

Príručka pre súpravu *artus*[®] HBV RG PCR Kit

 24 (katalógové č. 4506263)

 96 (katalógové č. 4506265)

Verzia 1

IVD

Kvantitatívna in vitro diagnostika

Na použitie s nástrojmi Rotor-Gene[®] Q Instruments

CE
0197

REF 4506263, 4506265

HB 1046920SK



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMECKO

R4 **MAT** 1046920SK



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je popredným poskytovateľom inovatívnych technológií vzoriek a testov, ktoré umožňujú izoláciu a detekciu obsahu akejkoľvek biologickej vzorky. Naše moderné, vysoko kvalitné produkty a služby zabezpečujú úspech od vzorky po výsledok.

QIAGEN stanovuje normy v:


- Purifikácii DNA, RNA a proteínov
- Testoch nukleových kyselín a proteínov
- Výskume mikroRNA a RNAi
- Automatizácii technológií vzoriek a testov

Naším poslaním je umožniť vám dosiahnuť vynikajúci úspech a prielomy. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Obsah súpravy | 4 |
| Symboly | 4 |
| Skladovanie | 5 |
| Účel použitia | 5 |
| Obmedzenia používania produktu | 5 |
| Varovania a preventívne opatrenia | 6 |
| Kontrola kvality | 6 |
| Úvod | 7 |
| Princíp | 7 |
| Informácie o patogéne | 7 |
| Charakteristiky účinnosti | 8 |
| Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ | 16 |
| Dôležité poznámky | 17 |
| Všeobecné bezpečnostné opatrenia | 17 |
| Odber, skladovanie a preprava vzoriek | 17 |
| Izolovanie DNA | 18 |
| Interný kontrolný roztok | 19 |
| Nastavenie prahu pre analýzu PCR | 20 |
| Kvantifikácia | 20 |
| Protokol: PCR analýza údajov | 21 |
| Spríevodca riešením problémov | 30 |
| Referenčná literatúra | 33 |
| Informácie o objednávaní | 34 |

Obsah súpravy

| artus HBV RG PCR Kit | | (24) | (96) |
|-----------------------------|---|---|----------------|
| Katalógové č | | 4506263 | 4506265 |
| Počet reakcií | | 24 | 96 |
| Modrá | HBV RG/TM Master | 2 x 12 reakcie | 8 x 12 reakcie |
| Červená | HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 ⁵ IU/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Červená | HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 ⁴ IU/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Červená | HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 ³ IU/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Červená | HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 ² IU/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Červená | HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 ¹ IU/μl) | QS 200 μl | 200 μl |
| Zelená | HBV RG/TM IC [†] | IC 1000 μl | 2 x 1000 μl |
| Biela | Voda (stupeň PCR) | 1000 μl | 1000 μl |
| | Príručka |  1 | 1 |

* Kvantitatívny štandard.

† Interný kontrolný roztok.

Symbols



<N>

Obsahuje reagentie postačujúce pre <N> testov



Použite do



Zdravotnícke diagnostické zariadenie na použitie v podmienkach in vitro



Katalógové číslo










Číslo šarže



Číslo materiálu



Komponenty

| | |
|---|---|
|  | Obsahuje |
|  | Číslo |
|  | Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number) |
|  | Teplotné obmedzenia |
|  | Výrobca |
|  | Prečítajte si návod na použitie |
|  | Dôležitá poznámka |

Skladovanie

Komponenty súpravy *artus* HBV RG PCR Kit by sa mali skladovať pri teplote -15 °C až -30 °C a sú stabilné do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku. Nemalo by dôjsť k opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu (> 2 x), pretože tým sa môže znížiť senzitivita testu. Ak sa reagentie nepoužívajú nepretržite, mali by sa zmraziť v alikvótach. Skladovanie pri teplote 2 – 8 °C by nemalo byť dlhšie ako 5 hodín.

Účel použitia

Súprava *artus* HBV RG PCR Kit je amplifikačný test nukleovej kyseliny používaný in vitro na kvantitatívne vyjadrenie DNA vírusu hepatitídy B (HBV) v ľudskej plazme. Táto súprava diagnostického testu využíva polymerázovú reťazovú reakcie (Polymerase Chain Reaction, PCR) a je nakonfigurovaná na použitie s nástrojmi Rotor-Gene Q Instruments.

Obmedzenia používania produktu

Všetky reagentie sa môžu použiť len pri diagnostike in vitro.

Tento výrobok používa personál, ktorý absolvoval špeciálne školenie ohľadom diagnostických postupov in vitro.

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov PCR je potrebné presne dodržiavať používateľskú príručku.

Pozornosť by sa mala venovať dátumu expirácie vytlačeným na škatuli a štítkoch všetkých komponentov. Nepoužívajte exspirované komponenty.

Aj keď je to zriedkavé, môže dôjsť v prípade mutácií vo vysoko zakonzervovaných častiach vírusového genómu, ktorý pokrývajú priméry súpravy a/alebo sonda k stanoveniu malého množstva alebo k zlyhaniu detegovania prítomnosti vírusu. Validita a účinnosť dizajnu testu sa v pravidelných intervaloch revidujú.

Varovania a preventívne opatrenia

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Ďalšie informácie nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ). Tieto materiály sú k dispozícii on-line v praktickom a kompaktnom formáte PDF na adrese www.qiagen.com/safety. Na tejto adrese môžete vyhľadať, zobrazit' a vytlačiť KBÚ pre každú súpravu QIAGEN® a jej súčasti.

Odpad vzoriek a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných predpisov.

Kontrola kvality

V súlade so certifikovaným systémom riadenia kvality QIAGEN ISO je každá šarža súpravy *artus* HBV RG PCR Kit testovaná na základe vopred určených špecifikácií, aby bola zaistená konzistentná kvalita produktu.

Úvod

Súprava *artus* HBV RG PCR Kit sa skladá zo systému pripraveného na použitie na detegovanie HBV DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na nástrojoch Rotor-Gene Q Instruments. HBV RG/TM Master obsahuje reagenty a enzýmy na špecifickú amplifikáciu regiónu 134 bp genómu HBV a na priamu detekciu špecifického amplikónu vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green nástroja Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 alebo Cycling A.FAM™ nástroja Rotor-Gene 3000.

Okrem toho obsahuje súprava *artus* HBV RG PCR Kit druhý heterológny amplifikačný systém na identifikovanie možnej inhibície PCR. Tá sa deteguje ako interný kontrolný roztok (IKR) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow nástroja Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene 6000 alebo A.JOE™ nástroja Rotor-Gene 3000. Detekčný limit analytickej HBV PCR (pozri „Analytická senzitivita“, strana 8) sa nezníži. Dodávajú sa externé pozitívne kontrolné roztoky (HBV RG/TM QS 1–5), ktoré umožňujú zistenie množstva vírusovej DNA. Ďalšie informácie nájdete v časti „Kvantifikácia“, strana 20.

Princíp

Detekcia patogénov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je založená na amplifikácii špecifických regiónov genómu patogénu. Pri real-time PCR sa amplifikovaný produkt deteguje prostredníctvom fluorescenčných farbív. Tie sú zvyčajne spojené so sondami oligonukleotidov, ktoré sa špecificky viažu na amplifikovaný produkt. Monitorovanie intenzity fluorescence počas PCR cyklu (t. j. v reálnom čase) umožňuje detekciu a vyčíslenie akumulujúceho sa produktu bez nutnosti opätovného otvorenia reakčných skúmaviek po PCR cykle.*

Informácie o patogéne

Vírus hepatitída B (HBV) sa prenáša hlavne krvou alebo krvnými produktmi. Tiež je ale možné nakazenie sa sexuálne, orálne a perinatálne prenášanou infekciou. Po všeobecnej nevoľnosti, vrátane straty chuti do jedla, zvracania a brušných ťažkostí sa u približne 10 – 20 % pacientov vyskytne horúčka, exantém (vyrážky na pokožke), ako aj reumatoidné problémy a problémy so svalmi. Po ďalších 2 – 14 dňoch sa rozvinie žltáčka, ktorú môže sprevádzať svrbenie. Náhla hepatitída sa vyskytne u približne 1 % všetkých infikovaných pacientov a je často fatálna. 5 – 10 % pacientov s hepatitídou B trpí chronickým zápalom pečene, ktorý môže prejsť do cirhózy pečene alebo primárneho hepatocelulárneho karcinómu.

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

Charakteristiky účinnosti

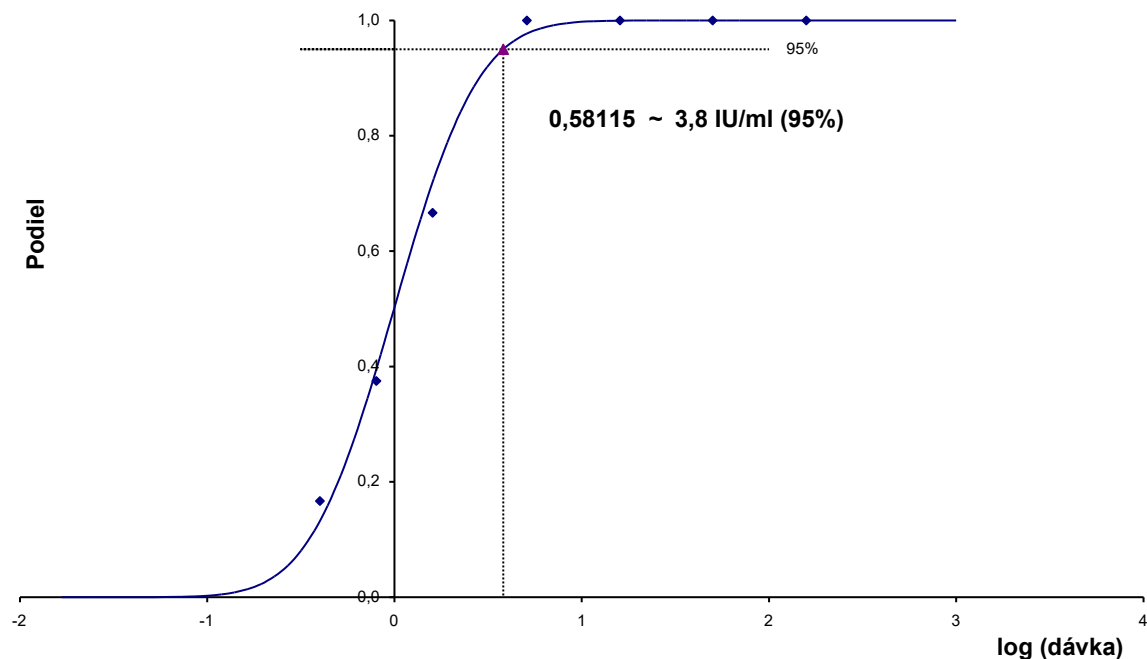
Analytická senzitivita

Pre súpravu *artus* HBV RG PCR Kit. sa vyhodnotil analytický detekčný limit, ako aj analytický detekčný limit vzhľadom na purifikáciu (limity senzitivity). Analytický detekčný limit vzhľadom na purifikáciu sa určí pomocou klinických vzoriek pozitívnych na HBV v kombinácii s konkrétnou metódou extrakcie. Na rozdiel od toho sa analytický detekčný limit určí bez klinických vzoriek a nezávisle od vybranej metódy extrakcie pomocou štandardu so známou koncentráciou.

Na určenie analytickej senzitivity súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa vytvorila séria riedení 10 do nominálneho množstva 0,0003 HBV IU/ μ l, ktorá sa analyzovala pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments. Testovanie sa uskutočnilo počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Analytický detekčný limit súpravy *artus* HBV RG PCR Kit v kombinácii s nástrojom Rotor-Gene 3000 je 0,02 IU/ μ l ($p = 0,05$). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 0,02 IU/ μ l.

Ekvivalencia medzi nástrojom Rotor-Gene 3000 a Rotor-Gene Q/6000 sa zobrazila na základe technických špecifikácií potvrdených analytickým porovnaním účinnosti. Na oboch systémoch sa paralelne vykonali analýzy probit. Analytický detekčný limit na nástroji Rotor-Gene Q/6000 leží v rámci intervalu spoľahlivosti nástroja Rotor-Gene 3000. Preto sa môže súprava *artus* HBV RG PCR Kit použiť na detekciu HBV DNA na nástroji Rotor-Gene Q/6000 s podobnou senzitivitou.

Analytická senzitivita s ohľadom na purifikáciu (QIAamp® DSP Virus Kit) súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa určila pomocou série riedení 1. medzinárodnej normy HBV (WHO) zo 158 na nominálnu hodnotu 0,4 HBV IU/ml, ktorá sa pridala do klinických vzoriek plazmy. Tie boli vystavené extrakcii DNA pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit (extračný objem: 0,5 ml, elučný objem: 26 μ l). Každé zo 7 riedení sa analyzovalo pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit počas 3 rôznych dní na 8 kópiách. Výsledky sa určili pomocou probit analýzy. Grafické zobrazenie probit analýzy nájdete na obrázku 1. Analytický detekčný limit s ohľadom na purifikáciu súpravy *artus* HBV RG PCR Kit v kombinácii s nástrojmi Rotor-Gene 3000 je 3,8 IU/ml ($p = 0,05$). To znamená, že existuje pravdepodobnosť 95 %, že dôjde k detekcii 3,8 IU/ml.



Obrázok 1. Probit analýza: HBV (Rotor-Gene 3000). Analytická senzitivita vzhľadom na purifikáciu (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) súpravy *artus* HBV RG PCR Kit na nástroji the Rotor-Gene 3000.

Špecificita

Špecificita súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa zabezpečí predovšetkým výberom primérov a sond, ako aj výberom prísnych podmienok reakcie. U primérov a sond sa skontrolovali prípadné homológie pre všetky sekvencie uvedené v génovej banke pomocou sekvenčnej porovnávacej analýzy. Detekovateľnosť všetkých relevantných genotypov bola preto zaistená pomocou zoradenia databázy a cyklu PCR na nástrojoch Rotor-Gene Instruments s týmito genotypmi (pozri Tabuľka 1).

Tabuľka 1. Testovanie špecificity relevantných genotypov

| Vírus | Genotyp | Zdroj | HBV (Cycling Green alebo A.FAM) | Interný kontrolný roztok (Cycling Yellow alebo A.JOE) |
|-------|------------------------|------------|---|---|
| HBV | A (USA) | Teragenix* | + | + |
| HBV | B (Indonézia) | Teragenix | + | + |
| HBV | C (Indonézia) | Teragenix | + | + |
| HBV | C (Venezuela) | Teragenix | + | + |
| HBV | D (USA) | Teragenix | + | + |
| HBV | E (Pobrežie Slonoviny) | Teragenix | + | + |
| HBV | F (Venezuela) | Teragenix | + | + |
| HBV | G (USA) | Teragenix | + | + |
| HBV | H (Nikaragua) | Teragenix | + | + |

* Teragenix Corporation, Florida, USA.

Na ďalšie testovanie špecificity sa použili kmene HBV so známymi sekvenčnými rozdielmi v pre-core regióne genómu HBV (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Florida, USA). Všetkých 9 zmutovaných kmeňov pre-core tohto panela bolo možné detegovať pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit.

Okrem toho sa špecificita overila pomocou 100 rôznych HBV negatívnych vzoriek plazmy. Nedošlo u nich k vygenerovaniu žiadnych signálov s primérmami a sondami špecifickými pre HBV, ktoré sú zahrnuté v HBV RG/TM Master.

Potenciálna krížová -reaktivita súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa testovala pomocou kontrolnej skupiny uvedenej v Tabuľka 2 (strana 11). Žiadny z testovaných patogénov nebol reaktívny. U zmiešaných infekcií sa neobjavili žiadne krížové reaktivity.

Lineárny rozsah

Lineárny rozsah (analytické meranie) súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa určil analyzovaním série riedení kvantitatívneho štandardu HBV s rozsahom 1×10^8 IU/ μ l až 1×10^{-2} IU/ μ l. Série riedení sa kalibrovali podľa 1. medzinárodnej normy WHO pre HBV DNA.

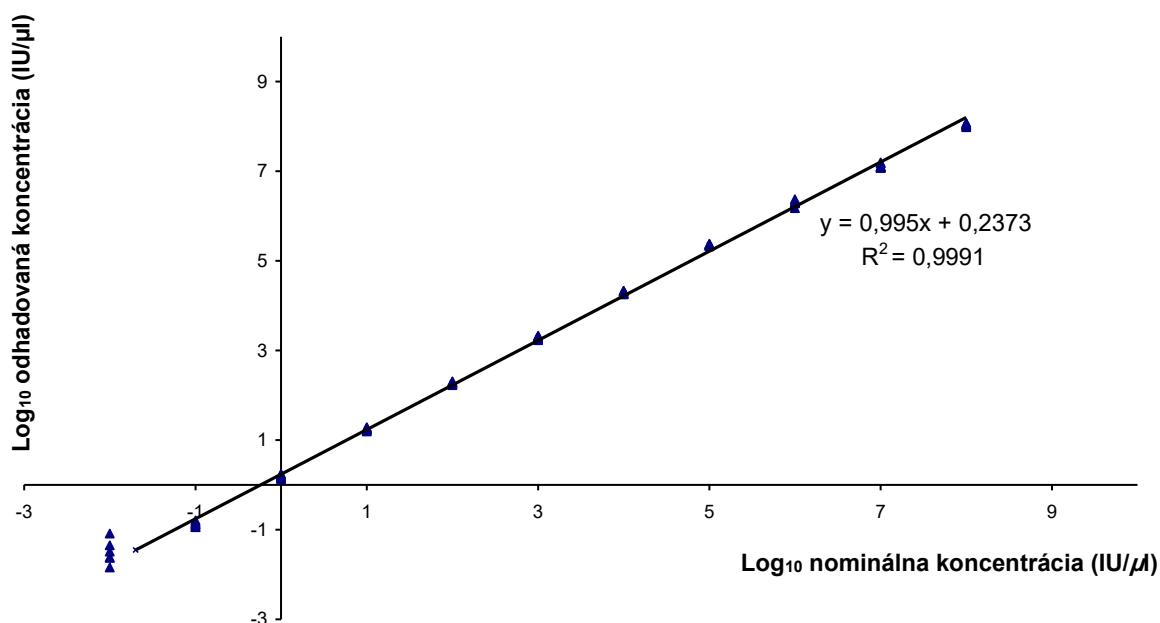
Každé riedenie sa testovalo v kópiách ($n = 8$ pre koncentrácie $\geq 1 \times 10^0$ IU/ μ l; $n = 16$ pre koncentrácie $< 1 \times 10^0$ IU/ μ l) pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments.

Tabuľka 2. Testovanie špecificity súpravy s potenciálne krížovo reaktívnymi patogénmi

| Kontrolná skupina | HBV (Cycling Green alebo Cycling A.FAM) | Interný kontrolný roztok (Cycling Yellow alebo Cycling A.JOE) |
|--|--|--|
| Ľudský herpetický vírus 1 (vírus herpes simplex 1) | – | + |
| Ľudský herpetický vírus 2 (vírus herpes simplex 2) | – | + |
| Ľudský herpetický vírus 3 (vírus varicella-zoster) | – | + |
| Ľudský herpetický vírus 4 (vírus Eppstein-Barrovej) | – | + |
| Ľudský herpetický vírus 5 (cytomegalovírus) | – | + |
| Ľudský herpetický vírus 6 | – | + |
| Vírus ľudskej imunodeficiencie 1 | – | + |
| Vírus hepatitídy A | – | + |
| Vírus hepatitídy C | – | + |
| Parvovírus B19 | – | + |
| Vírus žltej zimnice | – | + |
| Lymfotropný vírus T-buniek ľudí typu 1 a typu 2 | – | + |
| Vírus Coxsackie B3 | – | + |
| Vírus Dengue 1 – 4 | – | + |
| <i>Escherichia coli</i> | – | + |

Lineárny rozsah súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa určil tak, aby pokryl koncentrácie od 0,02 IU/ μ l do minimálne 1 x 10⁸ IU/ μ l (obrázok 2).

Za predpokladu, že súprava QIAamp DSP Virus Kit sa používa na extrakciu DNA, pokryje súprava *artus* HBV RG PCR Kit lineárny rozsah od 1,1 IU/ml do minimálne 4 x 10⁹ IU/ml.



Obrázok 2. Lineárny rozsah súpravy *artus* HBV RG PCR Kit. Výpočet lineárneho rozsah. Rovná priamka sa určila pomocou lineárnej regresie koncentrácií vypočítaných pomocou logaritmu \log_{10} s nominálnymi koncentraciami \log_{10} . Rovnica regresnej priamky je zobrazená na obrázku.

Presnosť

Údaje o presnosti súpravy *artus* HBV RG PCR Kit na nástrojoch Rotor-Gene Instruments umožňujú určenie celkový rozptyl testu. Celkový rozptyl sa skladá z rozptylu v rámci testu (rozptyl niekoľkých výsledkov vzoriek s rovnakou koncentráciou v rámci jedného experimentu), rozptylu medzi testami (rozptyl viacerých výsledkov testu, ktoré vygenerovali rôzni operátori v jednom laboratóriu na rôznych nástrojoch rovnakého typu) a rozptylu medzi dávkami (rozptyl viacerých výsledkov testu pomocou rôznych dávok). Získané údaje sa použili na určenie štandardnej odchýlky, rozptylu a koeficientu rozptylu pre konkrétny patogén a interný kontrolný roztok PCR.

Údaje o presnosti súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa zozbierali pomocou kvantitatívnej normy najnižšej koncentrácie (QS 5; 10 IU/μl). Testovanie sa uskutočnilo s 8 kópiami. Údaje o presnosti sa vypočítali na základe hodnôt C_T amplifikačných kriviek (C_T : prahový cyklus, pozri Tabuľka 3, strana 13). Okrem toho sa údaje o presnosti pre kvantitatívne výsledky v IU/μl určili pomocou príslušných hodnôt C_T (Tabuľka 4). Na základe týchto výsledkov je celkové štatistické rozšírenie danej vzorky s uvedenou koncentráciou na zistenie interného kontrolného roztoku 1,29 % (C_T) alebo 8,99 % (koncentrácia) a 1,87 % (C_T). Tieto hodnoty sú založené na súhrne všetkých jednotlivých hodnôt stanovených rozptylov.

Tabuľka 3. Údaje o presnosti na základe hodnôt C_T

| | Štandardná odchýlka | Rozptyl | Koeficient rozptylu (%) |
|--|------------------------|---------|----------------------------|
| Rozptyl v rámci testu: HBV RG/TM QS 5 | 0,09 | 0,01 | 0,32 |
| Rozptyl v rámci testu: Interný kontrolný roztok | 0,10 | 0,01 | 1,06 |
| Rozptyl medzi testami: HBV RG/TM QS 5 | 0,14 | 0,02 | 0,49 |
| Rozptyl medzi testami: Interný kontrolný roztok | 0,29 | 0,08 | 1,00 |
| Rozptyl medzi dávkami: HBV RG/TM QS 5 | 0,38 | 0,15 | 1,39 |
| Rozptyl medzi dávkami: Interný kontrolný roztok | 0,62 | 0,39 | 2,23 |
| Celkový rozptyl: HBV RG/TM QS 5 | 0,36 | 0,13 | 1,29 |
| Celkový rozptyl: Interný kontrolný roztok | 0,52 | 0,27 | 1,87 |

Tabuľka 4. Údaje o presnosti na základe kvantitatívnych výsledkov (v IU/μl)

| | Štandardná odchýlka | Rozptyl | Koeficient rozptylu (%) |
|--|------------------------|---------|----------------------------|
| Rozptyl v rámci testu: HBV RG/TM QS 5 | 0,93 | 0,87 | 9,28 |
| Rozptyl medzi testami: HBV RG/TM QS 5 | 0,79 | 0,63 | 7,92 |
| Rozptyl medzi dávkami: HBV RG/TM QS 5 | 1,03 | 1,05 | 10,21 |
| Celkový rozptyl: HBV RG/TM QS 5 | 0,90 | 0,81 | 8,99 |

Robustnosť

Overenie robustnosti umožňuje stanovenie celkovej miery zlyhania súpravy *artus* HBV RG PCR Kit. Na overenie robustnosti sa do 100 negatívnych HCV vzoriek plazmy sa pridalo 0,05 IU/ μ l objemu eluátu DNA kontrolného roztoku HBV (približne trojnásobná koncentrácia analytickej hranice senzitivity). Po extrakcii pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 18) sa tieto vzorky analyzovali pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit. Pre všetky HBV vzorky bola miera zlyhania 0 %. Okrem toho sa pomocou purifikácie a analýzy 100 negatívnych HBV vzoriek plazmy vyhodnotila masívnosť interného kontrolného roztoku. Celková miera zlyhania bola 0 %. Inhibície neboli spozorované. Robustnosť súpravy *artus* HBV RG PCR Kit je ≥ 99 %.

Reprodukovateľnosť

Údaje o reprodukovateľnosti umožňujú pravidelné zhodnotenie účinnosti súpravy *artus* HBV RG PCR Kit, ako aj porovnanie efektívnosti s ostatnými výrobkami. Tieto údaje boli získané počas účasti v uznávaných odborných programoch.

Diagnostické vyhodnotenie

V štúdií v 2 nezávislých laboratóriách sa súprava *artus* HBV RG PCR Kit porovnala s testom COBAS® TaqMan® HBV Assay. Na tento účel sa otestovalo 287 retrospektívnych a prospektívnych vzoriek plazmy.

HBV DNA na testovanie súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit izolovala RNA HCV a na nástroji Rotor-Gene 3000 Instrument sa uskutočnila analýza. Na komparatívne testovanie pomocou testu COBAS TaqMan HBV Assay sa podľa pokynov výrobcu uvedených na príbalovom letáku vykonala izolácia DNA HBV. Výsledky získané pomocou súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa porovnali s výsledkami testu COBAS TaqMan HBV Assay.

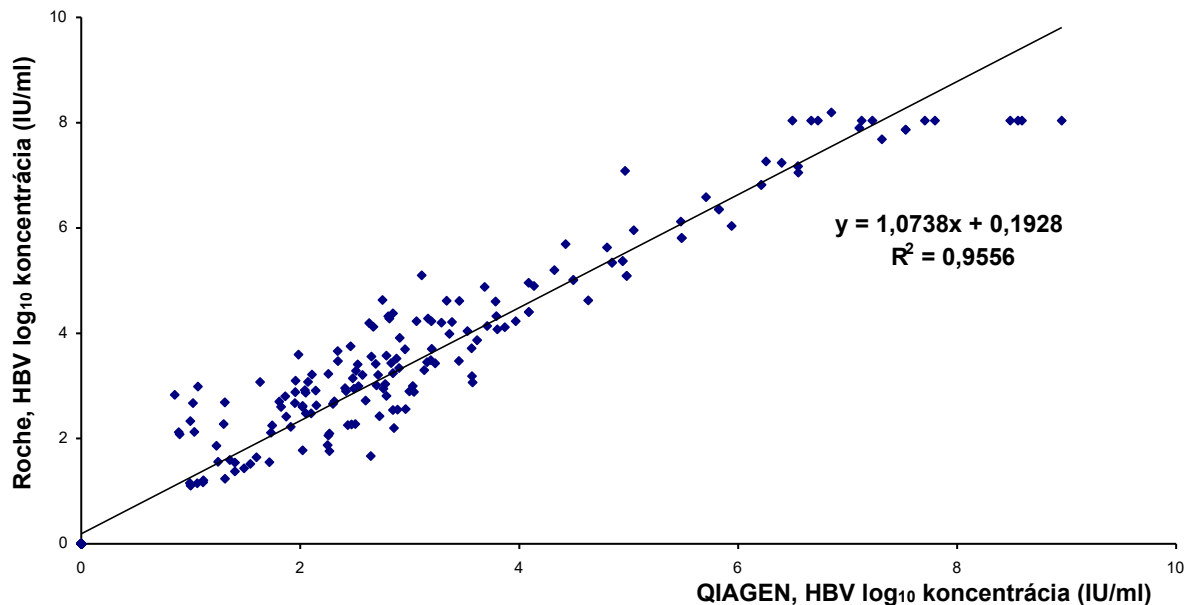
V porovnaní s výsledkami odobratými pomocou testu COBAS TaqMan HBV Assay ako referenčného testu sa určila diagnostická senzitivita súpravy *artus* HBV RG PCR Kit na úrovni 100 % a diagnostická špecificita dosiahla 97 % u všetkých vzoriek plazmy. Výsledky sú uvedené v Tabuľka 5.

Tabuľka 5. Výsledky komparatívnej validačnej štúdie

| | | COBAS TaqMan HBV Assay | | |
|--------------------------------|---|------------------------|----|--------|
| | | + | - | Celkom |
| <i>artus</i> HBV RG PCR Kit | + | 186 | 3 | 189 |
| | - | 0 | 98 | 98 |

Ďalšie testovanie 3 nezhodných vzoriek potvrdilo výsledky súpravy *artus* HBV RG PCR Kit. Preto je možné predpokladať, že diskrepancia je založená na vyššej senzitivite súpravy *artus* HBV RG PCR Kit.

Korelácia kvantitatívnych výsledkov z obidvoch testovacích systémov sa analyzovala pomocou lineárnej regresie. Výsledky obidvoch súprav sú zobrazené v porovnaní na obrázku 3.



Obrázok 3. Porovnanie testu COBAS TaqMan HBV Assay (Roche, HBV; s purifikáciou vzorky pomocou systému High Pure) so súpravou *artus* HBV RG PCR Kit (QIAGEN, HBV; s purifikáciou vzorky pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit). Korelácia kvantitatívnych výsledkov z obidvoch testovacích systémov (Tabuľka 5) sa analyzovala pomocou lineárnej regresie. Výsledky z obidvoch súprav sú zobrazené v grafe XY (rozptyl) s loglog mierkou.

Zariadenie a reagensie, ktoré dodá používateľ

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete na príslušných kartách bezpečnostných údajov (KBÚ), ktoré sú k dispozícii u dodávateľa produktov.

- Súprava na izoláciu DNA (pozri „Izolovanie DNA“, strana 18)
- Pipety (nastaviteľné)*
- Sterilné špičky pipiet s filtrami
- Vírivý mixér*
- Stolná centrifúga* s rotorom na reakčné skúmavky s objemom 2 ml
- Nástroj Rotor-Gene Q alebo Rotor-Gene Instrument* s fluorescenčnými kanálmi pre farbivá Cycling Green a Cycling Yellow alebo s fluorescenčnými kanálmi pre farbivo Cycling A.FAM a Cycling A.JOE
- Verzia softvéru 1.7.94 alebo vyššia (verzia softvéru 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 nástroja Rotor-Gene 6000; verzia softvéru 6.0.23 nástroja Rotor-Gene 3000) nástroja Rotor-Gene Q
- Skúmavky a uzávery Strip Tubes and Caps, 0.1 ml na použitie s rotorom 72-well rotor (kat. č. 981103 alebo 981106)
- Prípadne: Skúmavky PCR Tubes, 0.2 ml na použitie s rotorom 36-well rotor (kat. č. 981005 alebo 981008)
- Chladiaci blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901 alebo Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, kat. č. 9018905)

* Zabezpečte, aby sa nástroje skontrolovali a nakalibrovali podľa odporúčaní výrobcu.


Dôležité poznámky


Všeobecné bezpečnostné opatrenia

Používateľ by mal vždy dodržiavať tieto kroky:

- Používajte sterilné špičky pipiet s filtrami.
- Pozitívne materiály (vzorky, pozitívne kontrolné roztoky a amplikóny) skladujte a extrahujte oddelene od všetkých ostatných reagensí a pridávajte ich do reakčnej zmesi v oddelenom priestore.
- Pred začatím testu všetky komponenty dôkladne rozmrazte na izbovú teplotu (15 – 25 °C).
- Po rozmrazení komponenty zmiešajte (opakovaným pipetovaním hore a dole alebo pulzným vírivým miešaním) a krátko vložte do centrifúgy.
- Pracujte rýchlo a komponenty držte na ľade alebo v chladiacom bloku (72/96-jamkový zavádzací blok).

Odber, skladovanie a preprava vzoriek

 So všetkými vzorkami je potrebné zaobchádzať ako s potenciálne infekčným materiálom.

 Súčasné štúdie hovoria o tom, že EDTA alebo citrátová plazma je najvhodnejším materiálom vzoriek na detekciu HBV. Preto odporúčame použiť so súpravou *artus* HBV RG PCR Kit tieto materiály.

Interná validácia súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa uskutočnila s využitím ľudských vzoriek EDTA plazmy. Ostatné materiály vzoriek nie sú validované. Pri príprave vzorky používajte len odporúčanú súpravu na izoláciu nukleovej kyseliny (pozri „Izolovanie DNA“, strana 18).

Pri použití určitých materiálov sa musia dodržiavať konkrétne pokyny týkajúce sa odberu, prepravy a skladovania.

Odber vzorky

Pri každom odbere krvi dochádza k poraneniu krvných ciev (artérie, žily, kapiláry). Mal by sa používať len neškodný a sterilný materiál. Na odber krvi sú k dispozícii vhodné jednorazové pomôcky. Na prepichnutie žíl by sa nemali používať kapilárne ihly, ktoré sú príliš jemné. Odber krvi zo žily by mal prebiehať na vhodných miestach ohybu lakťa, predlaktia alebo zadnej strany ruky. Krv je potrebné odobrať pomocou štandardných skúmaviek na odber vzoriek (červený uzáver, skúmavka Sarstedt alebo ekvivalentná skúmavka od iného výrobcu). Malo by sa odobrať 5 – 10 ml krvi EDTA. Skúmavky by sa mali premiešať nad hlavou priamo po odbere vzorky (8 x, netrepať).

ⓘ Vzorky od ľudí užívajúcich heparín sa nesmú používať (pozri „Interferujúce látky“, nižšie).

Skladovanie vzoriek

Plná krv by sa mala centrifugáciou trvajúcou 20 minút pri rýchlosti 800 – 1600 x g za 6 hodín oddeliť na plazmu a bunkové komponenty. Izolovaná plazma sa musí preniesť do sterilných polypropylénových skúmaviek. Senzitivita testu môže byť nižšia, ak vzorky bežne zmrazujete alebo ich na dlhší čas uskladníte. Opuzdrená vírusová DNA je stabilná niekoľko dní, ak sa skladuje pri teplote 4 °C, týždne, ak sa skladuje pri teplote -20 °C a dokonca mesiace až roky, ak sa skladujú pri teplote -70 °C.*

Preprava vzoriek

Materiál vzorky by sa mal v princípe prepravovať v nerozbitnej prepravnej nádobe. Tak je možné predísť potenciálnemu nebezpečenstvu nákazy v prípade úniku. Vzorky by sa mali prepravovať podľa miestnych a vnútroštátnych nariadení pre prepravu patogénneho materiálu.†

Vzorky by sa mali odoslať do 6 hodín. Neodporúčame skladovať vzorky na mieste odberu. Vzorky sa môžu poslať poštou podľa právnych nariadení pre prepravu patogénneho materiálu. Odporúčame poslať vzorky kuriérom. Vzorky krvi by sa mali odoslať chladené (2 – 8 °C) a oddelená plazma by mala byť hlboko zmrazená (-15 až -30 °C).

Interferujúce látky

Zvýšené hladiny bilirubínu (≤ 15 mg/dl) a lipidov (≤ 800 mg/dl) a hemolytické vzorky nemajú na systém žiadny vplyv. Heparín (≥ 10 mg/dl) ovplyvňuje PCR. Vzorky odobraté do skúmaviek, ktoré obsahujú heparín ako antikoagulant, by sa používať nemali. Takisto sa nesmú používať vzorky od pacientov, ktorým sa podáva heparín.

Izolovanie DNA

Súprava QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. č. 60704) sa validuje na purifikáciu vírusovej DNA z ľudskej plazmy na použitie so súpravou *artus* HBV RG PCR Kit. Purifikáciu vírusovej DNA vykonajte v súlade s pokynmi v príručke súpravy *QIAamp DSP Virus Kit*.

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

† International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations.

ⓘ Použitie nosnej RNA je dôležité pre efektívnosť extrakcie a následne pre získanú DNA/RNA. Na zvýšenie stability nosnej RNA získanej súpravou QIAamp DSP Virus Kit odporúčame postupovať podľa informácií o zriedení a skladovaní nosnej RNA, ktoré sú uvedené v návode („Príprava reagensí a pufov“).

ⓘ Interný kontrolný roztok súpravy *artus* HBV RG PCR Kit sa môže použiť priamo počas procesu izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“ nižšie). Zabezpečte spoločné spracovanie negatívnej vzorky plazmy počas purifikácie. Jej príslušný signál interného kontrolného roztoku slúži ako základ hodnotenia purifikácie.

Interný kontrolný roztok

Dodáva sa interný kontrolný roztok (HBV RG/TM IC). Tá umožňuje používateľovi regulovať proces izolácie DNA aj skontrolovať možnú inhibíciu PCR. Na toto použitie pridajte interný kontrolný roztok do izolácie v pomere 0,1 μ l na 1 μ l elučného objemu. Napríklad pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit sa DNA eluuje v 60 μ l pufru Elution Buffer (AVE). Preto by sa na začiatku malo pridať 6 μ l interného kontrolného roztoku. Množstvo použitého interného kontrolného roztoku závisí len od elučného objemu.

ⓘ Interný kontrolný roztok a nosná RNA (potri „Izolovanie DNA“, strana 18) by sa mali pridať len do zmesi pufru lýzy a materiálu vzorky alebo priamo do pufru lýzy.

Interný kontrolný roztok sa nesmie pridať priamo do materiálu vzorky. Po pridaní do pufru lýzy nezabudnite, že je potrebné pripraviť čerstvú zmes interného kontrolného roztoku a pufru nosnej RNA lýzy, ktorá sa musí okamžite použiť (skladovanie zmesi pri izbovej teplote alebo v mrazničke aj keď len na niekoľko hodín môže viesť ku chybe interného kontrolného roztoku a zníženej efektívnosti extrakcie).

ⓘ Nepridávajte interný kontrolný roztok a nosnú RNA priamo do materiálu vzorky.

Aby sa purifikácia mohla považovať za úspešnú, musí hodnota C_T interného kontrolného roztoku negatívnej vzorky plazmy, ktoré sa spracovala počas purifikácie (súprava QIAamp DSP Virus Kit) dosiahnuť $C_T = 29 \pm 3$ (prah: 0,03) pomocou nástrojov Rotor-Gene Q Instruments. Uvedené šírenie je založené na rozptyle nástroja a purifikácie. Vyššia odchýlka naznačuje problém s purifikáciou. V tomto prípade sa musí purifikácia skontrolovať a v prípade potreby validovať druhýkrát. Ak máte ďalšie otázky alebo sa stretnete s problémami, kontaktujte technickú podporu spoločnosti QIAGEN.

Interný kontrolný roztok sa môže voliteľne použiť výhradne na kontrolu možnej inhibície PCR. V rámci tejto aplikácie pridajte interný kontrolný roztok priamo do zmesi HBV RG/TM Master podľa popisu v krok 2b protokolu (strana 22).

Nastavenie prahu pre analýzu PCR

Optimálne nastavenie prahu pre danú kombináciu nástroja Rotor-Gene Q a súpravy *artus* RG PCR Kit by sa malo určiť empiricky testovaním každej jednej kombinácie, pretože toto je relatívna hodnota, ktorá závisí od celkového priebehu diagnostiky. Ako začiatkový bod sa môže prah nastaviť na predbežnej hodnote 0,04 pre analýzu prvého cyklu PCR, ale táto hodnota by sa mala doladiť pomocou komparatívnej analýzy v ďalších cykloch pracovného toku. Práh by sa mal nastaviť manuálne len mierne nad základnou úrovňou signálu negatívnych kontrolných roztokov a negatívnych vzoriek. Hodnota stredného prahu vypočítaná z týchto experimentov bude pravdepodobne platiť pre väčšinu cyklov v budúcnosti, ale používateľ by mal napriek tomu v pravidelných intervaloch posudzovať vygenerovanú prahovú hodnotu. Práhová hodnota bude zvyčajne v rozsahu 0,03 – 0,05 a nemala by sa zaokrúhľovať na viac ako tri desatinné miesta.

Kvantifikácia

Priložené kvantitatívne štandardy (HBV RG/TM QS 1–5) sa považujú za predtým purifikované vzorky a použije sa rovnaký objem vzorky (20 μ l). Na vygenerovanie štandardnej krivky na nástrojoch Rotor-Gene Q Instruments by sa mali použiť všetky 5 kvantitatívne štandardy, ktoré by sa mali definovať v dialógovom poli „Edit Samples“ (Upraviť vzorky) ako normy s konkrétnymi koncentráciami (pozri používateľskú príručku nástroja).

i Kvantitatívne štandardy sú definované ako IU/ μ l.* Táto rovnica sa musí použiť na premenu hodnôt stanovených pomocou štandardnej krivky do IU/ml materiálu vzorky:

$$\text{výsledok (IU/ml)} = \frac{\text{výsledok (IU/}\mu\text{l)} \times \text{elučný objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorky (ml)}}$$

Z princípu by sa mal pôvodný objem vzorky zadať do vyššie uvedenej rovnice. Toto je potrebné zvážiť, ak sa objem vzorky pred extrakciou nukleovej kyseliny zmenil (napr. zníženie objemu v centrifúge alebo zvýšenie objemu pridaním objemu potrebného na izolovanie).

* Štandard bol kalibrovaný pomocou 1. medzinárodnej normy HBV (WHO).

Protokol: PCR analýza údajov

i Dôležité body pred začatím činnosti

- Pred začatím procesu si prečítajte „Dôležité poznámky“, strany 17 – 20.
- Vyhradte si dostatok času a oboznámte sa s nástrojom Rotor-Gene Q pred začatím protokolu. Pozri používateľskú príručku nástroja .
- Uistite sa, že cyklus PCR zahŕňa aspoň jeden kvantitatívny štandard, ako aj jednu negatívny kontrolný roztok (voda, stupeň PCR). Na vygenerovanie štandardnej krivky použite všetkých 5 dodaných kvantitatívnych štandardov (HBV RG/TM QS 1–5) pre každý cyklus PCR.

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Uistite sa, že chladiaci blok (príslušenstvo nástroja Rotor-Gene Q Instrument) je vopred vychladený na 2 – 8 °C.
- Pred každým použitím sa musia všetky reagenty úplne rozmraziť, zmiešať (opakovaným pipetovaním nahor a nadol alebo rýchlym vortexovaním) a nakrátko centrifugovať.

Postup

1. Umiestnite želaný počet skúmaviek PCR do adaptérov chladiaceho bloku.
2. Ak používate interný kontrolný roztok na monitorovanie izolačného procesu DNA a na kontrolu možnej inhibície PCR, postupujte krokom 2a. Ak používate interný kontrolný roztok len na kontrolu inhibície PCR, postupujte krokom 2b.
- 2a. Interný kontrolný roztok už bola pridaný do izolácie (pozri „Interný kontrolný roztok“, strana 19). V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 6.

Tabuľka 6. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý na monitorovanie izolácie DNA a na kontrolu inhibície PCR)

| Počet vzoriek | 1 | 12 |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| HBV RG/TM Master | 30 μ l | 360 μ l |
| HBV RG/TM IC | 0 μ l | 0 μ l každá |
| Celkový objem | 30 μl | 360 μl každá |

2b. Interný kontrolný roztok sa musí pridať priamo do zmesi HBV RG/TM Master. V tomto prípade pripravte hlavnú zmes podľa Tabuľka 7.

Reakčná zmes zvyčajne obsahuje všetky komponenty potrebné na PCR okrem vzorky.

Tabuľka 7. Príprava hlavnej zmesi (interný kontrolný roztok použitý len na kontrolu inhibície PCR)

| Počet vzoriek | 1 | 12 |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| HBV RG/TM Master | 30 μ l | 360 μ l |
| HBV RG/TM IC | 2 μ l | 24 μ l |
| Celkový objem | 32 μl* | 384 μl* |

* Zväčšenie objemu spôsobené pridaním interného kontrolného roztoku sa pri príprave PCR testu zanedbá. Senzitivita detekčného systému sa tým nezníži.

3. Napipetujte 30 μ l hlavnej zmesi do každej PCR skúmavky. Potom pridajte 20 μ l eluovanej DNA vzorky (pozri Tabuľka 8). Zodpovedajúco sa musí použiť 20 μ l z aspoň jedného kvantitatívneho štandardu (HBV RG/TM QS 1–5) ako pozitívny kontrolný roztok a 20 μ l vody (voda, stupeň PCR) ako negatívny kontrolný roztok.

Tabuľka 8. Príprava PCR testu

| Počet vzoriek | 1 | 12 |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Hlavná zmes | 30 μ l | 30 μ l každá |
| Vzorka | 20 μ l | 20 μ l každá |
| Celkový objem | 50 μl | 50 μl každá |

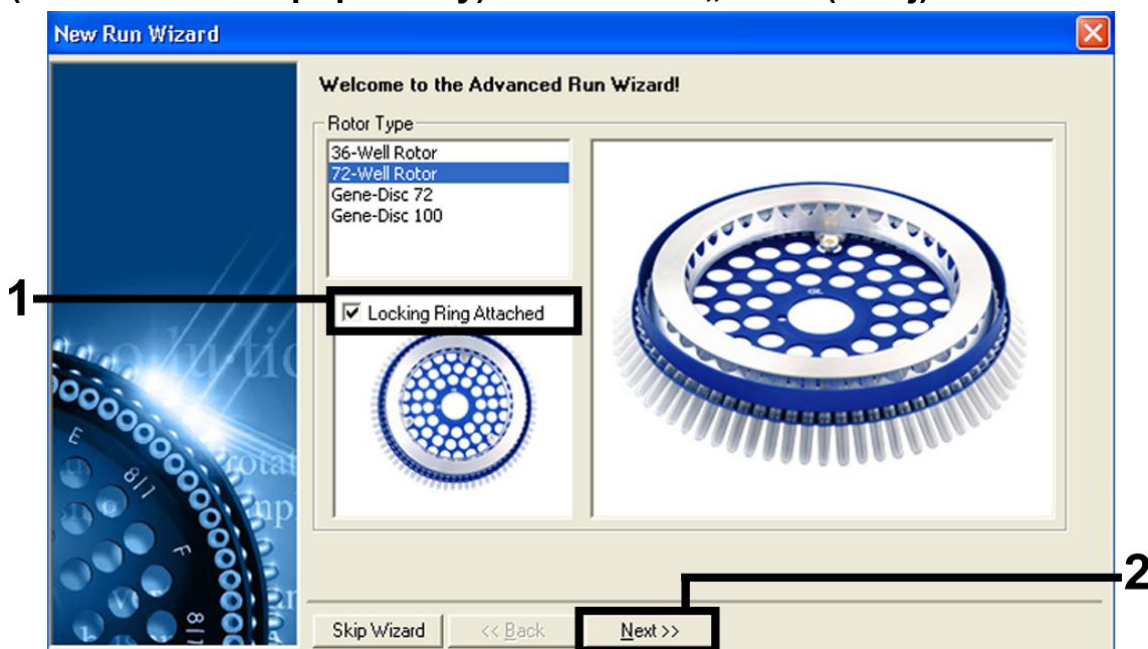
4. Zatvorte PCR skúmavky. Uistite sa, že poistný krúžok (príslušenstvo nástroja Rotor-Gene) je umiestnený na vrchu rotora, aby sa zabránilo náhodnému otvoreniu skúmaviek počas cyklu.

5. Na detekciu DNA HBV vytvorte teplotný profil podľa nasledujúcich krokov.

| | |
|--|-----------------|
| Nastavenie všeobecných parametrov testu | Obrázky 4, 5, 6 |
| Prvotná aktivácia enzýmu hot-start | Obrázok 7 |
| Amplifikácia DNA | Obrázok 8 |
| Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála | Obrázok 9 |
| Spustenie cyklu | Obrázok 10 |

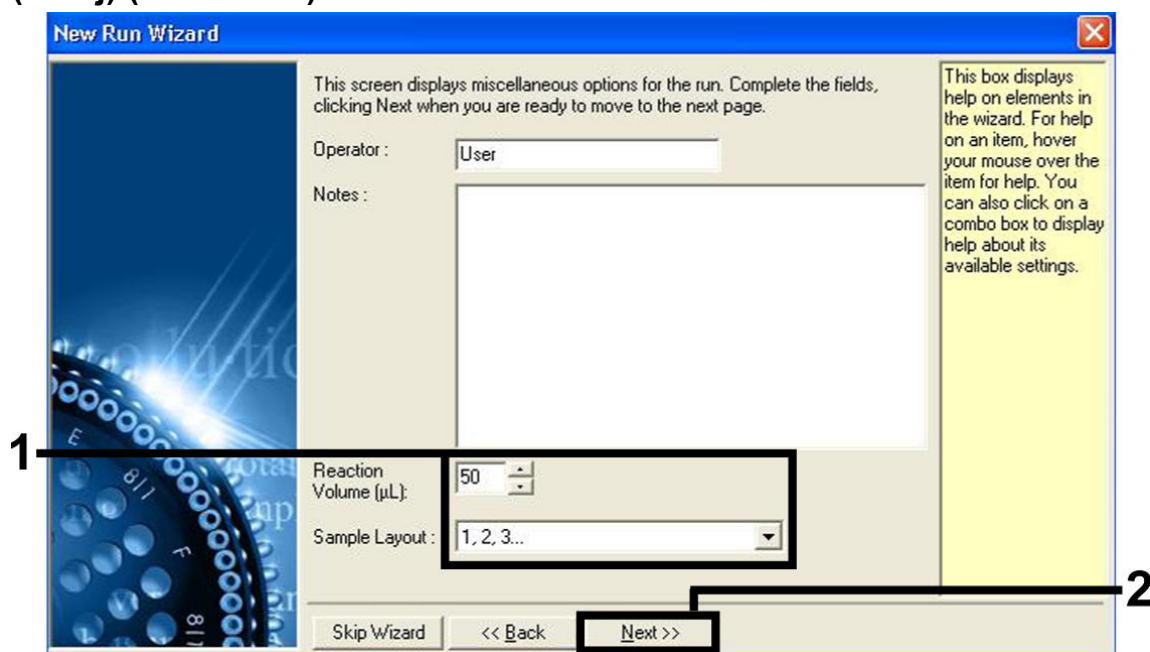
Všetky špecifikácie odkazujú na verziu softvéru 1.7.94 nástroja Rotor-Gene Q, verzie softvéru 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 nástroja Rotor-Gene 6000 a verziu softvéru 6.0.23 nástroja Rotor-Gene 3000. Ďalšie informácie o programovaní nástrojov Rotor-Gene Instruments nájdete v používateľskej príručke nástroja. Na ilustráciách sú tieto nastavenia softvéru orámované čiernou tučnou farbou. Ilustrácie sú zahrnuté pre nástroje Rotor-Gene Q Instruments. Ak sú pre nástroj Rotor-Gene 3000 potrebné rôzne hodnoty, sú tieto rozdiely popísané v texte.

6. Najprv otvorte dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 4). Skontrolujte pole „Locking Ring Attached“ (Tesniaci krúžok pripevnený) a kliknite na „Next“ (Ďalej).



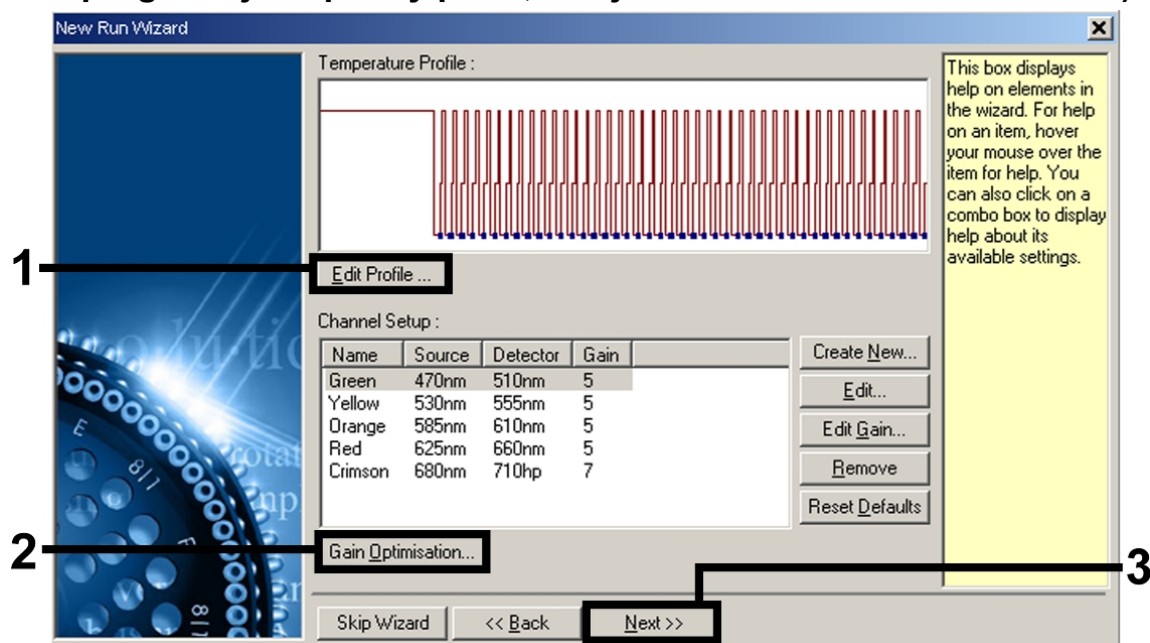
Obrázok 4. Dialógové okno „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom).

7. Vyberte hodnotu 50 pre PCR reakčný objem a kliknite na „Next“ (Dalej) (Obrázok 5).

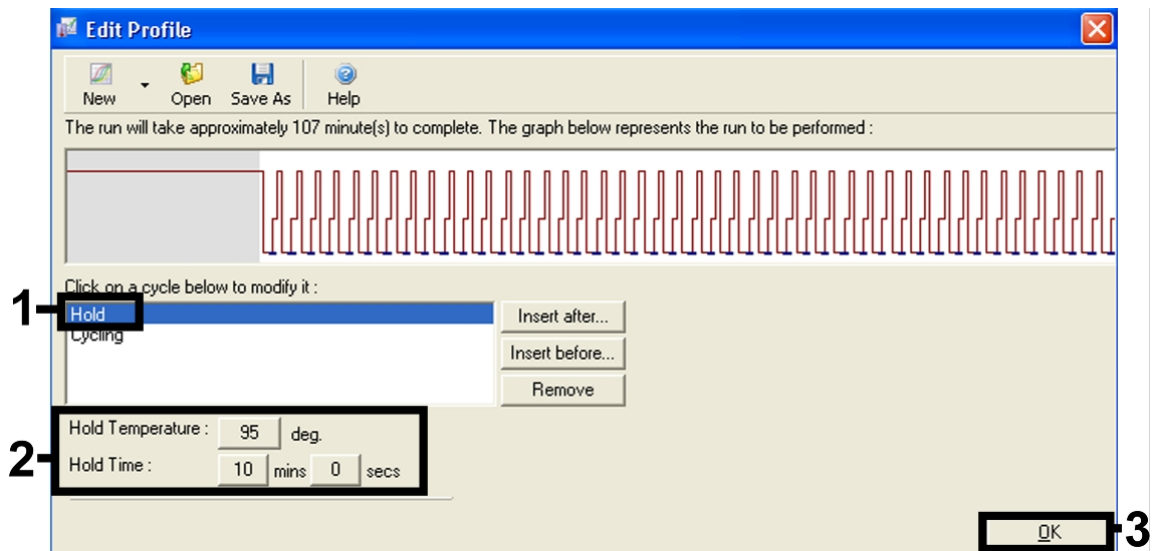


Obrázok 5. Nastavenie všeobecných parametrov testu.

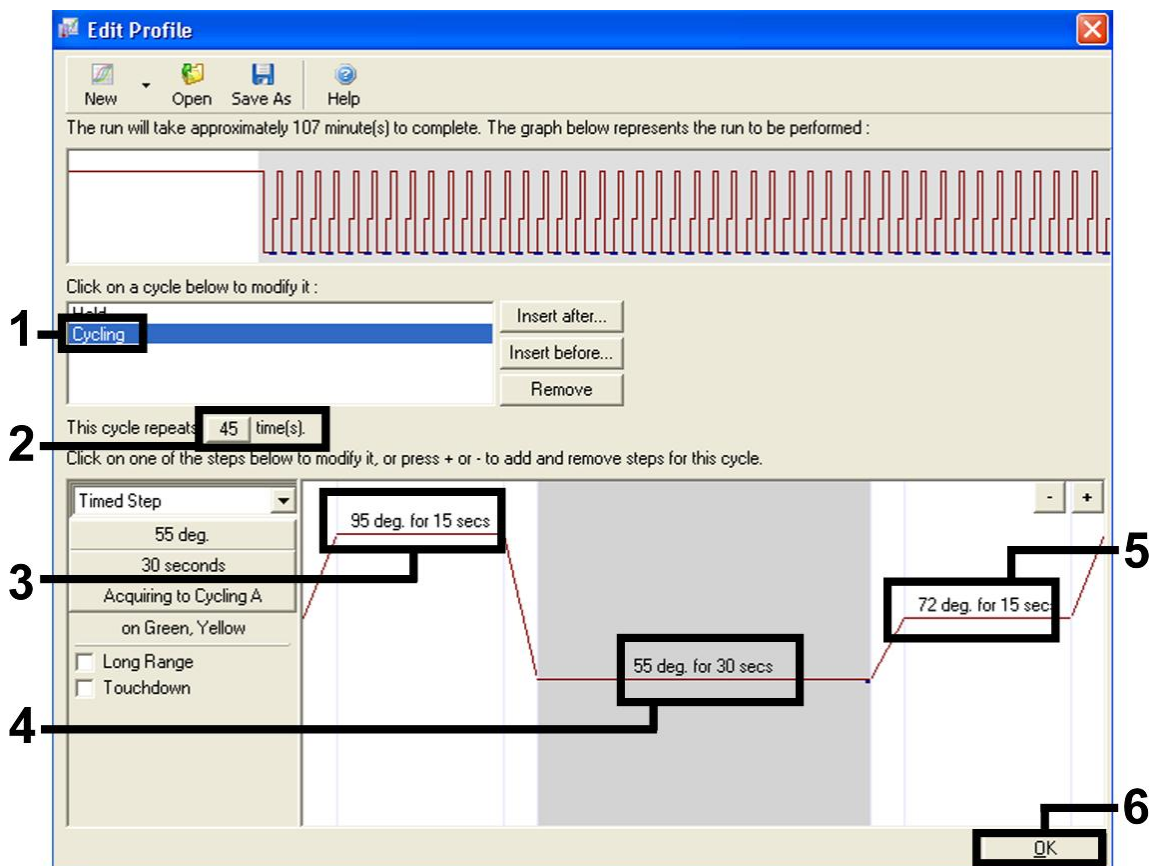
8. Kliknite na tlačidlo „Edit Profile“ (Upraviť profil) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 6) a naprogramujte teplotný profil, ako je zobrazené na obrázkoch 6–8).



Obrázok 6. Úprava profilu.

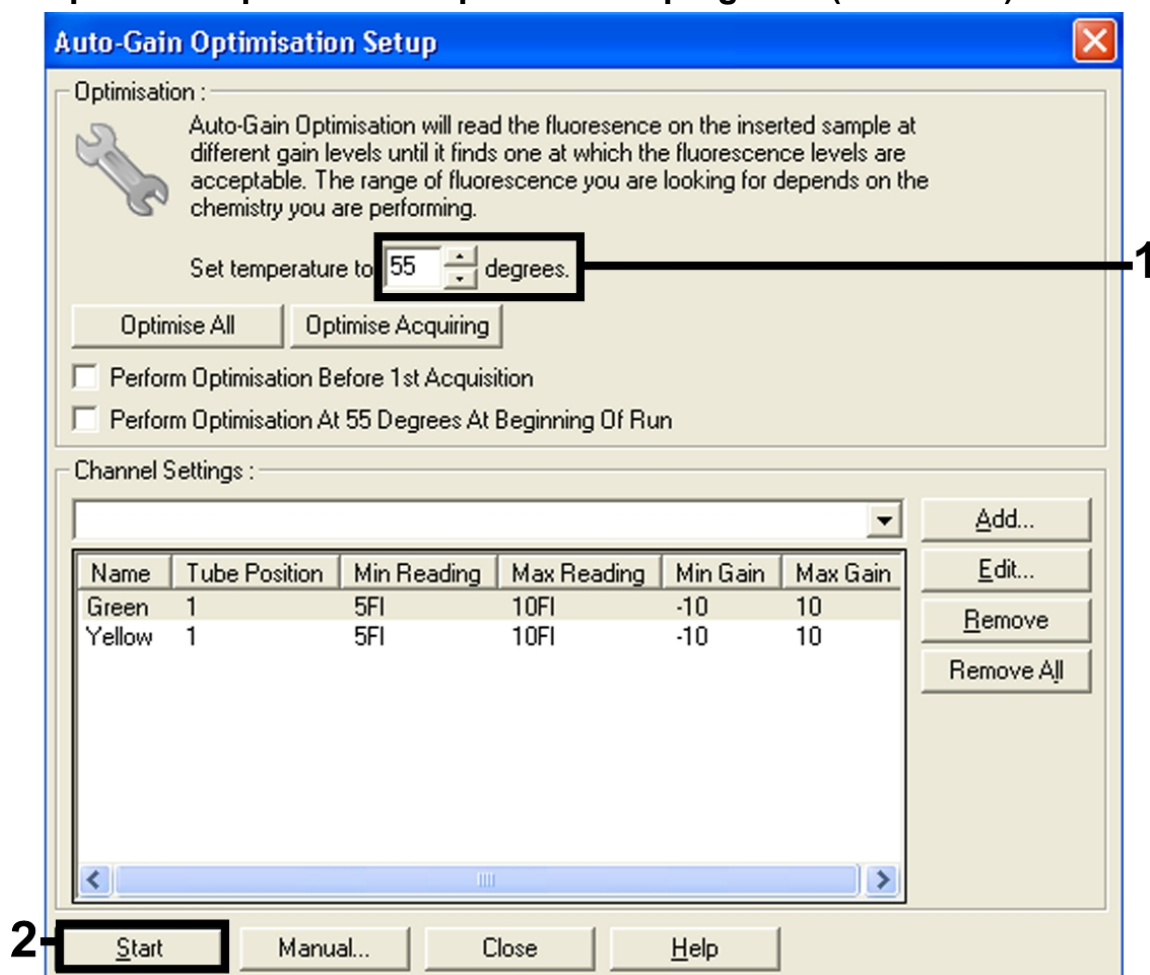


Obrázok 7. Prvotná aktivácia enzýmu hot-start.



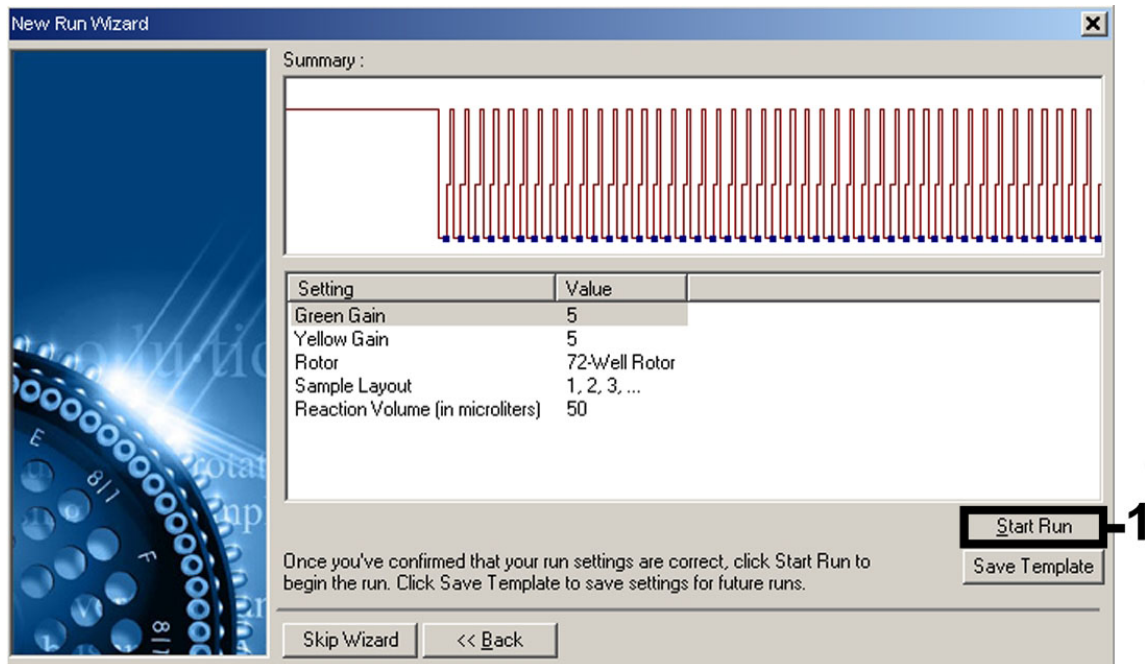
Obrázok 8. Amplifikácia DNA. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr, JOE“.

9. Detekčný rozsah fluorescenčných kanálov sa musí určiť podľa intenzity fluorescence v skúmvkách PCR. Kliknutím na „Gain Optimisation“ (Získať optimalizáciu) v dialógovom okne „New Run Wizard“ (Sprievodca novým cyklom) (Obrázok 6) otvoríte dialógové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavenie automatickej optimalizácie zisku). Kalibračnú teplotu nastavte na hodnotu 55, aby sa zhodovala s teplotou temperovania amplifikačného programu (Obrázok 9).



Obrázok 9. Nastavenie citlivosti fluorescenčného kanála. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr“ a „JOE“.

10. Hodnoty navýšenia stanovené kalibráciou kanálov sa automaticky uložia a sú uvedené v poslednom okne ponuky postupu programovania (Obrázok 10). Kliknite na „Start Run“ (Spustiť cyklus).



Obrázok 10. Spustenie cyklu. Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 definuje softvér fluorescenčné farbivá ako „FAM/Sybr“ a „JOE“.

11. Po dokončení cyklu údaje zanalyzujte. Sú možné tieto výsledky (11a, 11b a 11c).

Príklady pozitívnych a negatívnych PCR reakcií sú uvedené na obrázku Obrázok 11 a obrázku Obrázok 12.

- 11a. Vo fluorescenčnom kanáli farbiva Cycling Green sa zistí signál. Výsledok analýzy je pozitívny: vzorka obsahuje DNA HBV.

V tomto prípade je detekcia signálu vo kanáli farbiva Cycling Yellow nahraditeľná, pretože vysoké prvotné koncentrácie DNA HBV (pozitívny signál v kanáli Cycling Green) môžu viesť k zníženému alebo absentujúcemu fluorescenčnému signálu interného kontrolného roztoku v kanáli Cycling Yellow (konkurencia).



Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 je Cycling A.FAM relevantný kanál pre pozitívny signál a Cycling A.JOE je relevantný kanál pre interný kontrolný roztok.

11b. Vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green sa nedeteguje žiadny signál. Zároveň sa signál z interného kontrolného roztoku objaví v kanáli Cycling Yellow.

Vo vzorke nie je možné detegovať žiadnu DNA HBV. Môže sa považovať za negatívnu.

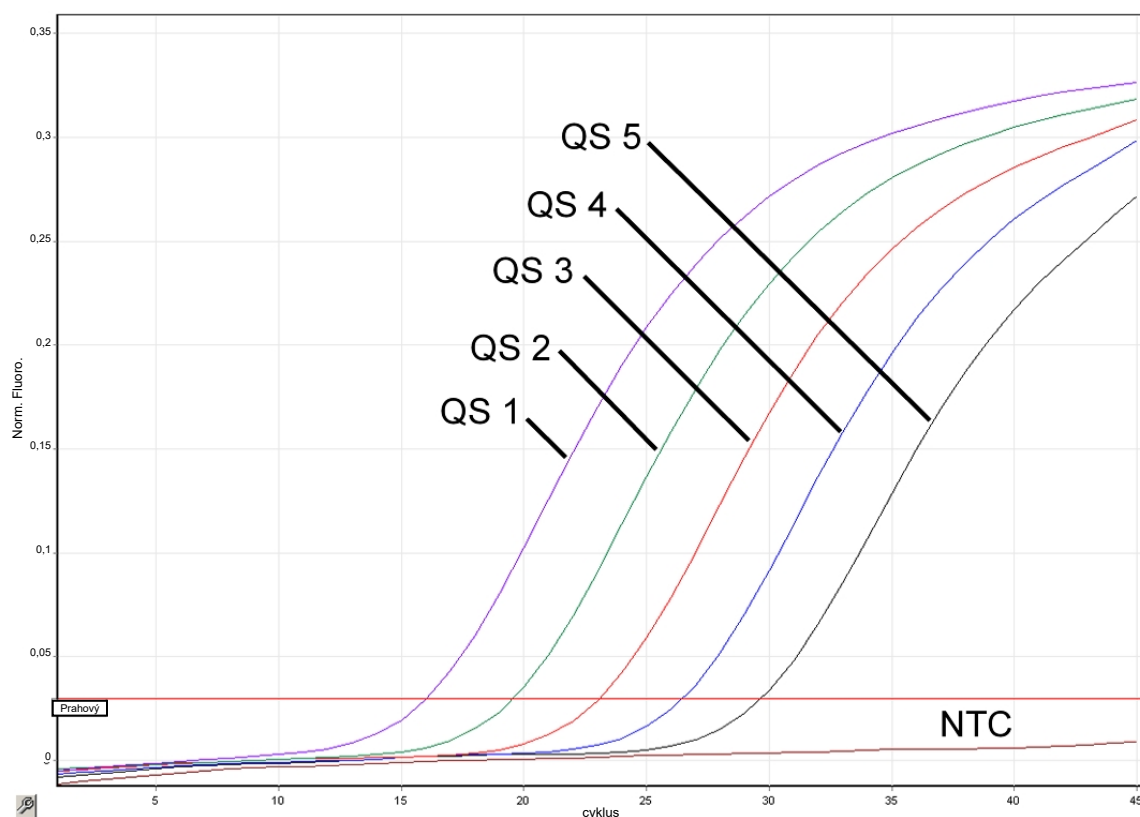
V prípade negatívneho testu HBV PCR vylučuje detegovaný signál interného kontrolného roztoku možnosť inhibície PCR.

i Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 je Cycling A.JOE relevantný kanál pre interný kontrolný roztok a nedostatok signálu pre Cycling A.FAM.

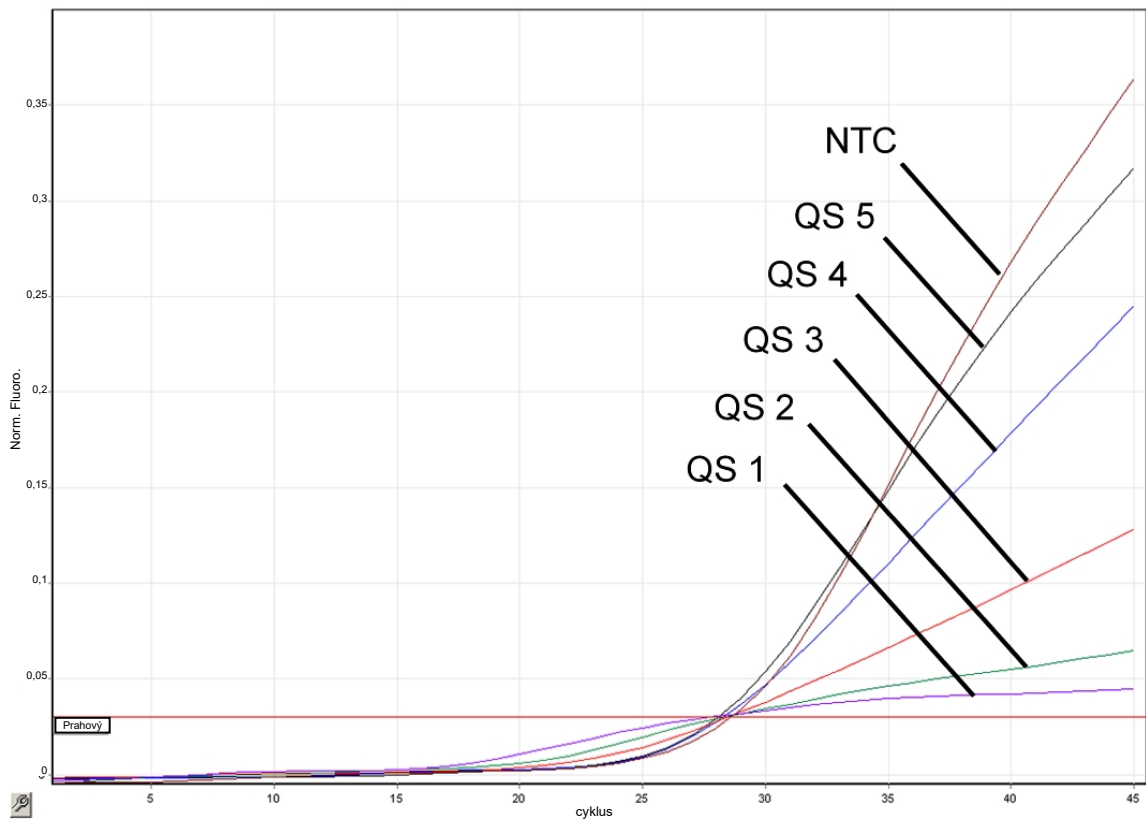
11c. V kanáli Cycling Green alebo Cycling Yellow sa nezistil žiadny signál. Nie je možné vyvodit' žiadny výsledok.

Informácie týkajúce sa zdrojov chýb a ich riešení nájdete v časti „Sprievodca riešením problémov“, strana 30.

i Nezabudnite, že na nástroji Rotor-Gene 3000 sú relevantné kanály Cycling A.FAM a Cycling A.JOE.



Obrázok 11. Detekcia kvantitatívnych štandardov (HBV RG/TM QS 1–5) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green. NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).








Obrázok 12. Detekcia interného kontrolného roztoku (Internal Control, IC) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow so súčasťou amplifikáciou kvantitatívnych štandardov (HBV RG/TM QS 1–5). NTC: Beztemplátový kontrolný roztok (negatívny kontrolný roztok).

Spríevodca riešením problémov

Tento sprievodca riešením problémov môže byť užitočný pri riešení akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. Viac informácií nájdete aj na stránke Často kladené otázky v našom stredisku technickej podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vedci v technických službách QIAGEN vám vždy radi zodpovedajú všetky otázky týkajúce sa informácií a protokolov v tejto príručke alebo technológií vzoriek a testov (kontaktné informácie nájdete na zadnej strane alebo na www.qiagen.com).






Komentáre a návrhy

Žiadny signál s pozitívnymi kontrolnými roztokmi (HBV RG/TM QS 1-5) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM

- a) Vybraný fluorescenčný kanál na analýzu PCR údajov nie je v súlade s protokolom  Na analýzu údajov vyberte fluorescenčný kanál Cycling Green alebo Cycling A.FAM pre analytický test HBV PCR a fluorescenčný kanál Cycling Yellow alebo Cycling A.JOE pre PCR interného kontrolného roztoku.
- b) Nesprávne naprogramovanie teplotného profilu nástroja Rotor-Gene Instrument  Porovnajete teplotný profil s protokolom. Pozrite si časť „Protokol: PCR analýza údajov“ na strane 21.
- c) Nesprávna konfigurácia PCR  Skontrolujte svoje pracovné kroky pomocou pipetovacej schémy a PCR v prípade potreby zopakujte. Pozrite si časť „Protokol: PCR analýza údajov“ na strane 21.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HBV RG PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensov a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Slabý alebo žiadny signál interného kontrolného roztoku negatívnej vzorky plazmy, ktorá bola vystavená purifikácii pomocou súpravy QIAamp DSP Virus Kit ($C_T = 29 \pm 3$; prah, 0,03) vo fluorescenčnom kanáli Cycling Yellow alebo Cycling A.JOE a súčasná absencia signálu v kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM

- a) Podmienky PCR nie sú v súlade s protokolom  Skontrolujte podmienky PCR (pozri vyššie) a v prípade potreby PCR zopakujte so správnymi nastaveniami.
- b) PCR bolo inhibované  Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- c) Počas extrakcie sa stratila DNA  Ak sa do extrakcie pridala interný kontrolný roztok, absentujúci signál interného kontrolného roztoku môže znamenať stratu DNA počas extrakcie. Uistite sa, že použijete odporúčaný spôsob izolovania (pozri časť „Izolovanie DNA“, strana 18) a postupujte presne podľa pokynov výrobcu.
- d) Podmienky skladovania jedného alebo viacerých komponentov súpravy nespĺňajú pokyny uvedené v časti „Skladovanie“ (strana 5)  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.
- e) Súprava *artus* HBV RG PCR Kit exspirovala  Skontrolujte podmienky skladovania a dátum expirácie (pozri štítok súpravy) reagensí a v prípade potreby použite novú súpravu.

Komentáre a návrhy

Signály s negatívnymi kontrolnými roztokmi vo fluorescenčnom kanáli Cycling Green alebo Cycling A.FAM analytickej PCR

a) Počas prípravy PCR došlo ku kontaminácii

ⓘ Zopakujte PCR s novými reagensiami v kópiách.

ⓘ Ak je to možné, zatvorte PCR skúmavky hneď po pridaní vzorky na testovanie.

ⓘ Pozitívny kontrolný roztok napipetujte ako posledný.

ⓘ Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a nástroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

b) Počas extrakcie došlo ku kontaminácii

ⓘ Zopakujte extrakciu a PCR vzorky na testovanie pomocou nových reagensíí.

ⓘ Zabezpečte, aby sa pracovný priestor a nástroje v pravidelných intervaloch dekontaminovali.

Referenčná literatúra

Spoločnosť QIAGEN vedie rozsiahlu aktuálnu on-line databázu vedeckých publikácií využívajúcich produkty QIAGEN. Komplexné možnosti vyhľadávania umožnia nájsť potrebné články, a to buď jednoduchým vyhľadávaním podľa kľúčových slov, alebo zadaním aplikácie, oblasti výskumu, názvu atď.

Úplný zoznam referenčnej literatúry nájdete v on-line Referenčnej databáze QIAGEN na stránke <http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp>, prípadne kontaktujte technické služby spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Informácie o objednávaní

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|---|---|---------|
| <i>artus</i> HBV RG PCR Kit (24) | Pre 24 reakcií: Zmes master, 5 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR) | 4506263 |
| <i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96) | Pre 96 reakcií: Zmes master, 5 kvantitatívne štandardy, interný kontrolný roztok, voda (stupeň PCR) | 4506265 |
| Súprava QIAamp DSP Virus Kit – na purifikáciu vírusových nukleových kyselín z ľudskej plazmy na účely in vitro diagnostiky | | |
| QIAamp DSP Virus Kit | Na 50 preparátov: Kolóny QIAamp MinElute® Spin Columns, pufre, reagencie, skúmavky, nadstavce kolón a konektory VacConnectors | 60704 |
| Rotor-Gene Q MDx – pre IVD-validované analýzy real-time PCR v klinických aplikáciách | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex System | Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9002023 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform | Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9002022 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie | 9002033 |

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|-------------------------------------|---|----------------|
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9002032 |
| Rotor-Gene Q MDx 6plex System | Real-time PCR cyklovač so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9002043 |
| Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform | Real-time PCR nástroj so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9002042 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex System | Real-time PCR cyklovač s 2 kanálmi (zelený, žltý), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9002003 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9002002 |
| Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie | 9002013 |

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|---|---|----------------|
| Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9002012 |
| Rotor-Gene Q – pre vynikajúcu účinnosť v real-time PCR | | |
| Rotor-Gene Q 5plex System | Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9001640 |
| Rotor-Gene Q 5plex Platform | Real-time PCR cyklovač s 5 kanálmi (zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9001570 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM System | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie | 9001650 |
| Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 5 kanálmi (zelená, žltá, oranžová, červená, karmínová) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9001580 |
| Rotor-Gene Q 6plex System | Real-time PCR cyklovač so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový), vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9001660 |

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|---------------------------------------|---|----------------|
| Rotor-Gene Q 6plex Platform | Real-time PCR nástroj so 6 kanálmi (modrý, zelený, žltý, oranžový, červený, karmínový) vrátane prenosného počítača, softvéru, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9001590 |
| Rotor-Gene Q 2plex System | Real-time PCR cyklovač s 2 kanálmi (zelený, žltý), prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštaláciu a zaškolenie | 9001620 |
| Rotor-Gene Q 2plex Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9001550 |
| Rotor-Gene Q 2plex HRM System | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie | 9001630 |
| Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform | Real-time PCR cyklovač a High Resolution Melt analyzátor s 2 kanálmi (zelený, žltý) plus kanál HRM, prenosný počítač, softvér, príslušenstvo, jednoročná záruka na diely a prácu, inštalácia a zaškolenie nie sú súčasťou balenia | 9001560 |
| Príslušenstvo pre Rotor-Gene Q | | |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie s jednokanálovou pipetou do skúmaviek 72 x 0,1 ml | 9018901 |
| Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes | Hliníkový blok na manuálnu prípravu reakcie v štandardnom teste 8 x 12 pomocou skúmaviek 96 x 0,2 ml | 9018905 |

| Produkt | Obsah | Kat. č. |
|-------------------------------------|---|----------------|
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 pášikov so 4 skúmavkami a uzávermi na 1000 reakcií | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 pášikov so 4 skúmavkami a uzávermi na 10 000 reakcií | 981106 |
| PCR Tubes, 0.2 ml (1000) | 1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií | 981005 |
| PCR Tubes, 0.2 ml (10000) | 10 x 1000 tenkostenných skúmaviek na 1000 reakcií | 981008 |

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa produktu nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite <http://www.qiagen.com/>, alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Nákup tohto výrobku umožňuje kupujúcemu používať výrobok na vykonávanie diagnostických krokov pre ľudskú in vitro diagnostiku. Týmto nie je priznaný žiadny všeobecný patent alebo iné oprávnenie žiadneho druhu ako toto konkrétne právo na používanie vyplývajúce z nákupu.

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

Súprava *artus* HBV RG PCR Kit a QIAamp DSP Virus Kit sú diagnostické súpravy s označením CE podľa smernice EÚ 98/79/ES o diagnostických medicínskych pomôckach in vitro. Nie sú dostupné vo všetkých krajinách.

Obmedzená licenčná zmluva

Použitie tohto produktu predstavuje súhlas kupujúceho alebo používateľa súpravy *artus* HBV RG PCR Kit s nasledovnými podmienkami:

1. Súprava *artus* HBV RG PCR Kit môže byť použitá výlučne v súlade s príručkou k súprave *artus HBV RG PCR Kit* a iba s komponentmi obsiahnutými v tejto súprave. Spoločnosť QIAGEN neudeľuje žiadnu licenciu v rámci žiadneho zo svojich práv na ochranu duševného vlastníctva na používanie alebo spájanie komponentov tejto súpravy so žiadnymi komponentmi, ktoré netvoria súčasť tejto súpravy, s výnimkou ustanovení uvádzaných v príručke k súprave *artus HBV RG PCR Kit* a v ďalších protokoloch, ktoré sú dostupné na adrese <http://www.qiagen.com/>.
2. Iné než výslovne uvedené licencie – spoločnosť QIAGEN neposkytuje žiadnu záruku na to, že táto súprava a/alebo jej použitie neporuší práva tretích strán.
3. Táto súprava a jej komponenty sú licenčne poskytnuté na jednorazové použitie a nesmú sa opätovne používať, opravovať ani predávať.
4. Spoločnosť QIAGEN sa špecificky zrieka všetkých ostatných (výslovných alebo implicitných) licencií než tých, ktoré sú tu výslovne uvedené.
5. Kupujúci a používateľ tejto súpravy súhlasia s tým, že iným osobám neumožnia ani nepovolí vykonať žiadne kroky, ktoré by mohli viesť k akýmkoľvek činnostiam, ktoré sú zakázané vyššie, alebo k nim napomáhať. Spoločnosť QIAGEN môže uplatňovať príslušné zákazy uvádzané v tejto obmedzenej licenčnej zmluve pred akýmkoľvek súdom a bude požadovať všetky náklady na vyšetrovanie a súdne konania (vrátane nákladov na právne zastupovanie) pri každom takomto kroku s cieľom uplatniť ustanovenia tejto obmedzenej licenčnej zmluvy alebo práv duševného vlastníctva súvisiacich so súpravou a/alebo jej komponentmi.

Aktualizované licenčné podmienky nájdete na <http://www.qiagen.com/>.

© 2009-2014 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

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)

