



artus[®] HI Virus-1 RG RT-PCR Kit El Kitabı

 24 (katalog no. 4513263)
 96 (katalog no. 4513265)

Versiyon 1

IVD

Kantitasyon in vitro diagnostik

Rotor-Gene[®] Q Aletleriyle kullanılmak üzere

CE
0197

REF

4513263, 4513265

HB

1049310TR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724

Hilden, ALMANYA

R5

MAT

1049310TR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN her biyolojik örneğin içeriğinin saptanması ve izolasyonunu mümkün kılacak şekilde yenilikçi örnek ve analiz teknolojilerinin önde gelen sağlayıcısıdır. Gelişmiş ve yüksek kalitede ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca kadar başarıyı garanti eder.

QIAGEN şunlarda standartları belirler:


- DNA, RNA ve protein saflaştırma
- Nükleik asit ve protein analizleri
- mikroRNA araştırmaları ve RNAi
- Analiz ve örnek teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz olağanüstü başarılar elde etmenizi ve yeni buluşlar yapmanızı sağlamaktır. Daha fazla bilgi için, www.qiagen.com adresini ziyaret ediniz.

İçindekiler

Kit İÇeriği	6
Semboller	6
Saklama	7
Kullanım Amacı	7
Ürün Kullanımı Sınırlamaları	8
Uyarılar ve Önlemler	8
Kalite Kontrol	8
Giriş	9
Prensip	9
Patojen bilgisi	9
Performans özellikleri	10
Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Ekipman ve Reaktifler	19
Önemli Notlar	20
Genel önlemler	20
Numune toplama, saklama ve nakli	20
RNA izolasyonu	22
Dahili kontrol	22
PCR analizi için eşiĐi ayarlama	23
Kantitasyon	23
Protokol: PCR ve Veri Analizi	25
Sorun Giderme Kılavuzu	35
Referanslar	38
Sipariş Bilgisi	39


Kit İçeriği

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Katalog no.		4513263	4513265
Reaksiyon sayısı		24	96
Mavi	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 reaksiyon	8 x 12 reaksiyon
Eflatun	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 reaksiyon	8 x 12 reaksiyon
Kırmızı	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Kırmızı	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Kırmızı	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Kırmızı	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Yeşil	HI Virus-1 RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Beyaz	Su (PCR sınıfı)	1000 μl	1000 μl
	El Kitabı	 1	1

* Kantitasyon standardı.

† Dahili kontrol.

Semboller

 <N> <N> test için yeterli reaktif içermektedir



Son kullanma tarihi



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz







Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası

COMP	Bileşenler
CONT	İçindekiler
NUM	Numara
GuHCL	Guanidin hidroklorür
GTIN	Global Ticaret Madde Numarası
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici
	Kullanma talimatına başvurun
	Önemli not

Saklama

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti bileşenleri -30°C - -15°C 'de saklanmalıdır ve etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Tekrarlanan dondurma ve çözmeden (>2 x) kaçınılmalıdır çünkü analiz hassasiyetini azaltabilir. Reaktifler sadece arada kullanılacaksa alikotlar halinde dondurulmaları gerekir. $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklama 5 saatlik bir dönemi geçmemelidir.

Kullanım Amacı

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti insan plazmasında insan immünyetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) RNA'sının kantitasyonu için bir in vitro nükleik asit amplifikasyonu testidir. Bu diagnostik test revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonunu (RT-PCR) kullanır ve Rotor-Gene Q Aletleriyle kullanılmak üzere konfigüre edilmiştir. Test $120 - 1 \times 10^8$ HIV-1 IU/ml aralığında HIV-1 RNA kantitasyonu yapabilir. Grup M Alt tipleri A-H içeren plazma örnekleri analizde kullanım için doğrulanmıştır.

 *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti Rotor-Gene Q 2plex Aletleriyle kullanılamaz.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin hastalık tanısı için klinik sunum ve diğer laboratuvar işaretleriyle birlikte kullanılması ve EDTA plazma HIV-1 RNA düzeylerindeki değişiklikler yoluyla ölçüldüğü şekilde antiretroviral tedaviye viral cevabın değerlendirilmesine yardımcı olarak kullanılması amaçlanmıştır. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin HIV için bir tarama testi olarak kullanılması veya HIV enfeksiyonu varlığını doğrulamak için diagnostik bir test olarak kullanılması amaçlanmamıştır.

Ürün Kullanımı Sınırlamaları

Tüm reaktifler sadece in vitro diagnostik için kullanılabilir.

Ürün sadece in vitro diagnostik işlemler konusunda özel talimat almış ve eğitilmiş personel tarafından kullanılmalıdır.

Optimum PCR sonuçları için kullanıcı el kitabına katı olarak uymak gerekir.

Tüm bileşenlerin etiketleri ve kutusunda basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Nadir olsa da kitin primerleri ve/veya probun kapsadığı viral genomun yüksek ölçüde korunmuş bölgelerinde mutasyonlar olması bu vakalarda virüs varlığının saptanmaması veya miktarının eksik gösterilmesiyle sonuçlanabilir. Analiz tasarımının geçerliliği ve performansı düzenli aralıklarla revize edilmektedir.

Uyarılar ve Önlemler

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN® kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Örnek ve analiz atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize uygun olarak atın.

Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca her *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti tutarlı ürün kalitesini sağlamak üzere önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilir.

Giriş

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit RotorGene Q Aletlerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak HIV-1 RNA saptanması için bir kullanıma hazır sistem oluşturur. HI Virus-1 RG Master A ve B HIV-1 genomunun bir 93 bp bölgesinin revers transkripsiyonu ve spesifik amplifikasyonu için ve RotorGene Q, veya Rotor-Gene 6000 veya Rotor-Gene 3000 Cycling A.FAM™ (kaynak 470 nm, detektör 510 nm) Cycling Green floresans kanalında spesifik amplikonun doğrudan saptanması için reaktifler ve enzimler içerir.

Ayrıca, *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti olası PCR inhibisyonunu tanımlamak için ikinci bir heterolog amplifikasyon sistemi içerir. Bu Rotor-Gene Q veya Rotor-Gene 6000 veya Rotor-Gene 3000 A.ROX™ (kaynak 585 nm, detektör 610 nm) Cycling Green floresans kanalında bir dahili kontrol (IC) olarak saptanır. Analitik HI Virus-1 RT-PCR (bakınız "Analitik hassasiyet", sayfa 10) saptama limiti azalmaz. Harici pozitif kontroller (HI Virus-1 RG QS 1–4) sağlanır ve bunlar viral RNA miktarının saptanmasını mümkün kılar. Daha fazla bilgi için bakınız "Kantitasyon", sayfa 23.

Prensip

Polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) patojen saptama, patojen genomunun spesifik bölgelerinin amplifikasyonunu temel alır. Gerçek zamanlı PCR'de amplifiye edilen ürün floresan boyalar yoluyla saptanır. Bunlar genellikle amplifiye edilen ürüne spesifik olarak bağlanan oligonükleotid problemleriyle bağlantılıdır. PCR çalışması sırasında (yani gerçek zamanlı olarak) floresans şiddetlerinin izlenmesi PCR çalışması sonrasında reaksiyon tüplerinin tekrar açılmasına gerek kalmadan biriken ürünün saptanması ve kantitasyonunu mümkün kılar.*

Patojen bilgisi

İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV) akkiz immünyetmezlik sendromuna (AIDS) neden olan bir retrovirüstür. HIV-1 ve HIV-2 şeklinde virülans ve prevalansı farklı olan, insan enfeksiyonlarından sorumlu iki tür HIV vardır. Dünya çapında bildirilen AIDS vakalarının çoğu HIV-1 ile ilişkilendirilmiştir. HIV enfeksiyonu enfekte kan, vajinal sıvı, anne sütü ve diğer vücut sıvılarının aktarılmasıyla oluşur. Bu vücut sıvıları içinde HIV hem serbest virüs partikülleri olarak hem de enfekte immün hücreler içinde virüs olarak bulunmaktadır. Bulaşmanın üç ana yolu korunmadan cinsel ilişki, kontamine iğneler ve enfekte bir anneden doğum sırasında veya anne sütü yoluyla geçiştir.

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

HIV temel olarak yardımcı T hücreleri (özellikle CD4⁺) gibi insan immün sistemi hücrelerini enfekte eder. HIV enfeksiyonu düşük CD4⁺ T hücreleri seviyelerine neden olur. CD4⁺ T hücre sayısı kritik bir düzeyin altına indiğinde hücre aracılıklı bağışıklık kaybedilir ve vücut fırsatçı enfeksiyonlara giderek daha yatkın hale gelir.

AIDS semptomları HIV enfeksiyonunda bozulmuş immün sistemin fırsatçı enfeksiyonlarla savaşamadığı ileri evrede oluşur. Bu evrede enfekte kişide giderek bu tür enfeksiyonların tetiklediği belirtiler gelişmeye başlar. En sık görülen enfeksiyonlar arasında kriptosporida diyaresi, sitomegalovirüs tarafından indüklenen göz enfeksiyonu, pnömosistis pnömonisi, toksoplazmosis ve tüberküloz ve ayrıca *Mycobacterium avium* kompleksi üyelerinin neden olduğu enfeksiyonlar vardır. Ayrıca invaziv servikal kanser, Kaposi sarkomu veya lenfoma gibi farklı kanser tiplerinin gelişmesine sık rastlanır. Şu anda AIDS için tam bir tedavi yoktur ve HIV enfeksiyonu olan çoğu kişinin zamanla AIDS ile ilişkili bir hastalıktan öleceğine inanılır. Ancak virüsün kendisiyle savaşanlar ve fırsatçı enfeksiyonları önleyenler veya tedavi edenler dahil olmak üzere HIV/AIDS tedavilerindeki ilerlemeler birçok HIV/AIDS hastasının yaşam beklentisi ve kalitesini önemli ölçüde arttırmıştır.

Performans özellikleri

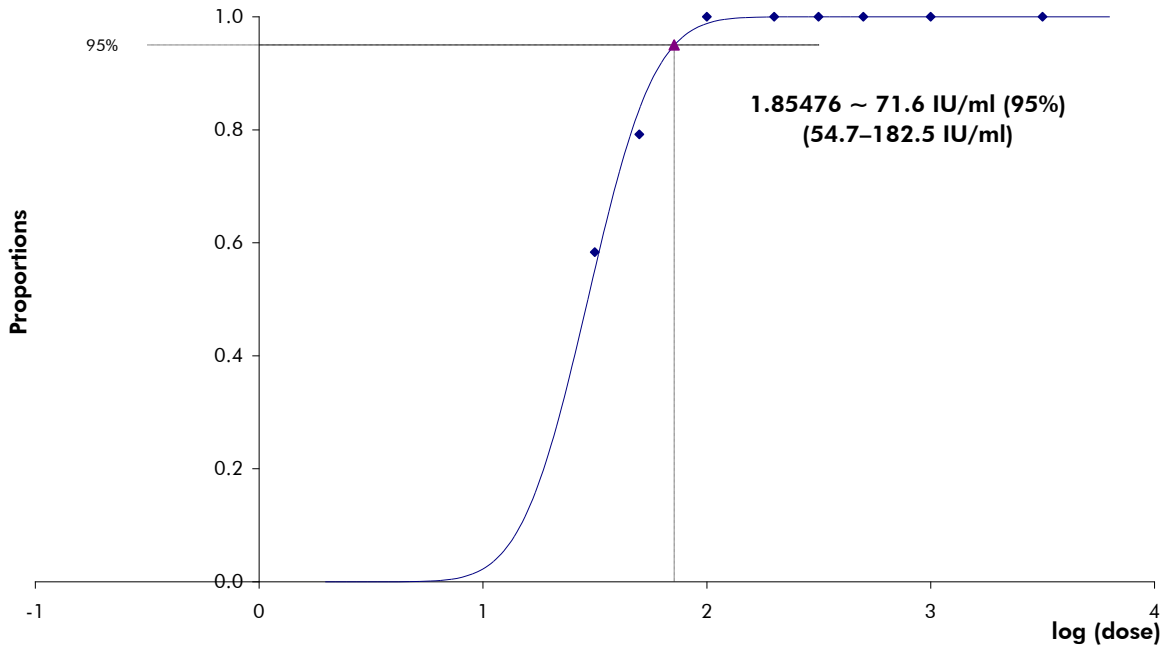
Analitik hassasiyet

Analitik saptama limiti ve ayrıca saflaştırma dikkate alınarak analitik saptama limiti (hassasiyet limitleri) *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti için değerlendirilmiştir. Saflaştırma dikkate alınarak analitik saptama limiti belirli bir ekstraksiyon yöntemiyle kombinasyon halinde HIV pozitif klinik numuneler kullanılarak belirlenir. Tersine analitik saptama limiti bilinen konsantrasyonda bir standart kullanılarak seçilen ekstraksiyon yönteminden bağımsız olarak belirlenir.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin analitik hassasiyetini belirlemek için 0,0316 ila 31,6 IU*/µl şeklinde standart bir dilüsyon serisi oluşturulmuş ve *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitiyle kombinasyon halinde Rotor-Gene 3000 üzerinde analiz edilmiştir. Testler 8 replikatta 3 farklı günde yapılmıştır. Sonuçlar probit analiziyle belirlenmiştir. Rotor-Gene 3000 ile kombinasyon halinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin analitik saptama limiti 4,5 IU/µl'dir (p = 0,05). Bu durum 4,5 IU/µl'nin saptanması olasılığının %95 olduğunu göstermektedir.

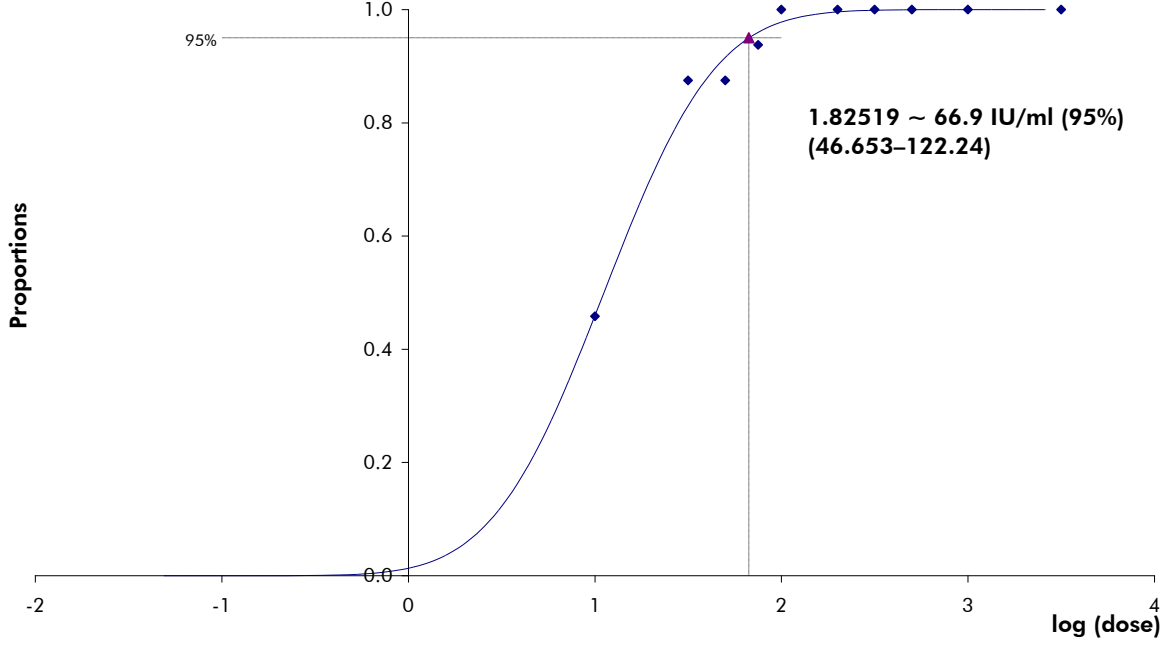
* Standart, 2. Uluslararası HIV standardı (DSÖ) kullanılarak konsantrasyonu kalibre edilmiş olan in vitro transkripsiyonlu bir RNA'dır.

Rotor-Gene Aletleri üzerinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması (QIAamp® DSP Virüs Kiti, QIAGEN) dikkate alınarak analitik hassasiyet, klinik plazma numunelerine eklenmiş 10 - 3160 HIV IU/ml ile nükleik asit amplifikasyonu teknolojisi (NAT) analizleri için HIV-1 RNA 2. Uluslararası DSÖ Standardı (NIBSC Kodu 97/650) dilüsyon serisi kullanılarak belirlenmiştir. Bunlar şu kit kullanılarak ekstraksiyona tabi tutulmuştur: QIAamp DSP Virüs Kiti (QIAGENekstraksiyon hacmi: 0,5 ml, elüsyon hacmi: 25 µl). Dilüsyonların her biri *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinde 3 farklı günde 8 replikat ile analiz edilmiştir. Sonuçlar probit analiziyle belirlenmiştir. Probit analizinin grafik bir temsili Şekil 1'de verilmiştir. Rotor-Gene 3000 ile kombinasyon halinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması dikkate alınarak analitik saptama limiti 71,6 IU/ml'dir ($p = 0,05$). Bu durum 71,6 IU/µl'nin saptanması olasılığının %95 olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Probit analizi: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000). Rotor-Gene 3000 üzerinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması (QIAamp DSP Virüs Kiti, QIAGEN) dikkate alınarak analitik hassasiyet.

Rotor-Gene Q/6000 ile kombinasyon halinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması dikkate alınarak analitik saptama limiti 66,9 IU/ml'dir ($p = 0,05$). Bu durum 66,9 IU/µl'nin saptanması olasılığının %95 olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Probit analizi: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). 6000 Rotor-Gene 6000 üzerinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması (QIAamp DSP Virüs Kiti, QIAGEN) dikkate alınarak analitik hassasiyet.

Özgüllük

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin özgüllüğü öncelikle primer ve problemlerin seçilmesi ve ayrıca katı reaksiyon koşullarının seçilmesiyle sağlanır. Primerler ve problemler gen bankalarında yayımlanmış tüm dizilere olası homolojiler açısından sekans karşılaştırma analiziyle kontrol edilmiştir. Tüm ilgili genotiplerin saptanabilirliği bu şekilde bir veri tabanı hizalaması ve Rotor-Gene Aletleri üzerinde aşağıdaki genotiplerle yapılan PCR çalışmalarıyla sağlanmıştır (bakınız Tablo 1).

Ayrıca özgüllük 100 farklı HIV negatif plazma örneğiyle doğrulanmıştır. Bunlar HI Virus-1 RG Mastere dahil edilmiş HIV spesifik primer ve problemlerle herhangi bir sinyal oluşturmamıştır.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin olası çapraz reaktivitesi Tablo 2'de liste halinde verilen kontrol grubu kullanılarak test edilmiştir. Test edilen patojenlerin hiçbiri reaktif bulunmamıştır. Karışık enfeksiyonlarla çapraz reaktivite görülmemiştir.

Tablo 1. İlgili genotiplerin özgülüğünün test edilmesi

Virüs	Genotip	Kaynak	HIV (FAM)	Dahili kontrol (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	+	+

* Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü, Hertfordshire.

Tablo 2. Kitin özgülüğünün potansiyel çapraz reaktif patojenlerle test edilmesi

Kontrol grubu	HIV (Cycling Green veya Cycling A.FAM)	Dahili kontrol (Cycling Orange veya Cycling A.ROX)
Hepatit A virüsü	-	+
Hepatit B virüsü	-	+
Hepatit C virüsü	-	+
İnsan herpes virüsü 1 (herpes simpleks virüsü 1)	-	+
İnsan herpes virüsü 2 (herpes simpleks virüsü 2)	-	+
İnsan herpes virüsü 3 (varisella-zoster virüsü)	-	+
İnsan herpes virüsü 5 (sitomegalovirüs)	-	+

Tablo bir sonraki sayfada devam ediyor

Tablo 2. Devam

Kontrol grubu	HIV (Cycling Green veya Cycling A.FAM)	Dahili kontrol (Cycling Orange veya Cycling A.ROX)
İnsan T hücreli lösemi virüsü tip 1 ve tip 2	-	+
Enterovirüs	-	+
Parvovirüs B19	-	+
Sarı humma	-	+
<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 sp.</i>	-	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+

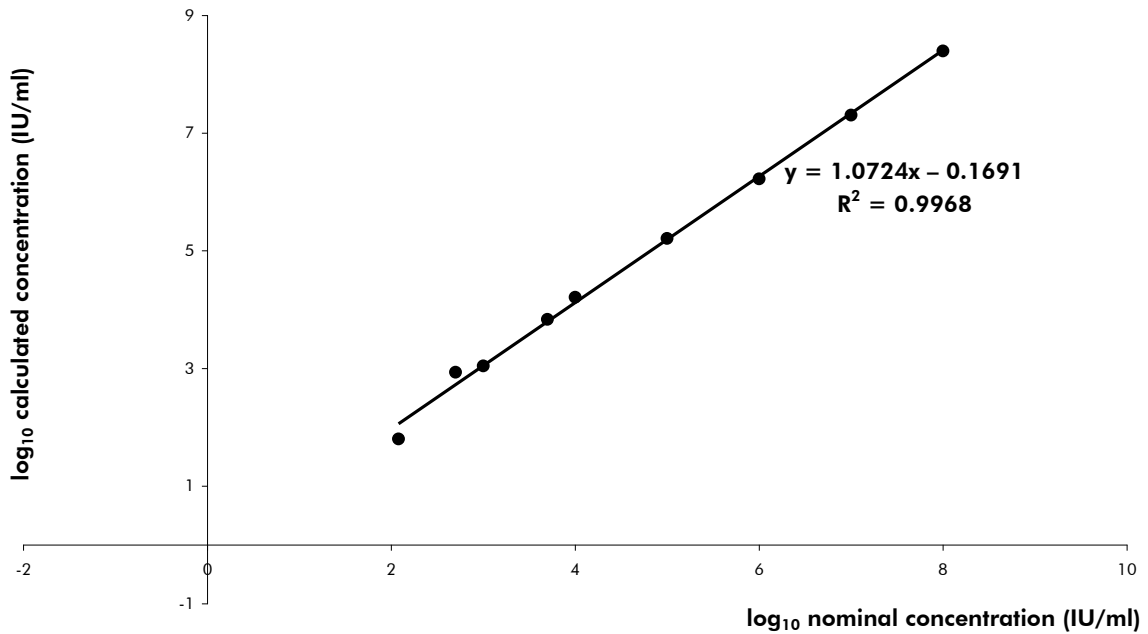
Lineer Aralık

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit lineer aralığı (analitik ölçüm) 1×10^8 IU/ μ l ile 1 IU/ μ l arasında bir HIV in vitro transkripti dilüsyon serisinin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Dilüsyon serisi DSÖ Uluslararası HIV RNA Standardına göre kalibre edilmiştir.

Her dilüsyon Rotor-Gene Aletleri üzerinde *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti kullanılarak replikatlar (n = 8) halinde test edilmiştir.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin lineer aralığı 5 IU/μl değerinden en az 1 x 10⁸ IU/μl değerine kadar konsantrasyonları kapsayacak şekilde belirlenmiştir.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması dikkate alınarak lineer aralığı 1 x 10⁸ IU/ml ile 120 IU/ml arasında bir OptiQuant HIV-1 RNA Kantitasyon Paneli dilüsyon serisinin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Saflaştırma QIAamp DSP Virüs Kiti kullanılarak kopyalar üzerinde yapılmıştır (ekstraksiyon hacmi: 0,5 ml, elüsyon hacmi: 25 μl). 9 örneğin her biri *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti kullanılarak analiz edilmiştir. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin saflaştırılması dikkate alınarak lineer aralık 120 IU/ml değerinden en az 1 x 10⁸ IU/ml değerine kadar konsantrasyonları kapsayacak şekilde belirlenmiştir (bakınız Şekil 3).



Şekil 3. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin Lineer Aralığı. Lineer aralığın hesaplanması. Düz çizgi log₁₀ nominal konsantrasyonlarla log₁₀ hesaplanmış konsantrasyonların lineer regresyonuyla belirlenmiştir. Regresyon çizgisinin denklemi şekle dahil edilmiştir.

Kesinlik

Rotor-Gene Aletleri yoluyla *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin kesinlik verileri toplanmıştır ve analizin toplam varyansının belirlenmesini mümkün kılar. Toplam varyans analiz içi değişkenlik (bir deneyde aynı konsantrasyondan örneklerin birden fazla sonucunun değişkenliği), analizler arası değişkenlik (bir laboratuvarda farklı kullanıcılar tarafından aynı tipte farklı aletlerde oluşturulan birden fazla tahlil sonucunun değişkenliği) ve partiler arası değişkenlikten

(çeşitli partiler kullanılarak tahlilin birden fazla sonucunun değişkenliği) oluşur. Elde edilen veriler patojene spesifik ve dahili kontrol PCR için varyasyon katsayısını, varyansı ve standart sapmayı belirlemek için kullanılmıştır.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin kesinlik verileri en düşük konsantrasyonun (QS4; 10 IU/ μ l) kantitasyon standardı kullanılarak toplanmıştır . Testler 8 replikatla yapılmıştır. Kesinlik verileri amplifikasyon eğrilerinin C_T değerleri temelinde hesaplanmıştır (C_T : eşik döngüsü, bakınız Tablo 3). Bu sonuçlar temelinde belirtilen konsantrasyona sahip herhangi bir belirli örneğin genel istatistiksel dağılımı %1,66 (C_T) ve dahili kontrolün saptanması için %2,15'tir (C_T). Bu değerler belirlenmiş değişkenliklerin tüm tek değerlerinin toplamı temelindedir.

Tablo 3. C_T değerleri temelinde kesinlik verileri

	C_T değeri	Standart sapma	Varyasyon katsayısı (%)
Tahlil içi değişkenlik: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Tahlil içi değişkenlik: Dahili kontrol	31,24	0,18	0,58
Analizler arası değişkenlik: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Analizler arası değişkenlik: Dahili kontrol	31,65	0,36	1,13
Partiler arası değişkenlik: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73
Partiler arası değişkenlik: Dahili kontrol	31,20	0,55	1,76
Toplam varyans: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Toplam varyans: Dahili kontrol	31,40	0,67	2,15

Güçlülük

Güçlülüğün doğrulanması *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin toplam başarısızlık oranının belirlenmesini mümkün kılar. 100 HIV negatif plazma örneğine 4,5 IU/ μ l elüsyon hacminde HIV kontrol RNA eklenmiştir (analitik hassasiyet limitinin üç katı konsantrasyon). QIAamp DSP Virüs Kiti ekstraksiyonundan sonra bu örnekler *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit ile analiz edilmiştir. Tüm HIV örnekleri için başarısızlık oranı %0'dır. Ayrıca dahili kontrolün güçlülüğü 100 HIV negatif plazma örneğinin saflaştırılması ve analizi ile değerlendirilmiştir. Toplam başarısızlık oranı %0'dır. İnhibisyonlar gözlenmemiştir. Böylece *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin güçlülüğü \geq %99'dur.

Tekrar Üretilirlik

Tekrar üretilebilirlik verileri *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin normal performansının değerlendirilmesini ve ayrıca başka ürünlerle etkinliğinin karşılaştırılmasını mümkün kılar. Bu veriler belirlenmiş verimlilik programlarına katılımla elde edilir.

Diagnostik değerlendirme

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti bir çalışmada değerlendirilmiştir. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin COBAS® TaqMan® HIV-1 Testiyle karşılaştırılması için 241 plazma numunesi retrospektif olarak analiz edilmiştir. Tüm plazma numuneleri daha önce rutin diagnostik için COBAS TaqMan HIV-1 Testi kullanılarak pozitif veya negatif olarak analiz edilmiştir.

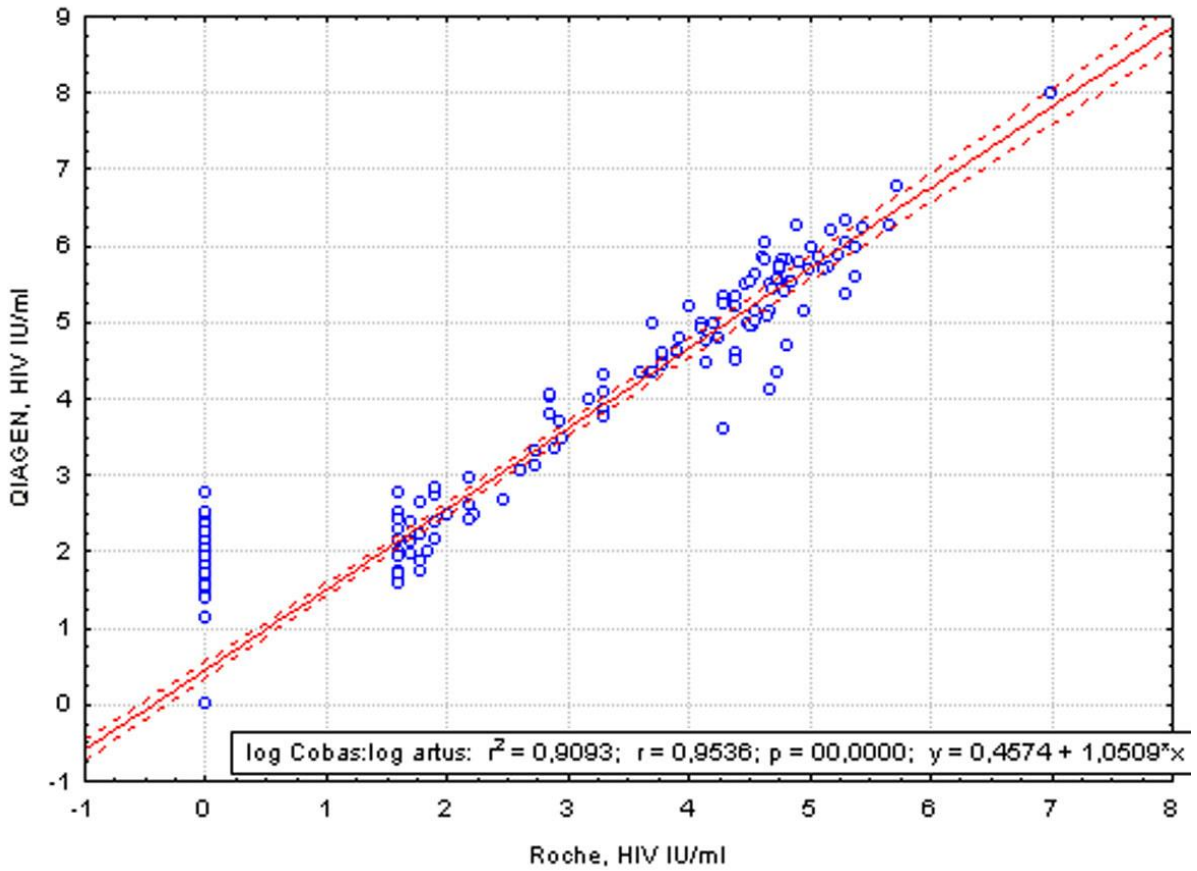
artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin test edilmesi için HIV RNA, QIAamp DSP Virüs Kiti kullanılarak izole edilmiştir ve analiz Rotor-Gene 6000 Aleti üzerinde yapılmıştır. COBAS TaqMan HIV-1 Testi ile karşılaştırmalı test için HIV RNA prospektüste sağlanan üretici talimatına göre izole edilmiştir. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti kullanılarak elde edilen sonuçlar COBAS TaqMan HIV-1 Testininkilerle karşılaştırılmıştır (bakınız Tablo 4 ve Şekil 4).

COBAS TaqMan HIV-1 Testiyle pozitif test sonucu veren 126 örneğin 105'i aynı zamanda *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti ile pozitif test sonucu vermiştir. COBAS TaqMan HIV-1 Testiyle negatif test sonucu veren 115 örneğin 113'ü aynı zamanda *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti ile negatif test sonucu vermiştir.

COBAS TaqMan HIV-1 Testi sonuçları referans olarak alınır, diagnostik hassasiyet %98,1 ve diagnostik özgüllük %84,3'tür.

Table 4. Retrospektif olarak analiz edilen 241 EDTA plazma örneğinin sonuçları

		COBAS TaqMan HIV-1 Testi		
		+	-	Toplam
artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti	+	105	21	126
	-	2	113	115



Şekil 4. COBAS TaqMan HIV-1 Testinin (Roche, HIV; COBAS AmpliPrep sistemi kullanılarak örnek saflaştırılmalı) artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitiyle (QIAGEN, HIV; QIAamp DSP Virüs Kiti kullanılarak örnek saflaştırılmalı) karşılaştırması. Her iki test sisteminden kantitatif sonuçların korelasyonu (Tablo 4) lineer regresyonla analiz edilmiştir. Her iki kitten sonuçlar bir XY (saçılım) plotunda log-log ölçeğiyle gösterilmiştir.

Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Ekipman ve Reaktifler

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

- RNA izolasyon kiti (bakınız "RNA izolasyonu", sayfa 22)
- Pipetler (ayarlanabilir)*
- Filtreli steril pipet uçları
- Vorteks karıştırıcı*
- 2 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu tezgah santrifüjü*
- Cycling Green ve Cycling Orange için floresans kanallı veya Cycling A.FAM ve Cycling A.ROX için floresans kanallı Rotor-Gene Q veya Rotor-Gene Aleti*†
- Rotor-Gene Q yazılım versiyonu 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 yazılım versiyonu 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 yazılım versiyonu 6.0.23)
- Strip Tüpler ve Kapakları, 0,1 ml, 72 kuyulu rotor ile kullanım için (kat. no. 981103 veya 981106)
- Alternatif olarak: PCR Tüpleri, 0,2 ml, 36 kuyulu rotor ile kullanım için (kat. no. 981005 veya 981008)
- Soğutma bloğu (Yükleme Bloğu 72 x 0,1 ml Tüp, kat. no. 9018901 veya Yükleme Bloğu 96 x 0,2 ml Tüp, kat. no. 9018905)

* Aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edildiği ve kalibre edildiğinden emin olun.

† *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti Rotor-Gene Q 2plex Aletleriyle kullanılamaz.

Önemli Notlar

Genel önlemler

Kullanıcı daima şunlara dikkat etmelidir:

- Filtreli steril pipet uçları kullanın.
- Pozitif materyalleri (numuneler, pozitif kontroller ve amplikonlar) tüm diğer reaktiflerden ayrı saklayın ve ekstrakte edin ve bunları reaksiyon karışımına konumsal olarak ayrılmış bir yerde ekleyin.
- Bir analize başlamadan önce tüm bileşenleri oda sıcaklığında (15–25°C) iyice çözün.
- Çözüldüğünde, bileşenleri karıştırın (tekrar tekrar yukarı ve aşağı pipetleyerek veya puls vortekslemeyle ve kısa süre santrifüje edin.
- Hızlı çalışın ve bileşenleri buz üzerinde veya soğutma bloğunda tutun (72/96 kuyulu yükleme bloğu).

Numune toplama, saklama ve nakli

i Tüm örnekler enfeksiyöz olabilecek materyal gibi muamele edilmelidir.

Sadece aşağıdaki örnek materyalleri kabul edilebilir ve bunlar için taşıma, nakil ve saklamayla ilgili aşağıdaki kurallar ve belirli talimat katı şekilde izlenmelidir:

i Güncel çalışmalar HIV saptama için en uygun örnek materyalleri olarak EDTA veya sitratlı plazmadan bahsetmektedir. Bu nedenle *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti ile bu materyallerin kullanılmasını öneririz.

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin dahili doğrulaması insan EDTA plazma örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Başka örnek materyalleri doğrulanmamıştır. Lütfen örnek hazırlama için sadece önerilen RNA izolasyon kitini (bakınız “RNA izolasyonu”, sayfa 22) kullanın.

Bazı örnek materyalleri kullanılırken taşıma, nakil ve saklamayla ilgili belirli talimata katı şekilde uyulması gerekir.

Numune toplama

Her kan alınması kan damarlarında (arterler, venler, kapillerler) hasara neden olur. Sadece zararsız ve steril materyal kullanılmalıdır. Kan alma için uygun tek kullanımlık malzeme mevcuttur. Ven ponksiyonu için çok ince kapiller iğneler kullanılmamalıdır. Venöz kan alınması dirsek eklemi, ön kol ve elin arkasının uygun kısımlarında yapılmalıdır. Kanın standart numune toplama tüplerine (kırmızı kapak, Sarstedt veya başka üreticinin eşdeğer tüpü) alınması gerekir. 5–

10 ml hacminde EDTA'lı kan alınmalıdır. Tüpler örnek alındıktan hemen sonra ters çevrilerek karıştırılmalıdır (8 x, sallamayın).

❗ Heparinize kişilerden alınan örnekler kullanılmamalıdır (bakınız “Olumsuz etkileyen maddeler”, sayfa 21).

Örnek saklama

Tam kan 6 saat içinde 20 dakika 800–1600 x g hızında santrifügasyon ile plazma ve hücresel bileşenlerine ayrılmalıdır. İzole edilen plazmanın steril polipropilen tüplere aktarılması gerekir. Örnekleri rutin olarak dondurursanız veya daha uzun süre saklarsanız analiz hassasiyeti azalabilir. Virüs kapsüllü RNA'sı 4°C'de saklanırsa günlerce, –20°C'de saklanırsa haftalarca ve hatta –70°C'de saklanırsa aylarca ve yıllarca stabildir.*

Örnek nakli

Örnek materyali prensip olarak kırılmaz bir taşıma kabında nakledilmelidir. Bu şekilde örnek sızması nedeniyle olası enfeksiyon tehlikesinden kaçınılabilir. Örnekler, patojenik materyalin taşınması için yerel ve ulusal talimat izlenerek taşınmalıdır.†

Örnekler 6 saat içinde sevk edilmelidir. Örnekleri alındıkları yerde saklamak önerilmez. Örnekleri patojenik materyalin taşınması için yasal talimat izlenerek postayla göndermek mümkündür. Örneklerin bir kuryeyle gönderilmesini öneriyoruz. Kan örnekleri soğutulmuş (2–8°C) olarak ve ayrılmış plazma derin dondurulmuş (–15 - –30°C) olarak gönderilmelidir.

Olumsuz etkileyen maddeler

Artmış bilirubin (≤ 15 mg/dl) ve lipid (≤ 800 mg/dl) seviyeleri ve hemolitik örnekler sistemi etkilemez. Heparin (≥ 10 IU/ml) PCR'ı etkiler. Antikoagülan olarak heparin içeren tüplere toplanmış örnekler kullanılmamalıdır. Ayrıca heparinize hastaların örnekleri kullanılmamalıdır.

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

† Uluslararası Hava Taşımacılığı Derneği (IATA). Dangerous Goods Regulations (Tehlikeli Mallar Düzenlemesi).

RNA izolasyonu

QIAamp DSP Virüs Kiti (QIAGEN, kat. no. 60704), *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitiyle kullanılmak üzere insan plazmasından viral RNA saflaştırma için doğrulanmıştır. Viral RNA saflaştırmayı *QIAamp DSP Virüs Kiti El Kitabındaki* talimata göre yapın.

i Ekstraksiyon etkinliği ve sonuçta DNA/RNA verimi için taşıyıcı RNA kullanılması çok önemlidir. QIAamp DSP Virüs Kiti ile sağlanan taşıyıcı RNA'nın stabilitesini arttırmak için talimat el kitabında verilen taşıyıcı RNA tekrar oluşturma ve saklamaya ilgili bilgilere göre ilerlemenizi öneririz ("Reaktifler ve tamponları hazırlama").

Her ekstraksiyonun başlangıcında lizis tamponu ve taşıyıcı RNA'nın (ve geçerliyse dahili kontrolün, bakınız aşağıda "Dahili kontrol") bir karışımı Tablo 5'teki pipetleme şemasına göre taze olarak hazırlanmalıdır.

Tablo 5. QIAamp DSP Virüs Kitiyle kullanılmak üzere pipetleme şeması

Örnek sayısı	1	12
Lizis Tamponu (AL)*	550 µl	6600 µl
Taşıyıcı RNA (1 µg/µl)	6,2 µl	74,4 µl
Toplam hacim	556,2 µl	6674,4 µl
Ekstraksiyon başına hacim	500 µl	her birinden 500 µl

* Guanidin hidroklorür içerir; güvenlik bilgisi için bakınız *QIAamp DSP Virüs Kiti El Kitabı*.

i Ekstraksiyon için taze hazırlanmış lizis tamponu ve taşıyıcı RNA karışımını hemen kullanın. Karışımın saklanması mümkün değildir.

i *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin dahili kontrolü izolasyon işleminde doğrudan kullanılabilir (bakınız aşağıda "Dahili kontrol").

Dahili kontrol

Bir dahili kontrol (HI Virus-1 RG IC) sağlanmıştır. Bu hem kullanıcının RNA izolasyon işlemini kontrol etmesine hem de olası PCR inhibisyonunu kontrol etmesine izin verir. Bu uygulama için dahili kontrolü 1 µl elüsyon hacmi başına 0,1 µl oranında izolasyona ekleyin. Örneğin QIAamp DSP Virüs Kiti kullanıldığında, RNA elüsyonu 60 µl Elüsyon Tamponu (AVE) içinde yapılır. Bu nedenle başlangıçta 6 µl dahili kontrol eklenmelidir.

i Dahili kontrol ve taşıyıcı RNA (bakınız “RNA izolasyonu”, sayfa 22) sadece lizis tamponu ve örnek materyali karışımına veya doğrudan lizis tamponuna eklenmelidir.

Dahili kontrol doğrudan örnek materyaline eklenmemelidir. Lizis tamponuna eklenirse, lütfen dahili kontrol ve lizis tamponu-taşıyıcı RNA karışımının taze olarak hazırlanıp hemen kullanılması gerektiğine dikkat edin (karışımın sadece birkaç saat bile oda sıcaklığı veya buzdolabında saklanması dahili kontrol başarısızlığı ve azalmış ekstraksiyon etkinliğine neden olabilir).

i Dahili kontrol ve taşıyıcı RNA'yı doğrudan örnek materyaline eklemeyin.

Dahili kontrol isteğe bağlı olarak sadece olası PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılabilir. Bu uygulama için dahili kontrolü protokolda adım 2b içinde tanımlandığı şekilde HI Virus-1 RG Master A ve HI Virus-1 RG Master B karışımına doğrudan ekleyin (sayfa 26).

PCR analizi için eşik ayarlama

Rotor-Gene Q aleti ve *artus* RG PCR Kitinin belirli bir kombinasyonu için optimum eşik ayarları her ayrı kombinasyonu deneysel olarak test etme yoluyla belirlenmelidir çünkü genel diagnostik iş akışına bağlı relatif bir değerdir. Başlangıç noktası olarak eşik ilk PCR çalışmasının analizi için 0,04 şeklinde bir ön değere ayarlanabilir ama bu değer iş akışında sonraki çalışmaların karşılaştırmalı analiziyle ince bir şekilde ayarlanmalıdır. Eşik manuel olarak negatif kontrollerin ve negatif örneklerin arka plan sinyalinin hemen üzerinde ayarlanmalıdır. Bu deneylerden hesaplanan ortalama eşik değeri muhtemelen gelecekteki çalışmaların çoğunluğuyla çalışacaktır ama kullanıcı yine de oluşturulan eşik değerini düzenli aralıklarla gözden geçirmelidir. Eşik değeri genellikle 0,03–0,05 aralığında olacaktır ve virgülden sonra en fazla üç rakam olacak şekilde yuvarlanmalıdır.

Kantitasyon

Ekteki kantitasyon standartları (HI Virus-1 RG QS 1–4) önceden saflaştırılmış örnekler gibi muamele görür ve aynı hacim (20 µl) kullanılır. Rotor-Gene Q Aletleri üzerinde bir standart eğri oluşturmak için 4 kantitasyon standardının hepsi kullanılmalı ve “Edit Samples” (Örnekleri Düzenle) diyalog kutusunda belirtilen konsantrasyonlarda standartlar olarak tanımlanmalıdır (alet kullanıcı el kitabına bakınız).

① Kantitasyon standartları IU/μl olarak tanımlanır.* Aşağıdaki denklemin, standart eğri kullanılarak belirlenen değerleri örnek materyalinden IU/ml değerine dönüştürmek için uygulanması gerekir.

$$\text{Sonuç (IU/ml)} = \frac{\text{Sonuç (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Elüsyon Hacmi (}\mu\text{l)}}{\text{Örnek Hacmi (ml)}}$$

Prensip olarak yukarıdaki denkleme başlangıç örnek hacmi girilmelidir. Örnek hacmi nükleik asit ekstraksiyonu öncesinde değiştirildiğinde bunun dikkate alınması gerekir (örn. hacmin santrifügasyonla azaltılması veya izolasyon için gerekli hacme ekleme yapılarak hacmin artırılması).

Dönüştürme faktörü

1 IU/ml, Rotor-Gene Q üzerinde QIAamp DSP Virüs Kiti kullanılarak manuel örnek hazırlama ile kombinasyon halinde HIV-1 RNA saptanması için 0,50 kopya/ml değerine karşılık gelir. Dönüştürme faktörü analizin dinamik aralığı boyunca ortalama bir faktör temelinde yaklaşık bir değerdir.

* Standart, Uluslararası HIV standardı (DSÖ) kullanılarak kalibre edilmiştir.

Protokol: PCR ve Veri Analizi

i Başlamadan önce önemli noktalar

- İşleme başlamadan önce "Önemli Notlar" kısmı, sayfa 20–23 okuyun.
- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q aletine aşına hale gelmek için zaman ayırın. Alet kullanıcı el kitabına bakın.
- En az bir kantitasyon standardı ve bir negatif kontrolün (Su, PCR sınıfı) her PCR çalışmasına eklendiğinden emin olun. Standart bir eğri oluşturmak için her PCR çalışmasında sağlanan 4 kantitasyon standardının (HI Virus-1 RG QS 1–4) hepsini kullanın.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Soğutma bloğunun (Rotor-Gene Q Aletinin aksesuarı) 2–8°C'ye önceden soğutulduğundan emin olun.
- Her kullanımdan önce tüm reaktiflerin tamamen çözülmesi, karıştırılması (tekrarlanan yukarı - aşağı pipetleme veya hızlı vorteksleme ile) ve kısa süre santrifüje edilmesi gerekir.

İşlem

- 1. İstenen sayıda PCR tüpünü soğutma bloğunun adaptörlerine yerleştirin.**
- 2. Dahili kontrolü RNA izolasyon işlemini izlemek ve olası PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2a'yı izleyin. Dahili kontrolü sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2b'yi izleyin.**
- 2a. Dahili kontrol izolasyona zaten eklenmiştir (bakınız "Dahili kontrol", sayfa 22). Bu durumda Tablo 6 uyarınca bir master karışımı hazırlayın.**

Reaksiyon karışımı tipik olarak örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

Tablo 6. Master karışımın hazırlanması (dahili kontrol RNA izolasyonunu izlemek ve PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)

Örnek sayısı	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
Toplam hacim	30 µl	360 µl

2b. Dahili kontrol HI Virus-1 Master A ve HI Virus-1 Master B karışımına doğrudan eklenmelidir. Bu durumda Tablo 7 uyarınca bir master karışımı hazırlayın.

Reaksiyon karışımı tipik olarak örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

Tablo 7. Master karışımın hazırlanması (dahili kontrol sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)

Örnek sayısı	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
Toplam hacim	32 µl*	384 µl*

* Dahili kontrolü eklemenin neden olduğu hacim artışı, PCR analizi hazırlanırken dikkate alınmaz. Saptama sisteminin hassasiyeti etkilenmez.

3. Her PCR tüpüne ana karışımdan 30 µl pipetleyin. Sonra elüsyon yapılmış örnek RNA'sından 20 µl ekleyin (bakınız Tablo 8). Buna karşılık olarak kantitasyon standartlarının (HI Virus-1 RG QS 1–4) en az birinden 20 µl pozitif kontrol olarak ve 20 µl su (Su, PCR sınıfı) negatif kontrol olarak kullanılmalıdır.

Tablo 8. PCR analizini hazırlama

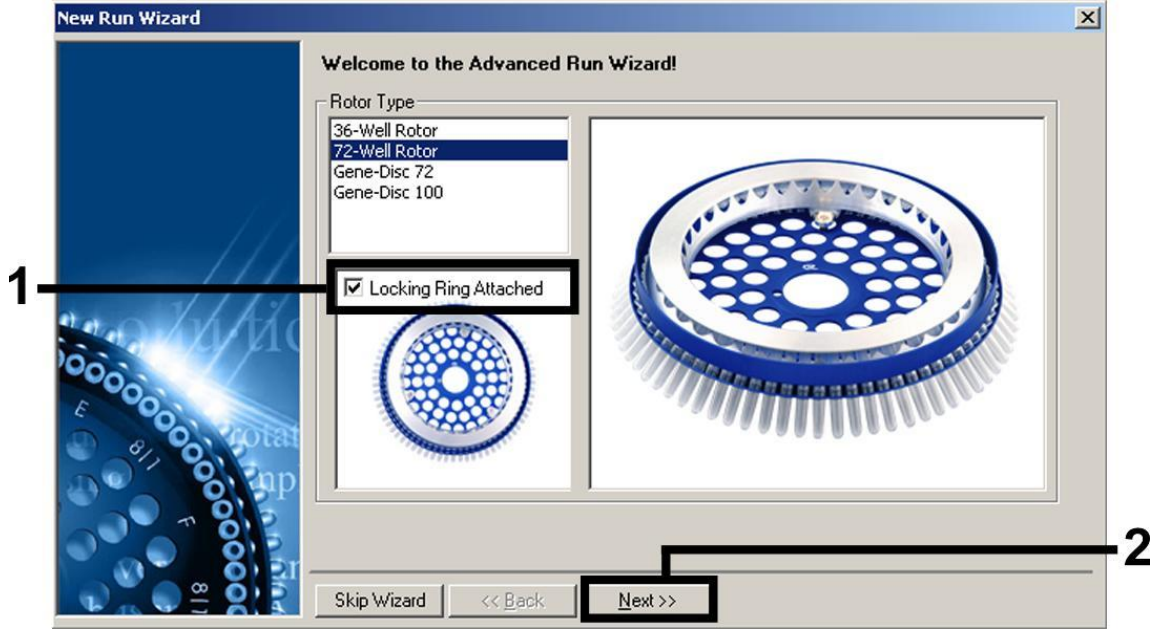
Örnek sayısı	1	12
Master karışım hacmi	30 µl	her birinden 30 µl
Örnek	20 µl	her birinden 20 µl
Toplam hacim	50 µl	her birinden 50 µl

- 4. PCR tüplerini kapatın. Tüplerin çalışma sırasında yanlışlıkla açılmasını önlemek üzere Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Aleti aksesuarı) rotorun en üstüne yerleştirildiğinden emin olun.**
- 5. HIV-1 RNA saptamak için aşağıdaki adımlara göre bir sıcaklık profili oluşturun.**

Genel analiz parametrelerini kurma	Şekil 5, 6, 7
RNA revers transkripsiyonu	Şekil 8
Hot-start enziminin başlangıç aktivasyonu	Şekil 9
cDNA amplifikasyonu	Şekil 10
Floresans kanalı hassasiyetini ayarlama	Şekil 11
Çalışmayı başlatma	Şekil 12

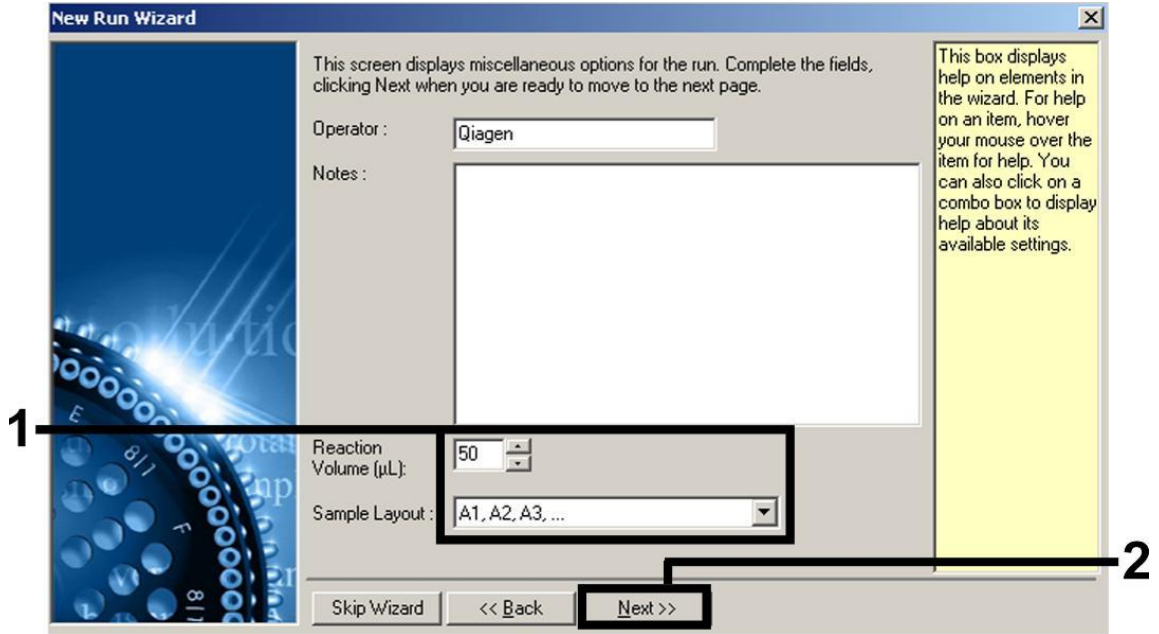
Tüm spesifikasyonlar Rotor-Gene Q yazılım versiyonu 1.7.94, RotorGene 6000 yazılım versiyonları 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 ve RotorGene 3000 yazılım versiyonu 6.0.23 ile ilişkilidir. Rotor-Gene Aletlerini programlamak ile ilgili ek bilgiyi alet kullanıcı el kitabında bulabilirsiniz. Şekillerde bu ayarlar kalın siyah çerçeveyle gösterilmiştir. Rotor-Gene Q Aletleri için şekiller dahil edilmiştir. Rotor-Gene 3000 için farklı değerler gerektiğinde bu farklar metin içinde tanımlanmıştır.

6. Önce “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) diyalog kutusunu açın (Şekil 5). “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Tutturulmuş) kutusunu seçin ve “Next” (Sonraki) kısmına tıklayın.



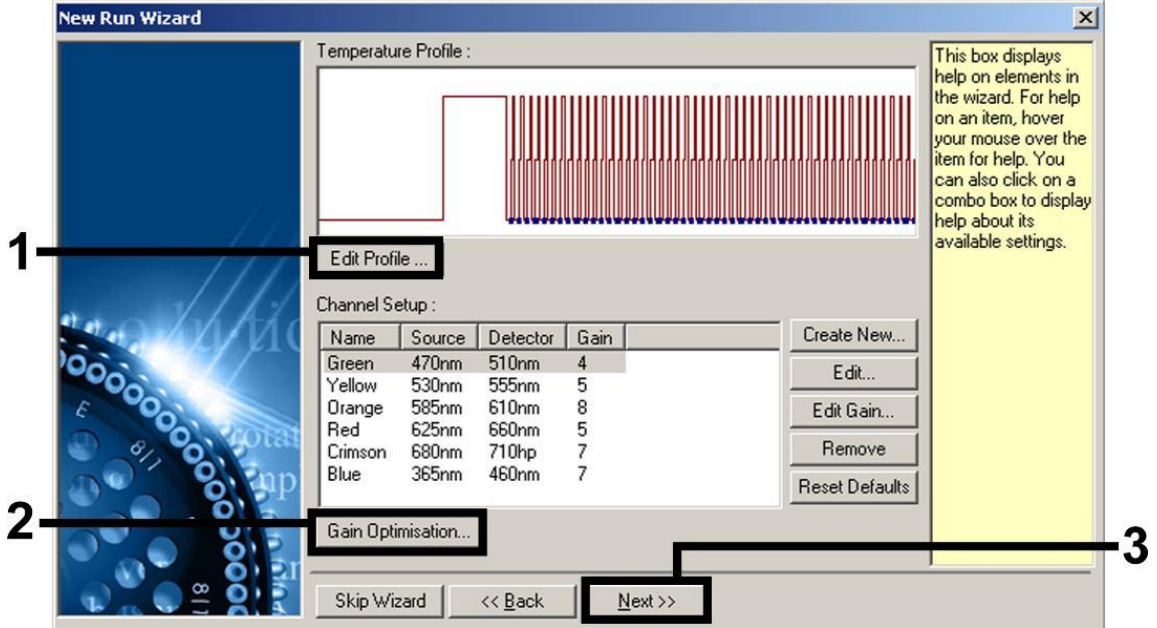
Şekil 5. “New Run Wizard” diyalog kutusu.

7. PCR reaksiyon hacmi için 50 seçin ve “Next” kısmına tıklayın (Şekil 6).

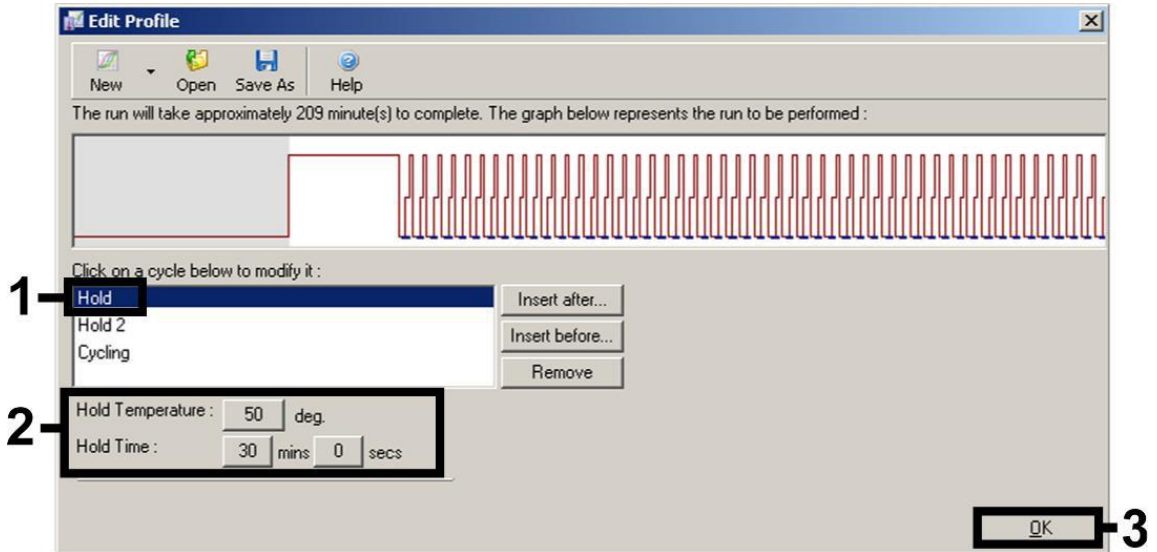


Şekil 6. Genel analiz parametrelerini kurma.

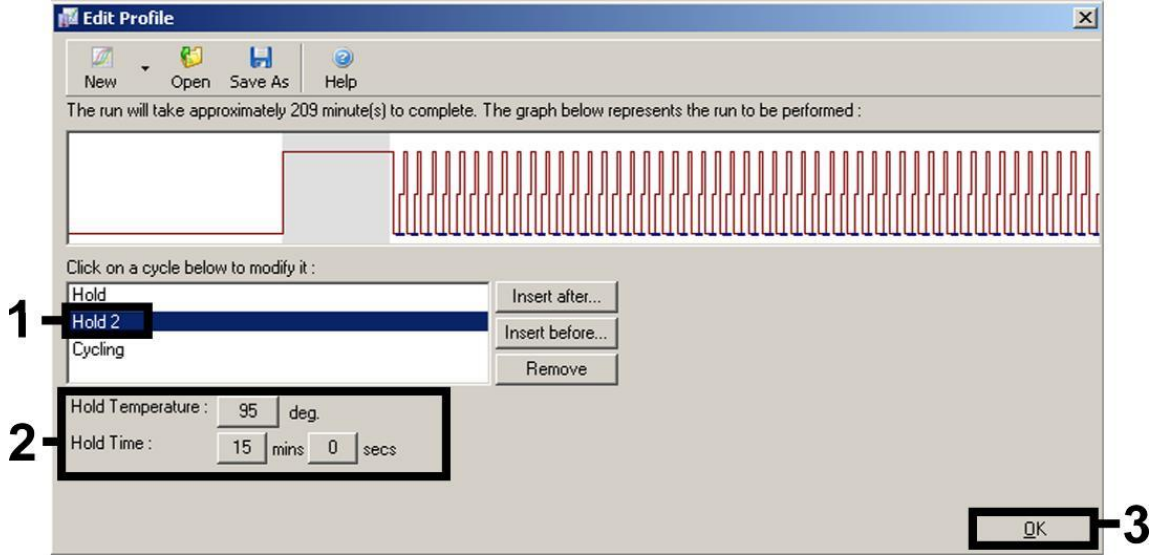
8. Sonraki "New Run Wizard" diyalog kutusunda "Edit Profil" (Profil Düzenle) düğmesine tıklayın (Şekil 7) ve sıcaklık profilini Şekil 7-10'da gösterildiği gibi programlayın.



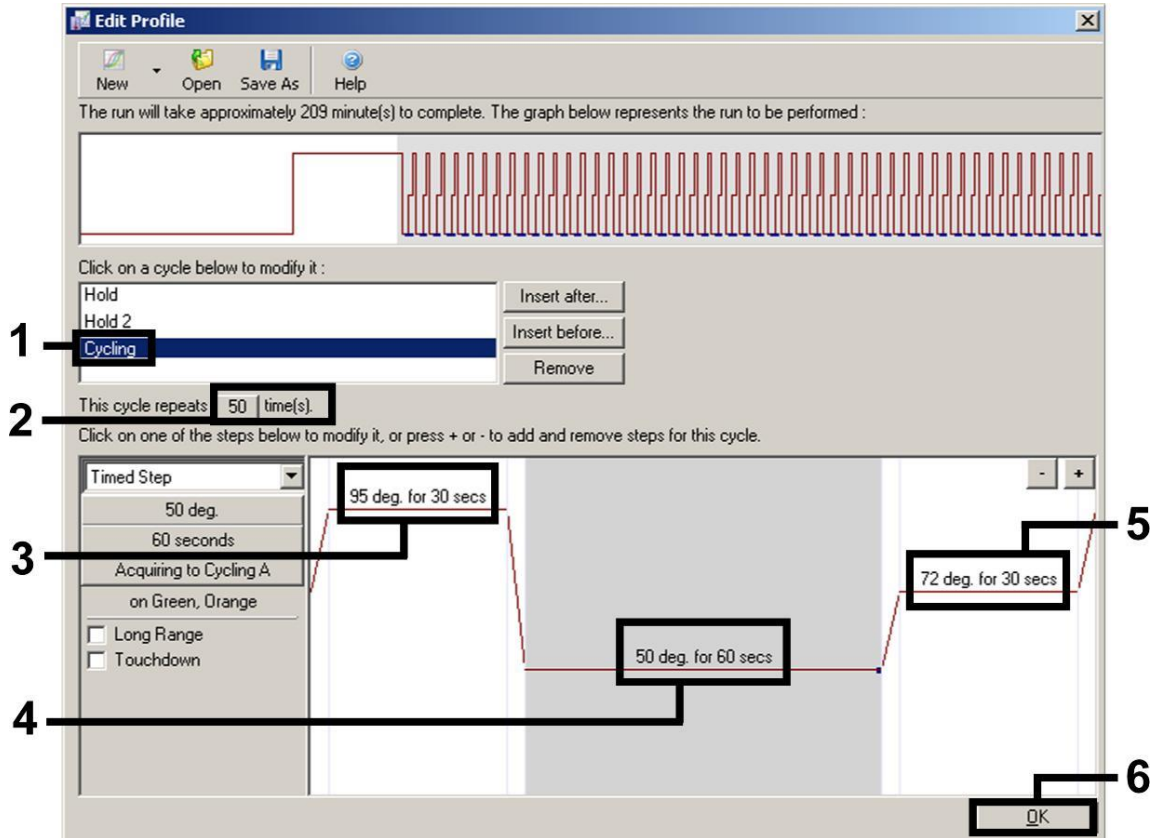
Şekil 7. Profili düzenleme.



Şekil 8. RNA revers transkripsiyonu.

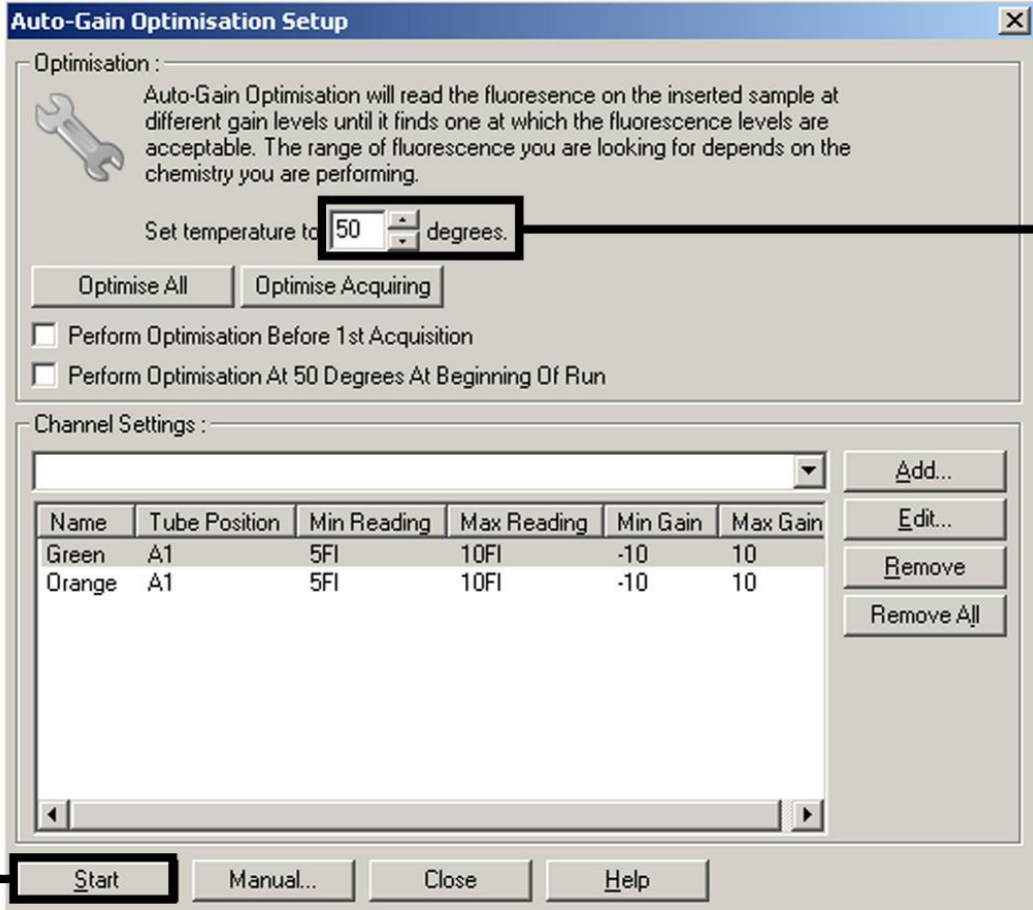


Şekil 9. Hot-start enziminin başlangıç aktivasyonu.



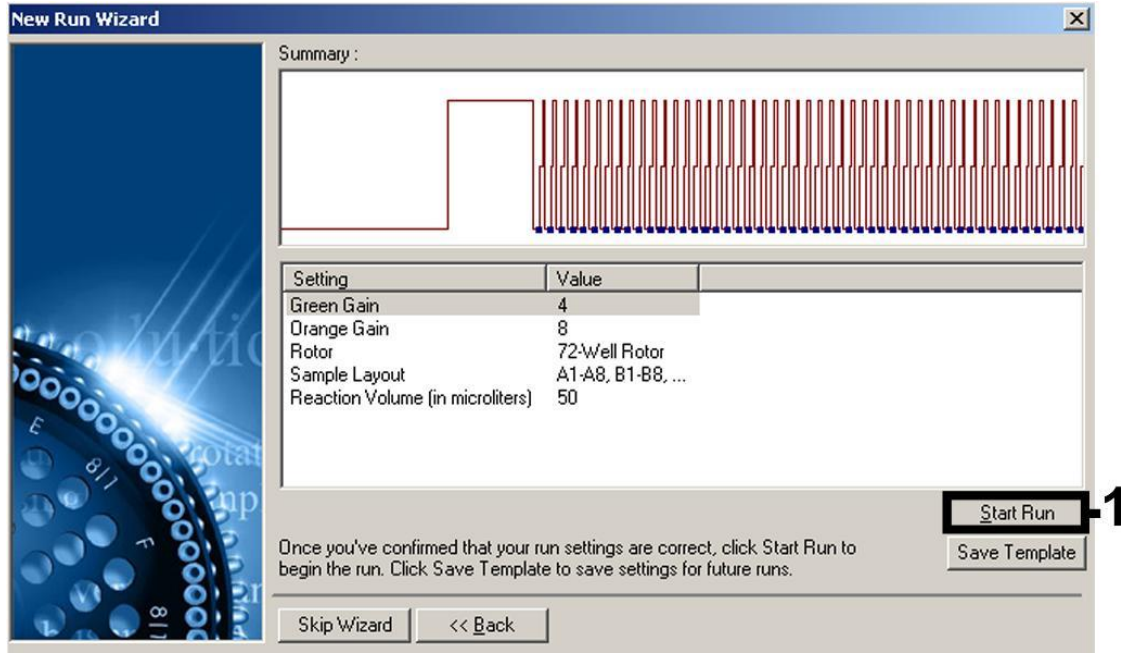
Şekil 10. cDNA amplifikasyonu. Rotor-Gene 3000 üzerinde yazılımın floresans boyalarını "FAM/Sybr, ROX" olarak tanımlayacağına dikkat edin.

9. Floresans kanalları için saptama aralığının PCR tüplerindeki floresans şiddetlerine göre belirlenmesi gerekir. "Auto-Gain Optimisation Setup" (Otomatik Kazanç Optimizasyon Kurulumu) diyalog kutusunu açmak için "New Run Wizard" diyalog kutusunda "Gain Optimisation" (Kazanç Optimizasyonu) kısmına tıklayın (bakınız Şekil 7). Kalibrasyon sıcaklığını, amplifikasyon programının birleştirme sıcaklığıyla eşleştirmek için 50 olarak ayarlayın (Şekil 11).



Şekil 11. Floresans kanalı hassasiyetini ayarlama. Rotor-Gene 3000 üzerinde yazılımın floresans boyalarını "FAM/Sybr" ve "ROX" olarak tanımlayacağına dikkat edin.

10. Kanal kalibrasyonu tarafından belirlenen kazanç değerleri otomatik olarak kaydedilir ve programlama işleminin son menü penceresinde liste halinde verilir (Şekil 12). “Start Run” (Çalışmayı Başlat) kısmına tıklayın.



Şekil 12. Çalışmayı başlatma. Rotor-Gene 3000 üzerinde yazılımın floresans boyalarını “FAM/Sybr” ve “ROX” olarak tanımlayacağına dikkat edin.

11. . Aşağıdaki sonuçlar (11a, 11b ve 11c) mümkündür.

Pozitif ve negatif PCR reaksiyonları örnekleri Şekil 13 ve Şekil 14'te verilmiştir.

Tablo 9 kantitatif sonuçların yorumlanması için kılavuz ilkeleri göstermektedir.

11a.Cycling Green floresans kanalında sinyal saptandı.

Analiz sonucu pozitifdir: örnek HIV-1 RNA içermektedir.

Bu durumda Cycling Orange kanalında sinyal saptanması dikkate alınmayabilir çünkü başlangıçta yüksek HIV-1 RNA konsantrasyonları (Cycling Green kanalında pozitif sinyal) Cycling Orange kanalında dahili kontrolün azalmış veya eksik floresans sinyaline yol açabilir (rekabet).



Rotor-Gene 3000 üzerinde ilgili kanalların pozitif sinyal için Cycling A.FAM ve dahili kontrol için Cycling A.ROX olduğuna dikkat edin.

11b.Cycling Green floresans kanalında sinyal saptanmadı. Aynı zamanda Cycling Orange kanalında dahili kontrolden bir sinyal mevcut.

Bu örnekte HIV-1 RNA saptanamaz.Negatif kabul edilebilir.

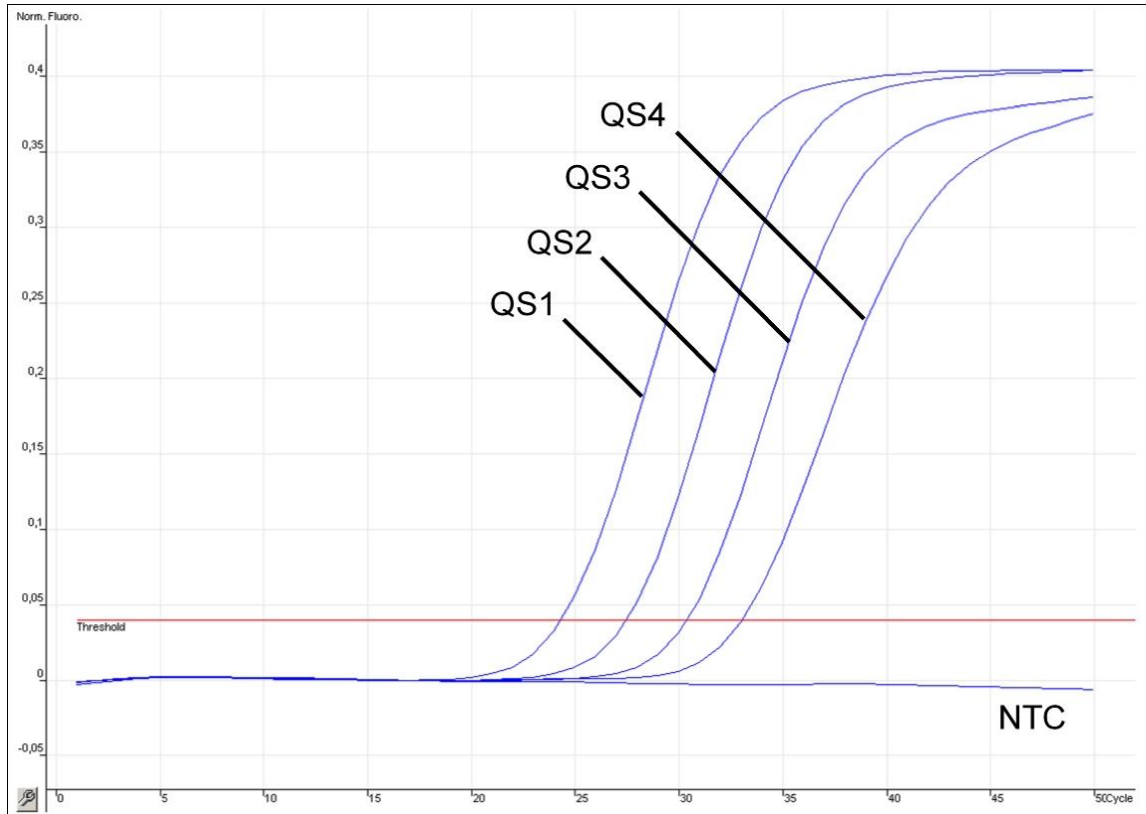
Negatif HI Virus-1 RT-PCR durumunda dahili kontrolün saptanan sinyali RT-PCR inhibisyonu olasılığını ortadan kaldırır.

i Rotor-Gene 3000 üzerinde ilgili kanalların dahili kontrol için Cycling A.ROX olduğuna ve Cycling A.FAM için sinyal bulunmaması olduğuna dikkat edin.

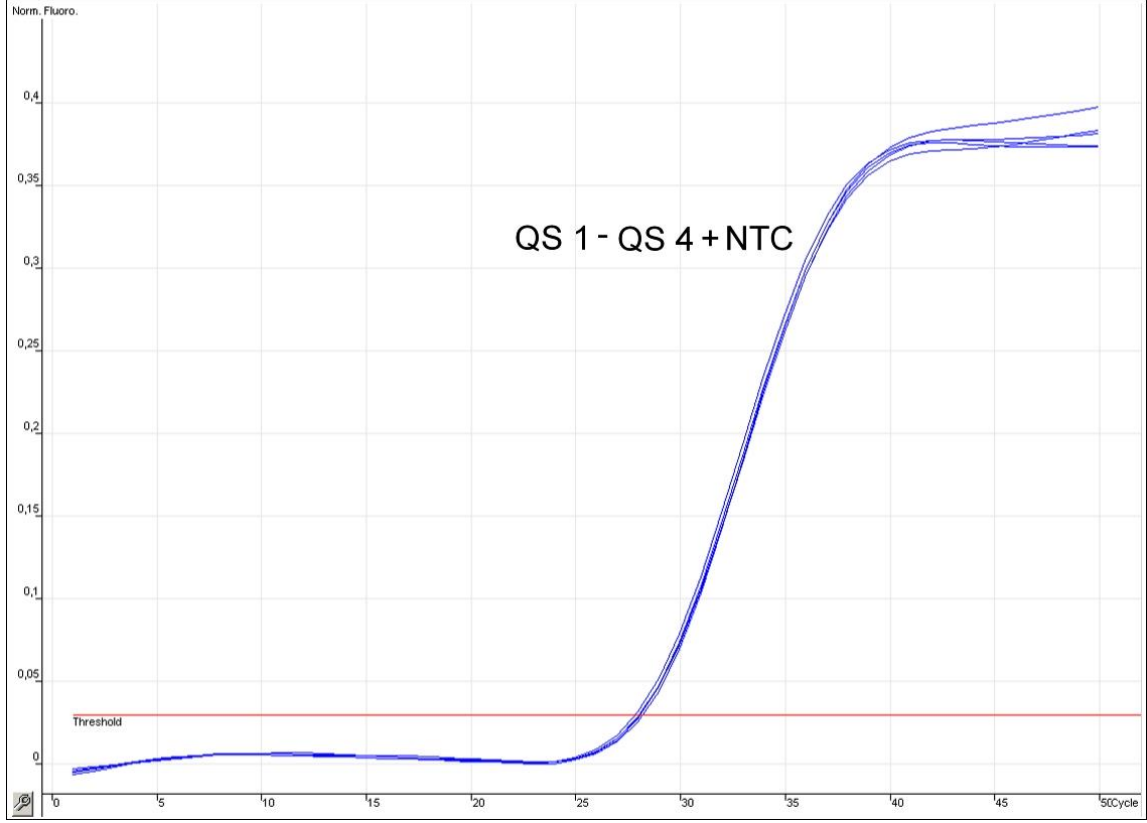
11c.Cycling Green veya Cycling Orange kanallarında sinyal saptanmadı. Bir sonuca varılamaz.

Hata kaynakları ve çözümü hakkında bilgi "**Sorun Giderme Kılavuzu**", sayfa 35 içinde bulunabilir.

i Rotor-Gene 3000 üzerinde ilgili kanalların Cycling A.FAM ve Cycling A.ROX olduğuna dikkat edin.



Şekil 13. Floresans kanalı Cycling Green içinde kantitasyon standartlarının (HI Virus-1 RG QS 1-4) saptanması. NTC: Şablon kontrolü (negatif kontrol) yok.



Şekil 14. Floresans kanalı Cycling Orange içinde dahili kontrol (IC) saptanması ve aynı zamanda kantitasyon standartlarının (HI Virus-1 RG QS 1–4) amplifikasyonu. NTC: Şablon kontrolü (negatif kontrol) yok.

Tablo 9. Kantitatif sonuçların yorumlanması

Sonuç	Yorumlama
HIV RNA >72 IU/ml	Sonuç belirlenen test aralığı dahilindedir. HIV RNA saptama olasılığı >%95'tir. Pozitif test sonucu istatistiksel olarak garanti edilmiştir.
HIV RNA <72 IU/ml	Sonuç belirlenen test aralığının dışındadır. Pozitif sonucun tekrar üretilebilirliği garanti değildir.
HIV RNA negatif	HIV RNA saptanmadı.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu çıkabilecek herhangi bir problemi çözmekte faydalı olabilir. Daha fazla bilgi için Teknik Destek Merkezimizde Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakınız: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgi ve protokollerle ya da örnek ve analiz teknolojileriyle ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplandırmaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgileri için arka kapağa bakınız veya www.qiagen.com adresini ziyaret ediniz).






Açıklama ve öneriler

Floresans kanalı Cycling Green veya Cycling A.FAM içinde pozitif kontrollerle (HI Virus-1 RG QS 1–4) sinyal olmaması

- a) PCR veri analizi için seçilen floresans kanalı protokole uymamaktadır ❗ Veri analizi açısından analitik HI Virus-1 RT-PCR için floresans kanalı Cycling Green veya Cycling A.FAM seçin ve dahili kontrol RT-PCR için floresans kanalı Cycling Orange veya Cycling A.ROX seçin.
- b) Rotor-Gene Aletinin sıcaklık profilinin hatalı programlanması ❗ Sıcaklık profilini protokolle karşılaştırın. Bakınız “Protokol: PCR ve Veri Analizi”, sayfa 25.
- c) Hatalı PCR konfigürasyonu ❗ Çalışma adımlarınızı pipetleme şeması yoluyla kontrol edin ve gerekirse PCR işlemini tekrarlayın. Bakınız “Protokol: PCR ve Veri Analizi”, sayfa 25.
- d) Bir veya birkaç kit bileşeninin saklama koşulları “Saklama” (sayfa 7) içinde verilen talimatla uyumlu değildir. ❗ Reaktiflerin saklama koşulları ve son kullanma tarihini (kit etiketine bakınız) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.
- e) *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin son kullanma tarihi geçmiştir ❗ Reaktiflerin saklama koşulları ve son kullanma tarihini (kit etiketine bakınız) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.

Açıklama ve öneriler

Cycling Orange veya Cycling A.ROX floresans kanalında dahili kontrol sinyali zayıf veya yok ve aynı anda Cycling Green veya Cycling A.FAM kanalında sinyal yok

- a) PCR koşulları protokole uymamaktadır  PCR koşullarını kontrol edin (yukarıya bakınız) ve gerekirse PCR'ı düzeltilmiş ayarlarla tekrarlayın.
- b) PCR inhibe olmuştur  Önerilen izolasyon yöntemini kullandığınızdan emin olun ve üreticinin talimatını yakından izleyin.
- c) Ekstraksiyon sırasında RNA kaybolmuştur  Dahili kontrol eğer ekstraksiyona eklendiyse dahili kontrol sinyalinin olmaması ekstraksiyon sırasında RNA kaybına işaret edebilir. Önerilen izolasyon yöntemini (bakınız"RNA izolasyonu", sayfa 22) kullandığınızdan emin olun ve üreticinin talimatını yakından izleyin.
- d) Bir veya birkaç kit bileşeninin saklama koşulları "Saklama" (sayfa 7) içinde verilen talimatla uyumlu değildir.  Reaktiflerin saklama koşulları ve son kullanma tarihini (kit etiketine bakınız) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.
- e) *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kitinin son kullanma tarihi geçmiştir  Reaktiflerin saklama koşulları ve son kullanma tarihini (kit etiketine bakınız) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.

Açıklama ve öneriler

Analitik PCR'da floresans kanalı Cycling Green veya Cycling A.FAM içinde negatif kontrollü sinyaller

- a) PCR hazırlama sırasında kontaminasyon oluşmuştur
- ① PCR'ı replikatlarda yeni reaktiflerle tekrarlayın.
 - ① Mümkünse PCR tüplerini test edilecek örneğin eklenmesinden hemen sonra kapatın.
 - ① Pozitif kontrolleri en son pipetlediğinizden emin olun.
 - ① Çalışma alanı ve aletlerin düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.
- b) Ekstraksiyon sırasında kontaminasyon oluşması
- ① Test edilecek örneğin ekstraksiyonu ve PCR'ını yeni reaktifler kullanarak tekrarlayın.
 - ① Çalışma alanı ve aletlerin düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.

Referanslar

QIAGEN, QIAGEN ürünlerini kullanan bilimsel yayınların büyük ve güncel bir çevrim içi veri tabanını tutmaktadır. Kapsamlı araştırma seçenekleri gereksinim duyduğunuz makaleleri basit bir anahtar kelime arama veya uygulama, araştırma alanı, başlık, vs. belirterek bulmanızı mümkün kılar.

Eksiksiz bir referans listesi için www.qiagen.com/RefDB/search.asp adresindeki çevrim içi QIAGEN Referans Veri Tabanını ziyaret edin veya QIAGEN Teknik Servis ya da yerel distribütörünüzle irtibat kurun.

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: 2 Master, 4 Kantitasyon Standardı, Dahili Kontrol, Su (PCR sınıfı)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	96 reaksiyon için: 2 Master, 4 Kantitasyon Standardı, Dahili Kontrol, Su (PCR sınıfı)	4513265
QIAamp DSP Virus Kit — in vitro diagnostik amaçlarla insan plazmasından viral nükleik asitlerin saflaştırılması için		
QIAamp DSP Virus Kit	50 işlem için: QIAamp MinElute® Çevirme Kolonları, Tamponlar, Reaktifler, Tüpler, Sütun Uzaticıları ve VacConnector'lar	60704
Rotor-Gene Q MDx — klinik uygulamalarda in vitro diagnostik olarak doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9002033

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002042
Rotor-Gene Q — gerçek zamanlı PCR'de olağanüstü performans için		
Rotor-Gene Q 5plex Sistemi	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9001650

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) gerçek zamanlı PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9001590
Rotor-Gene Q aksesuarları		
Yükleme Bloğu 72 x 0,1 ml Tüp	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Yükleme Bloğu 96 x 0,2 ml Tüp	96 x 0,2 ml tüp kullanılarak standart 8 x 12 diziyle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 reaksiyon için 1000 ince duvarlı tüp	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	1000 reaksiyon için 10 x 1000 ince duvarlı tüp	981008

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kit el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servis veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu ürünün satın alınması, satın alanın insan in vitro diagnostiği için diagnostik hizmetler yapılmasında kullanmasına izin verir. Burada satın alma ile bu spesifik kullanım hakkı dışında herhangi bir türde herhangi bir genel patent veya başka lisans verilmemektedir.

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

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti ve QIAamp DSP Virüs Kiti Avrupa İn Vitro Diagnostik Direktifi 98/79/EC uyarınca CE işaretli diagnostik kitledir. Tüm ülkelerde sağlanmamaktadır.

Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanılması artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kitini herhangi bir satın alanın veya kullanıcısının şu şartları kabul ettiğini belirtir:

- 1 artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti sadece artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti El Kitabı uyarınca kullanılabilir ve sadece Kit içindeki bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kiti El Kitabında ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokollerde tanımlananlar dışında bu Kite dahil edilmemiş herhangi bir bileşen ile Kitin içindeki bileşenleri kullanma veya birleştirme açısından herhangi bir fikri mülkiyet altında bir lisans vermez.
- 2 Açık olarak belirtilen lisanslar dışında QIAGEN bu Kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediği konusunda garanti vermez.
- 3 Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
- 4 QIAGEN açık olarak belirtilenler dışında açık veya zımni herhangi bir başka lisansı özellikle reddeder.
- 5 Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir mahkemede yürürlüğe koyabilir ve Kit ve/veya bileşenleriyle ilişkili herhangi bir fikri mülkiyet hakkı veya bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini yürürlüğe koymak için tüm araştırma ve mahkeme masraflarını avukat masrafları dahil olmak üzere geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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)

