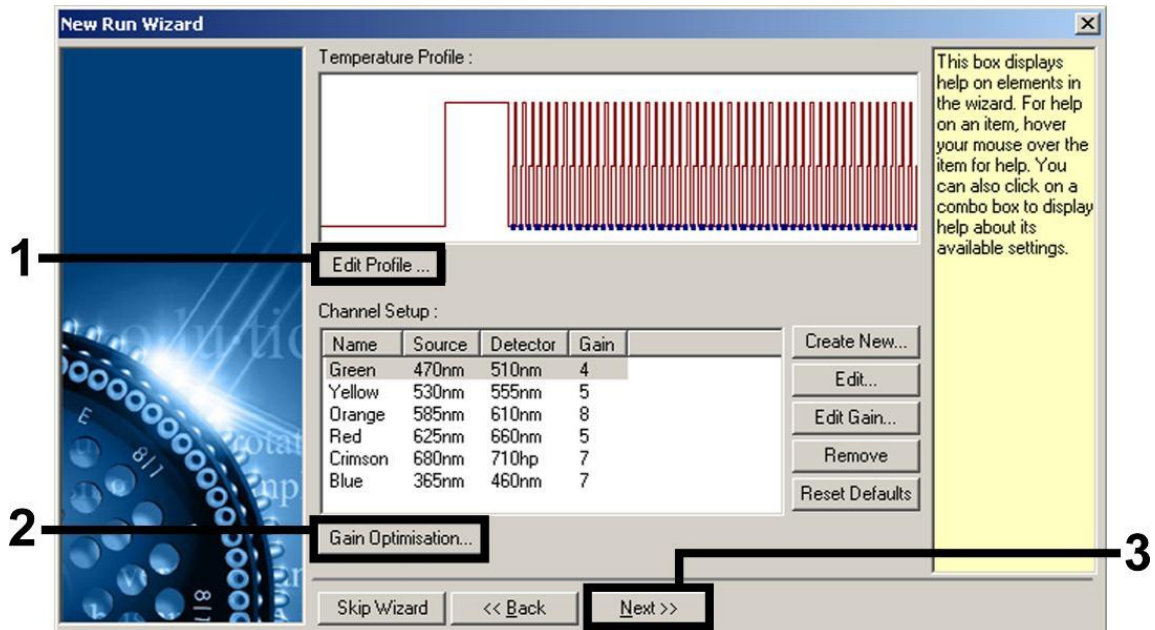
Obrázek 5. Dialogové okno “New Run Wizard”.

7. Zvolte 50 jako objem PCR reakce a klikněte na “Next” (obrázek 6).

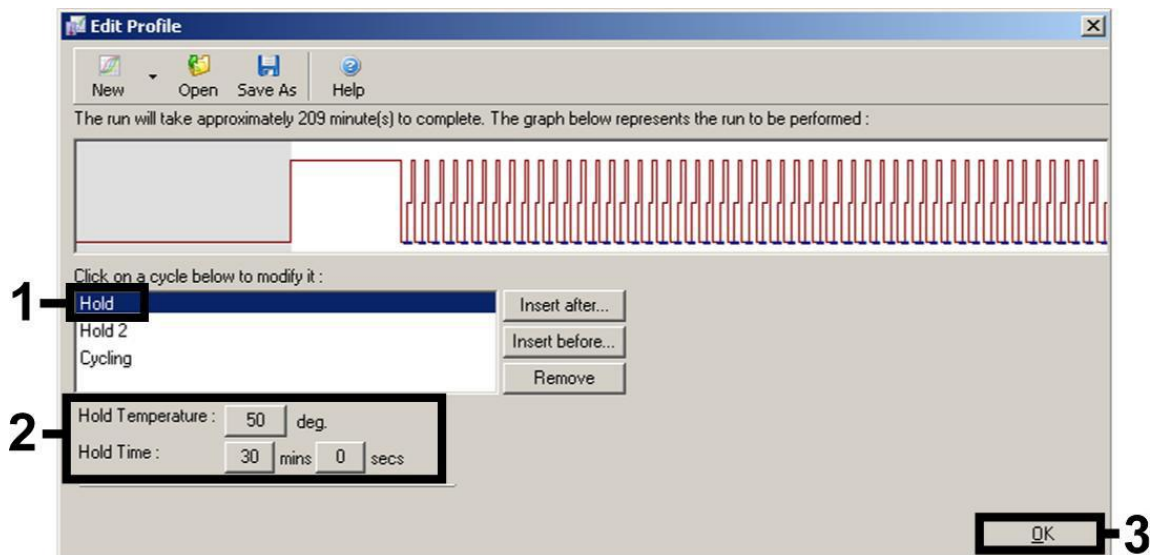


Obrázek 6. Nastavení obecných parametrů analýzy.

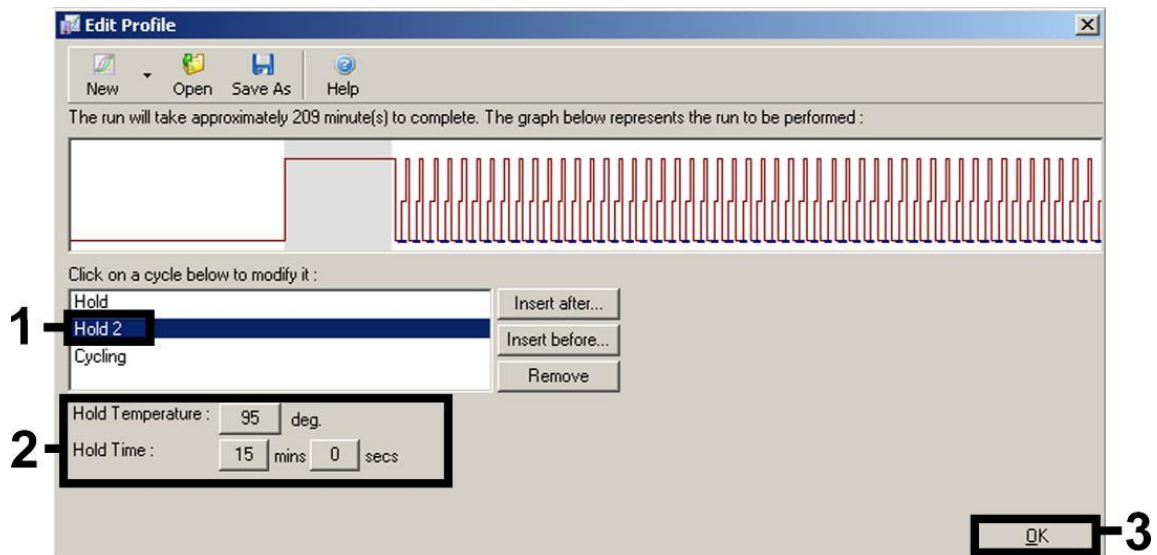
8. Klikněte na tlačítko “Edit Profile” v dalším okně “New Run Wizard” (obrázek 7) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 7-10.



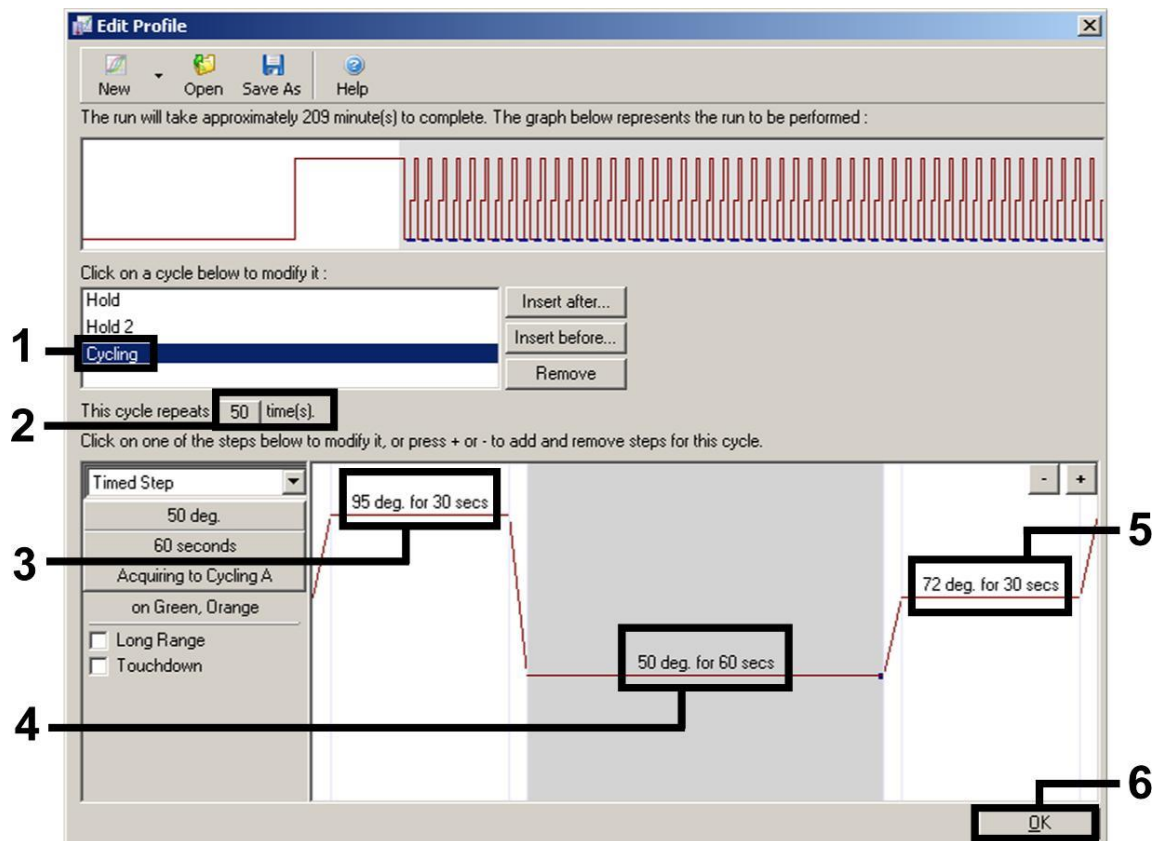
Obrázek 7. Úprava profilu.



Obrázek 8. Reverzní transkripce RNA.

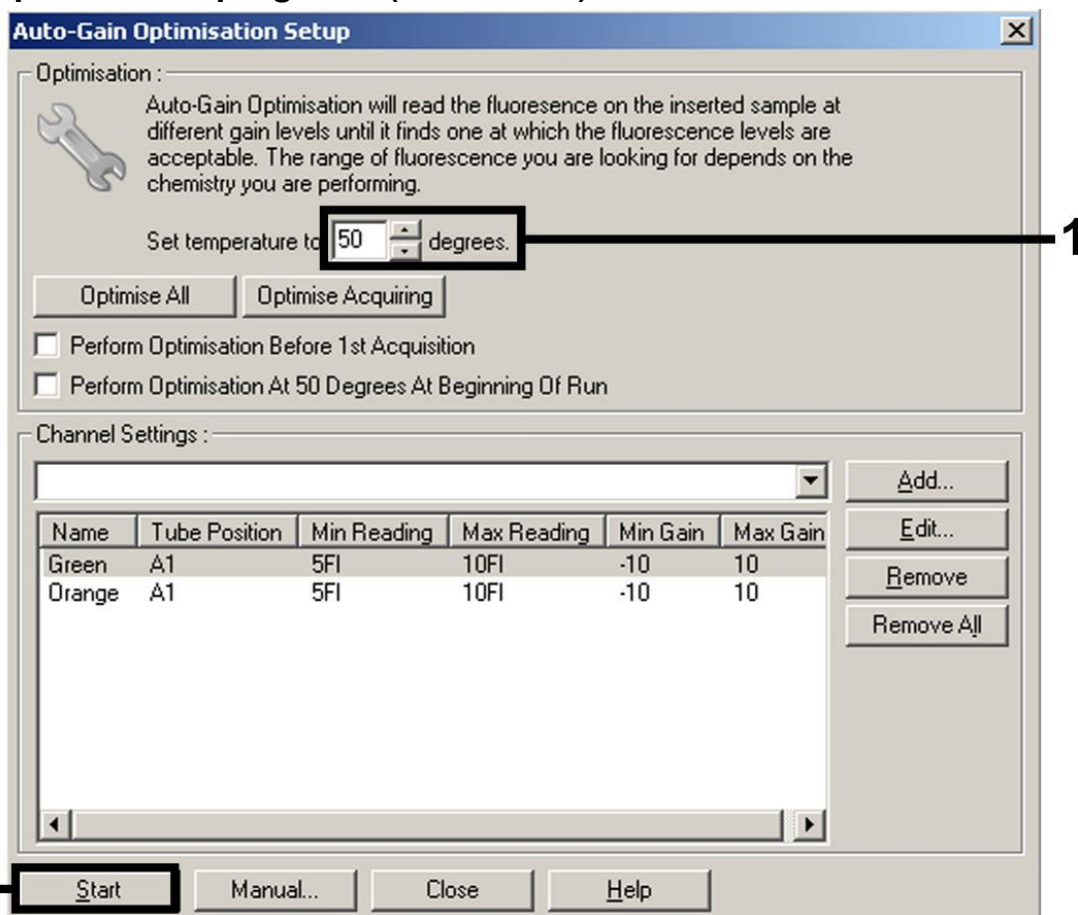


**Obrázek 9. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.**



**Obrázek 10. Amplifikace cDNA.** Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr, ROX“.

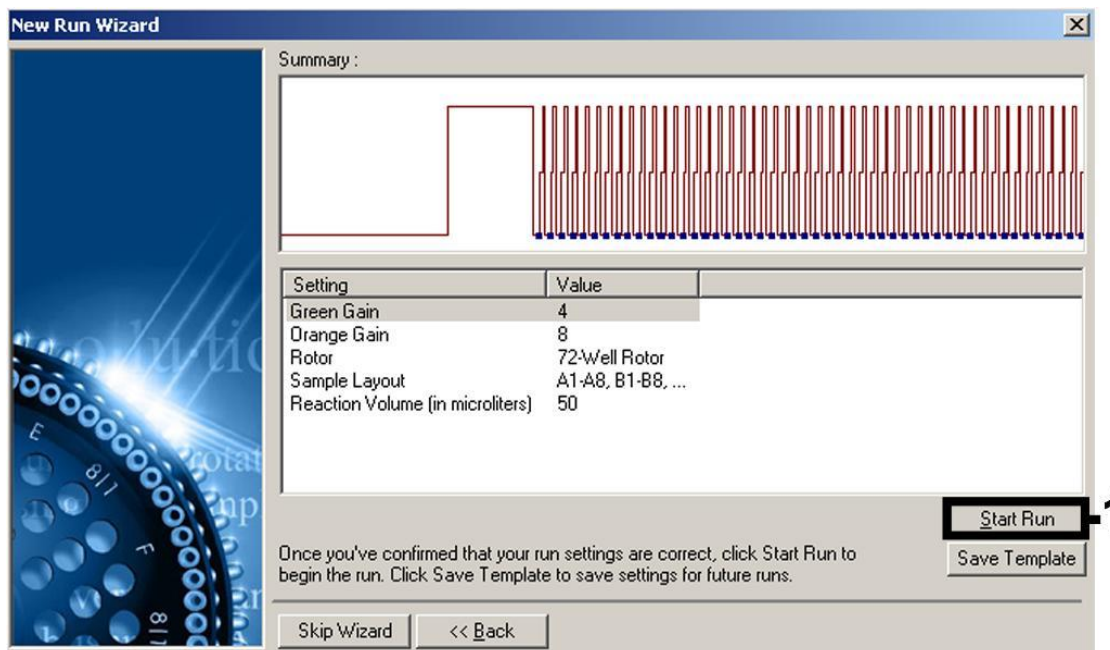
9. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity v PCR zkumavkách. Klikněte na “Gain Optimisation” v okně menu “New Run Wizard” (viz obrázek 7) pro otevření okna “Auto-Gain Optimisation Setup”. Nastavte kalibrační teplotu na 50, aby odpovídala reasociační (annealing) teplotě amplifikačního programu (obrázek 11).



**Obrázek 11. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.** Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr“ a „ROX“.



10. Hodnoty výsledků determinované kalibrací kanálů se automaticky uloží a jsou uvedené v seznamu v posledním okně programovací procedury (obrázek 12). Stiskněte “Start Run” (Spustit běh).



Obrázek 12. Spuštění běhu. Upozorňujeme, že software přístroje Rotor-Gene 3000 definuje fluorescenční barviva jako „FAM/Sybr“ a „ROX“.

11. . Může dojít k následujícím výsledkům (11a, 11b a 11c).

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích 13 a 14.

Tabulka 9 obsahuje pokyny pro interpretaci kvantitativních výsledků.

- 11a. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green je detekován signál.  
Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje RNA HIV-1.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling Orange podružná, protože vysoké výchozí koncentrace RNA viru HIV-1 (pozitivní signál v kanálu Cycling Green) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu interní kontroly v kanálu Cycling Orange (kompetice).



Upozorňujeme, že u přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.FAM pro pozitivní signál a Cycling A.ROX pro interní kontrolu.

**11b. Ve fluorescenčním kanálu Cycling Green není detekován žádný signál. Současně se v kanálu Cycling Orange objevuje signál interní kontroly.**

**Ve vzorku není prokazatelná žádná RNA HIV-1. Lze jej považovat za negativní.**

Při negativní RT-PCR HI Virus-1 vylučuje detekovaný signál interní kontroly možnost inhibice RT-PCR.

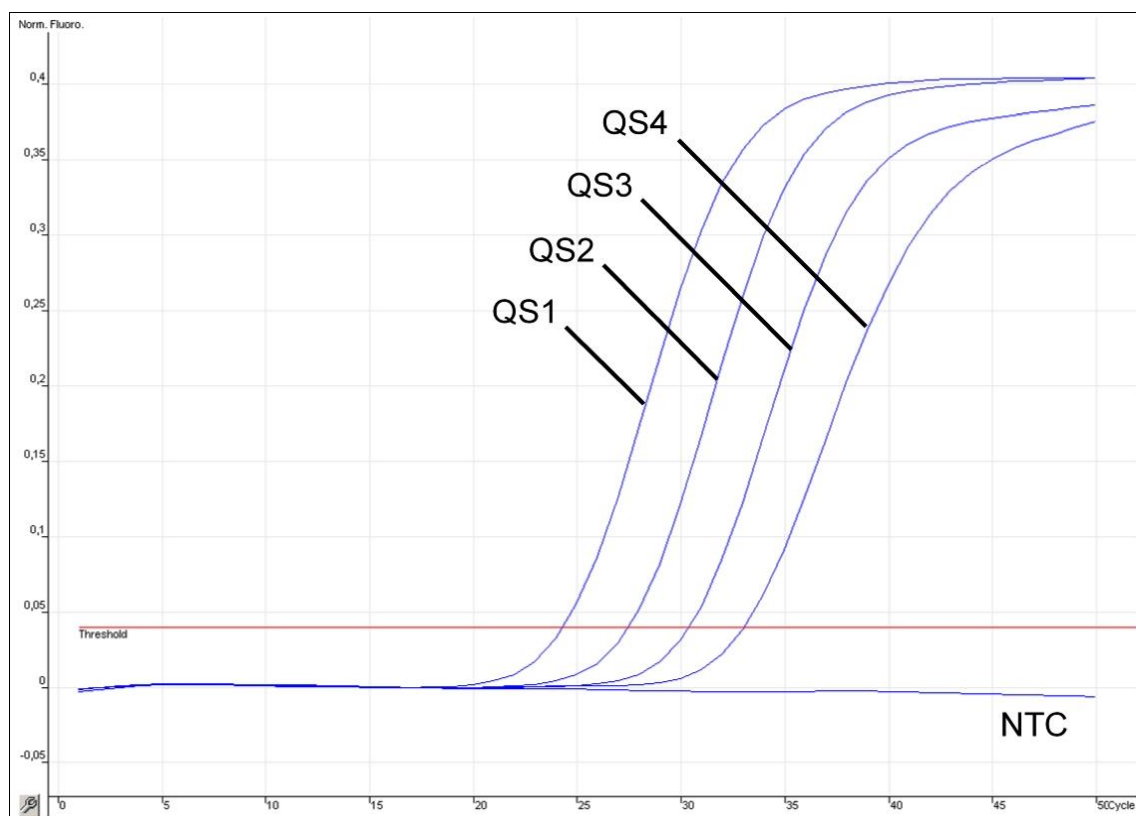
**i** Upozorňujeme, že u přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.ROX pro interní kontrolu a Cycling A.FAM pro chybějící signál.

**11c. Signál není detekován ani v kanálu Cycling Green ani v kanálu Cycling Orange.**

**Není možné učinit závěr.**

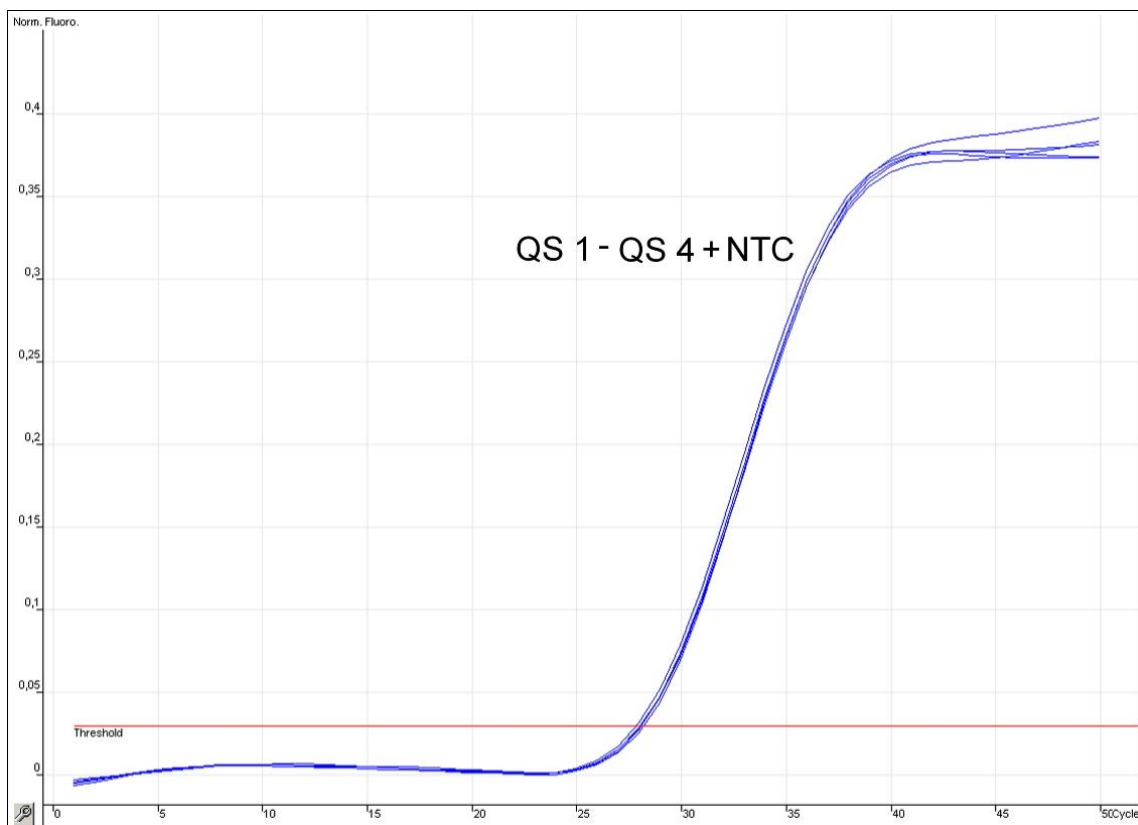
Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole “Řešení problémů”, strana 35.

**i** Upozorňujeme, že u přístroje Rotor-Gene 3000 se relevantní kanály označují Cycling A.FAM a Cycling A.ROX.



**Obrázek 13. Průkaz kvantifikačních standardů (HI Virus-1 RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).**





**Obrázek 14. Průkaz interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange při současné amplifikaci kvantifikačních standardů (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).**

**Tabulka 9. Interpretace kvantitativních výsledků**

Výsledek	Interpretace
RNA HIV > 72 IU/ml	Výsledek je v daném testovacím rozsahu. Pravděpodobnost průkazu RNA HIV je > 95 %. Pozitivní výsledek testu je statisticky zaručen.
RNA HIV < 72 IU/ml	Výsledek není v daném testovacím rozsahu. Reprokovatelnost pozitivního výsledku není zaručena.
RNA HIV negativní	RNA viru HIV nebyla prokázána.

## Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozboru (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Komentáře a návrhy

---






#### Žádný signál u pozitivních kontrol (HI Virus-1 RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM

- a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu PCR dat neodpovídá protokolu ❗ K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling Green nebo Cycling A.FAM pro analytickou RT-PCR HI Virus-1 a fluorescenční kanál Cycling Orange nebo Cycling A.ROX pro RT-PCR interní kontroly.
  
- b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene ❗ Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu. Viz “Protokol: PCR a analýza dat”, strana 25.
  
- c) Chybná konfigurace PCR ❗ Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem, případně PCR zopakujte. Viz “Protokol: PCR a analýza dat”, strana 25.
  
- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání“ (strana 7) ❗ Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
  
- e) Vypršela doba životnosti sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ❗ Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

## Komentáře a návrhy

---

### Slabý nebo chybějící signál interní kontroly ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange nebo -Cycling A.ROX při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM

- a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu  Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- b) Došlo k inhibici PCR  Ujistěte se, že používáte doporučený postup izolace a držte se přesně pokynů výrobce.
- c) Během extrakce došlo k úbytku RNA  Byla-li k izolaci přidána interní kontrola, může nepřítomnost signálu interní kontroly znamenat úbytek RNA během izolace. Ujistěte se, že používáte doporučenou izolační metodu (viz „Izolace RNA“, strana 22) a držte se přesně pokynů výrobce.
- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání“ (strana 7)  Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Vypršela doba životnosti sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR  Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

## Komentáře a návrhy

---

### Signály u negativních kontrol ve fluorescenčním kanálu Cycling Green nebo Cycling A.FAM při analytické PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci
- ① Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
  - ① Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
  - ① Pozitivní kontroly pipetujte zásadně jako poslední.
  - ① Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- b) Během extrakce došlo ke kontaminaci
- ① Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
  - ① Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

## Literatura

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu, atd.

Úplný seznam literatury naleznete v databance “QIAGEN Reference Database” (Databáze odkazů QIAGEN) na stránce [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) nebo kontaktujte technický servis QIAGEN nebo Vašeho místního distributora.

## Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: 2 směsi Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: 2 směsi Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4513265
<b>Sada QIAamp DSP Virus – pro purifikaci nukleových kyselin z lidské plazmy pro účely diagnostiky in vitro</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 příprav: Centrifugační kolonky, puřry, reagentie, zkumavky, nástavce kolonek a vakuové konektory QIAamp MinElute®	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx – pro analýzu PCR v reálném čase v klinických aplikacích validovanou jako in vitro diagnostikum</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002033

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9002042
<b>Rotor-Gene Q – výjimečná výkonnost PCR v reálném čase</b>		
Rotor-Gene Q 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9001650

<b>Produkt</b>	<b>Obsah</b>	<b>Kat. č.</b>
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt – HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, instalace a školení	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis, bez instalace a školení	9001590
<b>Příslušenství k Rotor-Gene Q</b>		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednokanálové pipety s využitím zkumavek 72 x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce ve standardní sestavě 8 x 12 s využitím zkumavek 96 x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky, pro 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 10 000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tenkostěnných zkumavek pro 1000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostěnných zkumavek pro 1000 reakcí	981008



Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní in vitro diagnostiku. Tímto se neuděluje žádný jiný obecný patent nebo licenci jiného druhu než toto specifické právo k používání vyplývající z nákupu.

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

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR a QIAamp DSP Virus jsou diagnostické sady s označením CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkt není dostupný ve všech zemích.

#### **Omezená licenční smlouva**

Použití tohoto produktu znamená, že jakýkoliv kupující či uživatel sady *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR souhlasí s následujícími podmínkami:

1. Sada *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR může být používána výlučně v souladu s *Příručkou pro sadu artus HI Virus-1 RG RT-PCR* a smí se používat pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponentů sady s komponenty, které nejsou v této sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu artus HI Virus-1 RG RT-PCR* a dodatečných protokolech dostupných na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může základy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

[www.qiagen.com](http://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)

