

„artus[®] HCV RG RT-PCR Kit“ vadovas



24 (katalogo Nr. 4518263)



96 (katalogo Nr. 4518265)

1 versija



Kiekybinė „in vitro“ diagnostika

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q“ instrumentais



4518263, 4518265



1049309LT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

VOKIETIJA

R5

MAT

1049309LT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN yra pirmaujanti novatoriškų mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir aptikti bet kokių biologinių mėginių turinį, tiekėja. Mūsų pažangūs, aukštos kokybės produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio iki rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:


- DNR, RNR ir baltymų gryninimas
- Nukleorūgščių ir baltymų tyrimai
- MikroRNR tyrimai ir RNR interferencija
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas – suteikti galimybę jums sėkmingai dirbti ir pasiekti laimėjimų. Daugiau informacijos rasite svetainėje www.qiagen.com.

Turinys

Rinkinio turinys	4
Simboliai	4
Laikymas	5
Numatytoji paskirtis	5
Produkto naudojimo apribojimai	6
Kokybės kontrolė	6
Įspėjimai ir atsargumo priemonės	6
Įvadas	7
Principas	7
Informacija apie patogeną	7
Darbinės charakteristikos	8
Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo	17
Svarbios pastabos	18
Bendrosios atsargumo priemonės	18
Mėginio ėmimas, laikymas ir transportavimas	18
RNR išskyrimas	20
Vidinė kontrolinė medžiaga	20
Kiekio nustatymas	21
Protokolas: PGR ir duomenų analizė	22
Trikčių šalinimo vadovas	32
Literatūra	35
Užsakymo informacija	36

Rinkinio turinys

„artus HCV RG RT-PCR Kit“		(24)	(96)
Katalogo Nr.		4518263	4518265
Reakcijų skaičius		24	96
Mėlyna	Hep. C Virus RG Master A	2 x 12 reakcijų	8 x 12 reakcijų
Violetinė	Hep. C Virus RG Master B	2 x 12 reakcijų	8 x 12 reakcijų
Raudona	Hep. C Virus RG QS 1* (10 ⁴ IU/μl) QS	200 μl	200 μl
Raudona	Hep. C Virus RG QS 2* (10 ³ IU/μl) QS	200 μl	200 μl
Raudona	Hep. C Virus RG QS 3* (10 ² IU/μl) QS	200 μl	200 μl
Raudona	Hep. C Virus RG QS 4* (10 ¹ IU/μl) QS	200 μl	200 μl
Žalia	Hep. C Virus RG IC [†] IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Balta	Vanduo (PGR klasės)	1000 μl	1000 μl
	Vadovas 	1	1

* Kiekybinės analizės etaloninis tirpalas.

† Vidinė kontrolinė medžiaga.

Simboliai



Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> testams atlikti



Tinka naudoti iki



In vitro diagnostikos medicinos prietaisas







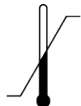



Katalogo numeris



Partijos numeris



Medžiagos numeris


	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris
	Visuotinis prekės numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas
	Svarbi pastaba

Laikymas

„*artus* HCV RG RT-PCR Kit“ komponentus reikia laikyti temperatūroje nuo -30 iki -15 °C; jie yra stabilūs iki ant etiketės nurodytos tinkamumo datos. Reikia vengti pakartotinai atšildyti ir užšaldyti (>2 x), nes tai gali sumažinti tyrimo jautrumą. Jei reagentai bus naudojami tik retkarčiais, juos reikia užšaldyti alikvotinėmis dalimis. Laikyti $2-8$ °C temperatūroje reikia ne ilgiau kaip 5 valandas.

Numatytoji paskirtis

„*artus* HCV RG RT-PCR Kit“ yra „in vitro“ nukleorūgščių amplifikacijos testas, skirtas hepatito C viruso (HCV) RNR kiekiui žmogaus plazmoje nustatyti. Šiame diagnostinių testų rinkinyje naudojama atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR); rinkinys konfigūruotas naudoti su „Rotor-Gene Q“ instrumentais. Naudojant testą HCV RNR galima kiekybiškai įvertinti $65-1 \times 10^6$ HCV IU/ml intervale.

 „*artus* HCV RG RT-PCR Kit“ negalima naudoti su „Rotor-Gene Q 2plex“ instrumentais.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ skirtas naudoti kartu atsižvelgiant į klinikinius simptomus ir kitus ligos prognozės laboratorinius žymenis ir naudoti kaip pagalbinę priemonę vertinant viruso atsaką į antiretrovirusinį gydymą, kai matuojamas HCV RNR lygio pokytis EDTA plazmoje. „artus HCV RG RT-PCR Kit“ nėra skirtas naudoti HCV atrankinės patikros tikslais arba kaip diagnostinis testas esamai HCV infekcijai patvirtinti.

Produkto naudojimo apribojimai

Visi reagentai gali būti naudojami tik „in vitro“ diagnostikai.

Produktą turi naudoti tik personalas, specialiai išmokytas atlikti „in vitro“ diagnostines procedūras.

Optimaliems PGR rezultatams užtikrinti reikia griežtai laikytis naudotojo vadovo nurodymų.

Reikia atkreipti dėmesį į tinkamumo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Nenaudokite komponentų, kurių galiojimo laikas baigėsi.

Nors mutacijos pasireiškia retai, tačiau dėl jų ypač atspariose viruso genomo, su kuriuo naudojami rinkinio pradmenys ir (arba) zondai, srityse gali nepavykti nustatyti kiekio arba aptikti viruso buvimo šiais atvejais. Tyrimo pagrįstumo ir veikimo duomenys reguliariai peržiūrimi.

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „artus HCV RG RT-PCR Kit“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS). Juos patogiu ir kompaktišku PDF formatu rasite interneto svetainėje www.qiagen.com/safety. Čia galite rasti, perskaityti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN® rinkinio ir rinkinio komponento SDS.

Mėginių ir tyrimų atliekas išmeskite laikydamiesi vietinių saugos reikalavimų.

Ivadas

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ sudėtyje yra paruošta naudoti sistema, skirta aptikti HCV viruso RNR, naudojant polimerazinę grandininę reakciją (PGR), naudojant „Rotor-Gene Q“ instrumentus. „Hep. C Virus RG Master A“ ir „Hep. C Virus RG Master B“ pagrindiniuose mišiniuose yra reagentų ir fermentų, skirtų atvirkštinei transkripcijai ir specifinei HCV genomo 240 bp regiono amplifikacijai bei tiesioginiam specifinio amplikono nustatymui „Rotor-Gene Q MDx“, „Rotor-Gene Q“ arba „Rotor-Gene 6000“ fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Rotor-Gene 3000“ fluorescenciniame kanale „Cycling A.FAM™“ (A.FAM™ ciklas) (šaltinis 470 nm, detektorius 510 nm).

Be to, „artus HCV RG RT-PCR Kit“ sudėtyje taip pat yra antra heterologinės amplifikacijos sistema, skirta galimam PGR slopinimui nustatyti. Jis aptinkamas kaip vidinė kontrolinė medžiaga (internal control, IC) „Rotor-Gene Q MDx“, „Rotor-Gene Q“ arba „Rotor-Gene 6000“ fluorescenciniame kanale „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas) arba „Rotor-Gene 3000“ fluorescenciniame kanale A.ROX™ (šaltinis 585 nm, detektorius 610 nm). Analitinės HCV AT-PGR aptikimo riba (žr. „Analitinis jautris“, 8 psl.) nesumažėja. Tiekiamos išorinės teigiamos kontrolinės medžiagos (Hep. C Virus RG QS 1–4), kurios leidžia nustatyti viruso RNR kiekį. Daugiau informacijos žr. „Kiečio nustatymas“, 21 psl.

Principas

Patogenų aptikimas taikant polimerazinę grandininę reakciją (PGR) pagrįstas specifinių patogeno genomo regionų amplifikacija. Taikant realiojo laiko PGR, amplifikuotas produktas aptinkamas naudojant fluorescencinius dažus. Jie paprastai yra susiję su oligonukleotidiniais zondais, kurie specifiskai jungiasi su amplifikuotu produktu. Fluorescencijos intensyvumo PGR tyrimų serijos metu (t. y. realiu-laiku) stebėjimas leidžia aptikti besikaupiantį produktą ir nustatyti jo kiekį, po PGR procedūros pakartotinai neatidarant reakcijos mėgintuvėlių.*

Informacija apie patogeną

Hepatitis C – tai kepenų uždegimas, kurį sukelia to paties pavadinimo virusas. Priešingai nei kiti hepatito virusai A, B, D arba E, hepatito C viruso (HCV) infekcija daugeliu atvejų sukelia lėtinę kepenų ligą. HCV infekcija dažnai nerodo jokių simptomų palyginti ilgą laiką. Dėl šios priežasties daugelis pacientų nežino, kad yra infekuoti HCV. Tačiau gydymas yra veiksmingiausias ankstyvaisiais ligos etapais. Šiuo metu vienintelis įrodytas, veiksmingas gydymas interferonu α (derinant su ribavirinu). Tačiau taip pat žinoma, kad tik kai kurie lėtiniai hepatitu C sergantys pacientai reaguoja į gydymą interferonu. Todėl tam tikromis aplinkybėmis šis brangus ligonių gydymas gali būti netinkamas ir turėti sunkų šalutinį poveikį, pvz., imuninės sistemos susilpnėjimas, dėl kurios paūmėja (pvz., lūpų pūslelinė, juostinė pūslelinė).

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

Darbinės charakteristikos

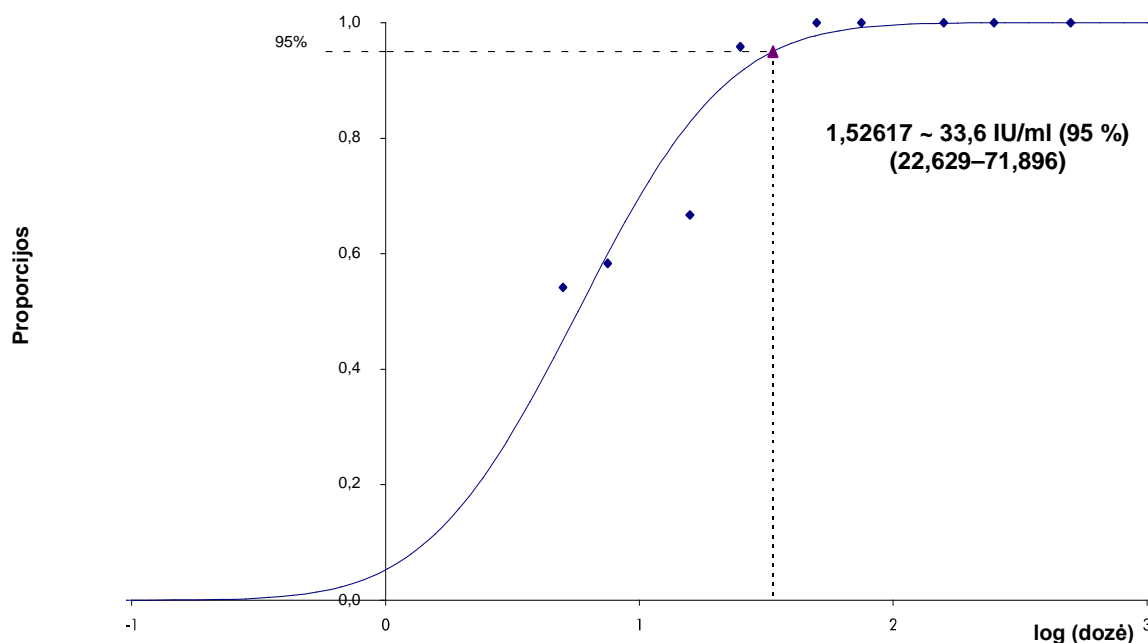
Analitinis jautris

Siekiant nustatyti analitinį „artus HCV RG RT-PCR Kit“ jautrį, standartinė skiedimo serija buvo nustatyta nuo 10 IU/μl iki nominalių 0,0316 IU/μl in vitro transkribuotų RNR kopijų ir buvo analizuojama naudojant „artus HCV RG RT-PCR Kit“. Testas buvo atliekamas 3 skirtingas dienas 8 kartotiniaus tyrimais. Rezultatai buvo nustatomi taikant statistinę „probit“ analizę.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ analitinio aptikimo riba yra 0,19 IU/μl ($p = 0,05$). Tai reiškia, kad yra 95 % tikimybė, kad bus aptikta 0,19 IU/ml.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ analitinis jautris įvertinant gryninimą („QIAamp[®] DSP Virus Kit“) „Rotor-Gene“ instrumentuose buvo nustatytas naudojant seriją WHO tarptautinių HCV RNR etaloninių tirpalų nuo 500 iki vardinės 5 HCV IU/ml praturtintų klinikinių plazmos mėginių. Buvo atliktas jų RNR ekstrahavimas naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“ (ekstrahuotas tūris: 0,5 ml, eliuavimo tūris: 25 μl). Kiekvienas iš 9 skiedinių buvo išanalizuotas naudojant „artus HCV RG RT-PCR Kit“ 3 skirtingas dienas 8 kartotiniaus tyrimais.

Rezultatai buvo nustatomi taikant statistinę „probit“ analizę. Grafinė „probit“ analizės iliustracija pateikta 1 pav. Analitinė aptikimo riba įvertinus „artus HCV RG RT-PCR Kit“ gryninimą kartu su „Rotor-Gene“ instrumentais yra 33,6 IU/ml ($p = 0,05$). Tai reiškia, kad yra 95 % tikimybė, kad bus aptikta 33,6 IU/ml.



1 pav. „Probit“ analizė: HCV („Rotor-Gene 3000“). „artus HCV RG RT-PCR Kit“, naudojamo su „Rotor-Gene 3000“, analitinis jautris įvertinus gryninimą („QIAamp DSP Virus Kit“, QIAGEN).

Specifiškumas

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ specifiškumas yra visų pirma ir geriausiai užtikrinamas parenkant pradmenis ir zondus, taip pat parenkant griežtas reakcijos sąlygas. Pradmenys ir zondai buvo patikrinti, ar nėra galimos homologijos visoms genų bankuose paskelbtoms sekoms, taikant sekos lyginamąją analizę. Taigi visų reikiamų potipių ir genotipų aptikimas buvo užtikrinamas.

Be to, specifiškumas buvo patvirtinamas naudojant 100 skirtingų HCV neigiamų plazmos mėginių. Jie neteikė jokių signalų naudojant HCV specifinius pradmenis ir zondus, kurie buvo tiekiami su „Hep. C Virus RG Masters“.

Galimas „artus HCV RG RT-PCR Kit“ kryžminis reaktyvumas buvo bandomas naudojant kontrolinę grupę, nurodytą 2 lentelėje. Nė vienas iš bandytų patogenų nebuvo reaktyvus. Kryžminis mišrių infekcijų reaktyvumas nepasireiškė.

1 lentelė. Atitinkamų genotipų specifiškumo tikrinimas

Virusas	Genotipas	Šaltinis	HCV („Cycling Green“ / A.FAM (žalias / A.FAM ciklas)	Vidinė kontrolinė medžiaga („Cycling Orange“ / A.ROX (oranžinis / A.ROX ciklas)
Hepatito C virusas	1	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+
Hepatito C virusas	2	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+
Hepatito C virusas	3	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+
Hepatito C virusas	4	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+
Hepatito C virusas	5	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+
Hepatito C virusas	6	NIBSC, „HemaCare“, Eseno universitetas	+	+

2 lentelė. Rinkinio specifiškumo bandymas naudojant potencialiai kryžmiškai reaktyvius patogenus

Kontrolinė grupė	HCV („Cycling Green“ / A.FAM (žalias / A.FAM ciklas)	Vidinė kontrolinė medžiaga („Cycling Orange“ / A.ROX (oranžinis / A.ROX ciklas)
Žmogaus imunodeficito virusas 1	–	+
Hepatito A virusas	–	+
Hepatito B virusas	–	+
Žmogaus herpeso virusas 1 (1 tipo paprastas herpeso virusas)	–	+
Žmogaus herpeso virusas 2 (2 tipo paprastas herpeso virusas)	–	+
Žmogaus herpeso virusas 3 (varicella-zoster virusas)	–	+
Žmogaus herpeso virusas 5 (citomegalovirusas)	–	+
1 ir 2 tipo žmogaus T ląstelių leukemijos virusas	–	+
Žmogaus herpeso virusas 6A	–	+
Žmogaus herpeso virusas 6B	–	+
Žmogaus herpeso virusas 8 (Kapoši sarkomos herpeso virusas)	–	+
Enterovirusas	–	+
Parvovirusas B19	–	+
Denge karštligė	–	+
Geltonoji karštligė	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

2 lentelė. Tęsinys

Kontrolinė grupė	HCV („Cycling Green“ / A.FAM (žalias / A.FAM ciklas))	Vidinė kontrolinė medžiaga („Cycling Orange“ / A.ROX (oranžinis / A.ROX ciklas))
<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>	–	+

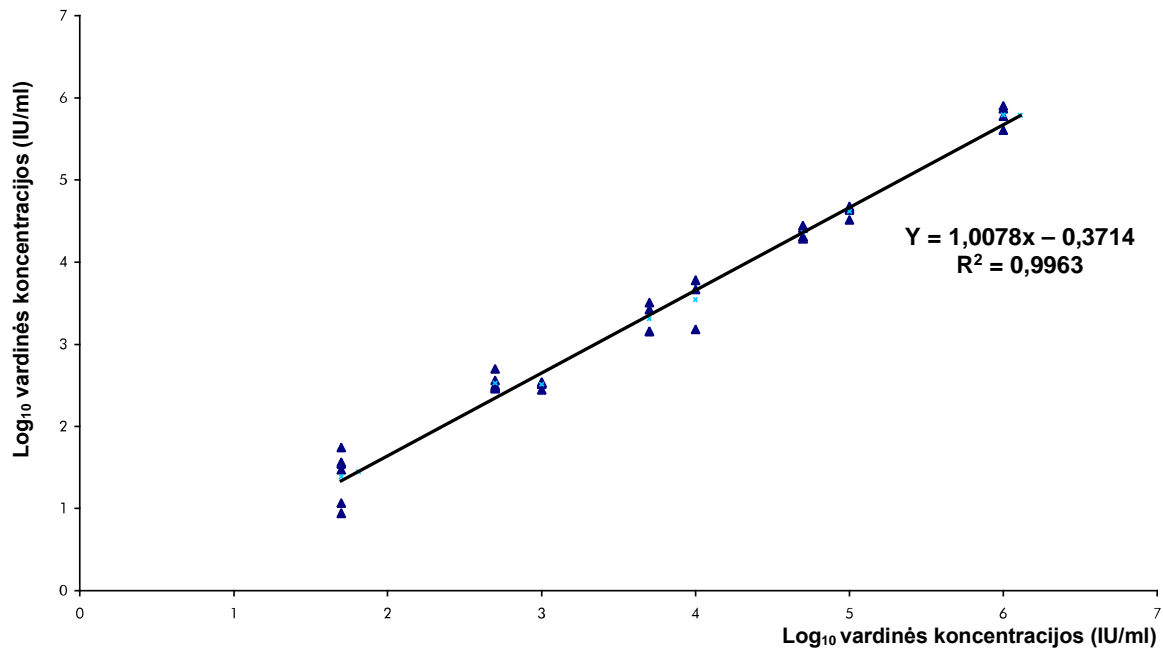
Tiesinis diapazonas

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ tiesinis diapazonas (analitinis matavimas) buvo nustatytas analizuojant HCV in vitro transkripto nuo 1×10^7 IU/μl iki 1 IU/μl skiedimo seriją. Skiedimo serija buvo sukalibruota pagal WHO tarptautinį HCV RNR standartą.

Naudojant „artus HCV RG RT-PCR Kit“ su „Rotor-Gene“ instrumentais, buvo tiriami kiekvieno skiedimo pakartojimai (n = 8).

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ tiesinis diapazonas buvo nustatytas taip, kad apimtų koncentracijas nuo 1 IU/μl iki bent 1×10^7 IU/μl.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ tiesinis diapazonas įvertinus gryninimą buvo nustatytas analizuojant „Acrometrix“ mėginius. Gryninimas buvo atliktas naudojant pakartojimus (n = 6) nuo 50 IU/ml iki 10³ IU/ml ir pakartojimus (n = 4) nuo 5 x 10³ IU/ml iki 10⁶ IU/ml, naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“ (ekstrahuotas tūris: 0,5 ml, eliuavimo tūris: 25 µl). Kiekvienas mėginys buvo išanalizuotas naudojant „artus HCV RG RT-PCR Kit“ su „Rotor-Gene“ instrumentais. „artus HCV RG RT-PCR Kit“ tiesinis diapazonas įvertinus gryninimą buvo nustatytas taip, kad apimtų koncentracijas nuo 65 IU/µl iki bent 10⁶ IU/µl (žr. 2 pav.).



2 pav. „artus HCV RG RT-PCR Kit“ tiesinis diapazonas. Tiesinio diapazono skaičiavimas įvertinant gryninimą. Tiesi linija buvo nustatyta pagal log₁₀ suskaičiuotų koncentracijų tiesinę regresiją naudojant log₁₀ vardines koncentracijas. Regresijos kreivės lygtis įtraukta į paveikslėlį.

Tikslumas

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ tikslumo duomenys, gauti „Rotor-Gene“ instrumentais, leidžia nustatyti bendrąją tyrimo dispersiją. Bendrąją dispersiją sudaro kintamumas tyrimo viduje (kelių tos pačios koncentracijos mėginių kintamumas vieno eksperimento metu), kintamumas tarp tyrimų (kelių tyrimo rezultatų kintamumas, kai tyrimą skirtingi operatoriai atlieka skirtingais to paties tipo instrumentais vienoje laboratorijoje) ir kintamumas tarp partijų (kelių tyrimo rezultatų, naudojant skirtingas partijas, kintamumas). Gauti duomenys buvo naudojami patogeniui specifinės ir vidinės kontrolinės medžiagos PGR standartiniam nuokrypiui, dispersijai ir variacijos koeficientui nustatyti.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ tikslumo duomenys buvo renkami taikant mažiausios koncentracijos kiekio nustatymo etaloninį tirpalą (QS 4; 10 IU/μl). Bandytas buvo atliekamas 8 kartotiniais tyrimais. Tikslumo duomenys buvo apskaičiuoti remiantis C_T reikšmėmis, taikomomis amplifikacijos kreivėms (C_T : slenksčio ciklas, žr. 3 lentelę). Taip pat IU/μl kiekybinės analizės rezultatų tikslumo duomenys buvo nustatomi naudojant atitinkamas C_T reikšmes (žr. 4 lentelę). Remiantis šiais rezultatais, bet kurio nurodytos koncentracijos mėginio vidinės kontrolinės medžiagos aptikimo bendra statistinė sklaida yra 1,52 % (C_T) arba 25,71 % (koncentracija) ir 0,75 % (C_T). Šios reikšmės pagrįstos visų atskirų nustatyto kintamumo reikšmių visuma.

3 lentelė. Tikslumo duomenys pagal C_T reikšmes

	C_T reikšmė	Standartinis nuokrypis	Variacijos koeficientas (%)
Kintamumas tyrimo viduje: Hep. C Virus RG QS 4	32,81	0,09	0,28
Kintamumas tyrimo viduje: Hep. C Virus RG IC	30,04	0,08	0,27
Kintamumas tarp tyrimų: Hep. C Virus RG QS 4	32,14	0,5	1,57
Kintamumas tarp tyrimų: Hep. C Virus RG IC	30,23	0,22	0,71
Kintamumas tarp partijų: Hep. C Virus RG QS 4	32,56	0,48	1,46
Kintamumas tarp partijų: Hep. C Virus RG IC	30,28	0,24	0,78
Bendroji dispersija: Hep. C Virus RG QS 4	32,41	0,49	1,52
Bendroji dispersija: Hep. C Virus RG IC	30,29	0,29	0,75

4 lentelė. Tikslumo duomenys pagal kiekybinės analizės rezultatus (IU/μl)

	Standartinis nuokrypis	Dispersija	Variacijos koeficientas (%)
Kintamumas tyrimo viduje: Hep. C Virus RG QS 4	0,64	0,41	6,34
Kintamumas tarp tyrimų: Hep. C Virus RG QS 4	1,00	1,00	9,93
Kintamumas tarp partijų: Hep. C Virus RG QS 4	3,92	15,34	37,35
Bendroji dispersija: Hep. C Virus RG QS 4	2,63	6,93	25,71

Patikimumas

Patikimumo tikrinimas leidžia nustatyti bendrą „artus HCV RG RT-PCR Kit“ klaidų dažnį. 100 HCV neigiamų plazmos mėginių buvo praturtinti 2 IU/μl eliuavimo tūriu HCV kontrolinės RNR (maždaug triguba analitinio jautrio ribos koncentracija). Po ekstrahavimo naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“ šie mėginiai buvo analizuojami naudojant „artus HCV RG RT-PCR Kit“. Visų HCV mėginių klaidų dažnis buvo 0 %. Be to, vidinės kontrolinės medžiagos patikimumas buvo vertinamas gryninant ir analizuojant 100 HCV neigiamų plazmos mėginių. Bendrasis klaidų dažnis buvo 0 %. Slopinimo nepastebėta. Taigi „artus HCV RG RT-PCR Kit“ patikimumas yra ≥ 99 %.

Atkartojamumas

Rezultatų atkuriamumas leidžia reguliariai įvertinti „artus HCV RG RT-PCR Kit“ veikimą ir palyginti efektyvumą su kitais produktais. Šie duomenys gauti dalyvaujant nustatytose kvalifikacijos patikrinimo programose.

Diagnostinis įvertinimas

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ buvo įvertintas atlikus tyrimą. Lyginant „artus HCV RG RT-PCR Kit“ su „COBAS® TaqMan® HCV Test“, retrospektyviai buvo išanalizuoti 276 plazmos mėginiai. Visi plazmos mėginiai prieš tai buvo išanalizuoti kaip teigiami arba neigiami naudojant „COBAS TaqMan HCV Test“ įprastos diagnostikos metu.

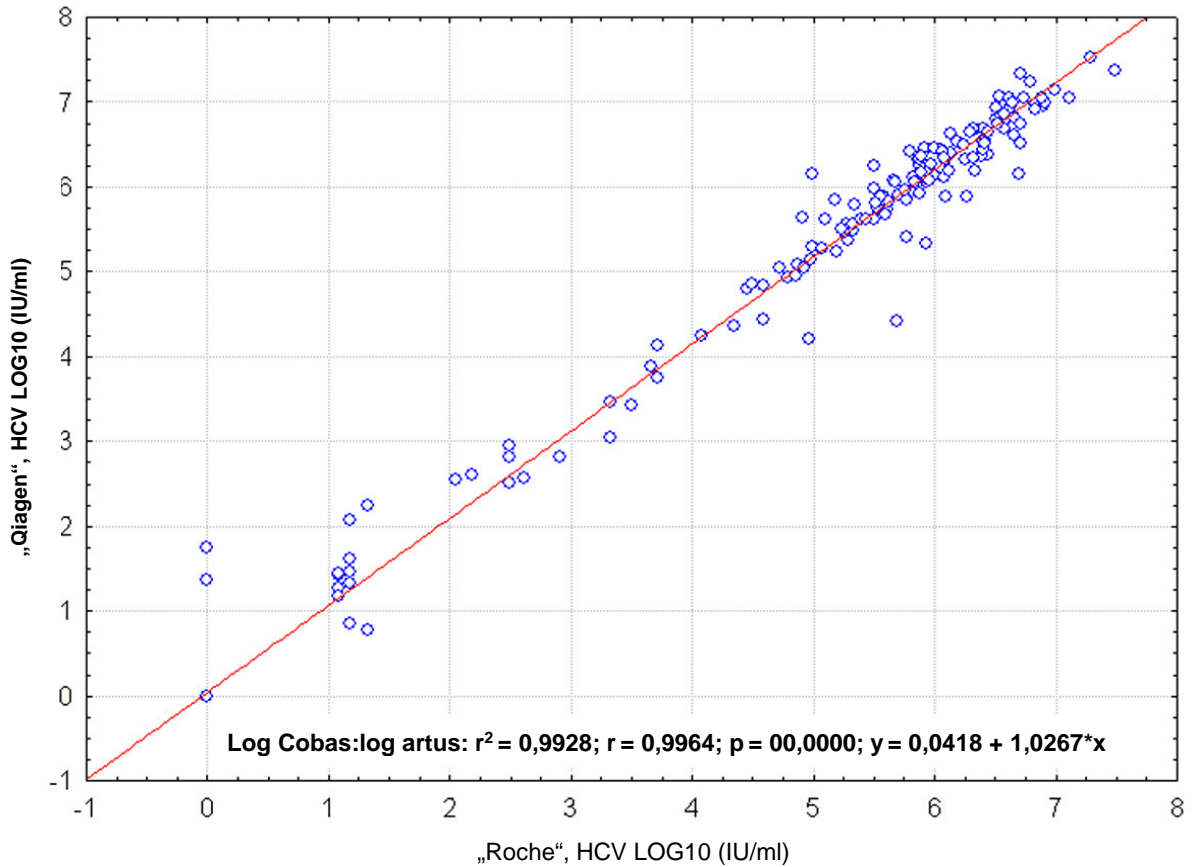
Išbandant „*artus* HCV RG RT-PCR Kit“, HCV RNR buvo išskirta naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“ ir analizuota naudojant „Rotor-Gene 6000“ instrumentą. Atliekant palyginamąjį bandymą su „COBAS TaqMan HCV Test“, HCV RNR buvo analizuojama laikantis gamintojo instrukcijų, pateiktų pakuotės lapelyje. Rezultatai, gauti naudojant „*artus* HCV RG PCR Kit“, buvo palyginti su rezultatais, gautais naudojant „COBAS TaqMan HCV Test“ (žr. 5 lentelę ir 3 pav.).

137 iš 139 mėginių, kurie testuojant „COBAS TaqMan HCV Test“ buvo nustatyti kaip teigiami, taip pat buvo teigiami naudojant „*artus* HCV RG RT-PCR Kit“. Visi iš 137 mėginių, kurie testuojant „COBAS TaqMan HCV Test“ buvo nustatyti kaip neigiami, taip pat buvo neigiami naudojant „*artus* HCV RG RT-PCR Kit“.

Jeigu „COBAS TaqMan HCV Test“ rezultatai naudojami kaip etaloniniai, diagnostinis jautris yra 100 %, o diagnostikos specifiškumas yra 98,6 %.

5 lentelė. 276 analizuotų retrospektyvinių EDTA plazmos mėginių rezultatai

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



3 pav. „COBAS TaqMan HCV Test“ („Roche“, HCV; su mėginio gryninimu naudojant „COBAS AmpliPrep“ sistemą) palyginimas su „artus HCV RG RT-PCR Kit“ (QIAGEN, HCV; su mėginio gryninimu naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“). Abiejų sistemų kiekybinių rezultatų koreliacija (5 lentelė) buvo analizuojama pagal tiesinę regresiją. Abiejų rinkinių rezultatai pavaizduoti XY (sklaidos) diagramoje su log–log skale.

Įranga ir reagentai, tiekiami naudotojo

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

- RNR išskyrimo rinkinys (žr. „RNR išskyrimas“, 20 psl.)
- Pipetės (reguliuojamos)*
- Sterilūs pipečių antgaliai su filtrais
- Sūkurinė maišyklė*
- Stalinė centrifuga* su rotoriumi 2 ml reakcijos mėgintuvėliams
- „Rotor-Gene Q MDx“, „Rotor-Gene Q“ arba „Rotor-Gene“ instrumentas*† su fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling Green“ (žalias ciklas) ir „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas), arba fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas) ir „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas)
- „Rotor-Gene Q MDx“ / „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos versija 1.7.94 arba naujesnė („Rotor-Gene 6000“ programinės įrangos versija 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; „Rotor-Gene 3000“ programinės įrangos versija 6.0.23)
- „Strip Tubes and Caps, 0.1 ml“, skirtos naudoti su 72 šulinėlių rotoriumi (kat. Nr. 981103 arba 981106)
- Arba: „PCR Tubes, 0.2 ml“, skirti naudoti su 36 šulinėlių rotoriumi (kat. Nr. 981005 arba 981008)
- Vėsinimo blokas („Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes“, kat. Nr. 9018901 arba „Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes“, kat. Nr. 9018905)

* Įsitikinkite, kad visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

† „artus HCV RG RT-PCR Kit“ negalima naudoti su „Rotor-Gene Q 2plex“ instrumentais.

Svarbios pastabos

Bendrosios atsargumo priemonės

Naudotojas visada turi laikytis šių nurodymų:

- Naudokite sterilius pipečių antgalius su filtrais.
- Teigiamas medžiagas (pavyzdžiui, teigiamas kontrolines medžiagas ir amplikonus) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Prieš pradėdami tyrimą visus komponentus gerai atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Atšildę sumaišykite komponentus (pakartotinai įsiurbdami ir lašindami pipete arba naudodami impulsinę sukurinę maišyklę) ir trumpai centrifuguokite.
- Dirbkite greitai, komponentus laikykite ant ledo arba vėsavimo bloke (72/96 šulinėlių įkėlimo bloke).

Mėginio ėmimas, laikymas ir transportavimas

i Visi mėginiai turi būti laikomi potencialiai infekuojančia medžiaga.

Leistinos tik šios mėginių medžiagos, su kurioms dirbant turi būti griežtai laikomasi šių taisyklių ir specialių instrukcijų, susijusių su ėmimu, transportavimu ir laikymu.

i Dabartiniai tyrimai remiasi EDTA arba citrato plazma, kurie yra tinkamiausios mėginių medžiagos HCV aptikti. Todėl rekomenduojame su „artus HCV RG RT-PCR Kit“ naudoti šias medžiagas.

„artus HCV RG RT-PCR Kit“ rinkinio vidinis patvirtinimas buvo atliktas naudojant žmogaus EDTA plazmos mėginius. Kitos mėginių medžiagos nėra patvirtintos. Ruošdami mėginį naudokite tik rekomenduojamą RNR išskyrimo rinkinį (žr. „RNR išskyrimas“, 20 psl.).

Naudojant tam tikras mėginių medžiagas būtina griežtai laikytis specialių ėmimo, gabenimo ir laikymo instrukcijų.

Mėginio ėmimas

Kiekvieną kartą imant kraują pažeidžiamos kraujagyslės (arterijos, venos, kapiliarai). Turi būti naudojama tik nekenksminga ir sterili medžiaga. Imant kraują reikia pasirūpinti tinkamomis vienkartinėmis medžiagoms. Duriant į veną neturi būti naudojamos per plonos kapiliarams skirtos adatos. Kraujas iš venos turi būti imamas atitinkamose alkūnės linkio, dilbio arba kitos rankos pusės vietose. Kraujas turi būti imamas naudojant standartinius mėginių ėmimo vamzdelius (raudonas kamštelis, „Sarstedt“ ar atitinkamas kito gamintojo mėgintuvėlis). Turi būti paimta 5–10 ml tūrio EDTA kraujo. Paėmus mėginį mėgintuvėliai turi būti iš karto sumaišyti apverčiant (8 x, neplakti).

i Negalima naudoti heparinizuotų žmonių mėginių (žr. „Trukdančios medžiagos“, 19 psl.).

Mėginio laikymas

Visas kraujas turi būti atskirtas į plazmos ir ląstelių komponentus 20 minučių centrifuguojant 800–1600 x g 6 valandų laikotarpiu. Atskirta plazma turi būti perkelta į sterilius polipropileno mėgintuvėlius. Tyrimo jautrumas gali būti sumažintas įprastai užšaldžius mėginius arba norint juos laikyti ilgesnį laiką. Viruse inkapsuluota RNR yra stabili kelias dienas, jei laikoma 4 °C temperatūroje, savaites, jei laikomas –20 °C, ir netgi mėnesius ir metus, jei laikomas –70 °C temperatūroje.*

Mėginių gabenimas

Mėginių medžiaga visada turi būti gabenama nedūžtančioje gabenimui skirtoje talpoje. Tokiu būdu galima išvengti potencialaus infekcijos pavojaus dėl mėginio nuotėkio. Mėginiai turi būti gabenami laikantis vietinių ir šalyje galiojančių patogeninės medžiagos gabenimo instrukcijų.†

Mėginiai turi būti išsiųsti per 6 valandas. Nerekomenduojama laikyti mėginių jų ėmimo vietoje. Mėginius galima siųsti paštu, laikantis teisės aktuose pateiktų patogeninių medžiagų gabenimo instrukcijų. Rekomenduojame siųsti mėginį naudojantis kurjerių tarnybos paslaugomis. Kraujo mėginiai turi būti išsiųsti atvėsinti (2–8 °C) ir atskyrus giliai sušaldytą plazmą (nuo –15 iki –30 °C).

Trukdančios medžiagos

Padidėjęs bilirubino (≤ 15 mg/dl) ir lipidų (≤ 800 mg/dl) kiekis bei hemolitiniai mėginiai sistemai poveikio neturi. Heparinas (≤ 10 IU/ml) veikia PGR. Mėginių, paimtų į mėgintuvėlius, kuriuose yra antikoagulianto heparino, naudoti negalima. Taip pat negalima naudoti heparinizuotų pacientų mėginių.

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

† Tarptautinė oro transporto asociacija („International Air Transport Association“, IATA). Pavojingiems kroviniams taikomi reglamentai.

RNR išskyrimas

„QIAamp DSP Virus Kit“ (QIAGEN, kat. Nr. 60704) patvirtintas virusinei RNR, skirtai naudoti su „artus HCV RG RT-PCR Kit“, gryninti iš žmogaus plazmos. Atlikite viruso RNR gryninimą pagal „QIAamp DSP Virus Kit“ vadove (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*) pateiktus nurodymus.

i Ekstrahavimo efektyvumui, taigi ir DNR / RNR išeigai užtikrinti labai svarbu naudoti nešančiąją RNR. Siekiant padidinti nešančiosios RNR, pateiktos su „QIAamp DSP Virus Kit“, stabilumą, rekomenduojame laikytis nurodymų dėl nešančiosios RNR atkūrimo ir laikymo, pateiktų instrukcijų vadove („Reagentų ir buferių paruošimas“).

i „artus HCV RG RT-PCR Kit“ vidinę kontrolinę medžiagą galima naudoti tiesiogiai išskyrimo procedūros metu (žr. „Vidinė kontrolinė medžiaga“ toliau). Pasirūpinkite, kad į gryninimo procedūrą būtų įtrauktas vienas neigiamas plazmos mėginys. Jo atitinkamas vidinės kontrolinės medžiagos signalas naudojamas kaip išgryninimo vertinimo pagrindas

Vidinė kontrolinė medžiaga

Teikiama vidinė kontrolinė medžiaga (Hep. C Virus RG IC). Tai leidžia naudotojui kontroliuoti RNR išskyrimo procedūrą ir patikrinti, ar nėra galimo PGR slopinimo. Tai darykite įdėdami vidinės kontrolinės medžiagos į atskirtą medžiagą santykiu 0,1 µl kiekvienam 1 µl eliuavimo tūrio. Pavyzdžiui, naudojant „QIAamp DSP Virus Kit“, RNR eliuuojama 60 µl „Elution Buffer“ (AVE). Taigi iš pradžių reikia pridėti 6 µl vidinės kontrolinės medžiagos.

i Vidinės kontrolinės medžiagos ir nešančiosios RNR (žr. „RNR išskyrimas“ anksčiau) reikia pridėti tik į lizės buferio ir mėginio medžiagos mišinį arba tiesiai į lizės buferį.

Vidinės kontrolinės medžiagos negalima dėti tiesiai į mėginio medžiagą. Jei dedama į lizės buferį, atkreipkite dėmesį į tai, kad vidinės kontrolinės medžiagos ir lizės buferio-nešančiosios RNR mišinį reikia ruošti šviežiai ir iš karto naudoti (laikant mišinį kambario temperatūroje arba šaldytuve tik kelias valandas, galima vidinės kontrolinės medžiagos triktis ir ekstrahavimo efektyvumo sumažėjimas).

i Vidinės kontrolinės medžiagos ir nešančiosios RNR negalima dėti tiesiai į mėginio medžiagą.

Galima pasirinkti naudoti vidinę kontrolinę medžiagą tik galimam PGR slopinimui tikrinti. Šiame taikyme vidinę kontrolinę medžiagą pilkite tiesiai į „Hep. C Virus RG Master A“ ir „Hep. C Virus RG Master B“ mišinį, kaip aprašyta protokolo 2b veiksmo (23 psl.).

Kiečio nustatymas

Pridėti kiekybinio nustatymo etaloniniai tirpalai (Hep. C Virus RG QS 1–4) traktuojami kaip anksčiau gryninti mėginiai ir naudojamas tas pats tūris (20 µl). Standartinei kreivei „Rotor-Gene Q“ instrumentuose sukurti visus 4 kiečio nustatymo etaloninius tirpalus reikia naudoti ir apibrėžti dialogo lange „Edit Samples“ (Mėginių redagavimas) kaip etaloninius tirpalus su nurodytomis koncentracijomis (žr. instrumento naudotojo vadovą).

i Kiekybinės analizės etaloniniai tirpalai apibrėžiami kaip IU/µl.* Šią lygtį reikia taikyti norint konvertuoti standartinę kreivę nustatytus dydžius į IU/ml mėginio medžiagoje:

$$\text{Rezultatas (IU/ml)} = \frac{\text{Rezultatas (IU/}\mu\text{l)} \times \text{elivavimo tūris (}\mu\text{l)}}{\text{Mėginio tūris (ml)}}$$

Teoriškai aukščiau pateiktoje lygtyje reikia nurodyti pradinį mėginio tūrį. Į tai reikia atsižvelgti, jei prieš nukleorūgščių ekstrahavimą pakito mėginio tūris (pvz., tūris sumažėjo centrifuguojant arba padidėjo pridėjus išskyrimui reikalingą tūrį).

* Etaloninis tirpalas buvo sukalibruotas naudojant 1-ąjį tarptautinį HCV standartą (pasaulio sveikatos organizacijos, (World health organization, WHO)).

Protokolas: PGR ir duomenų analizė

i Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą paskaitykite „Svarbios pastabos“, 18–21 psl.
- Prieš pradėdami vykdyti protokolą, skirkite laiko susipažinti su „Rotor-Gene Q“ instrumentu. Žr. instrumento naudotojo vadovą.
- Užtikrinkite, kad į vieną PGR procedūrą būtų įtrauktas bent vienas kiekybinės analizės etaloninis tirpalas ir viena neigiama kontrolinė medžiaga (vanduo, PGR klasės). Norėdami generuoti standartinę kreivę, kiekvienoje PGR procedūroje naudokite visus 4 pateiktus kiekybinės analizės etaloninius tirpalus (Hep. C Virus RG QS 1–4).

Prieš pradėdant atliekami veiksmai

- Įsitikinkite, kad vėsinimo blokas („Rotor-Gene Q“ instrumento priedas) yra atvėsintas iki 2–8 °C temperatūros.
- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti, sumaišyti (pakartotinai lašinant pipete į viršų ir žemyn arba naudojant pulsinę sukurinę maišyklę) ir trumpai centrifuguoti.

Procedūra

1. Įdėkite reikiamą PGR mėgintuvėlių skaičių į vėsinimo bloko adapterius.
2. Jei vidinę kontrolinę medžiagą naudojate RNR išskyrimo procedūrai stebėti ir galimam PGR slopinimui tikrinti, vykdykite 2a veiksmą. Jei vidinę kontrolinę medžiagą naudojate tik galimam PGR slopinimui tikrinti, vykdykite 2b veiksmą.
- 2a. Vidinė kontrolinė medžiaga jau pridėta išskyrimui (žr. „Vidinė kontrolinė medžiaga“, 20 psl.). Tokiu atveju paruoškite pagrindinį mišinį pagal 6 lentelę.

Reakcijos mišinyje paprastai būna visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

6 lentelė. Pagrindinio mišinio ruošimas (vidinė kontrolinė medžiaga naudojama RNR išskyrimui stebėti ir galimam PGR slopinimui tikrinti)

Mėginių skaičius	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 µl	144 µl
Hep. C Virus RG Master B	18 µl	216 µl
Hep. C Virus RG IC	0 µl	0 µl
Bendrasis tūris	30 µl	360 µl

2b. Vidinę kontrolinę medžiagą reikia pilti tiesiai į „Hep. C Virus Master A“ ir „Hep. C Virus Master B“ mišinį. Tokiu atveju paruoškite pagrindinį mišinį pagal 7 lentelę.

Reakcijos mišinyje paprastai būna visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

7 lentelė. Pagrindinio mišinio ruošimas (vidinė kontrolinė medžiaga naudojama tik galimam PGR slopinimui tikrinti)

Mėginių skaičius	1	12
Hep. C Virus RG Master A	12 µl	144 µl
Hep. C Virus RG Master B	18 µl	216 µl
Hep. C Virus RG IC	2 µl	24 µl
Bendrasis tūris	32 µl	384 µl

* Tūrio padidėjimo pridėjus vidinę kontrolinę medžiagą ruošiant PGR tyrimą nepaisoma. Aptikimo sistemos jautris nesumažėja.

3. Į kiekvieną PGR mėgintuvėlį pipete įlašinkite 30 µl pagrindinio mišinio. Po to įpilkite 20 µl eliuotos mėginio RNR (žr. 8 lentelę). Atitinkamai 20 µl ne mažiau kaip vieno iš kiekio nustatymo etaloninių tirpalų (Hep. C Virus RG QS 1–4) reikia naudoti kaip teigiamą kontrolinę medžiagą, o 20 µl vandens (vandens, PGR klasės) – kaip neigiamą kontrolinę medžiagą.

8 lentelė. Pasiruošimas PGR tyrimui

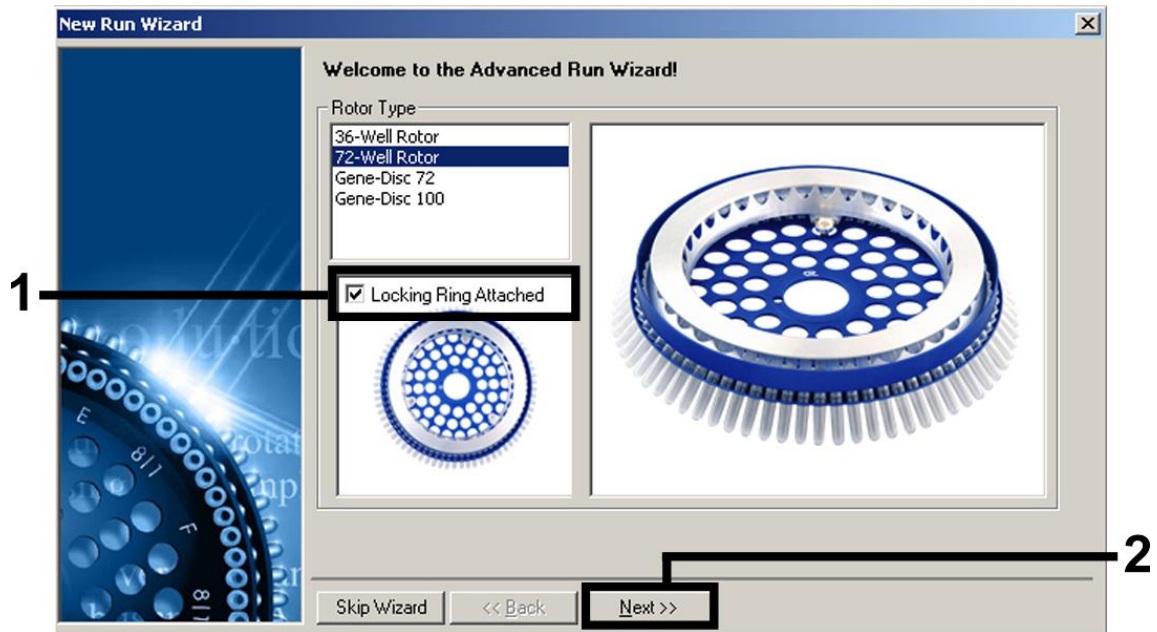
Mėginių skaičius	1	12
Pagrindinis mišinys	30 µl	Po 30 µl
Mėginys	20 µl	Po 20 µl
Bendrasis tūris	50 µl	Po 50 µl

4. Uždarykite PGR mėgintuvėlius. Įsitikinkite, kad ant rotoriaus viršaus uždėtas fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene“ instrumento priedas), kad procedūros metu mėgintuvėliai netyčia neatsidarytų.
5. HCV viruso RNR aptikimo temperatūros profilį sukurkite, laikydamiesi šių veiksmų.

Bendrų tyrimo parametrų nustatymas	4, 5, 6 pav.
Atvirkštinė RNR transkripcija	7 pav.
Pradinis „karštojo paleidimo“ fermento aktyvinimas	8 pav.
cDNR amplifikacija	9 pav.
Fluorescencinio kanalo jautrio reguliavimas	10 pav.
Procedūros pradžia	11 pav.

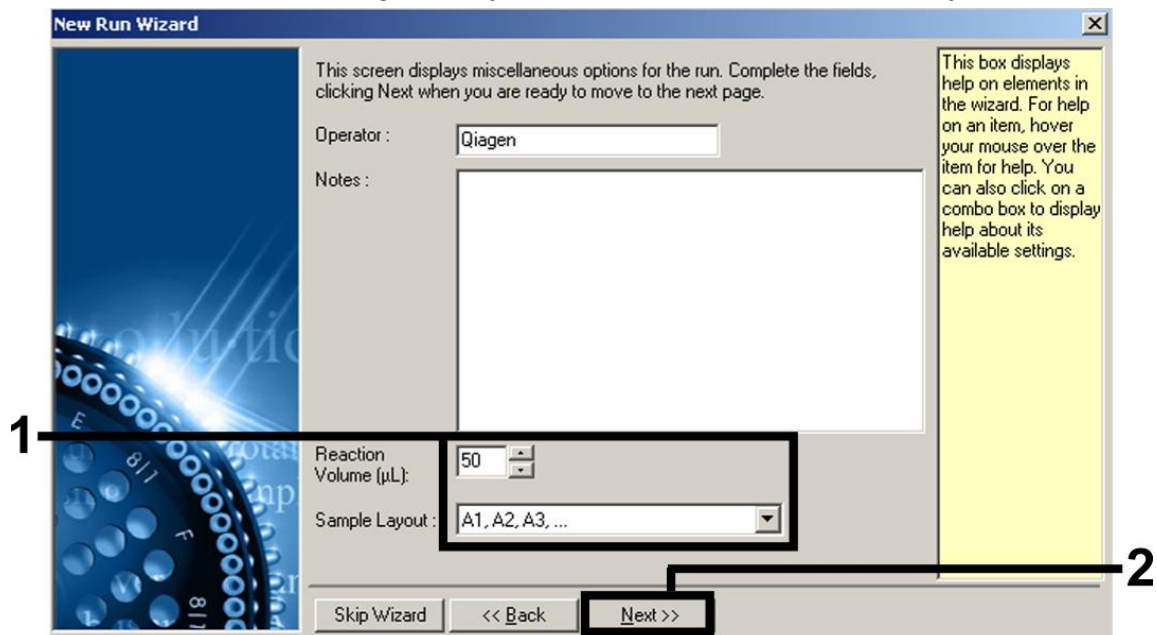
Visos specifikacijos taikomos „Rotor-Gene Q MDx“ / „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos versijai 1.7.94, „Rotor-Gene 6000“ programinės įrangos versijoms 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, ir „Rotor-Gene 3000“ programinės įrangos versijai 6.0.23. Instrumento naudotojo vadove susiraskite papildomos informacijos apie „Rotor-Gene“ instrumentų programavimą. Iliustracijose šie parametrai paryškinti juodu šriftu. Iliustracijos pateiktos „Rotor-Gene Q“ instrumentams. Kai „Rotor-Gene 3000“ reikalingos kitokios reikšmės, šie skirtumai yra aprašomi tekste.

6. Pirma atidarykite dialogo langą „New Run Wizard“ (naujos procedūros vedlys) (4 pav.). Pažymėkite laukelį „Locking Ring Attached“ (fiksuojamasis žiedas uždėtas) ir spustelėkite „Next“ (tęsti).



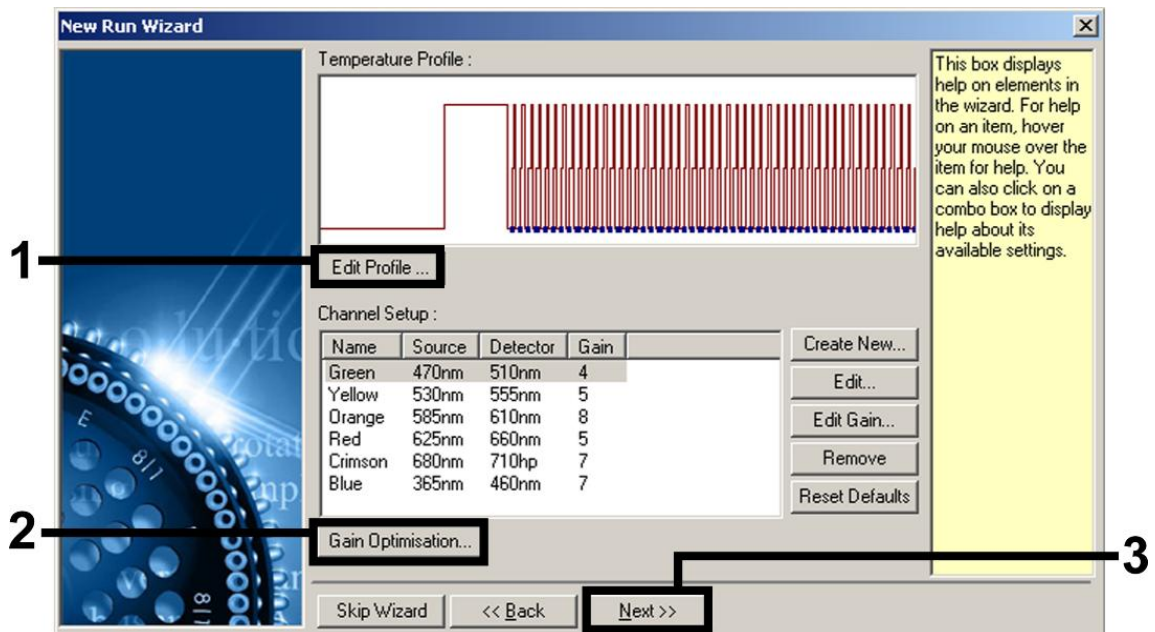
4 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (naujos procedūros vedlys).

7. Pasirinkite PGR reakcijos tūrį 50 ir spustelėkite „Next“ (tęsti) (5 pav.).

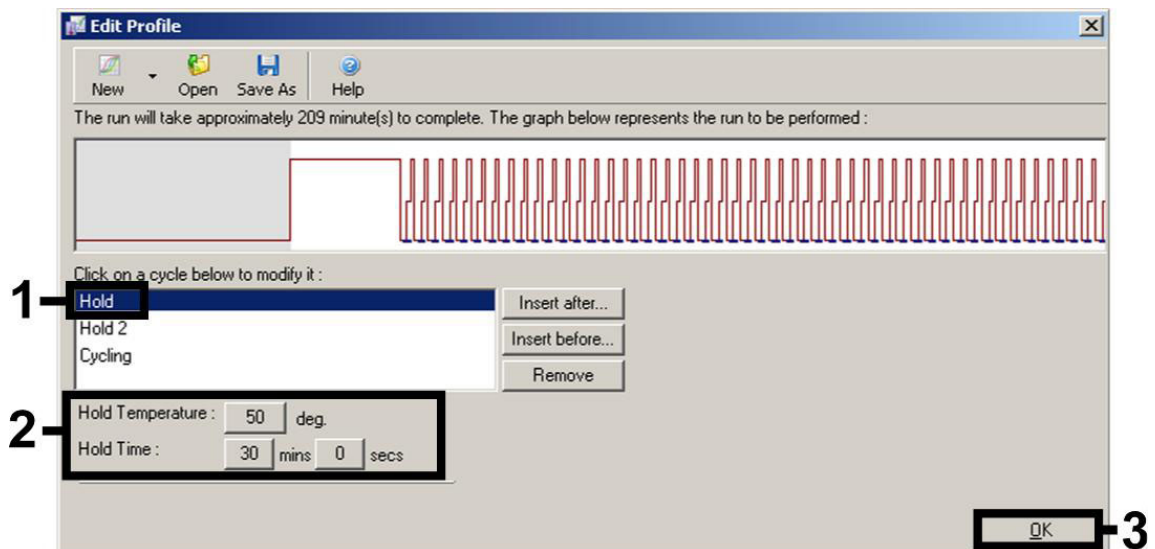


5 pav. Bendrų tyrimo parametrų nustatymas.

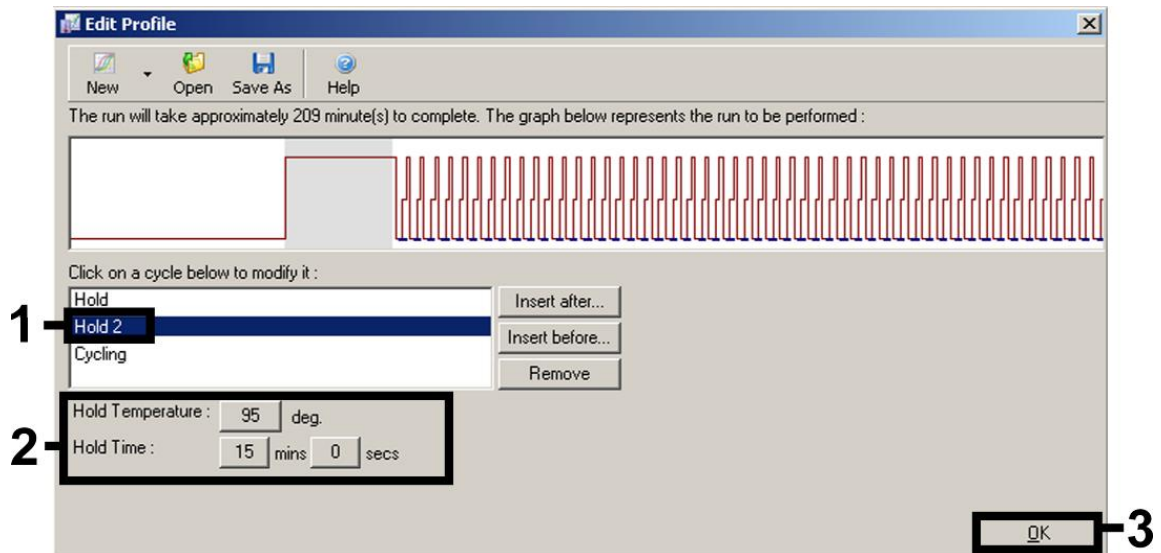
8. Kitame dialogo lange „New Run Wizard“ (naujos procedūros vedlys) spustelėkite mygtuką „Edit Profile“ (redaguoti profilį) (žr. 6 pav.) ir programuokite temperatūros profilį, kaip parodyta 6–9 pav.



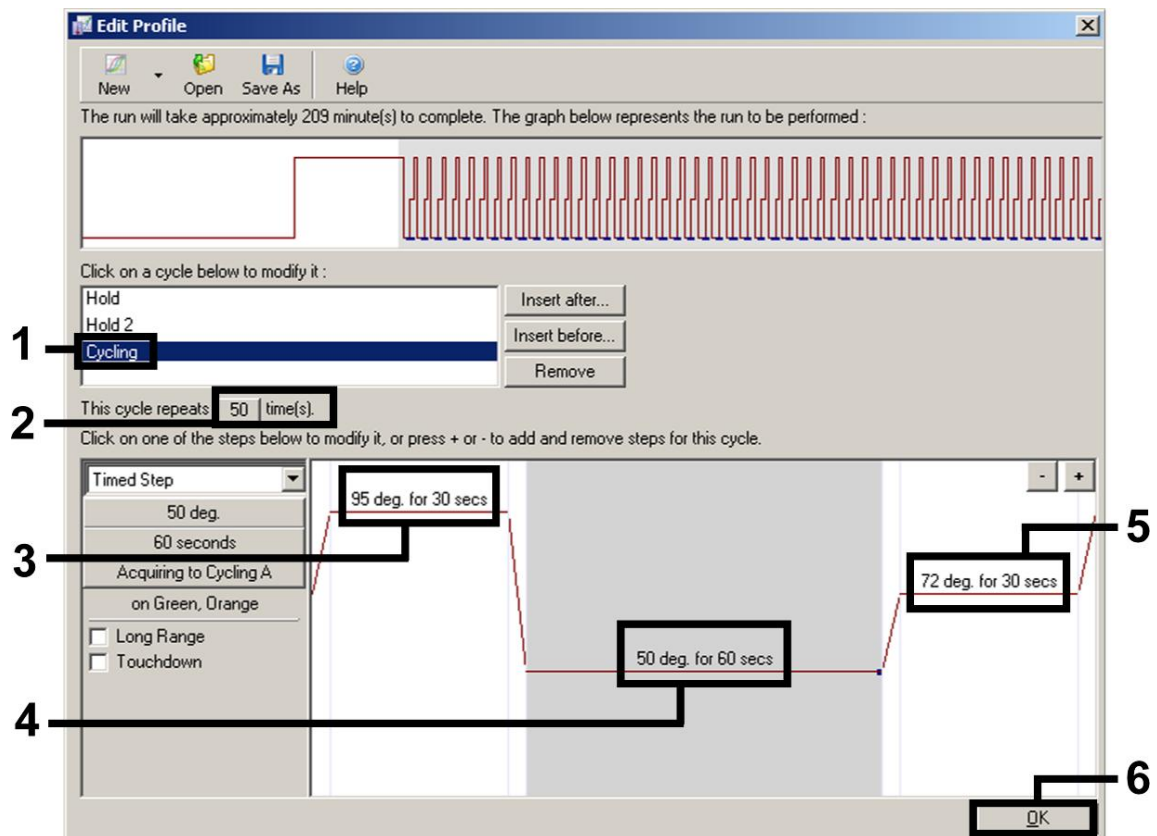
6 pav. Profilio redagavimas.



7 pav. Atvirkštinė RNR transkripcija.

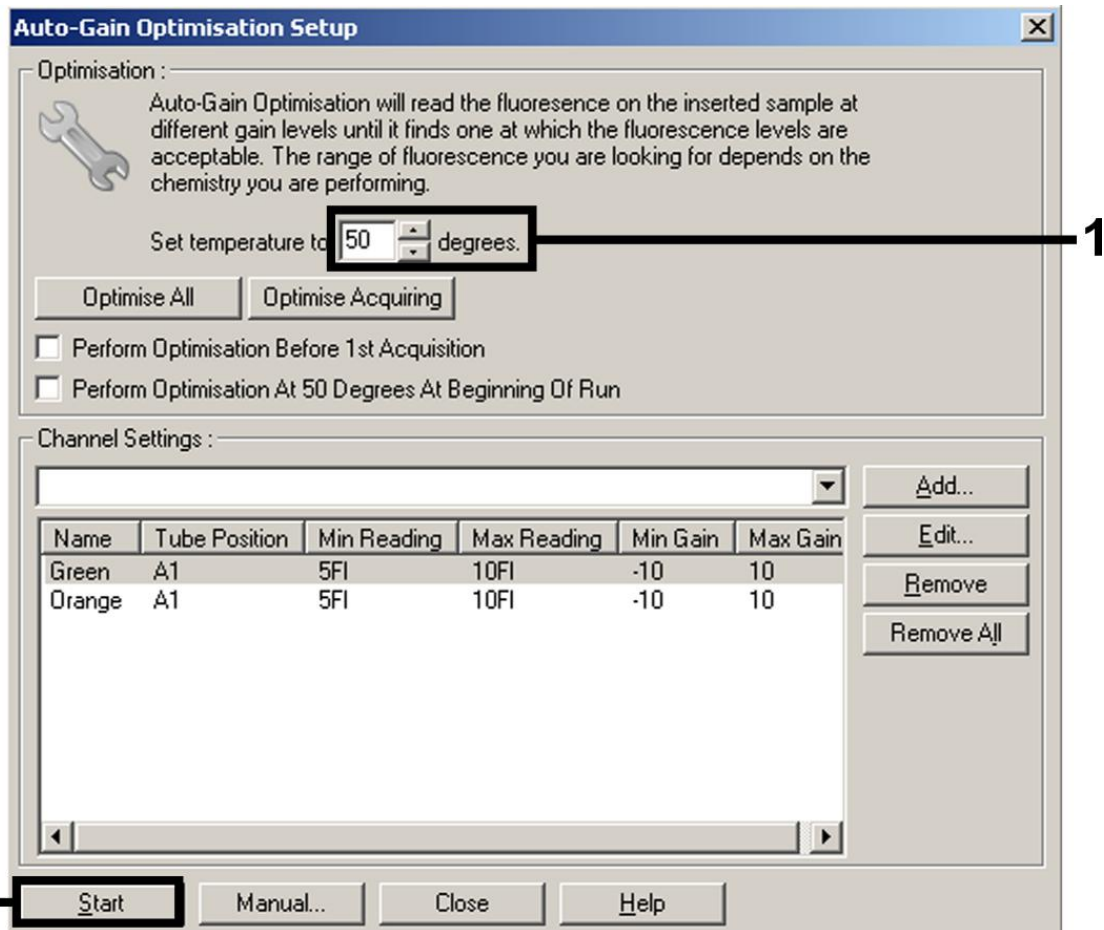


8 pav. Pradinis „karštojo paleidimo“ fermento aktyvinimas.



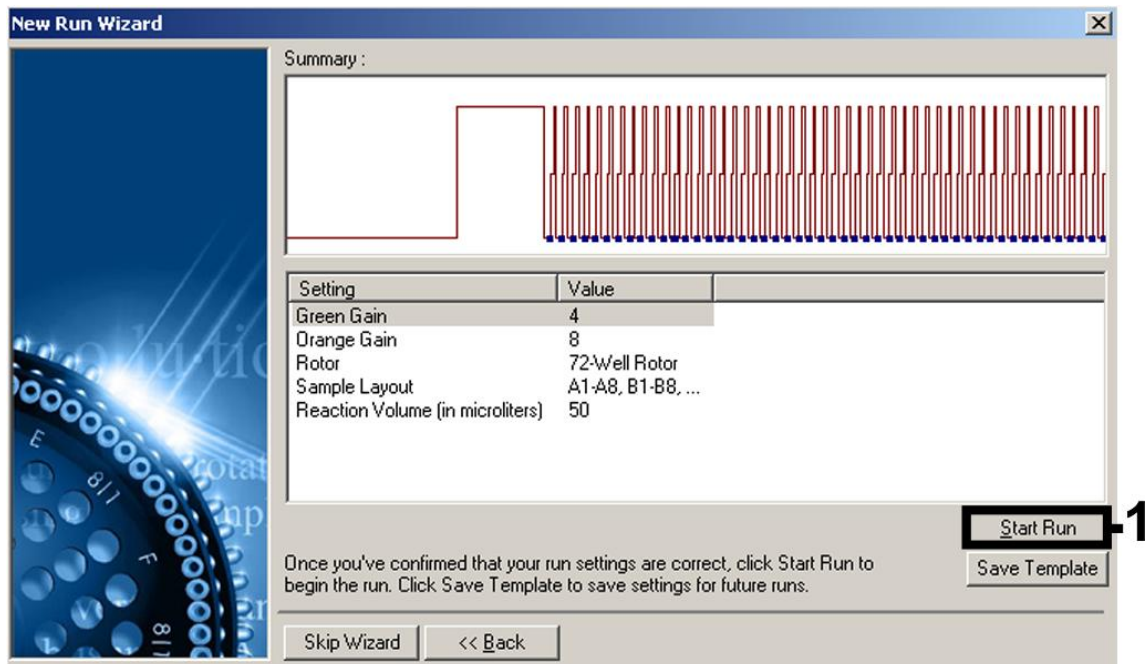
9 pav. cDNR amplifikacija. Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ programinė įranga fluorescencinius dažus apibrėš kaip „FAM/Sybr, ROX“.

9. Fluorescencinių kanalų aptikimo intervalą reikia nustatyti pagal fluorescavimo intensyvumą PGR mėgintuvėliuose. Dialogo lange „New Run Wizard“ (naujos procedūros vedlys) spustelėkite „Gain Optimisation“ (gavimo optimizavimas) (žr. 6 pav.), kad atidarytumėte dialogo langą „Auto-Gain Optimisation Setup“ (automatinio gavimo optimizavimo nustatymas). Nustatykite 50 kalibravimo temperatūrą, kad atitiktų amplifikacijos programos kaitinimo temperatūrą (10 pav.).



10 pav. Fluorescencinio kanalo jautrio reguliavimas. Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ programinė įranga fluorescencinius dažus apibrėš kaip „FAM/Sybr“ ir „ROX“.

10. Kanalo kalibravimu nustatytos stiprinimo reikšmės automatiškai įrašomos ir išvardijamos programavimo procedūros paskutiniame meniu lange (11 pav.). Spustelėkite „Start Run“ (pradėti procedūrą).



11 pav. Procedūros pradžia. Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ programinė įranga fluorescencinius dažus apibrėš kaip „FAM/Sybr“ ir „ROX“.

11. Pabaigę procedūrą, analizuokite duomenis. Galimi šie rezultatai (11a, 11b ir 11c).

Teigiamų ir neigiamų PGR reakcijų pavyzdžiai pateikti 12 ir 13 pav.

9 lentelėje pateikiamos kiekybinių rezultatų aiškinimo gairės.

- 11a. Signalas aptinkamas fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas).

Analizės rezultatas buvo teigiamas: mėginyje yra HCV RNR.

Tokiu atveju signalo aptikimas kanale „Cycling Orange“ nebūtinai, nes didelės HCV RNR (teigiamas signalas „Cycling Green“ (žalio ciklo) kanale) koncentracijos gali sąlygoti vidinės kontrolinės medžiagos fluorescencinio signalo kanale „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas) sumažėjimą arba nebuvimą (konkurencija).



Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ susiję kanalai yra „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas) teigiamam signalui ir „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas) vidinei kontrolinei medžiagai.

11b. Fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas) signalo neaptinkama. Tuo pat metu signalas iš vidinės kontrolinės medžiagos atsiranda kanale „Cycling Orange“ (žalias ciklas). Mėginyje HCV RNR neaptinkama. Rezultatas gali būti laikomas neigiamu.

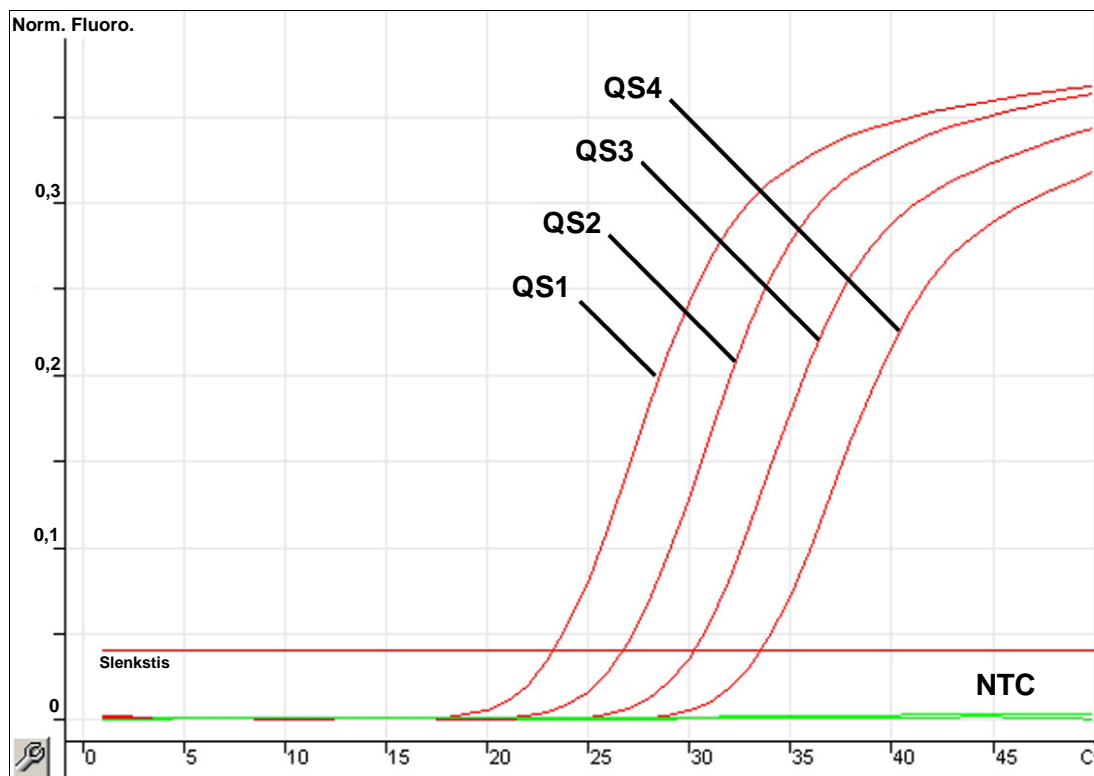
Neigiamo HCV AT-PGR atveju aptiktas vidinės kontrolinės medžiagos signalas atmeta AT-PGR slopinimo galimybę.

i Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ susiję kanalai yra „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas) vidinei kontrolinei medžiagai ir signalo „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas) nebuvimas.

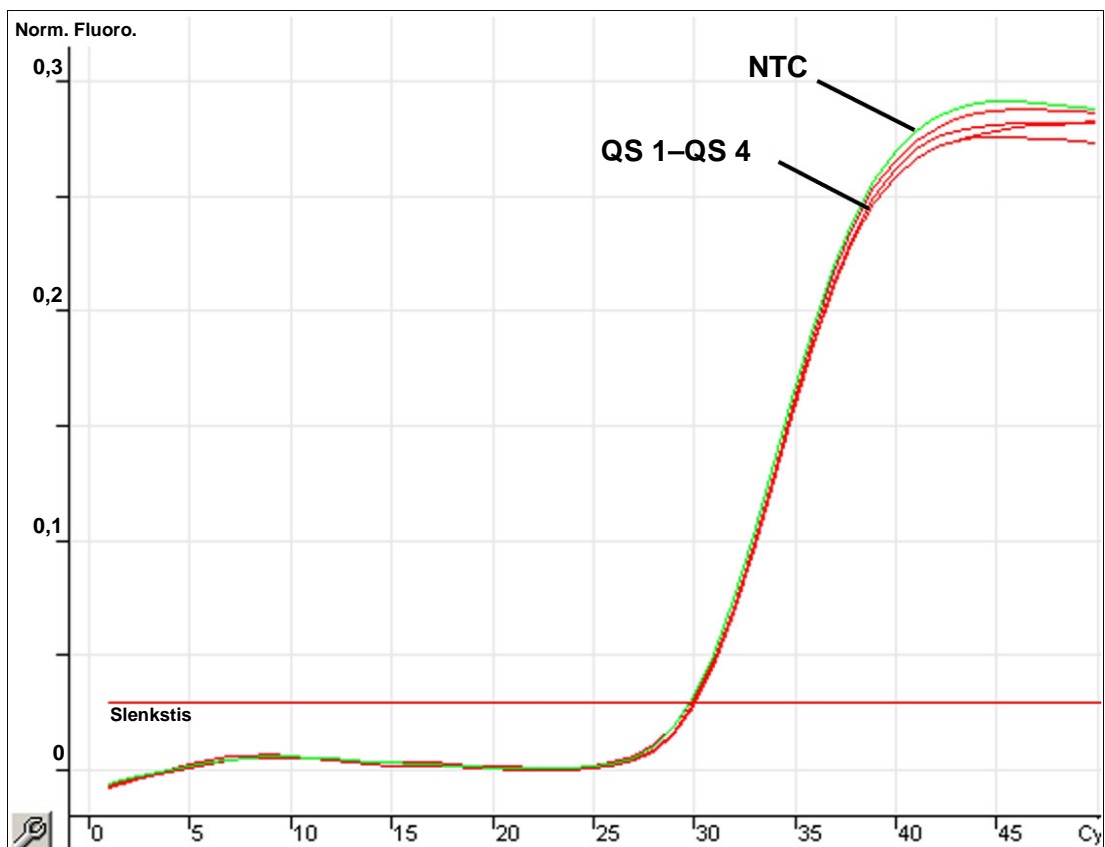
11c. Signalas neaptinkamas fluorescenciniuose kanaluose „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas). Rezultatų gauti negalima.

Informacijos apie klaidų šaltinius ir klaidų šalinimą pateikta toliau esančiame skyriuje „Trikčių šalinimo vadovas“, 32 psl.

i Atminkite, kad „Rotor-Gene 3000“ susiję kanalai yra „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas) ir „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas). ■



12 pav. Kiekybinės analizės etaloninių tirpalų aptikimas (Hep. C Virus RG QS 1–4) fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas). NTC: „No template control“ (nėra šabloninės kontrolinės medžiagos) (neigiamos kontrolinės medžiagos).



13 pav. Vidinės kontrolinės medžiagos (IC) aptikimas fluorescenciniame kanale „Cycling Orange“ oranžinis ciklas), taikant kiekybinio nustatymo etaloninių tirpalų viena laikę amplifikaciją (Hep. C Virus RG QS 1–4). NTC: „No template control“ (nėra šabloninės kontrolinės medžiagos) (neigiamos kontrolinės medžiagos).

9 lentelė. Kiekybinių rezultatų aiškinimas






Rezultatas	Aiškinimas
HCV RNR >34 IU/ml	Rezultatas yra nustatyto tyrimo diapazone. HCV RNR aptikimo tikimybė yra >95 %. Teigiamas tyrimo rezultatas yra statistiškai užtikrintas.
HCV RNR <34 IU/ml	Rezultatas nepatenka į nustatytą tyrimo diapazoną. Teigiamo rezultato atkuriamumas neužtikrintas.
HCV RNR neigiama	HCV RNR neaptikta.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus apie šiame vadove ir protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją žr. galiniame viršelyje arba apsilankykite www.qiagen.com).







Pastabos ir pasiūlymai

Jokio signalo naudojant teigiamas kontrolines medžiagas (Hep. C Virus RG QS 1–4) fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas)

- a) PGR duomenų analizei pasirinktas fluorescencinis kanalas neatitinka protokolo  Analizuodami duomenis, analitinei HCV AT-PGR pasirinkite fluorescencinį kanalą „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas) ir vidinei kontrolinei medžiagai AT-PGR – fluorescencinį kanalą „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas) arba „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas).
- b) Neteisingas „Rotor-Gene“ instrumento temperatūros profilio programavimas  Palyginkite temperatūros profilį su protokolu. Žr. „Protokolas: PGR ir duomenų analizė“, 22 psl.
- c) Neteisinga PGR konfigūracija  Patikrinkite savo darbo veiksmus naudodami lašinimo pipete schemą ir, jei reikia, pakartokite PGR. Žr. „Protokolas: PGR ir duomenų analizė“, 22 psl.
- d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Laikymas“ (5 psl.)  Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.
- e) Baigėsi „artus HCV RG RT-PCR Kit“ tinkamumo laikas  Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.

Pastabos ir pasiūlymai

Silpnas vidinės kontrolinės medžiagos signalas arba jo nėra fluorescenciniame kanale „Cycling Orange“ (oranžinis ciklas) arba „Cycling A.ROX“ (A.ROX ciklas) ir, tuo pačiu, signalo nebuvimas kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas)

- a) PGR sąlygos neatitinka protokolo  Patikrinkite PGR sąlygas (žr. aukščiau) ir, jei reikia, pakartokite PGR taikydami teisingas nuostatas.
- b) PGR buvo slopinama  Įsitikinkite, kad naudojate rekomenduojamą išskyrimo metodą ir atidžiai laikykitės gamintojo nurodymų.
-  Išskirdami RNR, prie eliuavimą būtinai atlikite rekomenduojamą centrifugavimo veiksmą, kad pašalintumėte likusį etanolį (žr. „RNR išskyrimas“, 20 psl.).
- c) Ekstrakcijos metu RNR buvo prarasta  Jei vidinė kontrolinė medžiaga buvo įdėta į ekstrahuojamą medžiagą, vidinės kontrolinės medžiagos signalo nebuvimas gali rodyti RNR praradimą ekstrahavimo metu. Įsitikinkite, kad naudojate rekomenduojamą išskyrimo metodą (žr. „RNR išskyrimas“, 20 psl.) ir atidžiai laikykitės gamintojo nurodymų.
- d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Laikymas“ (5 psl.)  Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.
- e) Baigėsi „artus HCV RG RT-PCR Kit“ tinkamumo laikas  Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.

Pastabos ir pasiūlymai

Signalai naudojant neigiamas kontrolines medžiagas analitinės PGR fluorescenciniame kanale „Cycling Green“ (žalias ciklas) arba „Cycling A.FAM“ (A.FAM ciklas)

a) PGR ruošimo metu atsirado tarša

ⓘ Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniaisi tyrimais.

ⓘ Jei galima, įdėję reikiamą bandyti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius.

ⓘ Užtikrinkite, kad teigiamos kontrolinės medžiagos būtų lašinamos paskutinės.

ⓘ Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami.

b) Ekstrahavimo metu atsirado tarša

ⓘ Pakartokite tiriamo mėginio ekstrahavimą ir PGR, naudodami naujus reagentus.

ⓘ Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami.

Literatūra

QIAGEN palaiko didelę atnaujinamą internetinę mokslinių publikacijų apie QIAGEN produktų utilizavimą duomenų bazę. Naudojant išsamios paieškos parinktis galima rasti reikiamus straipsnius, ieškant tiesiog pagal raktinį žodį arba nurodant pritaikymo sritį, mokslinių tyrimų sritį, pavadinimą ir kt.

Norėdami pamatyti visą literatūros sąrašą, apsilankykite internetinėje QIAGEN literatūros duomenų bazėje adresu www.qiagen.com/RefDB/search.asp arba kreipkitės į QIAGEN technines tarnybas ar vietinį platintoją.

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (24)	24 reakcijoms: 2 pagrindiniai, 4 kiekybinės analizės etaloniniai tirpalai, vidinė kontrolinė medžiaga, vanduo (PGR klasės)	4518263
<i>artus</i> HCV RG RT-PCR Kit (96)	96 reakcijoms: 2 pagrindiniai, 4 kiekybinės analizės etaloniniai tirpalai, vidinė kontrolinė medžiaga, vanduo (PGR klasės)	4518265
„QIAamp DSP Virus Kit“ – skirtas viruso nukleorūgštims gryninti iš žmogaus plazmos „in vitro“ diagnostikos sumetimais		
QIAamp DSP Virus Kit	50 preparatų: „QIAamp MinElute® Spin“ stulpeliai, buferiai, reagentai, vamzdeliai, stulpelių plėstuvai ir „VacConnectors“	60704
„Rotor-Gene Q MDx“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realiojo laiko PGR ciklą valdiklis su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realiojo laiko PGR ciklą valdiklis su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją, taikomą dalims ir darbui, montavimui ir mokymams	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realiojo laiko PGR ciklą valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002032

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realiojo laiko PGR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją, taikomą dalims ir darbui, montavimui ir mokymams	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Realiojo laiko PGR instrumentas su 6 kanalais (mėlynu, žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), įskaitant nešiojamąjį kompiuterį, programinę įrangą, priedus: apima 1 metų garantiją dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Realiojo laiko PGR instrumentas su 6 kanalais (mėlynu, žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), įskaitant nešiojamąjį kompiuterį, programinę įrangą, priedus: apima 1 metų garantiją, taikomą dalims ir darbui, montavimui ir mokymams	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui standartiniame 8 x 12 rinkinyje, naudojant 96 x 0,2 ml mėgintuvėlius	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 10 000 reakcijų	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 plonasienių mėgintuvėlių, skirtų 1000 reakcijų	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 plonasienių mėgintuvėlių, skirtų 1000 reakcijų	981008

Norėdami gauti naujausios informacijos apie licencijavimą ir atsakomybės už produktus apribojimus, žr. atitinkamą QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šio produkto įsigijimas leidžia pirkėjui jį naudoti diagnostinių paslaugų vykdymui žmogaus „in vitro“ diagnostikos tikslais. Joks bendras patentas ar kita licencija, išskyrus šią konkrečią įsigijimo suteikiamą teisę, nesuteikiama.

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

Ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia „artus HCV RG RT-PCR Kit“ pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. „artus HCV RG RT-PCR Kit“ galima naudoti tik vadovaujantis „artus *HCV RG RT-PCR Kit*“ vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su šiame rinkinyje neesančiais komponentais, išskyrus aprašytuosius „artus *HCV RG RT-PCR Kit*“ vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

© QIAGEN, 2015. Visos teisės saugomos.

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)

