

Marzec 2015

Instrukcja zestawu *artus*[®] HI Virus-1 RG RT-PCR Kit



24 (nr kat. 4513263)



96 (nr kat. 4513265)

Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do stosowania z aparatami Rotor-Gene[®] Q



REF

4513263, 4513265



1049310EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANY

R5

MAT

1049310EN



Sample & Assay Technologies

Technologie badań i analizy firmy QIAGEN

QIAGEN jest wiodącym dostawcą innowacyjnych technologii oczyszczania próbek i ich analizy, umożliwiając izolację i wykrywanie zawartości dowolnej próbki biologicznej. Nasze zaawansowane, wysokiej jakości produkty i usługi zapewniają sukces na każdym etapie - od chwili pobrania próbki do uzyskania wyniku.

QIAGEN wyznacza standardy w zakresie:


- ⌘ Oczyszczania DNA, RNA i białek
- ⌘ Analizy kwasów nukleinowych i białek
- ⌘ Badań nad mikroRNA oraz RNAi
- ⌘ Automatyzacji technologii obróbki próbek i ich analizy

Naszą misją jest umożliwienie Państwu osiągnięcia znakomitych i przełomowych osiągnięć w prowadzonych badaniach. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.qiagen.com.

Spis treści

Zawartość zestawu	4
Symbole	4
Przechowywanie	5
Przeznaczenie zestawu	5
Ograniczenia w stosowaniu produktu	6
Ostrzeżenia i środki ostrożności	6
Kontrola jakości	6
Wprowadzenie	7
Zasada metody	7
Informacja o patogenie	7
Charakterystyka wydajności	8
Sprzęt i odczynniki dostarczane przez użytkownika	17
Ważne informacje	18
Ogólne środki ostrożności	18
Pobieranie, przechowywanie i transport próbek	18
Izolacja RNA	20
Kontrola wewnętrzna	20
Ustawianie progu dla analizy PCR	21
Analiza ilościowa	21
Protokół: PCR i analiza danych	23
Rozwiązywanie problemów	33
Bibliografia	36
Informacje dot. zamawiania	37

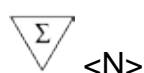
Zawartość zestawu

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Nr katalogowy		4513263	4513265
Liczba reakcji		24	96
Niebieski	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 reakcji	8 x 12 reakcji
Fioletowy	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 reakcji	8 x 12 reakcji
Czerwony	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Czerwony	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Zielony	HI Virus-1 RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Biały	Woda (o jakości do PCR)	1000 μl	1000 μl
	Instrukcja obsługi	 1	1

* Wzorzec oznaczeń ilościowych.

† Kontrola wewnętrzna.

Symbole



Zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do wykonania <N> testów



Należy zużyć przed



Wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro



Nr katalogowy











Nr serii



Nr materiału



Składniki

	Zawiera
	Numer
	Chlorowodorek guanidyny
	Globalny Numer Jednostki Handlowej
	Ograniczenia temperaturowe
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użytkowania
	Ważna informacja

Przechowywanie

Składniki zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit powinny być przechowywane w temp. od -30°C do -15°C i zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (więcej niż 2 razy), ponieważ może to wpłynąć na zmniejszenie czułości testu. Jeśli odczynniki będą stosowane w sposób nieciągły, powinny one być zamrożone w mniejszych porcjach. Przechowywanie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ nie powinno trwać dłużej niż 5 godzin.

Przeznaczenie zestawu

Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit jest testem *in vitro* opartym na amplifikacji kwasów nukleinowych w celu oznaczania ilościowego RNA ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1 (HIV-1) w ludzkim osoczu. Zestaw ten wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy poprzedzoną reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) i jest przeznaczony do używania z aparatami Rotor-Gene Q. Test może oznaczać ilościowo HIV-1 RNA w zakresie $120 - 1 \times 10^8$ HIV-1 IU/ml. W tym teście zwalidowano próbki osocza zawierające podtypy A-H Grupy M.

 Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR nie może być używany w aparatach Rotor-Gene Q 2plex.

Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z obrazem klinicznym i innymi markerami laboratoryjnymi służącymi do diagnozowania choroby. Jest też przeznaczony do stosowania

jako pomoc w ocenie odpowiedzi wirusowej na leczenie przeciwtretowirusowe mierzone zmianami poziomów RNA HIV-1 w osoczu pobranym na EDTA. Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR nie jest przeznaczony do stosowania jako test przesiewowy w kierunku HIV-1 lub jako test diagnostyczny w celu potwierdzenia obecności zakażenia HIV-1.

Ograniczenia w stosowaniu produktu

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

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

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

Należy zwracać uwagę na daty przydatności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich elementów zestawu. Nie używać przeterminowanych odczynników.

Choć występują rzadko, mutacje w obrębie wysoce konserwatywnych rejonów genomu wirusowego, do których przyłączają się startery i/lub sondy zestawu, mogą w takich przypadkach być przyczyną niedoszacowania lub niewykrycia obecności wirusa. Należy regularnie weryfikować walidację i działanie testu.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podczas pracy z chemikaliami należy nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, proszę zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF na stronie www.qiagen.com/safety, gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować karty charakterystyki dla każdego zestawu i poszczególnych składników zestawów QIAGEN.

Usuń próbkę i odpady z testu zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN, każda seria zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR jest testowana pod kątem ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Wprowadzenie

Zestaw *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* jest gotowym do użycia systemem do wykrywania HIV-1 RNA przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) na aparatach Rotor-Gene Q. Mastermiksy HI Virus-1 RG Master A i B zawierają odczynniki i enzymy do odwrotnej transkrypcji i specyficznej amplifikacji regionu o wielkości 93 pz genomu HIV-1 oraz do bezpośredniej detekcji określonego amplikonu w kanale fluorescencyjnym zielonym (Cycling Green) termocyklerów Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene 6000 albo w kanale fluorescencyjnym A.FAM™ (źródło 470 nm, detektor 510 nm) termocyklera Rotor-Gene 3000.

Dodatkowo zestaw *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* zawiera drugi, heterologiczny system amplifikacji, służący do detekcji potencjalnej inhibicji reakcji PCR. Wykrywa się ją jako kontrolę wewnętrzną (IC) w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym (Cycling Orange) aparatu Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene 6000, albo w kanale A.ROX™ (źródło 585 nm, detektor 610 nm) aparatu Rotor-Gene 3000.

Limit detekcji analitycznego RT-PCR dla HIV-1 (sprawdź “Czułość analityczna”, str. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**) nie ulega obniżeniu. Zewnętrzne kontrole dodatnie (HI Virus-1 RG QS 1–4), które umożliwiają określenie ilości wirusowego RNA, są dostarczone w zestawie. Więcej informacji można znaleźć w rozdziale “Oznaczanie ilościowe”, “Quantitation”, na str. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Zasada metody

Wykrywanie patogenu za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) opiera się na amplifikacji specyficznych regionów jego genomu. W metodzie amplifikacji w czasie rzeczywistym namnożony produkt wykrywa się dzięki barwnikom fluorescencyjnym. Są one zazwyczaj przyłączone do sond oligonukleotydowych wiążących się swoiście z namnożonym produktem. Monitorowanie natężenia fluorescencji podczas przebiegu reakcji PCR (a więc w czasie rzeczywistym) pozwala na wykrycie i oznaczenie ilościowe gromadzącego się produktu bez potrzeby otwierania probówek po zakończeniu cyklu PCR.*

Informacja o patogenie

Ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV) to renowirus, który wywołuje zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS). Istnieją dwa typy HIV odpowiedzialne za infekcje ludzkie: HIV-1 i HIV-2, które różnią się zjadliwością i rozpowszechnieniem. Większość zgłoszonych przypadków AIDS na świecie przypisano wirusowi HIV-1. Zakażenie HIV następuje poprzez przeniesienie zakażonej krwi, płynów pochwowych, mleka matki i innych płynów ustrojowych. W obrębie tych płynów ustrojowych HIV występuje zarówno jako cząsteczki wolnego wirusa, jak i wirusa w zakażonych komórkach odpornościowych. Trzy główne drogi przenoszenia to stosunek seksualny bez zabezpieczenia, skażone igły i przeniesienie z zakażonej matki na dziecko w czasie porodu lub poprzez mleko matki.

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

HIV zakaża głównie komórki ludzkiego układu odpornościowego, takie jak limfocyty T pomocnicze (w szczególności CD4⁺). Infekcja HIV prowadzi do niskiego poziomu limfocytów T CD4⁺. Kiedy liczba limfocytów T CD4⁺ spada poniżej krytycznego poziomu, odporność komórkowa jest stracona, a organizm staje się coraz bardziej podatny na infekcje oportunistyczne.

Objawy AIDS występują w zaawansowanym stadium zakażenia HIV, gdy osłabiony układ immunologiczny nie jest w stanie zwalczyć infekcji oportunistycznych. Na tym etapie osoba zarażona coraz bardziej rozwija objawy wywołane takimi infekcjami. Do najczęstszych zakażeń należą przewlekła biegunka cryptosporida, indukowane cytomegalowirusem zakażenie oka, pneumocystis pneumonia, toksoplazmoza i gruźlica, a także infekcje wywołane przez bakterie z kompleksu *Mycobacterium avium*. Ponadto często obserwuje się rozwój różnych typów raka, takich jak inwazyjny rak szyjki macicy, mięsak Kaposiego lub chłoniak. Obecnie nie ma lekarstwa na AIDS i uważa się, że większość osób zarażonych wirusem HIV umrze w końcu na chorobę związaną z AIDS. Jednak postęp w zakresie terapii HIV/AIDS, w tym tych, które zwalczają sam wirus, a także tych, które zapobiegają lub leczą zakażenia oportunistyczne, drastycznie poprawiły długość przeżycia i jakość życia wielu pacjentów z HIV/AIDS.

Charakterystyka wydajności

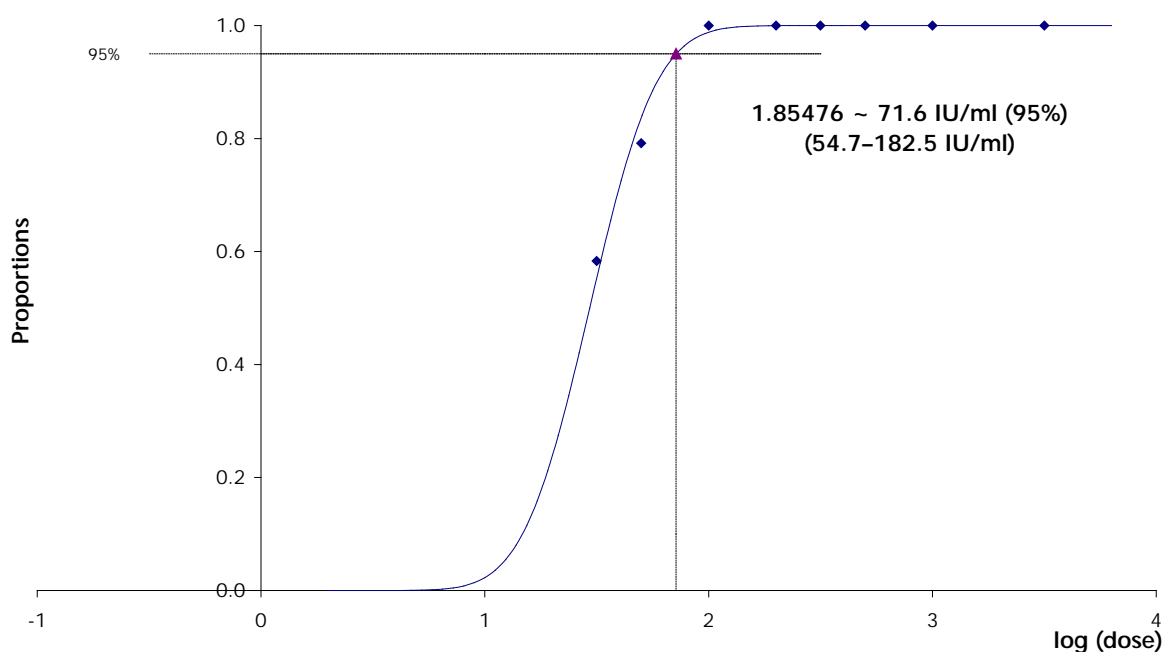
Czułość analityczna

Dla zestawu *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* określono analityczną granicę wykrywalności, jak również analityczną granicę wykrywalności z uwzględnieniem oczyszczania (granice czułości analitycznej). Analityczną granicę wykrywalności z uwzględnieniem oczyszczania określa się za pomocą próbek klinicznych o dodatnim wyniku HIV w połączeniu z konkretną metodą ekstrakcji. Natomiast analityczna granica wykrywalności jest określana niezależnie od wybranej metody ekstrakcji, przy użyciu standardu o znanym stężeniu.

W celu określenia czułości analitycznej zestawu *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*, przygotowano standardową serię rozcieńczeń od 0,0316 do 31,6 IU*/ μ l i analizowano na Rotor-Gene 3000 i przeanalizowano za pomocą zestawu *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*. Testy przeprowadzono w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono za pomocą analizy probitowej. Analityczna granica wykrywalności zestawu *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* na aparacie Rotor-Gene 3000 wynosi 4,5 jm/ μ l ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95% prawdopodobieństwo wykrycia 4,5 IU/ μ l.

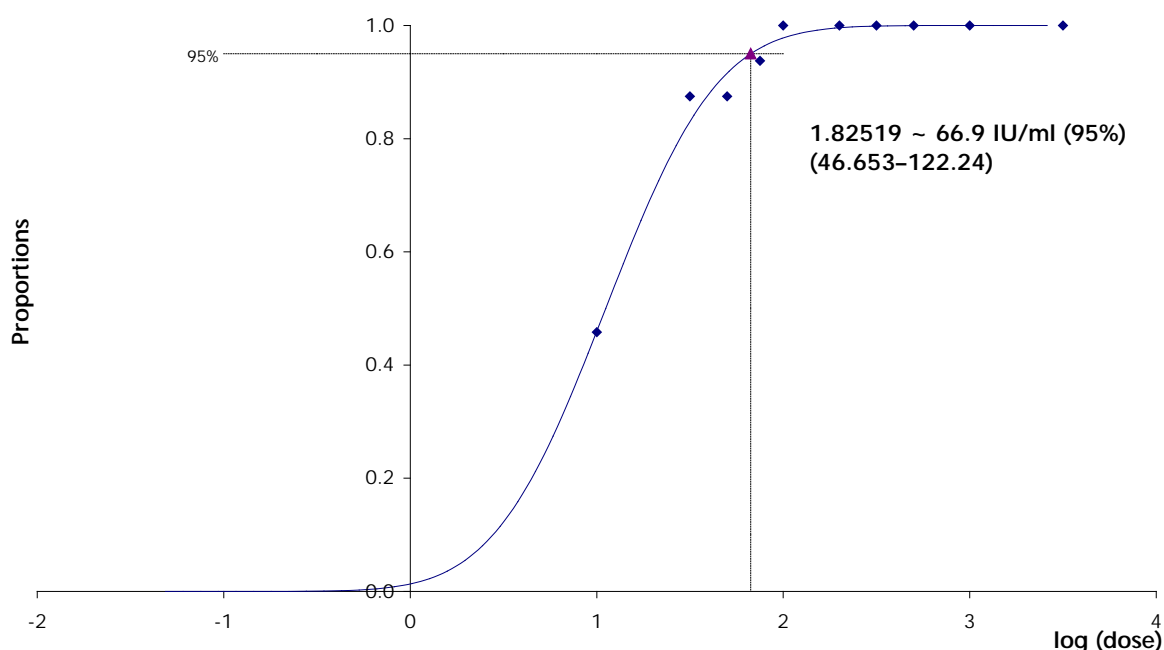
* Użyty standardem jest RNA transkrybowane in vitro, którego stężenie zostało skalibrowane przy użyciu 2-giego Międzynarodowego Standardu HIV (WHO).

Czułość analityczna zestawu artus HI Virus-1 RG RT-PCR z uwzględnieniem procesu oczyszczania (zestaw QIAamp® DSP Virus, QIAGEN) na aparatach Rotor-Gene została określona przy użyciu serii rozcieńczeń RNA wirusa HIV-1 według 2-giego Międzynarodowego Standardu WHO dla testów prowadzonych techniką amplifikacji kwasów nukleinowych (NAT) (kod NIBSC 97/650) od 10 do 3160 HIV IU/ml dodanych do klinicznych próbek osocza. Zostały one poddane ekstrakcji RNA przy użyciu zestawu QIAamp DSP Virus (QIAGEN, objętość ekstrakcji: 0,5 ml, objętość elucji: 25 µl). Każde z rozcieńczeń analizowano zestawem artus HI Virus-1 RG RT-PCR w 3 różnych dniach w 8 powtórzeniach. Wyniki określono za pomocą analizy probitowej. Graficzną ilustrację analizy probitów pokazano na rysunku 1. Analityczna granica wykrywalności z uwzględnieniem oczyszczania zestawu artus HI Virus-1 RG RT-PCR w połączeniu z Rotor-Gene 3000 wynosi 71,6 IU/ml ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95% prawdopodobieństwo wykrycia 71,6 IU/ml.



Rys. 1. Analiza probitowa: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000). Czułość analityczna zestawu artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit na aparacie Rotor-Gene 3000 z uwzględnieniem oczyszczania (zestaw QIAamp DSP Virus, QIAGEN).

Analityczna granica wykrywalności, z uwzględnieniem oczyszczania zestawu artus HI Virus-1 RG RT-PCR na aparacie Rotor-Gene Q / 6000 wynosi 66,9 IU/ml ($p = 0,05$). Oznacza to, że istnieje 95% prawdopodobieństwo, że wykryte zostanie 66,9 IU/ml.



Rys. 2. Analiza probitowa: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). Czulość analityczna zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit na aparacie Rotor-Gene 3000 z uwzględnieniem oczyszczania (zestaw QIAamp DSP Virus, QIAGEN).

Specyficzność

Specyficzność zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR jest przede wszystkim zapewniona przez dobór starterów i sond, a także wybór rygorystycznych warunków reakcji. Startery i sondy sprawdzono pod kątem możliwych homologii ze wszystkimi sekwencjami publikowanymi w bankach genów za pomocą analizy porównań sekwencji. Wykrywalność wszystkich odpowiednich genotypów została zapewniona dzięki porównaniu baz danych i reakcji PCR przeprowadzonych na aparatach Rotor-Gene z odpowiednimi genotypami (patrz Tabela 1).

Co więcej, swoistość potwierdzono za pomocą 100 różnych próbek osocza z ujemnym wynikiem HIV. Nie generowały one żadnych sygnałów dla starterów i sond specyficznych dla wirusa HIV, które są zawarte w HI Virus-1 RG Master.

Potencjalną reaktywność krzyżową zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR testowano przy użyciu grupy kontrolnej wymienionej w Tabeli 2. Żaden z testowanych patogenów nie był reaktywny. W przypadku mieszanych zakażeń nie pojawiły się reakcje krzyżowe.

Tabela 1. Testowanie specyficzności odpowiednich genotypów

Wirus	Genotyp	Źródło	HIV (FAM)	Kontrola wewnętrzna (ROX)
HI Virus-1	A	NIBSC*	+	+
HI Virus-1	B	NIBSC	+	+
HI Virus-1	C	NIBSC	+	+
HI Virus-1	D	NIBSC	+	+
HI Virus-1	E	NIBSC	+	+
HI Virus-1	F	NIBSC	+	+
HI Virus-1	G	NIBSC	+	+
HI Virus-1	H	NIBSC	+	+

* Narodowy Instytut Standardów Biologicznych i Kontroli, Hertfordshire.

Tabela 2. Badanie specyficzności zestawu z potencjalnymi patogenami reaktywnymi krzyżowo

Grupa kontrolna	HIV (Kanał zielony lub kanał A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (kanał pomarańczowy lub kanał A.ROX)
Hepatitis A virus	–	+
Hepatitis B virus	–	+
Hepatitis C virus	–	+
Human herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	–	+
Human herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	–	+
Human herpesvirus 3 (varicella-zoster virus)	–	+
Human herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Tabela 2. Ciąg dalszy

Grupa kontrolna	HIV (Kanał zielony lub kanał A.FAM)	Kontrola wewnętrzna (kanał pomarańczowy lub kanał A.ROX)
Human T cell leukemia virus type 1 and type 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Yellow fever	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

Zakres liniowy

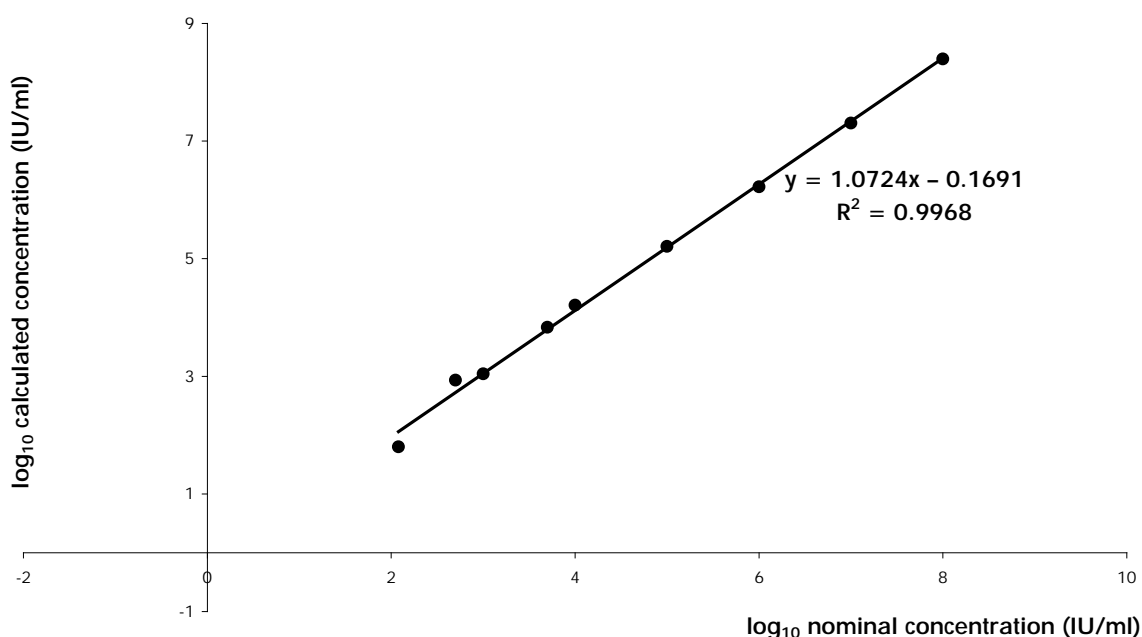
Zakres liniowy (pomiar analityczny) zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit określono poprzez analizę serii rozcieńczeń transkryptu in vitro wirusa HIV od

1 x 10⁸ IU/μl do 1 IU/μl. Seria rozcieńczeń została skalibrowana zgodnie z Międzynarodowym Standardem WHO dla HIV RNA.

Każde rozcieńczenie testowano w powtórzeniach (n = 8) przy użyciu zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na aparatach Rotor-Gene.

Określono liniowy zakres zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, aby pokryć stężenia od 5 IU/μl do co najmniej 1 x 10⁸ IU/μl.

Zakres liniowy pod względem oczyszczania zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR określono przez analizę serii rozcieńczeń panelu OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel 1 od 1 x 10⁸ IU/ml do 120 IU/ml. Oczyszczanie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, stosując zestaw QIAamp DSP Virus (objętość ekstrakcji: 0,5 ml, objętość elucji: 25 μl). Każdą z 9 próbek analizowano przy użyciu zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Zakres liniowy, z uwzględnieniem oczyszczania zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, określono tak, aby pokrywał stężenia od 120 IU/ml do co najmniej 1 x 10⁸ IU/ml (patrz Rys. 3).



Rys. 3. Zakres liniowy zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Obliczanie zakresu liniowego z uwzględnieniem oczyszczania. Prosta wyznaczona przez regresję liniową wyliczonych stężeń log₁₀ z nominalnymi stężeniami log₁₀. Równanie linii regresji znajduje się na rysunku.

Precyzja

Dane dot. precyzji zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR zebrano za pomocą instrumentów Rotor-Gene i pozwolono na określenie całkowitej wariancji testu. Całkowita wariancja polega na zmienności wewnątrz testu (zmienność wielu wyników próbek o tym samym stężeniu w jednym eksperymencie), zmienności między testami (zmienność wielu wyników testu wygenerowanego na różnych

instrumentach tego samego typu przez różnych operatorów w jednym laboratorium) i zmienność między seriami (zmienność wielu wyników testu przy użyciu różnych partii produktu). Uzyskane dane wykorzystano do określenia odchylenia standardowego, wariancji i współczynnika zmienności dla PCR specyficznego dla patogenu i kontroli wewnętrznej.

Dane dot. precyzji zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR zebrano przy użyciu standardu ilościowego o najniższym stężeniu (QS4; 10 IU/μl). Test przeprowadzono z 8 powtórzeniami. Dane dotyczące precyzji obliczono na podstawie wartości C_T krzywych amplifikacji (C_T : cykl progowy (threshold cycle), patrz Tabela 3). Na podstawie tych wyników ogólny rozkład statystyczny dowolnej próbki o wspomnianym stężeniu wynosi 1,66% (C_T) i 2,15% (C_T) w celu wykrycia kontroli wewnętrznej. Wartości te są oparte na całości wszystkich pojedynczych wartości określonych zmienności.

Tabela 3. Precyzja w oparciu o wartości C_T

	Wartość C_T	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności (%)
Zmienność w obrębie jednego testu: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Zmienność w obrębie jednego testu: Kontrola wewnętrzna	31,24	0,18	0,58
Zmienność pomiędzy różnymi testami: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Zmienność pomiędzy różnymi testami: Kontrola wewnętrzna	31,65	0,36	1,13
Zmienność pomiędzy testami z różnych serii: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73
Zmienność pomiędzy testami z różnych serii: Kontrola wewnętrzna	31,20	0,55	1,76
Całkowita wariancja: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Całkowita wariancja: Kontrola wewnętrzna	31,40	0,67	2,15

Solidność testu

Weryfikacja solidności testu pozwala na określenie całkowitego odsetka niepowodzeń zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Do 100 próbek osocza HIV- ujemnych dodano 4,5 IU/ μ l objętości elucji RNA kontrolnego względem HIV (trzykrotne stężenie granicy czułości analitycznej). Po ekstrakcji za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit próbki te analizowano zestawem *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Dla wszystkich próbek HIV wskaźnik niepowodzenia wynosił 0%. Ponadto, solidność kontroli wewnętrznej oceniono przez oczyszczenie i analizę 100 próbek osocza ujemnego pod względem HIV. Całkowity wskaźnik niepowodzenia wynosił 0%. Inhibicji nie zaobserwowano. Zatem solidność zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR wynosi ³ 99%.

Powtarzalność

Dane dotyczące powtarzalności umożliwiają regularną ocenę działania zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR jak również porównanie jego wydajności w stosunku do innych produktów. Dane te uzyskuje się uczestnicząc w ustalonych programach badań biegłości.

Ocena diagnostyczna

Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit oceniano w badaniu porównawczym. Aby porównać *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR do testu COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test, przeanalizowano retrospektywnie 241 próbek osocza. Wszystkie próbki były wcześniej analizowane jako dodatnie lub ujemne za pomocą testu COBAS TaqMan HIV-1 Test w rutynowej diagnostyce.

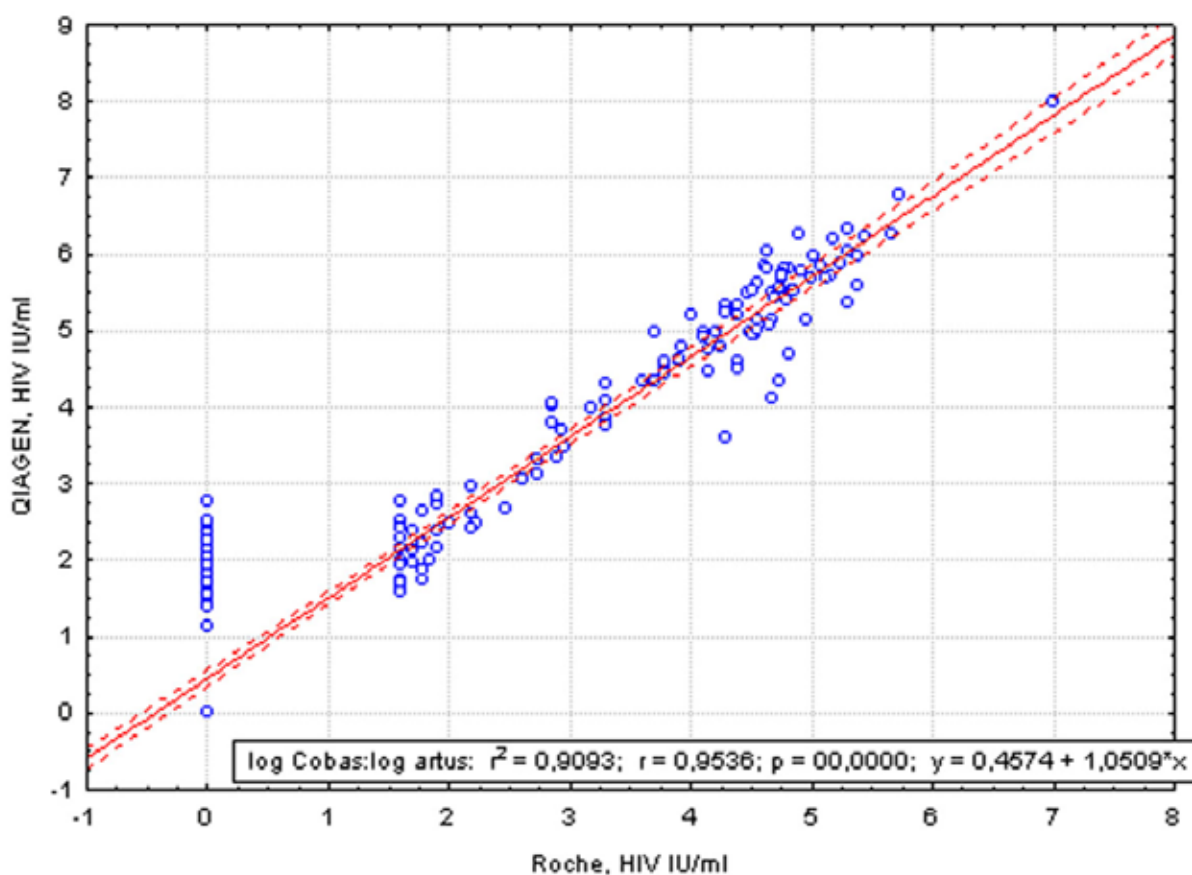
Celem przetestowania zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, RNA wirusa HIV było izolowane za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit, a analizy prowadzono na urządzeniu Rotor-Gene 6000. Aby przeprowadzić testy porównawcze za pomocą COBAS TaqMan HIV-1 Test, RNA wirusa HIV było izolowane zgodnie z instrukcjami producenta zawartymi w ulotce. Wyniki otrzymane przy użyciu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR zostały porównane do wyników otrzymanych przy użyciu testu COBAS TaqMan HIV-1 Test (zobacz Tabela 4 i Rys. 4).

105 próbek spośród 126, które dały wynik dodatni w teście COBAS TaqMan HIV-1 dało również wynik dodatni w teście *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 113 próbek spośród 115 próbek z wynikiem ujemnym uzyskanym w teście COBAS TaqMan HIV-1 również dało wynik ujemny w teście *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Jeśli wyniki testu COBAS TaqMan HIV-1 są traktowane jako wzorzec, czułość diagnostyczna wynosi 98,1%, a swoistość diagnostyczna jest na poziomie 84,3%.

Tabela 4. Wyniki dla 241 próbek osocze-EDTA analizowanych retrospektywnie

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



Rys 4. Porównanie testu COBAS TaqMan HIV-1 (Roche, HIV, z oczyszczaniem próbki z zastosowaniem systemu COBAS AmpliPrep) z zestawem *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (QIAGEN, HIV, z oczyszczaniem próbki za pomocą QIAamp DSP Virus Kit).

Korelację wyników ilościowych z obu systemów testowych (tabela 4) analizowano za pomocą regresji liniowej. Wyniki obu zestawów pokazano na wykresie XY (punktowy) ze skalą log-log.

Sprzęt i odczynniki dostarczane przez użytkownika

Podczas pracy z chemikaliami należy nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Aby uzyskać więcej informacji, proszę zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS) dostępnymi u producenta.

- ☉ Zestaw do izolacji RNA (zobacz "Izolacja RNA", str. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**)
- ☉ Pipety (nastawne)*
- ☉ Sterylne końcówki do pipet z filtrami
- ☉ Worteks*
- ☉ Wirówka nastołowa* z rotorem na próbówki o pojemności 2 ml
- ☉ Termocykler Rotor-Gene Q lub Rotor-Gene*† z kanałami fluorescencyjnymi zielonym (Cycling Green) i pomarańczowym (Cycling Orange) z kanałami fluorescencyjnymi A.FAM i A.ROX
- ☉ Oprogramowanie Rotor-Gene Q wersja 1.7.94 (oprogramowanie Rotor-Gene 6000 wersja 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; oprogramowanie Rotor-Gene 3000 wersja 6.0.23) lub wyższe
- ☉ Paski próbówkowe z korkami, 0,1 ml, dedykowane do rotora 72-dołkowego (nr kat. 981103 lub 981106)
- ☉ Alternatywnie: próbówki PCR o poj. 0,2 ml, dedykowane do rotora 36-dołkowego (nr kat. 981005 lub 981008)
- ☉ Blok chłodzący (blok na 72 próbówki o poj. 0,1 ml o nr kat. 9018901 lub blok na 96 próbówek o poj. 0,2 ml o nr. kat. 9018905)

* Należy upewnić się, że sprzęt został sprawdzony i skalibrowany zgodnie z wytycznymi producenta.

† Zestaw *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR nie może być używany w aparatach Rotor-Gene Q 2plex.

Ważne informacje

Ogólne środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze mieć na uwadze poniższe zalecenia:

- ☒ Korzystaj z jałowych końcówek do pipet z filtrami.
- ☒ Przechowuj i izoluj osobno pozytywne materiały (jak próbki, kontrole pozytywne, amplikony) i dodawaj je do mieszaniny reakcyjnej w specjalnie przeznaczonym do tego pomieszczeniu.
- ☒ Przed rozpoczęciem oznaczeń należy całkowicie rozmrozić wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (15–25°C).
- ☒ Po rozmrożeniu wymieszaj odczynniki za pomocą powtarzanego pipetowania lub worteksowania pulsacyjnego i krótko zwiruj.
- ☒ Pracuj szybko, a odczynniki do PCR trzymaj na lodzie lub w bloku chłodzącym (72/96 dołkowy blok).

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek

- ⓘ Wszystkie próbki należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.

Dozwolone są tylko następujące rodzaje próbek, dla których należy ściśle przestrzegać odpowiednich zasad i szczegółowych instrukcji dotyczących ich pobierania, transportu i przechowywania.

- ⓘ Aktualne badania wskazują, że osocze-EDTA lub osocze z cytrynianem są najodpowiedniejszym materiałem do detekcji HIV. Z tego powodu zalecamy używanie tych materiałów z zestawem *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Wewnętrzną walidację zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR przeprowadzono na próbkach ludzkiego osocza z EDTA. Inne próbki nie były walidowane. W celu przygotowania próbek proszę korzystać wyłącznie z zalecanego zestawu do izolacji RNA (patrz "Izolacja RNA", strona 20).

Stosując niektóre materiały jako próbki, należy ściśle przestrzegać szczegółowych instrukcji ich pobierania, transportu i przechowywania

Pobieranie próbek

Każde pobranie krwi powoduje uszkodzenie naczyń krwionośnych (tętnic, żył, naczyń włosowatych). Należy używać wyłącznie nieszkodliwych i sterylnych materiałów. Do pobierania krwi dostępne są odpowiednie materiały jednorazowego użytku. Przy nakłuciach żył nie należy stosować zbyt cienkich igieł kapilarnych. Usunięcie krwi żyłnej należy przeprowadzić na odpowiednich częściach łuku łokciowego, przedramieniu lub grzbiecie dłoni. Krew musi być pobierana za pomocą standardowych probówek do pobierania próbek

(czerwona zakrętka, Sarstedt lub równoważna probówka innego producenta). Należy pobrać objętość 5-10 ml krwi na EDTA. Probówki powinny być mieszane góra-dół bezpośrednio po pobraniu próbki (8 x, nie wstrząsać).

i Nie należy używać próbek od pacjentów heparynizowanych (patrz "Substancje interferujące", strona 19).

Przechowywanie próbek

Krew pełną należy w ciągu 6 godzin rozdzielić na osocze i frakcję komórkową, odwirowując ją przez 20 minut przy 800–1600 x g. Odseparowane osocze należy przenieść do sterylnych polipropylenowych probówek. Czułość testu może być zmniejszona w wyniku rutynowego mrożenia próbek lub przechowywania ich przez dłuższe okresy czasu.

Wirusowe RNA zamknięte w kapsułach jest stabilne przez wiele dni, jeśli jest przechowywane w 4°C, przez kilka tygodni, jeśli jest przechowywane w temperaturze -20°C, a nawet przez miesiące i lata, gdy jest przechowywane w temperaturze -70°C *

Transport próbek

Z zasady transportowane próbki muszą być umieszczone w nietłukącym pojemniku. W ten sposób można zapobiec potencjalnym zakażeniom spowodowanym wyciekami materiału. Probki należy transportować zgodnie z lokalnymi i krajowymi zaleceniami dotyczącymi transportu materiału zakaźnego[†].

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

Substancje interferujące

Podwyższony poziom bilirubiny (≤ 15 mg/dl) i lipidów (≤ 800 mg/dl) oraz próbki zhemolizowane nie mają wpływu na system. Heparyna wpływa na reakcję PCR. Nie należy używać próbek pobranych do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant. Nie należy też korzystać z próbek pobranych od pacjentów przyjmujących heparynę.

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

[†] Międzynarodowe Zrzeszenie Przewoźników Powietrznych (IATA). Przepisy dotyczące transportu materiałów niebezpiecznych w międzynarodowym transporcie lotniczym (Dangerous Goods Regulations).

Izolacja RNA

Zestaw QIAamp DSP Virus (QIAGEN, nr kat. 60704) jest zwalidowany do oczyszczania wirusowego RNA z ludzkiego osocza w celu stosowania z zestawem *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Oczyszczanie wirusowego RNA należy prowadzić zgodnie z instrukcjami zawartymi w podręczniku zestawu *QIAamp DSP Virus*.

i Zastosowanie nośnikowego RNA ma kluczowe znaczenie dla wydajności ekstrakcji i w konsekwencji dla wydajności DNA/RNA. Aby zwiększyć stabilność nośnikowego RNA dostarczonego z zestawem QIAamp DSP Virus, zalecamy postępować zgodnie z informacjami na temat przygotowania i przechowywania nośnikowego RNA podanymi w instrukcji obsługi ("Przygotowanie odczynników i buforów").

Przed rozpoczęciem każdej ekstrakcji mieszaninę buforu do lizy i nośnikowego RNA (oraz kontrolę wewnętrzną, o ile ma to zastosowanie, patrz "Kontrola wewnętrzna", poniżej) należy przygotować na świeżo zgodnie ze schematem pipetowania w Tabeli 5.

Tabela 5. Schemat pipetowania składników zestawu QIAamp DSP Virus

Liczba próbek	1	12
Lysis Buffer (AL)* - bufor lizujący	550 µl	6600 µl
Carrier RNA (1 µg/µl) – nośnikowe RNA	6,2 µl	74,4 µl
Objętość całkowita	556,2 µl	6674,4 µl
Objętość na izolację	500 µl	500 µl każda

* Zawiera chlorowodorek guanidyny; zapoznaj się z podręcznikiem zestawu QIAamp DSP Virus, aby uzyskać informacje na temat bezpieczeństwa.

i Użyj świeżo przygotowanej mieszaniny buforu do lizy i nośnikowego RNA natychmiast do procesu ekstrakcji. Przechowywanie mieszaniny nie jest możliwe.

i Wewnętrzną kontrolę zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR można stosować bezpośrednio w procedurze izolacji (patrz "Kontrola wewnętrzna", poniżej).

Kontrola wewnętrzna

Wraz z zestawem jest dostarczona kontrola wewnętrzna (HI Virus-1 RG IC). Pozwala to użytkownikowi zarówno kontrolować procedurę izolacji RNA, jak i sprawdzać możliwą inhibicję PCR. W tym zastosowaniu należy dodać kontrolę

wewnętrzną do izolacji w stosunku 0,1 µl na 1 µl objętości elucji. Na przykład przy użyciu zestawu QIAamp DSP Virus, RNA wymywa się w 60 µl buforu do elucji (AVE). W związku z tym na początku należy dodać 6 µl kontroli wewnętrznej.

i Kontrolę wewnętrzną i nośnikowe RNA (patrz "Izolacja RNA", str. 20) należy dodać tylko do mieszaniny buforu do lizy i materiału próbki lub bezpośrednio do buforu do lizy.

Kontrola wewnętrzna nie może być dodana bezpośrednio do materiału próbki. W przypadku dodawania jej do buforu do lizy należy pamiętać, że mieszanina kontroli wewnętrznej i buforu do lizy-nośnikowego RNA musi być świeżo przygotowana i zużyta natychmiast (przechowywanie mieszaniny w temperaturze pokojowej lub w lodówce tylko przez kilka godzin może prowadzić do uszkodzenia kontroli wewnętrznej i obniżenia wydajności ekstrakcji).

i Nie dodawaj bezpośrednio kontroli wewnętrznej i nośnikowego RNA do materiału próbki.

Kontrola wewnętrzna może być opcjonalnie wykorzystana wyłącznie w celu sprawdzenia możliwej inhibicji PCR. W przypadku takiego zastosowania dodaj kontrolę wewnętrzną bezpośrednio do mieszaniny HI Virus-1 RG Master A i HI Virus-1 RG Master B, jak opisano w kroku 2b protokołu (strona 24).

Ustawianie progu dla analizy PCR

Optymalne ustawienia progu odcięcia (threshold) dla danej kombinacji aparatu Rotor-Gene Q i zestawu *artus* RG PCR Kit powinny zostać ustalone empirycznie poprzez przetestowanie każdej pojedynczej kombinacji, ponieważ jest to względna wartość w zależności od ogólnego przepływu pracy diagnostycznej. Jako punkt wyjścia, próg ten można ustawić na wstępną wartość 0,04 dla pierwszej analizy PCR, ale wartość ta powinna zostać dopracowana w analizie porównawczej kolejnych cykli. Próg powinien zostać ustawiony ręcznie tuż nad sygnałem tła kontroli ujemnych i próbek ujemnych. Średnia wartość progowa obliczona na podstawie tych eksperymentów najprawdopodobniej będzie działać dla większości przyszłych analiz, ale użytkownik powinien jednak przeglądać wygenerowaną wartość progową w regularnych odstępach czasu. Wartość progowa będzie zwykle w zakresie od 0,03 do 0,05 i powinna być zaokrąglana do nie więcej niż trzech miejsc po przecinku.

Analiza ilościowa

Załączone standardy oznaczenia ilościowego (HI Virus-1 RG QS 1–4) traktuje się jak wcześniej oczyszczone próbki i stosuje się tą samą objętość (20 µl). Aby wygenerować krzywą wzorcową na Rotor-Gene Q, wszystkie 4 standardy ilościowe powinny być stosowane i zdefiniowane w oknie dialogowym "Edycja próbek" jako standardy o określonych stężeniach (patrz podręcznik użytkownika aparatu).

① Standardy ilościowe są zdefiniowane jako IU/μl*. Aby przekształcić wartości określone za pomocą krzywej standardowej w IU/ml materiału próbki, należy zastosować następujące równanie:

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

Zasadniczo w równaniu powyżej należy wprowadzić początkową objętość próbki. Należy mieć też to na uwadze, że objętość próbki może zostać zmieniona przed ekstrakcją kwasu nukleinowego (np. zmniejszając objętość przez odwirowanie lub zwiększając objętość przez dodanie do objętości wymaganej do izolacji).

Współczynnik konwersji

1 IU/ml odpowiada 0,50 kopii/ml dla wykrywania RNA wirusa HIV-1 na Rotor-Gene Q w połączeniu z ręcznym przygotowaniem próbki za pomocą zestawu QIAamp DSP Virus Kit. Współczynnik konwersji jest przybliżeniem opartym na średnim współczynniku w zakresie dynamicznym testu.

* Standard został skalibrowany przy użyciu Pierwszego Międzynarodowego Standardu HIV (WHO). International HIV standard (WHO).

Protokół: PCR i analiza danych

Ważne punkty przed rozpoczęciem

- ☉ Przed rozpoczęciem procedury przeczytaj "Ważne uwagi", strony 18-21.
- ☉ Poświęć czas na zapoznanie się z Instrumentem Rotor-Gene Q przed rozpoczęciem protokołu. Zobacz instrukcję obsługi urządzenia.
- ☉ Upewnij się, że co najmniej jeden standard oceny ilościowej, a także jedna kontrola negatywna (woda do PCR) są uwzględnione w przebiegu PCR. Aby wygenerować krzywą standardową, należy użyć wszystkich 4 dostarczonych standardów ilościowych (HI Virus-1 RG QS 1–4) dla każdego cyklu PCR.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- ☉ Upewnij się, że blok chłodzący (akcesorium instrumentu Rotor-Gene Q) jest wstępnie schłodzony do 2-8°C.
- ☉ Przed każdym użyciem wszystkie odczynniki należy całkowicie rozmrozić, wymieszać (przez pipetowanie lub krótkie worteksowanie) i krótko zwirować.

Procedura

1. Umieść żadaną liczbę probówek PCR w adapterach bloku chłodzącego.
2. Jeśli używasz kontroli wewnętrznej do monitorowania procedury izolacji RNA i sprawdzenia możliwości inhibicji PCR, wykonaj krok 2a. Jeśli korzystasz z kontroli wewnętrznej wyłącznie w celu sprawdzenia inhibicji PCR, wykonaj krok 2b.
- 2a. Kontrola wewnętrzna została już dodana do izolacji (patrz "Kontrola wewnętrzna", strona 20). W takim przypadku przygotuj mastermiks zgodnie z Tabelą 6.

Mieszanka reakcyjna zwykle zawiera wszystkie składniki potrzebne do PCR z wyjątkiem próbki.

Tabela 6. Przygotowanie mastermiks (kontrola wewnętrzna stosowana do monitorowania izolacji DNA i ewentualnej inhibicji PCR)

Liczba próbek	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	0 µl	0 µl
Objętość całkowita	30 µl	360 µl

- 2b. **Kontrola wewnętrzna musi być dodana bezpośrednio do mieszaniny HI Virus-1 Master A i HI Virus-1 Master B. W tym przypadku przygotuj mastermiks zgodnie z Tabelą 7.**

Na ogół mieszanina reakcyjna zawiera wszystkie elementy niezbędne do przeprowadzenia reakcji PCR, z wyjątkiem próbki.

Tabela 7. Przygotowanie mastermiks (kontrola wewnętrzna stosowana do monitorowania izolacji DNA i ewentualnej inhibicji PCR)

Liczba próbek	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	2 µl	24 µl
Objętość całkowita	32 µl*	384 µl*

* Wzrost objętości spowodowany dodaniem kontroli wewnętrznej jest pomijany przy opracowywaniu testu PCR. Czulość układu wykrywającego nie jest ograniczona.

3. **Odmierz pipetą 30 µl mastermiks do każdej z probówek PCR. Następnie dodaj 20 µl wyeluowanej próbki DNA (patrz Tabela 8). Należy też użyć co najmniej jednego ze standardów w ilości 20 µl (HI Virus-1 RG QS 1–4) jako kontroli pozytywnej, a jako kontroli negatywnej 20 µl wody (o jakości odpowiedniej do PCR).**

Tabela 8. Przygotowanie reakcji PCR

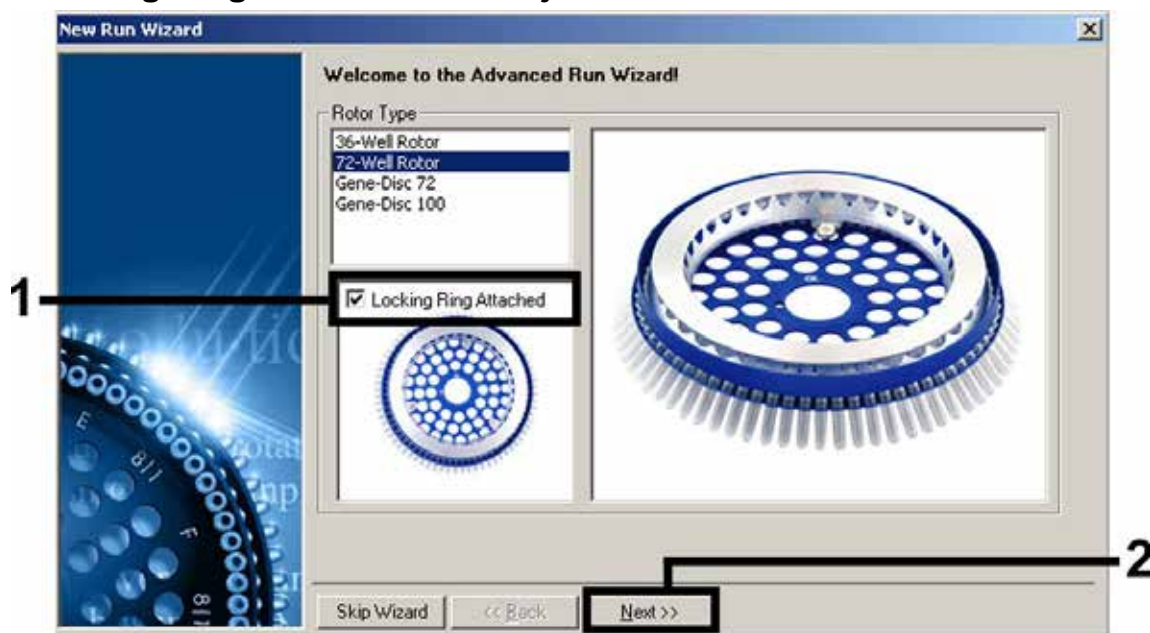
Liczba próbek	1	12
Mastermiks	30 µl	30 µl każda
Próbka	20 µl	20 µl każda
Objętość całkowita	50 µl	50 µl każda

- Zamknij probówki PCR. Upewnij się, że pierścień mocujący (akcesorium do aparatu Rotor-Gene) jest nałożony na wierzch rotora w celu zapobieżenia przypadkowemu otwarciu próbek w czasie reakcji.**
- Do wykrycia RNA HIV-1, należy utworzyć profil temperaturowy zgodnie z następującymi etapami:**

Ustawianie ogólnych parametrów testu	Rys. 5, 6, 7
Odwrotna transkrypcja RNA	Rys. 8
Wstępna aktywacja enzymu hot-start	Rys. 9
Amplifikacja cDNA	Rys. 10
Regulacja czułości kanału fluorescencji	Rys. 11
Rozpoczęcie analizy	Rys. 12

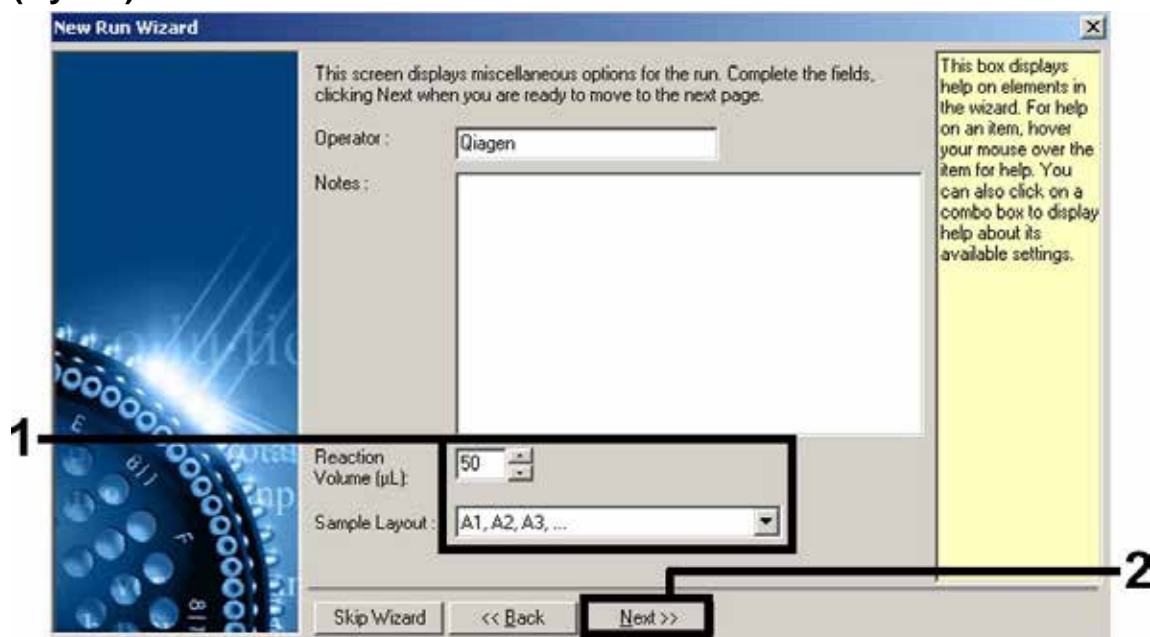
Wszystkie dane techniczne odnoszą się do wersji oprogramowania 1.7.94 dla Rotor-Gene Q, wersji oprogramowania 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 dla Rotor Gene 6000 i wersji oprogramowania 6.0.23 dla Rotor Gene 3000. Więcej informacji na temat programowania aparatów Rotor Gene można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu. Na ilustracjach te ustawienia są zaznaczone czarną pogrubioną ramką. Ilustracje dotyczą urządzenia Rotor Gene Q. W przypadku Rotor-Gene 3000 są wymagane inne wartości i różnice te są opisane w tekście.

6. Otwórz okno dialogowe “New Run Wizard” (Rys. 5). Zaznacz pole “Locking Ring Attached” i kliknij “Next”.



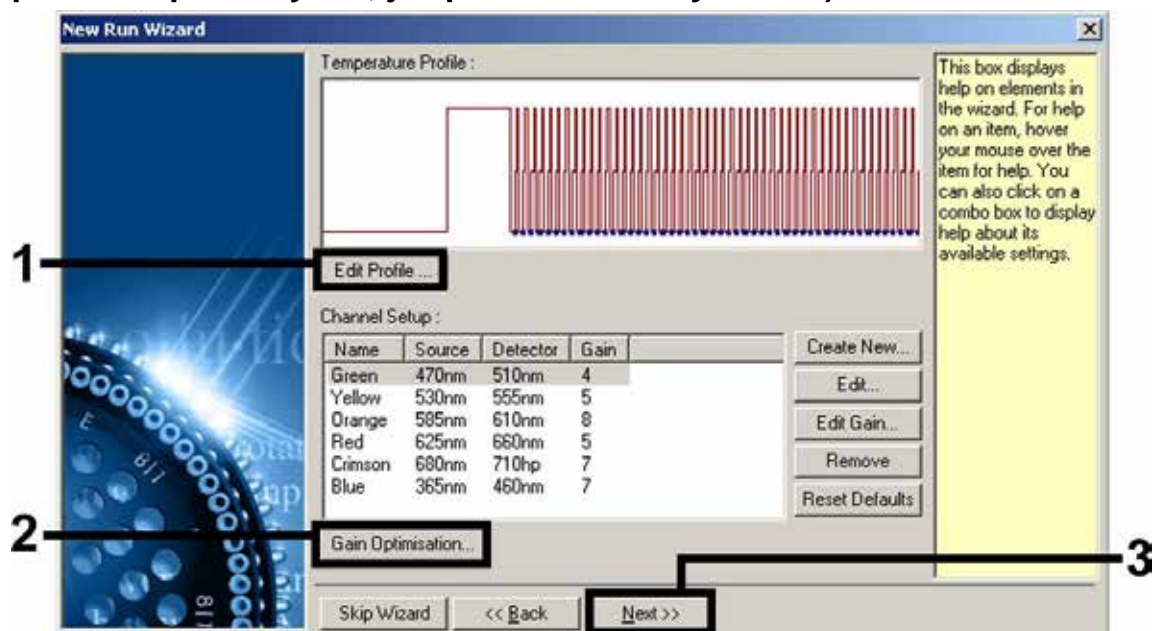
Rys 5. Okno dialogowe “New Run Wizard”.

7. Wybierz “50” dla objętości reakcji PCR, a następnie kliknij “Next” (Rys. 6).

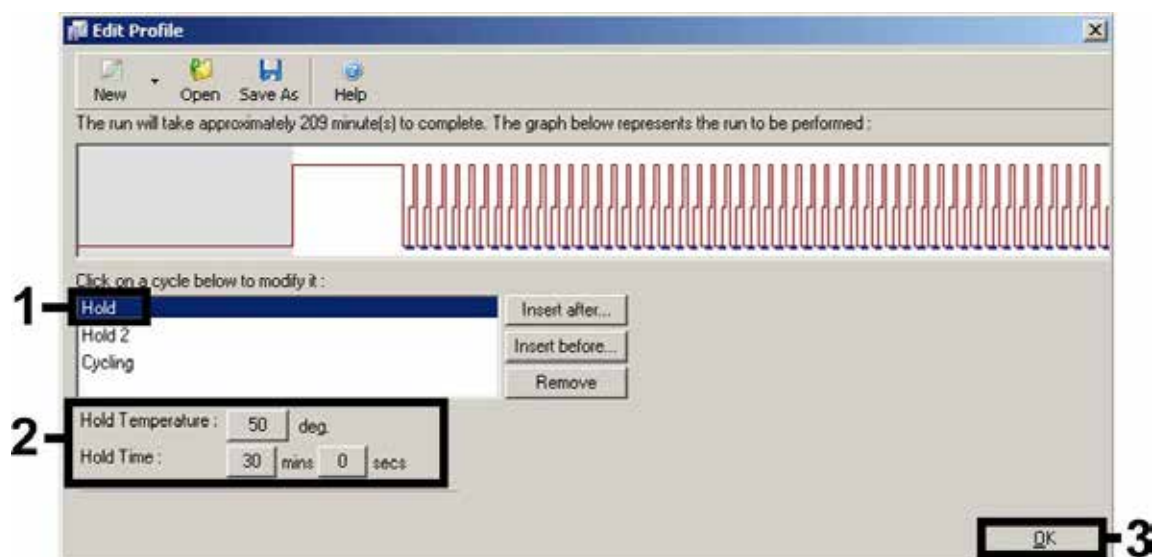


Rys 6. Ustawianie ogólnych parametrów badania.

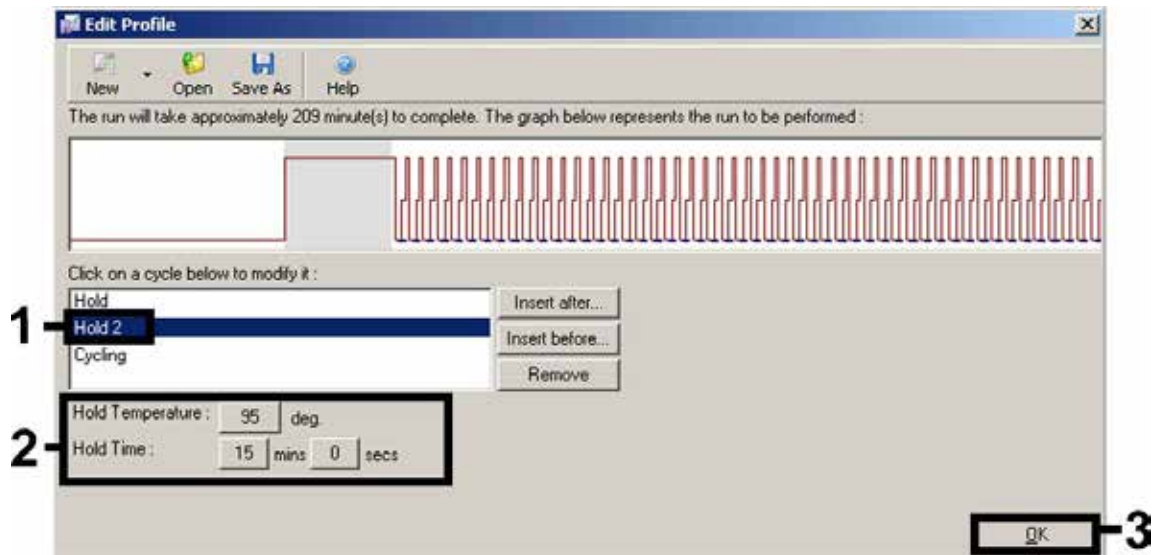
8. Kliknij przycisk “Edit Profile” obecny w następnym oknie dialogowym “New Run Wizard” (Rys. 7), a następnie zaprogramuj profil temperatury tak, jak pokazano na Rys. 7–10).



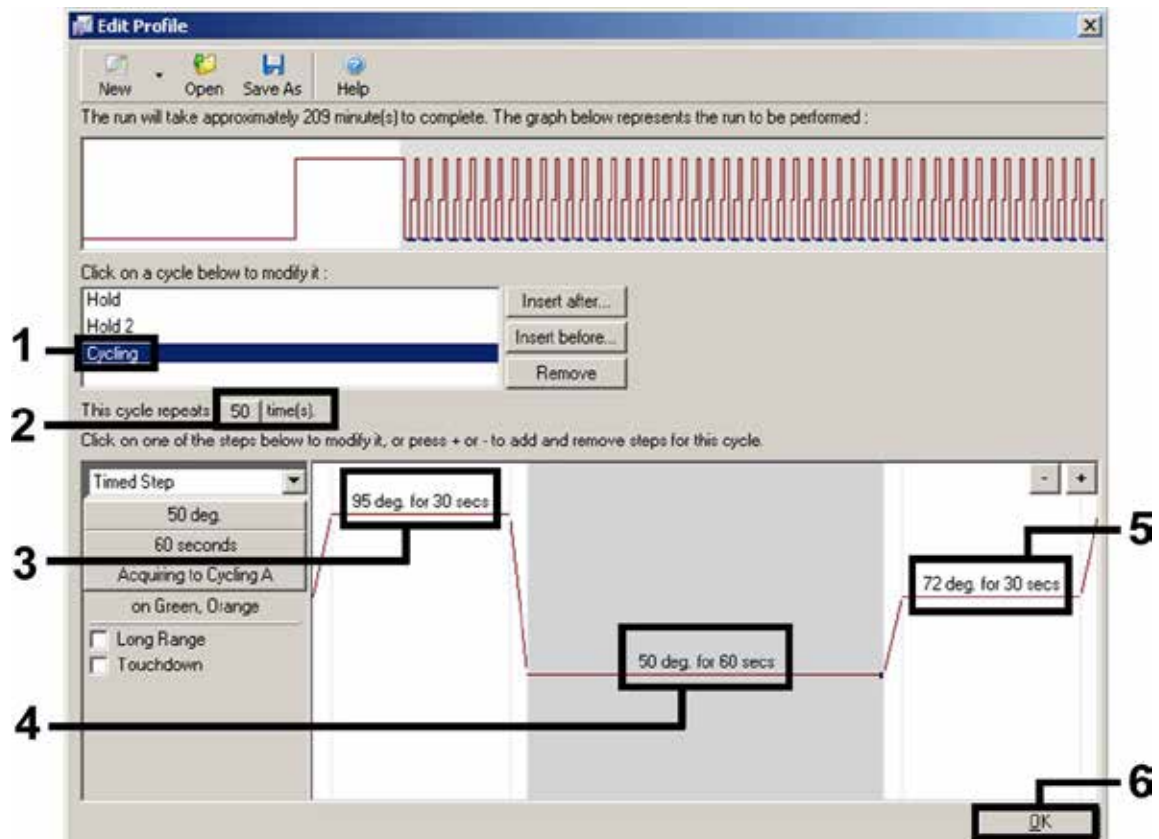
Rys 7. Edytowanie profilu.



Rys. 8. Odwrotna transkrypcja RNA.

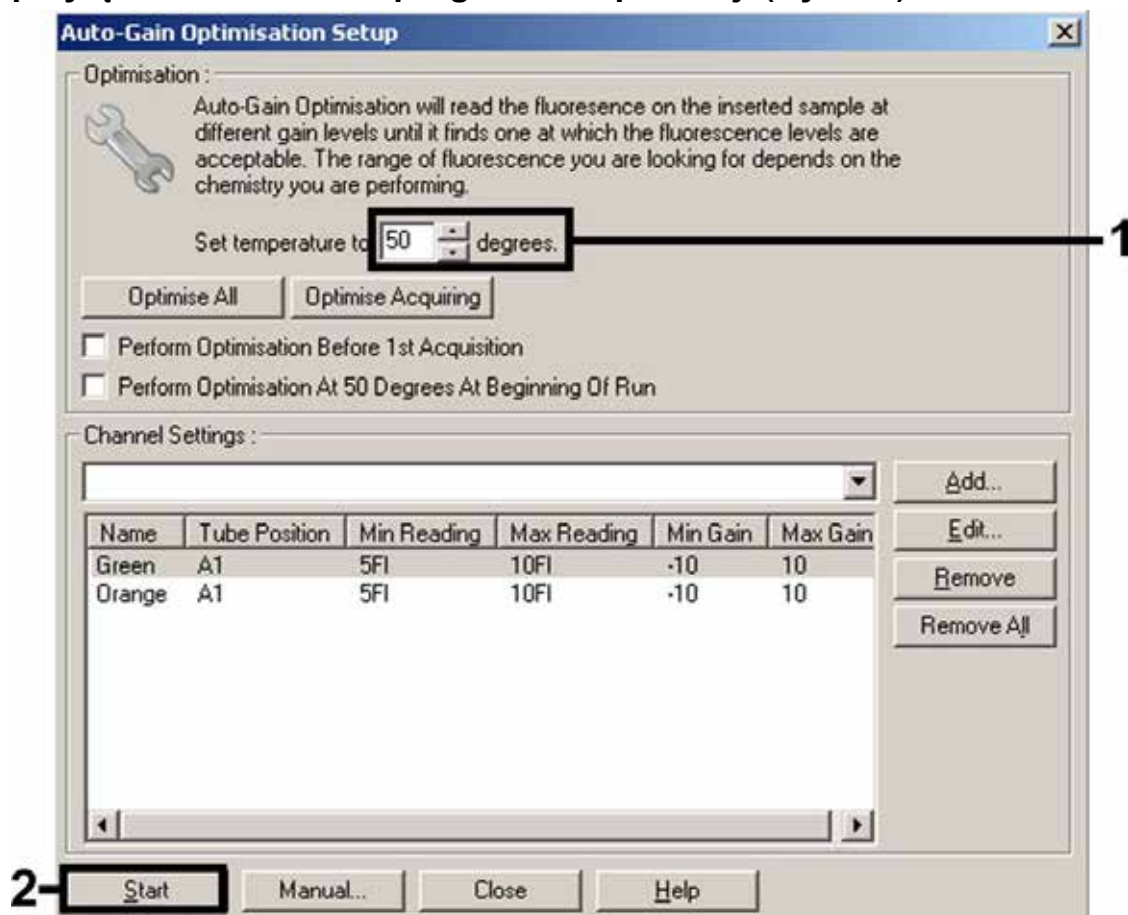


Rys. 9. Wstępna aktywacja enzymu hot-start.



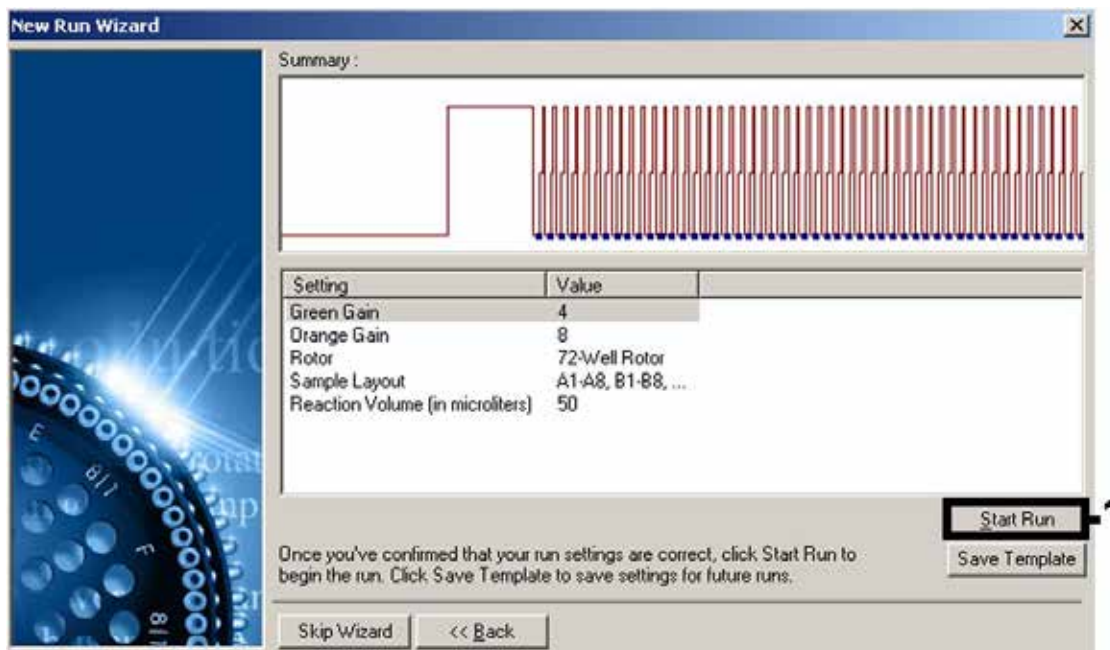
Rys. 10. Amplifikacja cDNA. Zwrócić uwagę, że w Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako "FAM/Sybr, ROX".

9. Zakres detekcji kanałów fluorescencyjnych określa się na podstawie intensywności świecenia próbek PCR. Zaznacz “Gain Optimisation” w oknie “New Run Wizard” (patrz Rys. 7), aby otworzyć okno “Auto-Gain Optimisation Setup”. Ustaw temperaturę kalibracji na “50”, aby odpowiadała ona temperaturze w czasie etapu przyłączania starterów programu amplifikacji (Rys. 11).



Rys. 11. Dostosowywanie czułości kanału fluorescencyjnego. Zwróć uwagę, że w Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako “FAM/Sybr” and “ROX”.

10. Wartości wzmocnienia określone przez kalibrację kanału są automatycznie zapisywane oraz wyświetlane w ostatnim oknie menu procedury programowania (Rys. 12). Kliknąć "Start Run".



Rys. 12. Rozpoczynanie cyklu. Zwróć uwagę, że w Rotor-Gene 3000 oprogramowanie zdefiniuje barwniki fluorescencyjne jako "FAM/Sybr" and "ROX".

11. Możliwe są następujące wyniki (11a, 11b i 11c).

Przykłady dodatnich i ujemnych reakcji PCR przedstawiono na Rysunku 13 i Rysunku 14.

Tabela 9 przedstawia wytyczne dla interpretacji wyników ilościowych.

- 11a. **Sygnal jest wykrywany w kanale fluorescencyjnym zielonym. Wynik analizy jest pozytywny: próbka zawiera RNA HIV-1.**

W tym przypadku wykrywanie sygnału w kanale pomarańczowym jest zbędne, ponieważ wysokie początkowe stężenia RNA HIV-1 (sygnal dodatni w kanale zielonym) mogą prowadzić do zmniejszenia lub braku sygnału fluorescencji kontroli wewnętrznej w kanale pomarańczowym (na zasadzie kompetycji).

i Należy zwrócić uwagę na to, że na aparacie Rotor-Gene 3000 odpowiednie kanały A.FAM dla sygnału dodatniego i A.ROX dla kontroli wewnętrznej.

11b. W kanale fluorescencyjnym zielonym nie wykryto sygnału. W tym samym czasie sygnał z kontroli wewnętrznej pojawia się w kanale pomarańczowym.

W próbce nie można wykryć RNA HIV-1. Może być uznana za negatywną.

W przypadku ujemnego wyniku HI Virus-1 RT-PCR wykryty sygnał kontroli wewnętrznej wyklucza możliwość inhibicji reakcji RT-PCR.

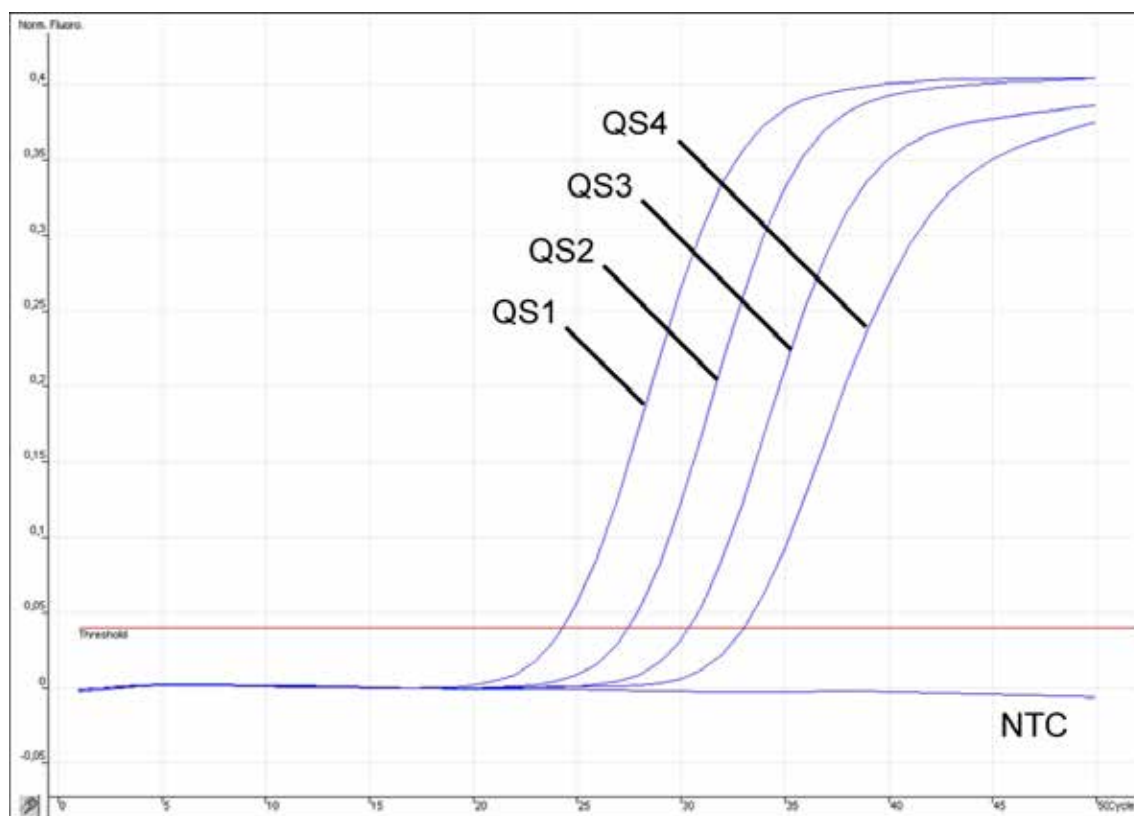
i Zauważ, że na aparacie Rotor-Gene 3000, odpowiednimi kanałami są A.ROX dla kontroli wewnętrznej i brak sygnału dla A.FAM.

11c. Nie wykryto sygnału w zielonym kanale fluorescencyjnym ani w pomarańczowym.

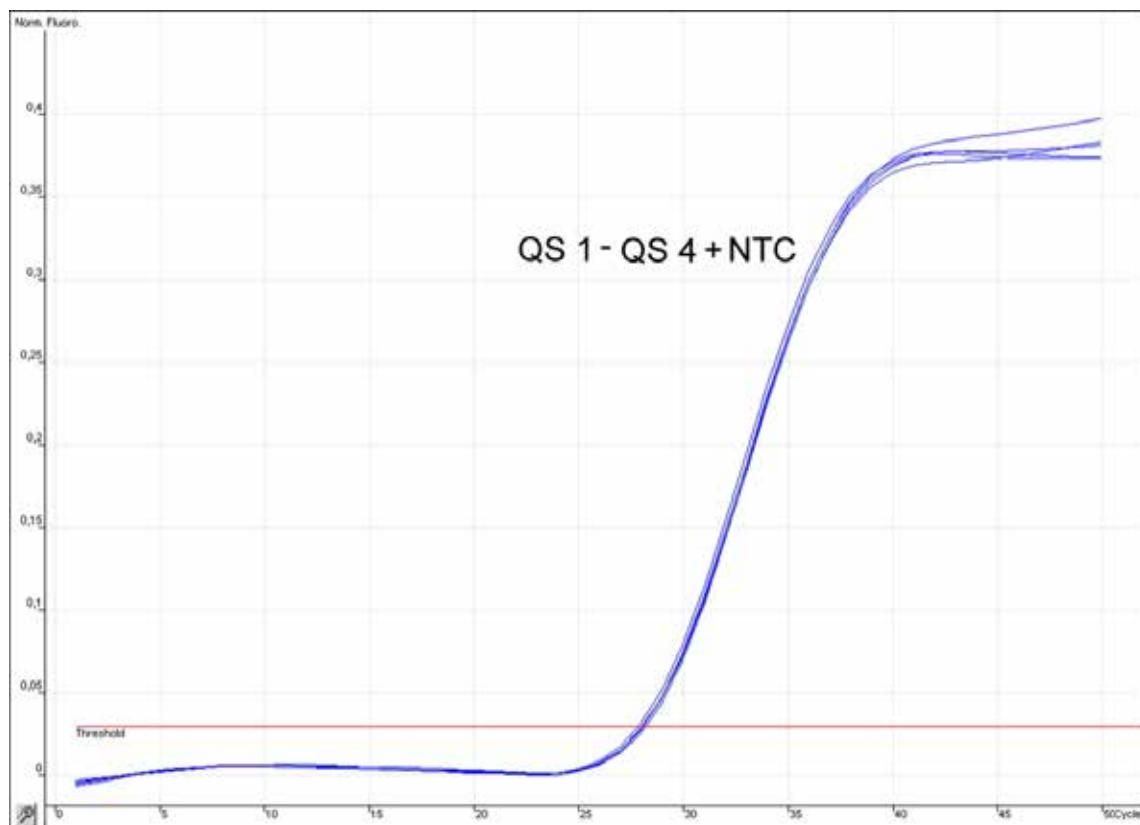
Nie można wyciągnąć żadnego wniosku – brak wyniku.

Informacje na temat źródeł błędów i ich rozwiązania można znaleźć w "Poradniku rozwiązywania problemów", strona 33.

i Zauważ, że na aparacie Rotor-Gene 3000, odpowiednimi kanałami są A.FAM i A.ROX.



Rys. 13. Detekcja standardów ilościowych (HI Virus-1 RG QS 1-4) w kanale fluorescencyjnym zielonym. NTC: No template control (kontrola ujemna).



Rys. 14. Detekcja kontroli wewnętrznej (IC) w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym z jednoczesną amplifikacją standardów ilościowych (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (kontrola ujemna).

Tabela 9. Interpretacja wyników ilościowych





Wynik	Interpretacja
HIV RNA >72 IU/ml	Wynik mieści się w określonym zakresie testowym. Prawdopodobieństwo wykrycia HIV RNA wynosi > 95%. Dodatni wynik testu jest statystycznie zapewniony.
HIV RNA <72 IU/ml	Wynik jest poza ustalonym zakresem testowym. Powtarzalność wyniku dodatniego nie jest zapewniona.
HIV RNA negative	Nie wykryto RNA wirusa HIV.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Więcej informacji można uzyskać także na stronie Często Zadawane Pytania (FAQ) w Dziale Pomocy Technicznej: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z Działu Pomocy Technicznej firmy QIAGEN z chęcią odpowiedzą na wszystkie Państwa pytania dotyczące zarówno informacji i opisów protokołów zawartych w tej instrukcji obsługi, jak i technologii wykonania oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej okładce lub na stronie www.qiagen.com).

Komentarze i sugestie

Brak sygnału kontroli dodatnich (HI Virus-1 RG QS 1–4) w zielonym kanale fluorescencyjnym (cycling green) lub A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Wybrany do analizy danych PCR kanał fluorescencyjny nie spełnia wymagań protokołu |  Do analizy danych należy wybrać zielony kanał fluorescencyjny lub A.FAM dla analitycznego HI Virus-1 RT-PC a pomarańczowy kanał fluorescencyjny lub A.ROX dla kontroli wewnętrznej PCR. |
| b) Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperatury w aparacie Rotor-Gene |  Porównać profil temperatury z protokołem. Patrz “Protokół: PCR i analiza danych”, strona Fehler! Textmarke nicht definiert.. |
| c) Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR |  Upewnić się, że badanie ustawiono poprawnie oraz zastosowano właściwe ustawienia parametrów badania. W razie potrzeby powtórzyć PCR. Patrz “Protokół: PCR i analiza danych” str. Fehler! Textmarke nicht definiert.. |
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego z odczynników wchodzących w skład zestawu nie spełniły zaleceń zawartych w części “Przechowywanie” str. 5. |  Sprawdzić warunki przechowywania i datę przydatności do użytku odczynników (patrz etykieta zestawu) i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |

Komentarze i sugestie

- e) Upłynęła data przydatności do użytku zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę przydatności do użytku odczynników (patrz etykieta zestawu) i w razie potrzeby użyć nowego zestawu.

Słaby sygnał bądź jego brak w kontroli wewnętrznej w pomarańczowym kanale fluorescencyjnym lub A.ROX i jednoczesny brak sygnału w zielonym kanale (cycling green) lub A.FAM

- a) Warunki reakcji PCR nie są zgodne z protokołem
- ⓘ Sprawdzić warunki reakcji PCR (patrz wyżej) i, w razie potrzeby, powtórzyć PCR z prawidłowymi parametrami.
- b) Reakcja PCR uległa inhibicji
- ⓘ Upewnić się, czy korzystasz z zalecanej metody izolacji i dokładnie przestrzegasz instrukcji producenta.
- c) Utrata materiału RNA w czasie ekstrakcji
- ⓘ Jeśli kontrola wewnętrzna została dodana na etapie izolacji, brak sygnału kontroli wewnętrznej może oznaczać utratę RNA podczas izolacji. Upewnić się, czy użytkownik korzysta z zalecanej metody izolacji (zobacz "Izolacja RNA", strona 20) i dokładnie przestrzega instrukcji producenta.
- d) Warunki przechowywania co najmniej jednego z odczynników wchodzących w skład zestawu nie spełniły zaleceń zawartych w części "Przechowywanie" (str. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**)
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę przydatności do użytku odczynników (patrz etykieta zestawu) i w razie potrzeby użyć nowego zestawu.
- e) Upłynęła data przydatności do użytku zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR
- ⓘ Sprawdzić warunki przechowywania i datę przydatności do użytku odczynników (patrz etykieta zestawu) i w razie potrzeby użyć nowego zestawu.

Komentarze i sugestie

Sygnaly w kontroli negatywnej w zielonym kanale fluorescencyjnym (cycling green) lub w kanale A.FAM podczas analitycznej reakcji PCR

- a) Podczas przygotowywania reakcji PCR doszło do zanieczyszczenia próbki
- ⓘ Powtórzyć reakcję PCR z nowymi odczynnikami w powtórzeniach.
 - ⓘ Jeśli to tylko możliwe, zamknąć probówki PCR zaraz po dodaniu próbki badanej.
 - ⓘ Upewnij się, że kontrola pozytywna jest pipetowana na końcu.
 - ⓘ Sprawdzić, czy miejsce pracy i aparaty są regularnie czyszczone.
- b) Podczas ekstrakcji doszło do zanieczyszczenia
- ⓘ Powtórzyć ekstrakcję i reakcję PCR próbki testowej, korzystając z nowych odczynników.
 - ⓘ Sprawdzić, czy miejsce pracy i aparaty są regularnie czyszczone.

Bibliografia

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

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

Informacje dot. zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: 2 Mastermiksy, 4 standardy ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	Na 96 reakcji: 2 Mastermiksy, 4 standardy ilościowe, kontrola wewnętrzna, woda (odpowiednia do PCR)	4513265
QIAamp DSP Virus Kit — przeznaczony do izolacji wirusowych kwasów nukleinowych z ludzkiej surowicy; do diagnostyki in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Na 50 izolacji: kolumny wirownicze QIAamp MinElute®, bufony, odczynniki, probówki, przedłużacze kolumn i złączki VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx — zwalidowany do analizy real-time PCR w zastosowaniach klinicznych IVD		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termocykler typu real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termocykler typu real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczą analizą topnienia (HRM), z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9002033

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczą analizą topnienia (HRM), z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Termocykler typu real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Termocykler typu real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9002042
Rotor-Gene Q — doskonała wydajność w real-time PCR		
Rotor-Gene Q 5plex System	Termocykler typu real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termocykler typu real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9001570

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczą analizą topnienia (HRM), z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Termocykler typu real-time PCR z wysokorozdzielczą analizą topnienia (HRM), z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), plus kanał HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Termocykler typu real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, w cenie instalacja i szkolenie	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Termocykler typu real-time PCR z 6 kanałami (niebieski, zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, fioletowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria; zawiera 1 rok gwarancji na części i robociznę, instalacja i szkolenie nie są wliczone w cenę	9001590
Rotor-Gene Q accessories		
Blok na próbki 72 x 0,1 ml	Aluminiowy blok do ręcznego nastawiania reakcji pipetą jednokanałową w 72 próbkach o poj. 0,1 ml	9018901
Blok na próbki 96 x 0,2 ml	Aluminiowy blok do ręcznego nastawiania reakcji w standardowym układzie mikroplątki 8 x 12 przy użyciu 96 próbek o poj. 0,2 ml	9018905

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Probówki w stripach z korkami, 0,1 ml (250)	250 stripów po 4 probówki z korkami na 1000 reakcji	981103
Probówki w stripach z korkami, 0,1 ml (2500)	10 x 250 stripów po 4 probówki z korkami na 10,000 reakcji	981106
Probówki do PCR, 0,2 ml (1000)	1000 cienkościennych probówek na 1000 reakcji	981005
Probówki do PCR, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 cienkościennych probówek na 10,000 reakcji	981008

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu QIAGEN lub z instrukcji obsługi. Podręczniki zestawów QIAGEN i instrukcje obsługi są dostępne na stronie www.qiagen.com. Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Strona celowo pozostawiona pustą

Strona celowo pozostawiona pustą

Zakup tego produktu umożliwia zastosowanie go przez nabywcę do przeprowadzania czynności diagnostycznych w zakresie diagnostyki in vitro u ludzi. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkowania wynikającym z nabycia produktu.

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

Zestawy *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR oraz QIAamp DSP Virus są zestawami diagnostycznymi oznakowanymi znakiem CE wg Europejskiej Dyrektywy Diagnostyki in vitro 98/79/EC. Nie są dostępne we wszystkich krajach.

Ograniczona umowa licencyjna

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR na następujące warunki:

1. Zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR można używać wyłącznie zgodnie z Instrukcją obsługi zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie użytkowania lub włączania dołączonych składników tego zestawu do innych składników, które nie zostały dołączone do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w Instrukcji obsługi zestawu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR oraz dodatkowych protokołów dostępnych na stronie www.qiagen.com.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Ten zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodjęcie ani niepozwolenie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

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

© 2015 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

www.qiagen.com

Australia | Zamówienia 1-800-243-800 | Fax 03-9840-9888 | Pomoc techniczna 1-800-243-066

Austria | Zamówienia 0800-28-10-10 | Fax 0800-28-10-19 | Pomoc techniczna 0800-28-10-11

Belgia | Zamówienia 0800-79612 | Fax 0800-79611 | Pomoc techniczna 0800-79556

Brazylia | Zamówienia 0800-557779 | Fax 55-11-5079-4001 | Pomoc techniczna 0800-557779

Kanada | Zamówienia 800-572-9613 | Fax 800-713-5951 | Pomoc techniczna 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Chiny | Zamówienia 86-21-3865-3865 | Fax 86-21-3865-3965 | Pomoc techniczna 800-988-0325

Dania | Zamówienia 80-885945 | Fax 80-885944 | Pomoc techniczna 80-885942

Finlandia | Zamówienia 0800-914416 | Fax 0800-914415 | Pomoc techniczna 0800-914413

Francja | Zamówienia 01-60-920-926 | Fax 01-60-920-925 | Pomoc techniczna 01-60-920-930 | Offers 01-60-920-928

Niemcy | Zamówienia 02103-29-12000 | Fax 02103-29-22000 | Pomoc techniczna 02103-29-12400

Hong Kong | Zamówienia 800 933 965 | Fax 800 930 439 | Pomoc techniczna 800 930 425

Irlandia | Zamówienia 1800 555 049 | Fax 1800 555 048 | Pomoc techniczna 1800 555 061

Włochy | Zamówienia 800-789-544 | Fax 02-334304-826 | Pomoc techniczna 800-787980

Japonia | Telephone 03-6890-7300 | Fax 03-5547-0818 | Pomoc techniczna 03-6890-7300

Korea (Południowa) | Zamówienia 080-000-7146 | Fax 02-2626-5703 | Pomoc techniczna 080-000-7145

Luksemburg | Zamówienia 8002-2076 | Fax 8002-2073 | Pomoc techniczna 8002-2067

Meksyk | Zamówienia 01-800-7742-639 | Fax 01-800-1122-330 | Pomoc techniczna 01-800-7742-436

Holandia | Zamówienia 0800-0229592 | Fax 0800-0229593 | Pomoc techniczna 0800-0229602

Norwegia | Zamówienia 800-18859 | Fax 800-18817 | Pomoc techniczna 800-18712

Singapur | Zamówienia 1800-742-4362 | Fax 65-6854-8184 | Pomoc techniczna 1800-742-4368

Hiszpania | Zamówienia 91-630-7050 | Fax 91-630-5145 | Pomoc techniczna 91-630-7050

Szwecja | Zamówienia 020-790282 | Fax 020-790582 | Pomoc techniczna 020-798328

Szwajcaria | Zamówienia 055-254-22-11 | Fax 055-254-22-13 | Pomoc techniczna 055-254-22-12

Wielka Brytania | Zamówienia 01293-422-911 | Fax 01293-422-922 | Pomoc techniczna 01293-422-999

USA | Zamówienia 800-426-8157 | Fax 800-718-2056 | Pomoc techniczna 800-DNA-PREP (800-362-7737)

