

# Manual *artus*<sup>®</sup> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit



24 (nr. de catalog 4513263)



96 (nr. de catalog 4513265)

Versiunea 1



Cantitativ în diagnosticare in vitro

Pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene<sup>®</sup> Q



4513263, 4513265



1049310RO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANIA

R5



1049310RO



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN este furnizor de top de tehnologii inovatoare pentru probe și teste, permițând izolarea și detecția conținutului oricărei probe biologice. Produsele și serviciile noastre avansate, de înaltă calitate, asigură succesul, de la prelevarea probei până la rezultat.

QIAGEN stabilește standarde în următoarele domenii:


- Purificarea ADN, ARN și a proteinelor
- Teste efectuate pe acizi nucleici și proteine
- Cercetare microARN și ARN de interferență
- Automatizarea tehnologiilor pentru probe și teste

Misiunea noastră este aceea de a vă permite să obțineți un succes excepțional și realizări ieșite din comun. Pentru mai multe informații, vizitați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Cuprins

<b>Conținutul kitului</b>	<b>4</b>
<b>Simboluri</b>	<b>5</b>
<b>Depozitarea</b>	<b>6</b>
<b>Domeniul de utilizare</b>	<b>6</b>
<b>Limitări în utilizarea produsului</b>	<b>6</b>
<b>Avertizări și precauții</b>	<b>7</b>
<b>Controlul calității</b>	<b>7</b>
<b>Introducere</b>	<b>8</b>
Principiu	8
Informații despre agenții patogeni	8
Caracteristici de performanță	9
<b>Echipe și reactivi care trebuie puse la dispoziție de utilizator</b>	<b>18</b>
<b>Note importante</b>	<b>19</b>
Precauții generale	19
Recoltarea, depozitarea și transportul probelor	19
Izolarea ARN-ului	21
Substanță de control internă	21
Setarea pragului pentru analiza PCR	22
Cuantificarea	22
<b>Protocol: PCR și analiza datelor</b>	<b>24</b>
<b>Ghid de remediere a problemelor</b>	<b>34</b>
<b>Referințe</b>	<b>37</b>
<b>Informații pentru comandă</b>	<b>38</b>

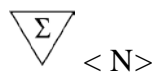
## Conținutul kitului

<b>artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit</b>			<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>Nr. de catalog</b>			<b>4513263</b>	<b>4513265</b>
<b>Număr de reacții</b>			<b>24</b>	<b>96</b>
Albastru	HI Virus-1 RG Master A		2 x 12 reacții	8 x 12 reacții
Violet	HI Virus-1 RG Master B		2 x 12 reacții	8 x 12 reacții
Roșu	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 <sup>4</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Roșu	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 <sup>3</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Roșu	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 <sup>2</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Roșu	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 <sup>1</sup> IU/μl)	<b>QS</b>	200 μl	200 μl
Green	HI Virus-1 RG IC <sup>†</sup>	<b>IC</b>	1000 μl	2 x 1000 μl
Alb	Apă (clasa PCR)		1000 μl	1000 μl
	Manual		1	1

\* Substanță standard de cuantificare.

† Substanță de control internă.

## Simboluri



Conține reactivi suficienți pentru <N> testări



Data de expirare



Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro



Număr catalog



Număr de lot



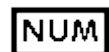
Număr material



Componente



Conține



Număr



Clorhidrat de guanidină



Număr de comercializare global articol



Limitări de temperatură



Producător



Consultați instrucțiunile de utilizare




Notă importantă

## Depozitarea

Componentele *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit trebuie depozitate la o temperatură cuprinsă între -30 °C și -15 °C și sunt stabile până la data de expirare menționată pe etichetă. Trebuie evitate decongelarea și congelarea repetate (>2 x), deoarece aceste acțiuni pot reduce sensibilitatea testului. Dacă reactivii vor fi utilizați în mod intermitent, aceștia trebuie congelați în părți alicote. Depozitarea la o temperatură cuprinsă între 2 și 8 °C nu trebuie să depășească o perioadă de 5 ore.

## Domeniul de utilizare

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit este un test de amplificare a acidului nucleic in vitro pentru cuantificarea ARN-ului virusului imunodeficienței umane tip 1 (HIV-1) în plasma umană. Acest kit de testare pentru diagnosticare utilizează tehnologia revers-transcriere-reacție de polimerizare în lanț (RT-PCR) și este configurat pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene Q. Testul poate cuantifica ARN-ul HIV-1 pe intervalul 120 – 1 x 10<sup>8</sup> HIV-1 UI/ml. Probele de plasmă care conțin Grupa M Subtipurile A–H au fost validate pentru utilizare în cadrul testului.

 *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit nu poate fi utilizat cu instrumentele Rotor-Gene Q 2plex.

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit este destinat utilizării împreună cu simptomele clinice și cu alți markeri de laborator, pentru prognosticul bolii și ca ajutor în evaluarea răspunsului viral la tratamentul antiretroviral, măsurat prin modificările nivelurilor de ARN HIV-1 în plasma tratată cu EDTA. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit nu este destinat utilizării ca test de screening pentru HIV sau ca test de diagnosticare pentru confirmarea prezenței infecției cu HIV.

## Limitări în utilizarea produsului

Toți reactivii pot fi utilizați exclusiv pentru diagnosticare in vitro.

Produsul va fi utilizat de personal instruit și pregătit special doar în procedurile de diagnosticare in vitro.

Respectarea strictă a manualului de utilizare este obligatorie pentru rezultatele optime ale PCR.

Trebuie acordată atenție datelor de expirare tipărite pe cutia și pe etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate.

Deși rare, mutațiile din regiunile extrem de conservate ale genomului viral acoperite cu soluțiile de amorsare și/sau cu sonda kitului pot duce la cuantificarea insuficientă sau la nereușită în detecția prezenței virusului în aceste cazuri. Validitatea și performanța designului testului sunt revizuite la intervale regulate.

## Avertizări și precauții

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF, compact și ușor de folosit, la adresa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de siguranță (SDS) pentru fiecare kit QIAGEN® și pentru componentele kiturilor.

Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

## Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea consecventă a produsului.

## Introducere

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit constituie un sistem pregătit pentru utilizare pentru detecția ARN-ului HIV-1 utilizând reacția de polimerizare în lanț (PCR) pe instrumentele Rotor-Gene Q. HI Virus-1 RG Master A și B conțin reactivi și enzime pentru revers-transcriere și amplificarea specifică a unei regiuni de 93 bp din genomul HIV-1, și pentru detecția directă a ampliconului specific în canalul de fluorescență Cycling Green al instrumentului Rotor-Gene Q sau Rotor-Gene 6000, sau Cycling A.FAM™ (sursă 470 nm, detector 510 nm) al instrumentului Rotor-Gene 3000.

În plus, *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit conține un al doilea sistem de amplificare heterologă pentru identificarea unei posibile inhibări PCR. Acesta este detectat ca substanță de control internă (IC) pe canalul de fluorescență Cycling Orange al instrumentului Rotor-Gene Q sau Rotor-Gene 6000, sau A.ROX™ (sursă 585 nm, detector 610 nm) al instrumentului Rotor-Gene 3000. Limita de detecție a HI Virus-1 RT-PCR analitic (consultați „Sensibilitate analitică”, pagina 9) nu este redusă. Sunt furnizate substanțele de control externe pozitive (HI Virus-1 RG QS 1–4), care permit determinarea cantității de ARN viral. Pentru informații suplimentare, consultați „Cuantificarea”, pagina 22.

## Principiu

Detecția patogenilor prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) se bazează pe amplificarea regiunilor specifice ale genomului patogenului. În PCR în timp real, produsul amplificat este detectat prin intermediul vopselelor fluorescente. Acestea sunt legate, de obicei, de sondele cu secvențe de oligonucleotide, care se leagă specific de produsul amplificat. Monitorizarea intensităților fluorescenței în timpul testării PCR (adică în timp real) permite detecția și cuantificarea produsului care se acumulează, fără a fi necesară redeschiderea eprubetelor de reacție după testarea PCR.\*

## Informații despre agenții patogeni

Virusul imunodeficienței umane (HIV) este un retrovirus care provoacă sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA). Există două tipuri de virus HIV, responsabile pentru infecțiile umane, HIV-1 și HIV-2, care diferă prin virulență și prevalență. Cele mai multe cazuri raportate de SIDA la nivel mondial au fost atribuite virusului HIV-1. Infecția cu HIV are loc prin transferul de sânge infectat, fluid vaginal, lapte matern și alte fluide corporale. În aceste fluide corporale, HIV este prezent atât sub forma particulelor virale libere, cât și ca virus în celulele imune infectate. Cele trei căi principale de transmitere sunt actul sexual neprotejat, ace contaminate și transmiterea de la o mamă infectată către copilul ei, la naștere sau prin intermediul laptelui matern.

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



În principal, HIV infectează celulele sistemului imunitar uman, precum celulele T ajutătoare (în mod special, CD4<sup>+</sup>). Infecția cu HIV determină niveluri reduse de celule T CD4<sup>+</sup>. Atunci când numărul de celule T CD4<sup>+</sup> scade sub un nivel critic, imunitatea mediată celular se pierde, iar corpul devine treptat din ce în ce mai predispus la infecțiile oportuniste.

Simptomele SIDA apar într-un stadiu avansat al infecției cu HIV, atunci când sistemul imunitar compromis nu mai poate lupta cu infecțiile oportuniste. În acest stadiu, persoana infectată dezvoltă din ce în ce mai mult simptome declanșate de astfel de infecții. Printre cele mai comune infecții se numără diareea cronică declanșată de *Cryptosporidium*, infecție oculară indusă de citomegalovirus, pneumonie cu *Pneumocystis*, toxoplasmoză și tuberculoză, precum și infecții cu membrii complexului *Mycobacterium avium*. În plus, dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer, precum cancerul cervical invaziv, sarcomul Kaposi sau limfomul, este observată frecvent. Pentru moment nu există tratament pentru SIDA și se crede că cei mai mulți oameni infectați cu HIV mor, în cele din urmă, din cauza unei afecțiuni asociate cu SIDA. Cu toate acestea, progresul în ceea ce privește terapiile pentru HIV/SIDA, inclusiv cele care luptă împotriva virusului în sine, precum și cele care previn sau tratează infecțiile oportuniste, au îmbunătățit semnificativ speranța de viață și calitatea vieții pentru numeroși pacienți cu HIV/SIDA.

## Caracteristici de performanță

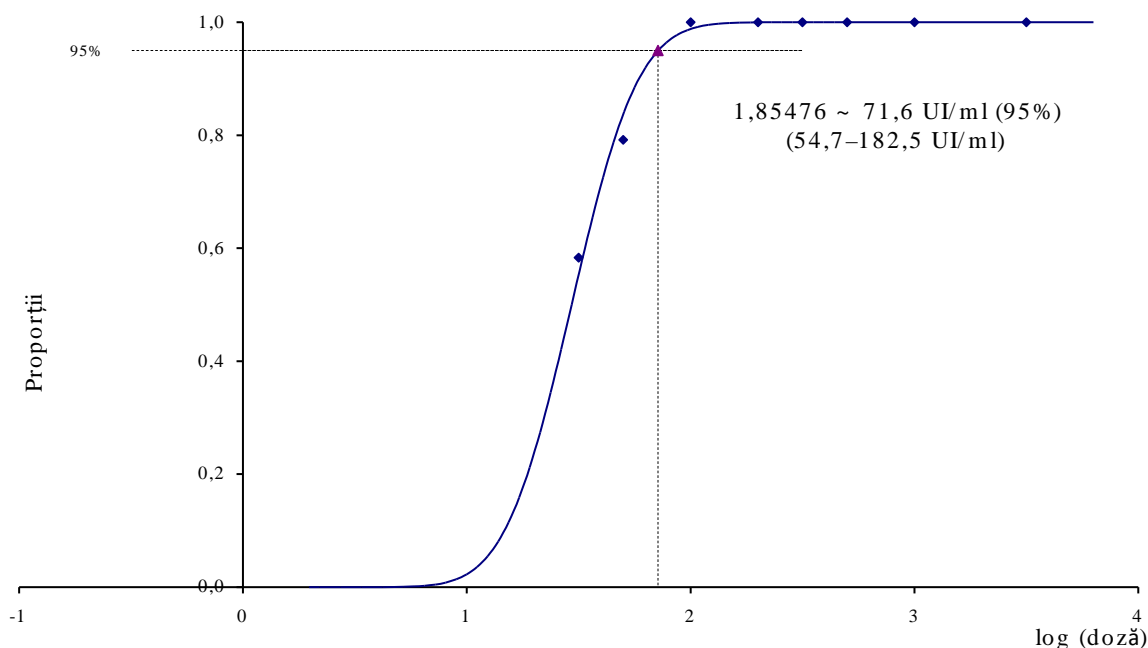
### Sensibilitate analitică

Limita de detecție analitică, precum și limita de detecție analitică luată în considerare pentru purificare (limite de sensibilitate) au fost evaluate pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Limita de detecție analitică luată în considerare pentru purificare este determinată utilizând probele clinice pozitive la HIV, împreună cu o metodă specială de extracție. În schimb, limita de detecție analitică este determinată independent de metoda de extracție selectată, utilizând o substanță standard cu concentrație cunoscută.

Pentru a determina sensibilitatea analitică pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit, a fost configurată o serie de diluție a substanței standard de la 0,0316 până la 31,6 UI\*/μl și aceasta a fost analizată pe Rotor-Gene 3000 împreună cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Testarea a fost realizată în 3 zile diferite, pe 8 duplicate. Rezultatele au fost determinate printr-o analiză de tip probit. Limita de detecție analitică pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit, împreună cu Rotor-Gene 3000, este 4,5 UI/μl (p = 0,05). Aceasta înseamnă că există o probabilitate de 95% să fie detectate 4,5 UI/μl.

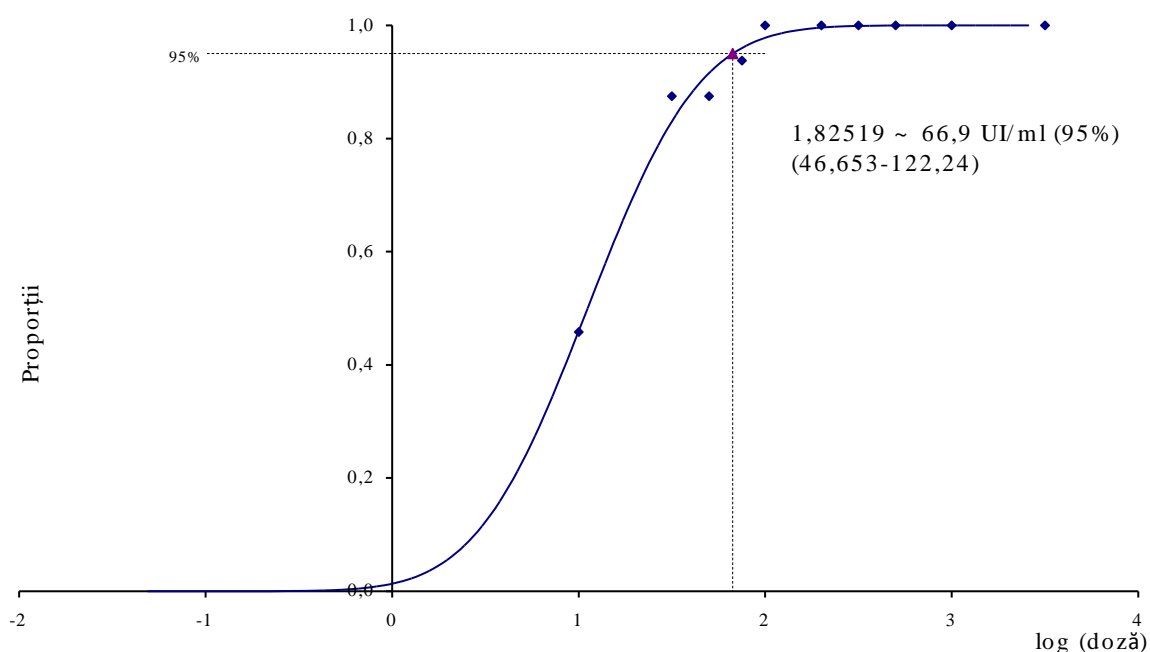
\* Substanța standard este un ARN transcris in vitro, a cărui concentrație a fost calibrată utilizând al doilea standard internațional pentru HIV (2nd International HIV Standard) (OMS).

Sensibilitatea analitică luată în considerare pentru purificare (QIAamp® DSP Virus Kit, QIAGEN) pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit pe instrumentele Rotor-Gene a fost determinată utilizând o serie de diluții din al doilea standard internațional OMS (2nd International WHO Standard) aferentă ARN-ului HIV-1 pentru testele cu tehnologie de amplificare a acidului nucleic (NAT) (NIBSC Cod 97/650) de la 10 până la 3160 HIV UI/ml, îmbogățită în probele de plasmă clinice. Acestea au fost supuse extracției ARN-ului, utilizând QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, volum de extracție: 0,5 ml, volum de eluție: 25  $\mu$ l). Fiecare diluție a fost analizată cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit în 3 zile diferite, pe 8 duplicate. Rezultatele au fost determinate printr-o analiză de tip probit. În Figura 1 este prezentată o ilustrație grafică a analizei de tip probit. Limita de detecție analitică luată în considerare pentru purificarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit împreună cu Rotor-Gene 3000 este 71,6 UI/ml ( $p = 0,05$ ). Aceasta înseamnă că există o probabilitate de 95% să fie detectate 71,6 UI/ml.



**Figura 1. Analiză de tip probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000).** Sensibilitatea analitică luată în considerare pentru purificare (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit pe Rotor-Gene 3000.

Limita de detecție analitică luată în considerare pentru purificarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit împreună cu Rotor-Gene Q/6000 este 66,9 UI/ml ( $p = 0,05$ ). Aceasta înseamnă că există o probabilitate de 95% să fie detectate 66,9 UI/ml.



**Figura 2. Analiză de tip probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000).** Sensibilitatea analitică luată în considerare pentru purificare (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit pe Rotor-Gene 6000.

## Specificitate

Specificitatea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit este asigurată în primul rând de selectarea soluțiilor de amorsare și a sondelor, precum și de selectarea condițiilor stricte de reacție. Soluțiile de amorsare și sondele au fost verificate pentru posibile omologii cu toate secvențele publicate în băncile de gene, prin analiza comparațiilor secvențiale. Astfel, a fost asigurată detectabilitatea tuturor genotipurilor relevante, printr-o aliniere a bazei de date și prin intermediul unei testări PCR pe instrumentele Rotor-Gene, cu următoarele genotipuri (consultați Tabelul 1).

Mai mult, specificitatea a fost validată cu 100 de probe diferite de plasmă negative la HIV. Acestea nu au generat semnale în soluțiile de amorsare și sondele specifice HIV, care sunt incluse în HI Virus-1 RG Master.

O potențială reactivitate încrucișată a *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost testată utilizând grupul de substanțe de control enumerat în Tabelul 2. Niciunul dintre patogenii testați nu a fost reactiv. Nu s-au observat reactivități încrucișate cu infecții mixte.

**Tabelul 1. Testarea specificității genotipurilor relevante**

<b>Virus</b>	<b>Genotip</b>	<b>Sursă</b>	<b>HIV (FAM)</b>	<b>Substanță de control internă (ROX)</b>
HI Virus-1	A	NIBSC*	+	+
HI Virus-1	B	NIBSC	+	+
HI Virus-1	C	NIBSC	+	+
HI Virus-1	D	NIBSC	+	+
HI Virus-1	E	NIBSC	+	+
HI Virus-1	F	NIBSC	+	+
HI Virus-1	G	NIBSC	+	+
HI Virus-1	H	NIBSC	+	+

\* National Institute for Biological Standards and Control (Institutul Național pentru Control și Standarde Biologice), Hertfordshire.

**Tabelul 2. Testarea specificității kitului cu patogeni cu potențial de reacție încrucișată**

<b>Grup de substanțe de control</b>	<b>HIV (Cycling Green sau Cycling A.FAM)</b>	<b>Substanță de control internă (Cycling Orange sau Cycling A.ROX)</b>
Virusul hepatitei A	–	+
Virusul hepatitei B	–	+
Virusul hepatitei C	–	+
Virus herpetic uman 1 (virusul Herpes Simplex 1)	–	+
Virus herpetic uman 2 (virusul Herpes Simplex 2)	–	+
Virus herpetic uman 3 (virusul varicelo-zosterian)	–	+
Virus herpetic uman 5 (cytomegalovirus)	–	+

Tabel continuat pe pagina următoare

**Tabelul 2. Continuare**

<b>Grup de substanțe de control</b>	<b>HIV (Cycling Green sau Cycling A.FAM)</b>	<b>Substanță de control internă (Cycling Orange sau Cycling A.ROX)</b>
Virusul leucemiei cu celule T umane tip 1 și tip 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Febră galbenă	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

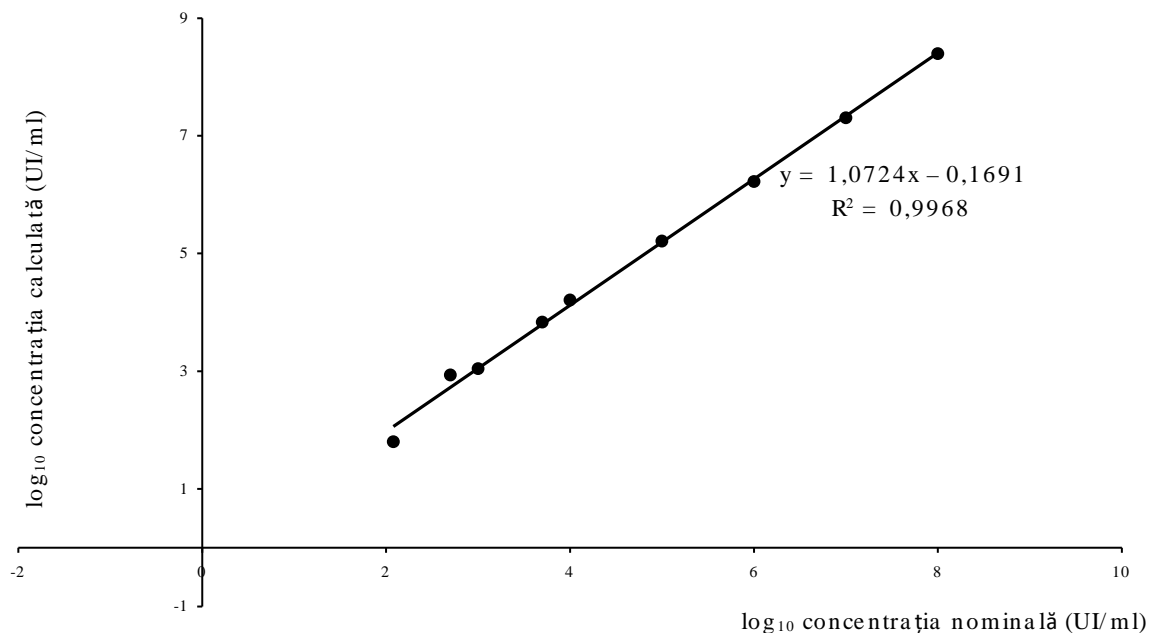
## Interval liniar

Intervalul liniar (măsurătoare analitică) al *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost determinat prin analiza unei serii de diluție a unei transcripții HIV in vitro de la  $1 \times 10^8$  UI/ $\mu$ l până la 1 UI/ $\mu$ l. Seria de diluție a fost calibrată comparativ cu Standardul internațional OMS pentru ARN-ul HIV.

Fiecare diluție a fost testată în duplicate ( $n = 8$ ) utilizând *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit pe instrumente Rotor-Gene.

S-a determinat că intervalul liniar al *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit acoperă concentrații de la 5 UI/ $\mu$ l până la minim  $1 \times 10^8$  UI/ $\mu$ l.

Intervalul liniar luat în considerare pentru purificarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost determinat prin analiza unei serii de diluție a OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel de la  $1 \times 10^8$  UI/ml până la 120 UI/ml. Purificarea a fost realizată în duplicate, utilizând QIAamp DSP Virus Kit (volum de extracție: 0,5 ml, volum de eluție: 25  $\mu$ l). Fiecare dintre cele 9 probe a fost analizată utilizând *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. S-a determinat că intervalul liniar luat în considerare pentru purificarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit acoperă concentrații de la 120 UI/ml până la minim  $1 \times 10^8$  UI/ml (consultați Figura 3).



**Figura 3. Intervalul liniar al *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.** Calculul intervalului liniar. Linia dreaptă a fost determinată de o regresie liniară a concentrațiilor calculate log<sub>10</sub> cu concentrațiile nominale log<sub>10</sub>. Ecuția liniei de regresie este inclusă în figură.

## Precizie

Datele privind precizia *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit au fost colectate prin intermediul instrumentelor Rotor-Gene și permit determinarea variației totale a testului. Variația totală constă în variabilitatea intra-test (variabilitatea rezultatelor multiple ale probelor cu aceeași concentrație în cadrul unui singur experiment), variabilitatea inter-teste (variabilitatea rezultatelor multiple ale testului, generate pe instrumente diferite de același tip, de operatori diferiți, în cadrul unui singur laborator) și variabilitatea inter-loturi (variabilitatea rezultatelor multiple ale testului, utilizând diferite loturi). Datele obținute au fost utilizate pentru a determina abaterea standard, variația și coeficientul de variație pentru agentul patogen specific și PCR cu substanță de control internă.

Datele privind precizia *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR au fost colectate utilizând substanța standard de cuantificare cu concentrația cea mai mică (QS4; 10 UI/ $\mu$ l). Testarea a fost realizată cu 8 duplicate. Datele privitoare la precizie au fost calculate pe baza valorilor  $C_T$  ale curbelor de amplificare ( $C_T$ : ciclu prag, consultați Tabelul 3). Pe baza acestor rezultate, distribuția statistică generală a oricărei probe cu concentrația menționată este de 1,66% ( $C_T$ ), și 2,15% ( $C_T$ ) pentru detecția substanței de control interne. Aceste valori se bazează pe totalitatea valorilor unice ale variabilităților determinate.

**Tabelul 3. Datele privind precizia, bazate pe valorile  $C_T$**

	<b>Valoare <math>C_T</math></b>	<b>Abatere standard</b>	<b>Coeficient de variație (%)</b>
Variabilitate intra-test: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Variabilitate intra-test: Substanță de control internă	31,24	0,18	0,58
Variabilitate inter-teste: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Variabilitate inter-teste: Substanță de control internă	31,65	0,36	1,13
Variabilitate inter-loturi: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73

Variabilitate inter-loturi:			
Substanță de control internă	31,20	0,55	1,76
Variație totală:			
HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Variație totală:			
Substanță de control internă	31,40	0,67	2,15

## Robustețe

Verificarea robusteții permite determinarea ratei totale de respingere pentru *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. 100 de probe de plasmă negative la HIV au fost îmbogățite cu un volum de eluție de 4,5 UI/μl al ARN-ului de control HIV (concentrație de trei ori mai mare comparativ cu limita de sensibilitate analitică). După extracția utilizând QIAamp DSP Virus Kit, aceste probe au fost analizate cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Pentru toate probele HIV, rata de respingere a fost de 0%. În plus, robustețea substanței de control interne a fost evaluată prin purificarea și analiza celor 100 de probe de plasmă negative la HIV. Rata totală de respingere a fost de 0%. Nu s-au observat inhibări. Astfel, robustețea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit este de ≥99%.

## Reproductibilitate

Datele privind reproductibilitatea permit o evaluare regulată a performanței *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit, precum și o comparație a eficienței cu alte produse. Aceste date sunt obținute prin participare la programe de competențe stabilite.

## Evaluare pentru diagnosticare

*artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost evaluat în cadrul unui studiu. Comparând *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit cu COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, 241 de probe de plasmă au fost analizate retrospectiv. Toate probele de plasmă fuseseră analizate anterior ca pozitive sau negative, utilizând COBAS TaqMan HIV-1 Test pentru diagnosticare de rutină.

ARN-ul HIV pentru testarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost izolat utilizând QIAamp DSP Virus Kit, iar analiza a fost efectuată pe instrumentul Rotor-Gene 6000. Pentru testarea comparativă cu COBAS TaqMan HIV-1 Test, ARN-ul HIV a fost izolat în conformitate cu instrucțiunile producătorului, furnizate în prospect. Rezultatele obținute prin utilizarea *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit au fost comparate cu cele ale COBAS TaqMan HIV-1 Test (consultați Tabelul 4 și Figura 4).

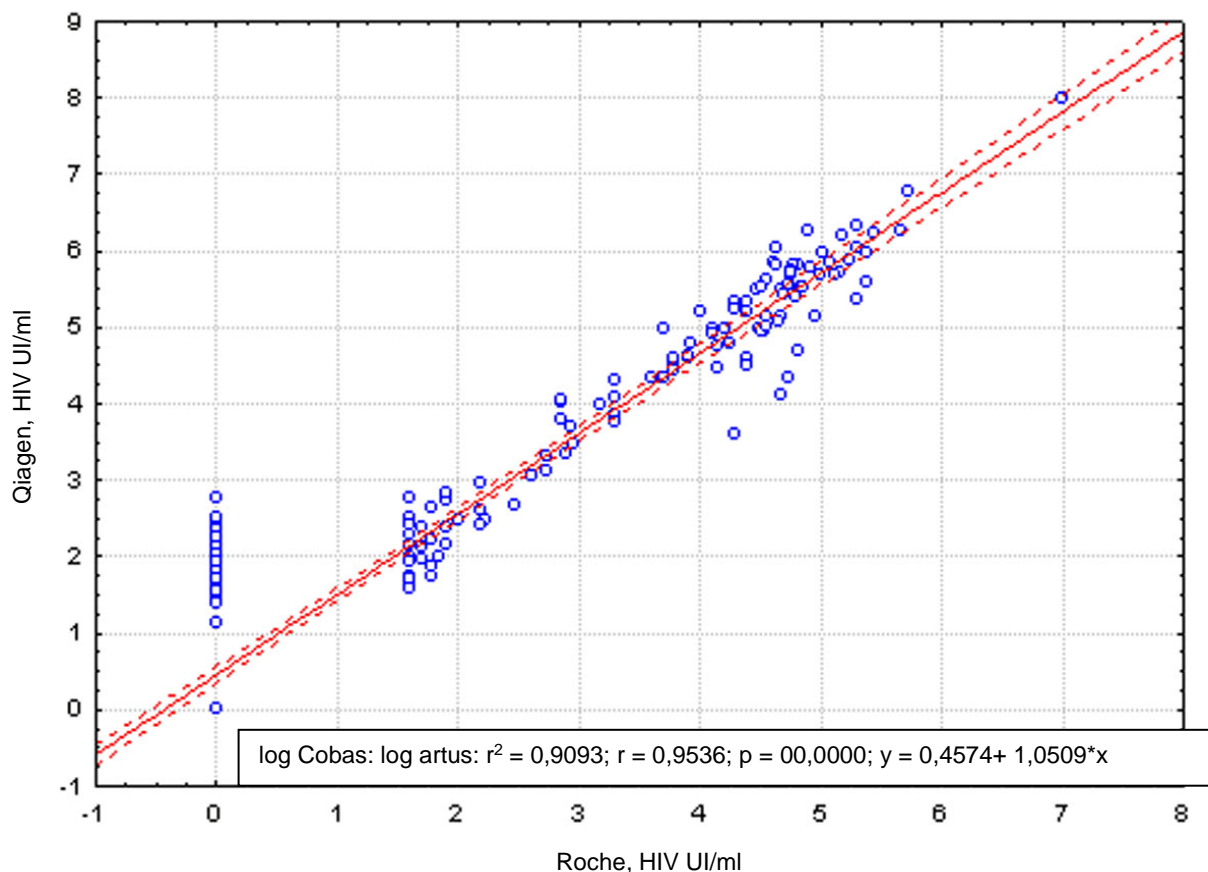


105 din 126 de probe care au fost testate ca pozitive cu COBAS TaqMan HIV-1 Test au fost testate ca pozitive și cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. 113 din 115 de probe care au fost testate ca negative cu COBAS TaqMan HIV-1 Test au fost testate ca negative și cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.

Dacă luăm ca referință rezultatele COBAS TaqMan HIV-1 Test, sensibilitatea de diagnosticare este 98,1%, iar specificitatea diagnosticării este 84,3%.

**Tabelul 4. Rezultatele celor 241 de probe de plasmă EDTA, analizate retrospectiv**

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



**Figura 4. Comparație între COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche, HIV; cu purificarea probelor utilizând sistemul COBAS AmpliPrep) și *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (QIAGEN, HIV; cu purificarea probelor utilizând QIAamp DSP Virus Kit). Corelația rezultatelor cantitative obținute de la ambele sisteme de testare (Tabelul 4) a fost analizată prin regresie liniară. Rezultatele obținute de la ambele kituri sunt prezentate într-o diagramă (de dispersie) XY la scară log-log.**

## Echipamente și reactivi care trebuie puse la dispoziție de utilizator

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (safety data sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

- Kit de izolare a ARN-ului (consultați „Izolarea ARN-ului”, pagina 21)
- Pipete (reglabile)\*
- Vârfuri de pipete sterile cu filtre
- Agitator vortex\*
- Centrifugă de banc\* cu rotor pentru eprubete de reacție de 2 ml
- Instrument Rotor-Gene Q sau Rotor-Gene\*<sup>†</sup> cu canale de fluorescență pentru Cycling Green și Cycling Orange sau cu canale de fluorescență pentru Cycling A.FAM și Cycling A.ROX
- Software Rotor-Gene Q versiunea 1.7.94 (software Rotor-Gene 6000 versiunea 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software Rotor-Gene 3000 versiunea 6.0.23) sau mai recent
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pentru utilizare cu 72-well rotor (nr. cat. 981103 sau 981106)
- Alternativ: PCR Tubes, 0.2 ml, pentru utilizare cu 36-well rotor (nr. cat. 981005 sau 981008)
- Cooling block (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, nr. cat. 9018901, sau Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, nr. cat. 9018905)

\* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

<sup>†</sup> *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit nu poate fi utilizat cu instrumentele Rotor-Gene Q 2plex.

## Note importante

### Precauții generale

Utilizatorul trebuie să acorde întotdeauna atenție următoarelor aspecte:

- Utilizarea vârfulor de pipete sterile cu filtre.
- Depozitarea și extracția materialelor pozitive (probe, substanțe de control pozitive și ampliconi), separat de toți ceilalți reactivi, și adăugarea acestora în amestecul de reacție într-o unitate separată din punct de vedere spațial.
- Decongețați cu atenție toate componentele la temperatura camerei (15 – 25 °C) înainte de a începe un test.
- După decongelare, amestecați componentele prin pipetare verticală în mod repetat sau prin agitare puternică prin impuls și centrifugați pentru scurt timp.
- Lucrați repede și păstrați componentele pe gheață sau în blocul de răcire (bloc de încărcare cu 72/96 de godeuri).

### Recoltarea, depozitarea și transportul probelor

**i** Toate probele trebuie tratate ca materiale potențial infecțioase.

Sunt permise doar următoarele materiale de probă, pentru care trebuie respectate cu strictețe următoarele reguli și instrucțiuni speciale privitoare la recoltare, transport și depozitare.

**i** Studiile curente se referă la plasma tratată cu EDTA sau cu citrat ca fiind cele mai potrivite materiale de probă pentru detecția HIV. Prin urmare, recomandăm utilizarea acestor materiale cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.

Validarea internă a *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a fost realizată utilizând probe de plasmă umană EDTA. Alte materiale de probă nu sunt validate. Utilizați doar kitul de izolare ARN recomandat (consultați „Izolarea ARN-ului”, pagina 21) pentru prepararea probelor.

La utilizarea anumitor materiale de probă trebuie respectate cu strictețe instrucțiunile speciale referitoare la recoltarea, transportul și depozitarea acestora.

## Recoltarea probelor

Fiecare recoltare de sânge provoacă o leziune a vaselor sanguine (artere, vene, capilare). Trebuie utilizat doar material inofensiv și steril. Pentru recoltarea sângelui sunt disponibile consumabilele corespunzătoare. Pentru punctiile venoase nu trebuie utilizate ace pentru capilare, care sunt prea fine. Recoltarea sângelui venos trebuie efectuată în părțile corespunzătoare ale plicii cotului, antebrațului sau dosul palmei. Sângele trebuie tras în eprubete standard de recoltare a probei (capac roșu, Sarstedt sau eprubetă echivalentă a altui producător). Trebuie recoltat un volum de 5–10 ml de sânge EDTA. Eprubetele trebuie amestecate în aer, direct după recoltarea probei (de 8 ori, nu agitați).

**i** Probele de la pacienți heparinizați nu trebuie utilizate (consultați „Substanțe de interferență”, pagina 20).

## Depozitarea probelor

Sângele integral trebuie separat în plasmă și componente celulare prin centrifugare timp de 20 de minute la 800–1600 x g în termen de 6 ore. Plasma izolată trebuie transferată în eprubete sterile din polipropilenă. Sensibilitatea testului poate fi redusă dacă probele sunt congelate ca o chestiune de rutină sau depozitate pentru o perioadă mai mare de timp. ARN-ul viral încapsulat este stabil timp de mai multe zile, dacă este depozitat la 4 °C, timp de mai multe săptămâni, dacă este depozitat la –20 °C, și chiar timp de mai multe luni și ani, dacă este depozitat la –70 °C.\*

## Transportul probelor

Materialul de probă trebuie transportat într-un recipient de transport rezistent la rupere, în principiu. Astfel, se poate evita un potențial pericol de infecție cauzat de o scurgere a probei. Probele trebuie transportate în conformitate cu instrucțiunile locale și naționale privind transportul materialului patogen.†

Probele trebuie expediate în termen de 6 ore. Nu se recomandă depozitarea probelor în locul în care au fost recoltate. Este posibilă expedierea probelor prin poștă, în conformitate cu instrucțiunile legale privind transportul materialului patogen. Recomandăm transportul probelor prin intermediul unui serviciu de curierat. Probele de sânge trebuie expediate în stare răcită (2–8 °C), iar plasma separată trebuie congelată (între –15 și –30 °C).

## Substanțe de interferență

Nivelurile ridicate de bilirubină ( $\leq 15$  mg/dl) și lipide ( $\leq 800$  mg/dl) și probele hemolitice nu influențează sistemul. Heparina ( $\geq 10$  UI/ml) afectează PCR. Probele recoltate în eprubete cu conținut de heparină pe post de anticoagulant nu trebuie utilizate. De asemenea, probele pacienților heparinizați nu trebuie utilizate.

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

† Asociația Internațională de Transport Aerian (International Air Transport Association, IATA). Regulamentele privind transportul mărfurilor periculoase.

## Izolarea ARN-ului

QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, nr. cat. 60704) este validat pentru purificarea ARN-ului viral din plasma umană, pentru a fi utilizat cu *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Efectuați purificarea ARN-ului viral în conformitate cu instrucțiunile din *Manualul QIAamp DSP Virus Kit*.

**i** Utilizarea ARN-ului de transport este esențială pentru eficiența extracției și, prin urmare, pentru rezultatul ADN-ului/ARN-ului. Pentru a mări stabilitatea ARN-ului de transport furnizat împreună cu QIAamp DSP Virus Kit, vă recomandăm să acționați în conformitate cu informațiile privind reconstituirea și depozitarea ARN-ului de transport, oferite în manualul de instrucțiuni („Prepararea reactivilor și a soluțiilor tampon”).

Înainte de începerea fiecărei extracții, trebuie preparat un amestec proaspăt de soluție tampon pentru liză și ARN de transport (și substanță de control internă, unde este cazul, consultați „Substanță de control internă” de mai jos), în conformitate cu schema de pipetare din Tabelul 5.

**Tabelul 5. Schemă de pipetare pentru utilizare cu QIAamp DSP Virus Kit**

Numărul de probe	1	12
Soluție tampon pentru liză (AL)*	550 $\mu$ l	6600 $\mu$ l
ARN de transport (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	6,2 $\mu$ l	74,4 $\mu$ l
<b>Volum total</b>	<b>556,2 <math>\mu</math>l</b>	<b>6674,4 <math>\mu</math>l</b>
<b>Volum pe extracție</b>	<b>500 <math>\mu</math>l</b>	<b>500 <math>\mu</math>l fiecare</b>

\* Conține clorhidrat de guanidină; consultați *Manualul QIAamp DSP Virus Kit* pentru informații privind siguranța.

**i** Utilizați imediat amestecul proaspăt preparat de soluție tampon pentru liză și ARN de transport pentru extracție. Depozitarea amestecului nu este posibilă.

**i** Substanța de control internă a *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit poate fi utilizată direct în procedura de izolare (consultați „Substanță de control internă” de mai jos).

## Substanță de control internă

Este furnizată o substanță de control internă (HI Virus-1 RG IC). Aceasta îi permite utilizatorului să controleze procedura de izolare a ARN-ului și să verifice posibila inhibare PCR. Pentru această aplicație, adăugați substanța de control internă pentru izolare la un raport de 0,1  $\mu$ l la 1  $\mu$ l de eluție în volum.

De exemplu, utilizând QIAamp DSP Virus Kit, ARN-ul este eluat în 60  $\mu$ l de soluție tampon pentru eluție (AVE). Astfel, la început trebuie adăugați 6  $\mu$ l de substanță de control internă.

**i** Substanța de control internă și ARN-ul de transport (consultați „Izolarea ARN-ului”, pagina 21) trebuie adăugate doar în amestecul de soluție tampon pentru liză și material de probă sau direct în soluția tampon pentru liză.

Substanța de control internă nu trebuie adăugată direct în materialul de probă. Dacă este adăugat în soluția tampon pentru liză, rețineți că amestecul de substanță de control internă și soluție tampon pentru liză – ARN de transport trebuie să fie proaspăt preparat și utilizat imediat (depozitarea amestecului la temperatura camerei sau în frigider timp de numai câteva ore poate duce la o eroare privind substanța de control internă și la o eficiență redusă a extracției).

**i** Nu adăugați substanța de control internă și ARN-ul de transport direct în materialul de probă.

Opțional, substanța de control internă poate fi utilizată exclusiv pentru verificarea existenței unei posibile inhibări PCR. Pentru această aplicație, adăugați substanța de control internă direct în amestecul de HI Virus-1 RG Master A și HI Virus-1 RG Master B, conform descrierii de la etapa 2b a protocolului (pagina 25).

## Setarea pragului pentru analiza PCR

Setările pragului optim pentru o anumită combinație între instrumentul Rotor-Gene Q și *artus* RG PCR Kit trebuie făcute empiric, prin testarea fiecărei combinații în parte, deoarece pragul reprezintă o valoare relativă, care depinde de fluxul de lucru general pentru diagnosticare. Ca punct de plecare, pragul poate fi setat la o valoare preliminară egală cu 0,04 pentru analiza primei testări PCR, dar această valoare trebuie reglată fin, în cadrul unei analize comparative a testărilor ulterioare ale fluxului de lucru. Pragul trebuie setat manual, chiar deasupra semnalului de fond al substanțelor de control negative și al probelor negative. Valoarea medie a pragului calculată din aceste experimente va funcționa, cel mai probabil, pentru cele mai multe testări ulterioare, dar utilizatorul trebuie să revizuiască valoarea de prag generată la intervale regulate. Valoarea de prag va fi, de obicei, cuprinsă în intervalul 0,03–0,05, și trebuie rotunjită la maximum trei zecimale.

## Cuantificarea

Substanțele standard de cuantificare incluse (HI Virus-1 RG QS 1–4) sunt tratate ca probe purificate anterior și se utilizează același volum (20  $\mu$ l). Pentru a genera o curbă standard pe instrumentele Rotor-Gene Q, toate cele 4 substanțe standard de cuantificare trebuie utilizate și definite în caseta de dialog „Edit Samples” (Editare probe) ca substanțe standard cu concentrațiile specificate (consultați manualul de utilizare al instrumentului).

① Substanțele standard de cuantificare sunt definite ca UI/μl.\* Ecuația următoare trebuie aplicată pentru transformarea valorilor determinate, utilizând curba standard, în UI/ml de material de probă:

$$\text{Rezultat (UI/ml)} = \frac{\text{Rezultat (UI/}\mu\text{l)} \times \text{Volum de eluție (}\mu\text{l)}}{\text{Volumul probei (ml)}}$$

În principiu, volumul inițial al probei trebuie introdus în ecuația de mai sus. Acesta trebuie luat în considerare atunci când volumul probei a fost modificat înainte de extracția acizilor nucleici (de exemplu, reducerea volumului prin centrifugare sau creșterea volumului prin adăugare la volumul necesar pentru izolare).

### **Factorul de conversie**

1 UI/ml corespunde unei valori de 0,50 copii/ml pentru detecția ARN-ului HIV-1 pe Rotor-Gene Q împreună cu prepararea manuală a probelor, utilizând QIAamp DSP Virus Kit. Factorul de conversie este o aproximare bazată pe un factor mediu pe tot intervalul dinamic al testului.

\* Substanța standard a fost calibrată utilizând Standardul internațional pentru HIV (International HIV Standard) (OMS).

# Protocol: PCR și analiza datelor

## **i** Informații importante înainte de a începe

- Înainte de începerea procedurii, consultați „Note importante”, paginile 19 – 22.
- Acordați-vă timp pentru a vă familiariza cu Rotor-Gene Q înainte de a începe protocolul. Consultați manualul de utilizare al instrumentului.
- Asigurați-vă că în fiecare testare PCR sunt incluse cel puțin o substanță standard de cuantificare și o substanță de control negativă (Apă, clasa PCR). Pentru a genera o curbă standard, utilizați toate cele 4 substanțe standard de cuantificare furnizate (HI Virus-1 RG QS 1–4) pentru fiecare testare PCR.

## Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Asigurați-vă că blocul de răcire (accesoriu al instrumentului Rotor-Gene Q) este răcit în prealabil la 2 – 8 °C.
- Înainte de fiecare utilizare, toți reactivii trebuie decongelați complet, amestecați (prin pipetare verticală repetată sau prin agitare rapidă) și centrifugați pentru scurt timp.

## Procedură

- 1. Amplasați numărul dorit de eprubete PCR în adaptoarele blocului de răcire.**
- 2. Dacă utilizați substanța de control internă pentru monitorizarea procedurii de izolare a ARN-ului și pentru verificarea existenței unei posibile inhibări PCR, parcurgeți etapa 2a. Dacă utilizați substanța de control internă exclusiv pentru verificarea existenței unei inhibări PCR, parcurgeți etapa 2b.**
- 2a. Substanța de control internă a fost adăugată deja pentru izolare (consultați „Substanță de control internă”, pagina 21). În acest caz, preparați un amestec master mix în conformitate cu Tabelul 6.**

De obicei, amestecul de reacție conține toți componentii necesari pentru PCR, cu excepția probei.



**Tabelul 6. Prepararea amestecului master mix (substanță de control internă utilizată pentru monitorizarea izolării ARN-ului și verificarea existenței inhibării PCR)**

<b>Numărul de probe</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Volum total</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>360 <math>\mu</math>l</b>

**2b. Substanța de control internă trebuie adăugată direct în amestecul de HI Virus-1 Master A și HI Virus-1 Master B. În acest caz, preparați un amestec master mix în conformitate cu Tabelul 7.**

De obicei, amestecul de reacție conține toți componenții necesari pentru PCR, cu excepția probei.

**Tabelul 7. Prepararea amestecului master mix (substanță de control internă utilizată exclusiv pentru verificarea existenței inhibării PCR)**

<b>Numărul de probe</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>Volum total</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>

\* Creșterea de volum provocată prin adăugarea substanței de control interne este neglijată la pregătirea testului PCR. Sensibilitatea sistemului de detecție nu este afectată.

- Pipetați câte 30  $\mu\text{l}$  de amestec master mix în fiecare eprubetă PCR. Apoi adăugați 20  $\mu\text{l}$  din ARN-ul de probă eluat (consultați Tabelul 8). În mod corespunzător, 20  $\mu\text{l}$  din cel puțin una dintre substanțele standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4) trebuie utilizați ca substanță de control pozitivă și 20  $\mu\text{l}$  de apă (Apă, clasa PCR) trebuie utilizați ca substanță de control negativă.

**Tabelul 8. Pregătirea testului PCR**

Numărul de probe	1	12
Amestec master mix	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ fiecare
Probă	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$ fiecare
<b>Volum total</b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math> fiecare</b>

- Închideți eprubetele PCR. Asigurați-vă că inelul de blocare (accesoriu al instrumentului Rotor-Gene) este amplasat pe partea superioară a rotorului pentru a preveni deschiderea accidentală a eprubetelor în timpul testării.
- Pentru detecția ARN HIV-1, creați un profil de temperatură în conformitate cu etapele următoare.

Setarea parametrilor generali ai testului	Figurile 5, 6, 7
Revers-transcrierea ARN-ului	Figura 8
Activarea inițială a enzimei cu amorsare la cald	Figura 9
Amplificarea ADN-ului complementar	Figura 10
Ajustarea sensibilității canalului de fluorescență	Figura 11
Pornirea testării	Figura 12

Toate specificațiile se referă la software-ul Rotor-Gene Q versiunea 1.7.94, la software-ul Rotor-Gene 6000 versiunile 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 și la software-ul Rotor-Gene 3000 versiunea 6.0.23. Puteți găsi informații suplimentare despre programarea instrumentelor Rotor-Gene în manualul de utilizare al instrumentului. În ilustrații, aceste setări sunt încercuite cu o linie neagră îngroșată. Ilustrațiile sunt incluse pentru instrumentele Rotor-Gene Q. Dacă sunt necesare valori diferite pentru Rotor-Gene 3000, aceste diferențe sunt descrise în text.

6. Mai întâi, deschideți caseta de dialog „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) (Figura 5). Bifați caseta „Locking Ring Attached” (Inel de blocare fixat), apoi faceți clic pe „Next” (Următorul).

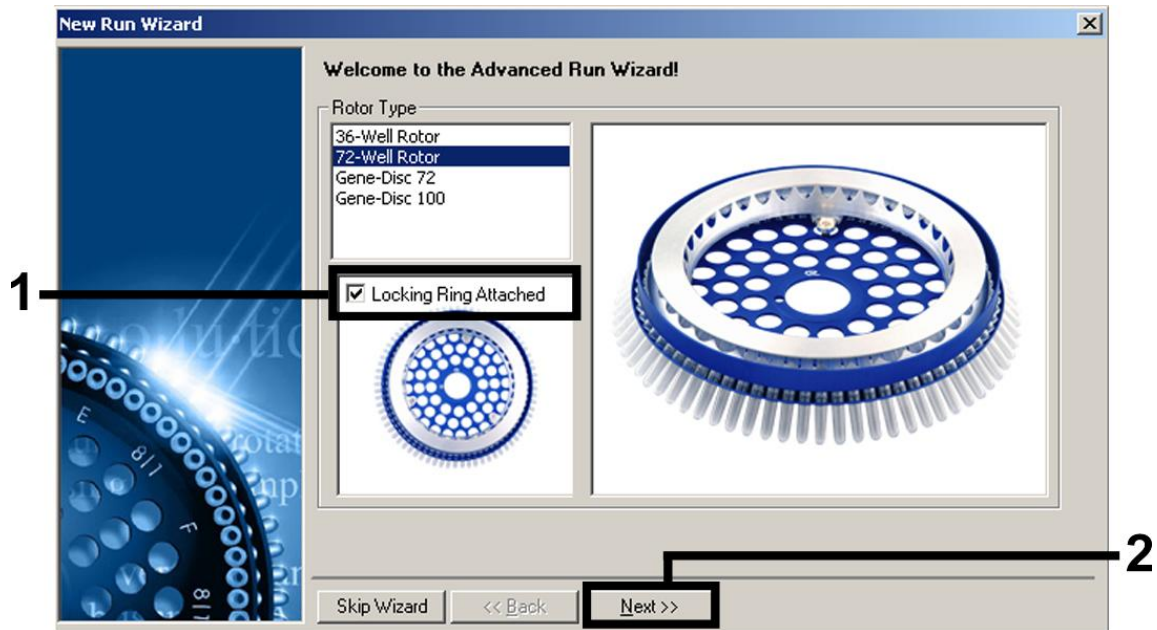


Figura 5. Caseta de dialog „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă).

7. Selectați 50 pentru volumul de reacție PCR, apoi faceți clic pe „Next” (Următorul) (Figura 6).

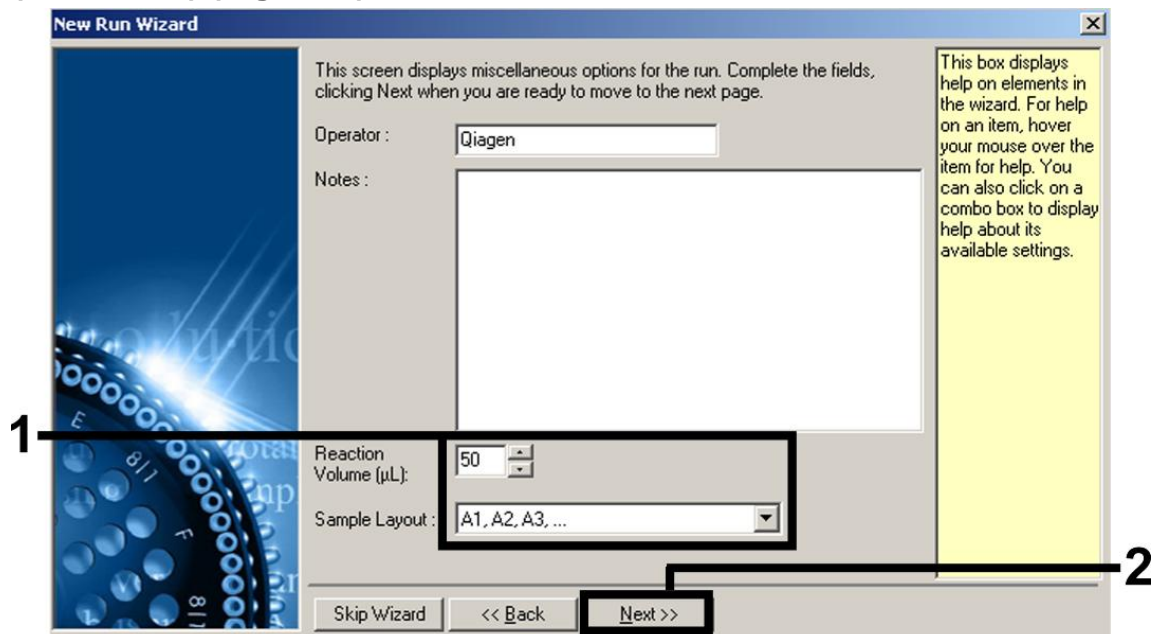


Figura 6. Setarea parametrilor generali ai testului.

8. Faceți clic pe butonul „Edit Profile” (Editare profil) din caseta de dialog următoare „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) (Figura 7) și programați profilul de temperatură conform celor prezentate în Figurile 7–10.

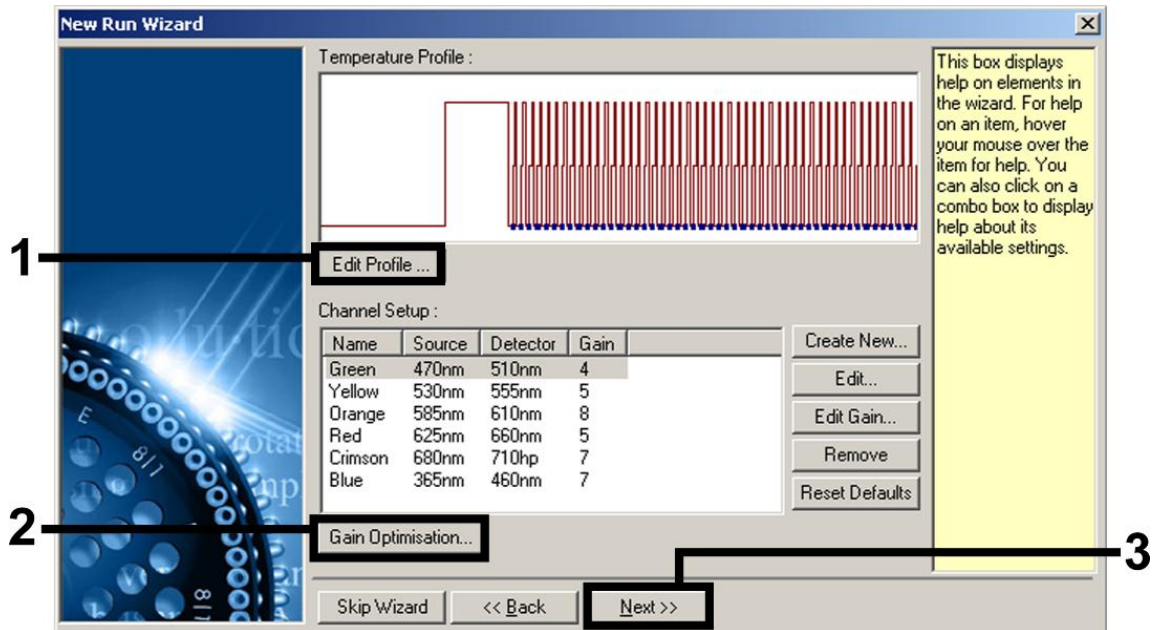


Figura 7. Editarea profilului.

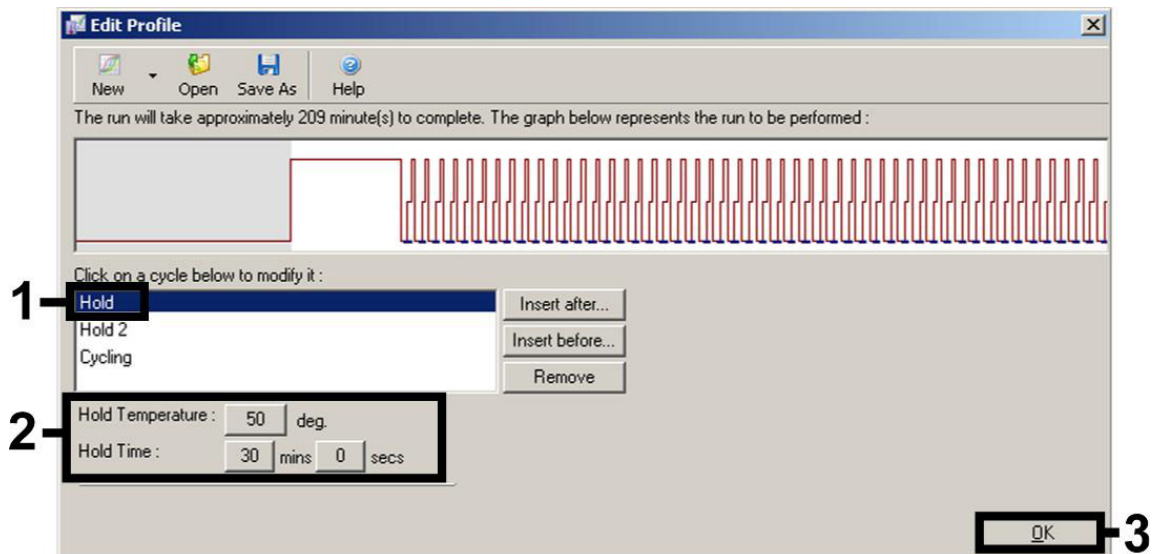


Figura 8. Revers-transcrierea ARN-ului.

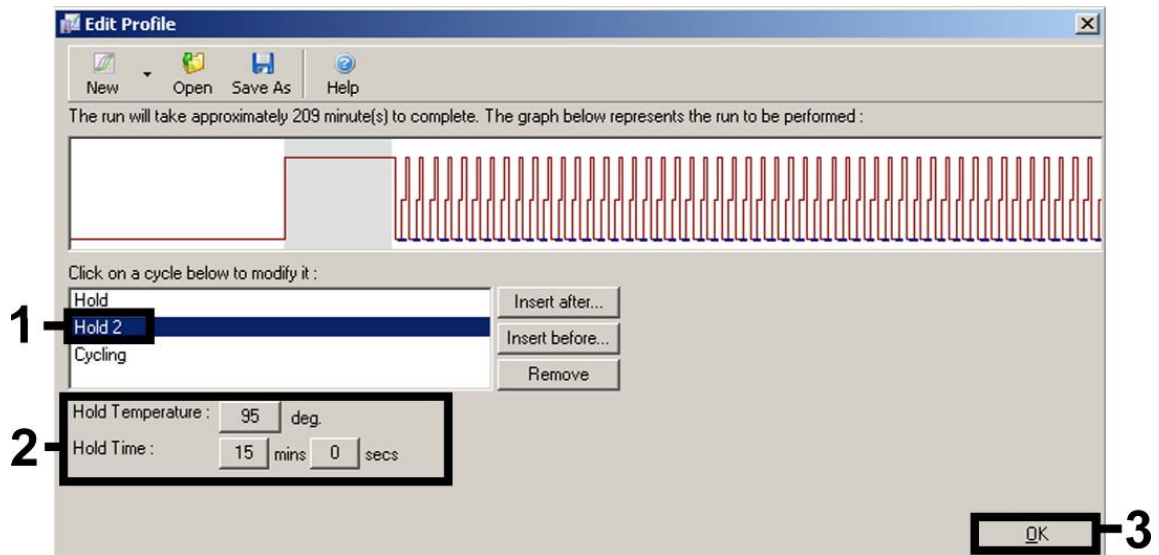


Figura 9. Activarea inițială a enzimei cu amorsare la cald.

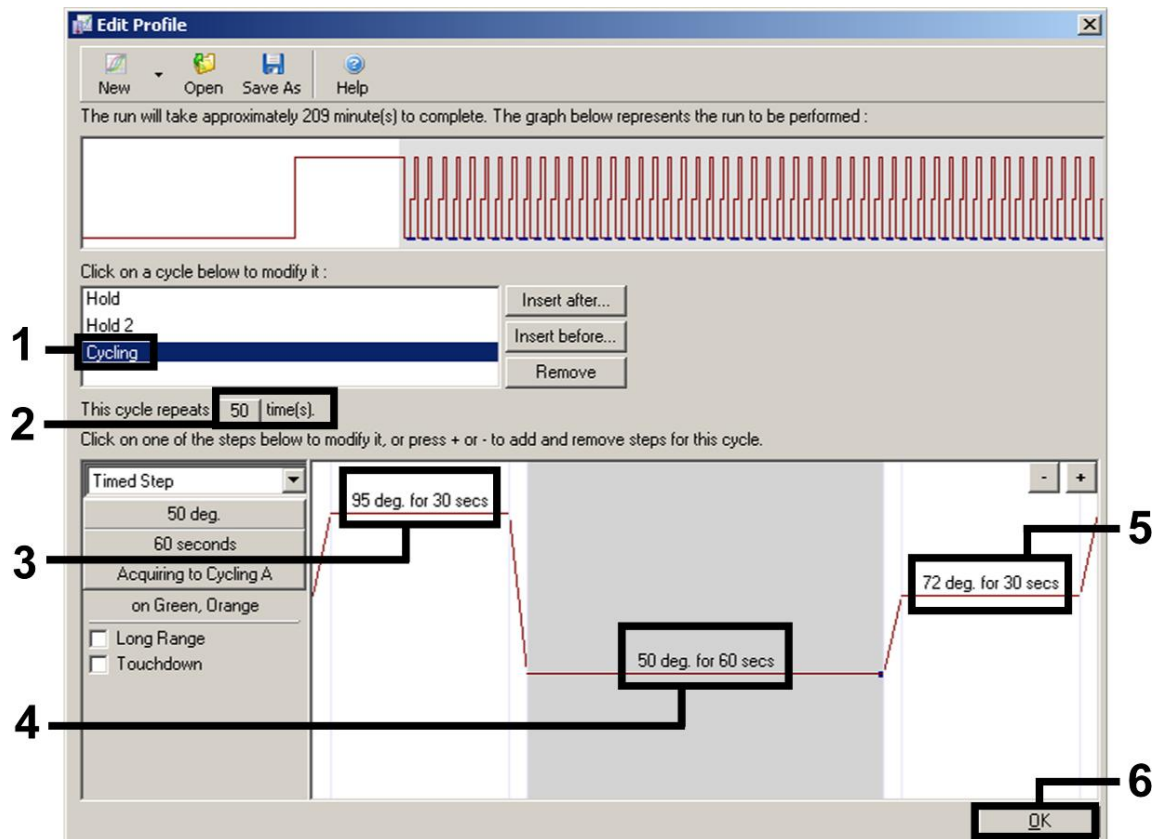
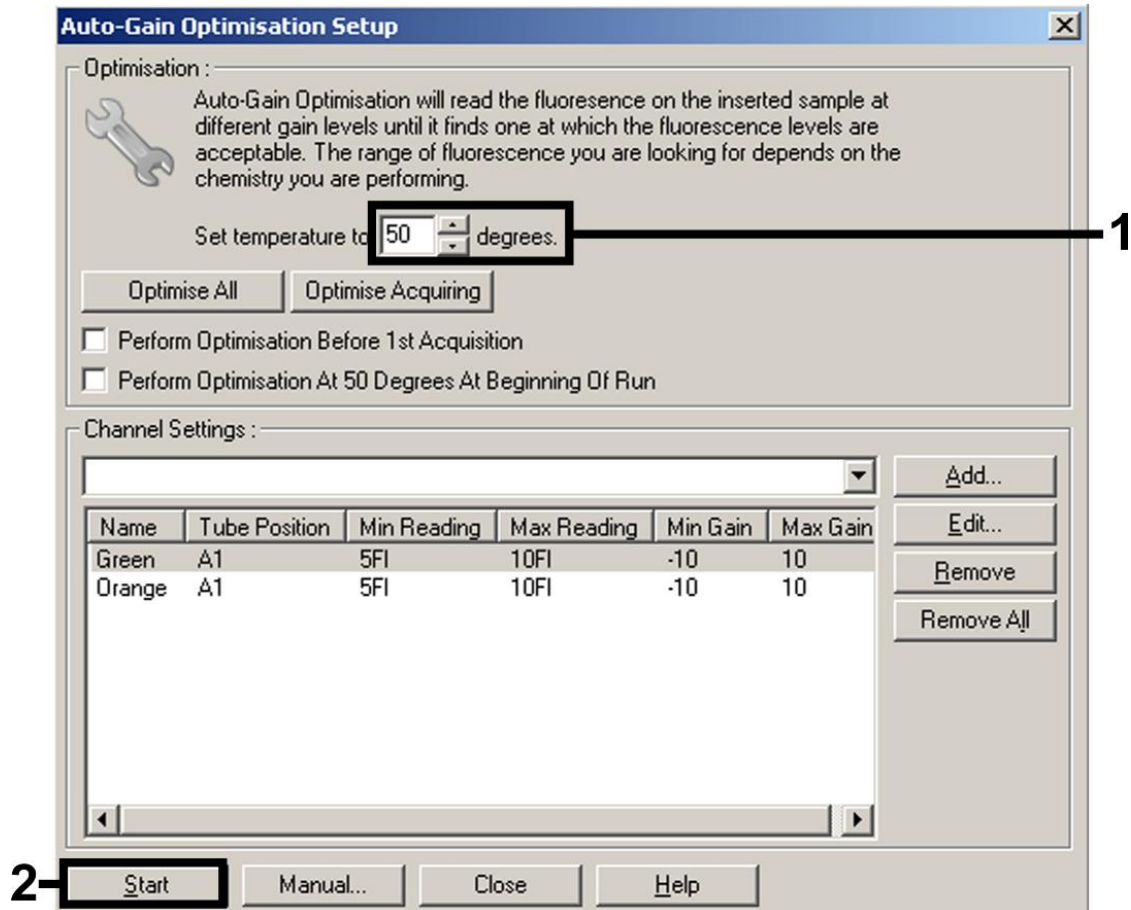


Figura 10. Amplificarea ADN-ului complementar. Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, software-ul va defini vopselele fluorescente drept „FAM/Sybr, ROX”.

9. Intervalul de detectare a canalelor de fluorescență trebuie determinat în funcție de intensitățile fluorescenței din eprubetele PCR. Faceți clic pe „Gain Optimisation” (Optimizare amplificare) în caseta de dialog „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) (consultați Figura 7) pentru a deschide caseta de dialog „Auto-Gain Optimisation Setup” (Configurarea optimizării amplificării automate). Setați temperatura de calibrare la 50 pentru a coincide cu temperatura de temperare a programului de amplificare (Figura 11).



**Figura 11. Ajustarea sensibilității canalului de fluorescență.** Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, software-ul va defini vopselele fluorescențe drept „FAM/Sybr” și „ROX”.

10. Valorile amplificării determinate prin calibrarea canalelor sunt salvate automat și sunt enumerate în ultima fereastră de meniu a procedurii de programare (Figura 12). Faceți clic pe „Start Run” (Pornire testare).

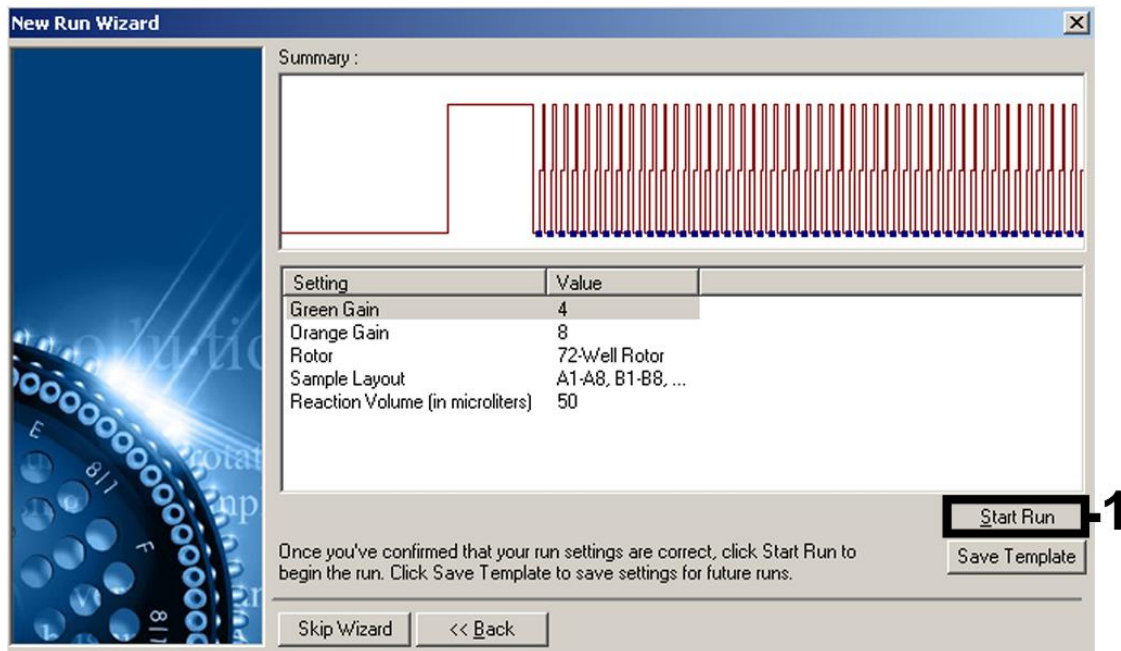


Figura 12. Pornirea testării. Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, software-ul va defini vopselele fluorescențe drept „FAM/Sybr” și „ROX”.

### 11. . Sunt posibile următoarele rezultate (11a, 11b și 11c).

Exemple de reacții PCR pozitive și negative sunt oferite în Figura 13 și în Figura 14.

Tabelul 9 prezintă instrucțiuni pentru interpretarea rezultatelor cantitative.

#### 11a. Este detectat un semnal pe canalul de fluorescență Cycling Green.

Rezultatul analizei este pozitiv: proba conține ARN- HIV-1.

În acest caz, detectarea semnalului pe canalul Cycling Orange nu este esențială, deoarece concentrațiile inițiale mari de ARN HIV-1 (semnal pozitiv pe canalul Cycling Green) pot duce la reducerea sau absența semnalului pentru fluorescență a substanței de control interne pe canalul Cycling Orange (concurență).

**i** Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, canalele relevante sunt Cycling A.FAM pentru semnalul pozitiv și Cycling A.ROX pentru substanța de control internă.

**11b. Pe canalul de fluorescență Cycling Green nu este detectat niciun semnal. În același timp, pe canalul Cycling Orange apare un semnal de la substanța de control internă.**

**În probă nu este detectabil niciun ARN HIV-1. Aceasta poate fi considerată negativă.**

În cazul unui HI Virus-1 RT-PCR negativ, semnalul detectat al substanței de control interne exclude posibilitatea inhibării RT-PCR.

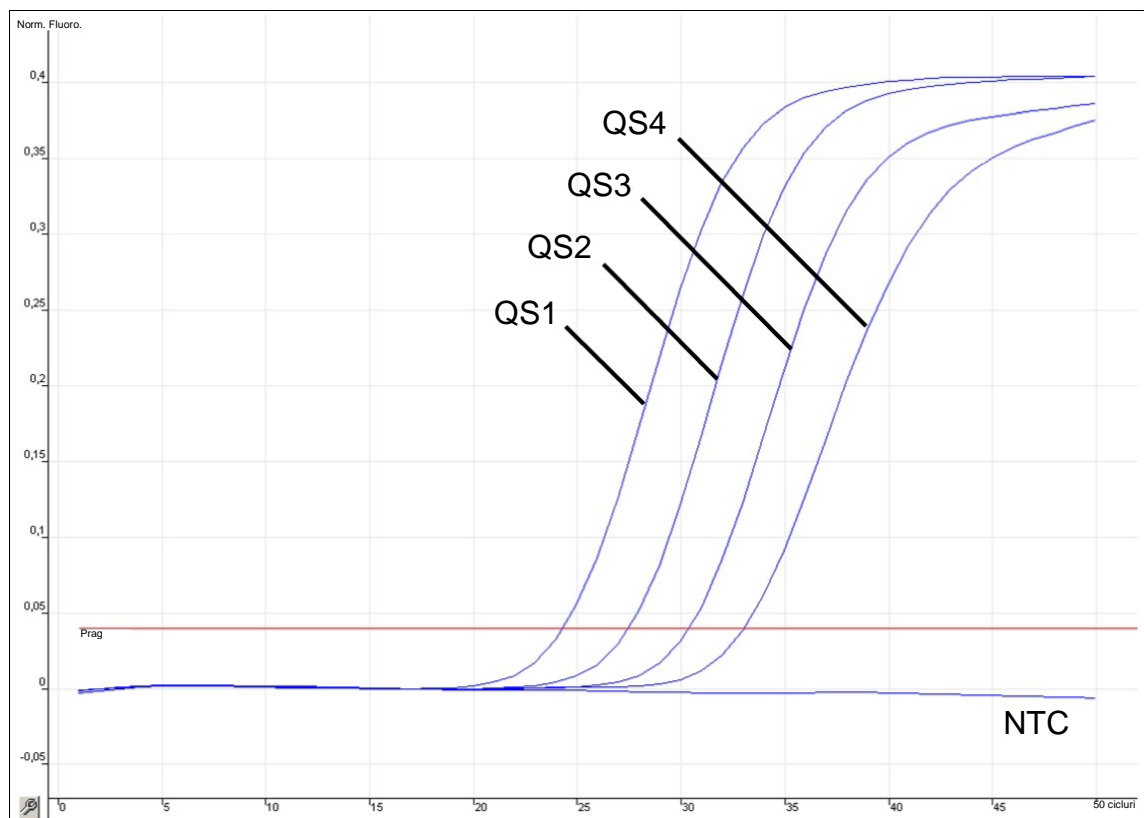
**i** Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, canalele relevante sunt Cycling A.ROX pentru substanța de control internă și lipsa unui semnal pentru Cycling A.FAM.

**11c. Nu este detectat niciun semnal pe canalul Cycling Green sau pe canalul Cycling Orange.**

**Nu se poate obține o concluzie cu privire la rezultate.**

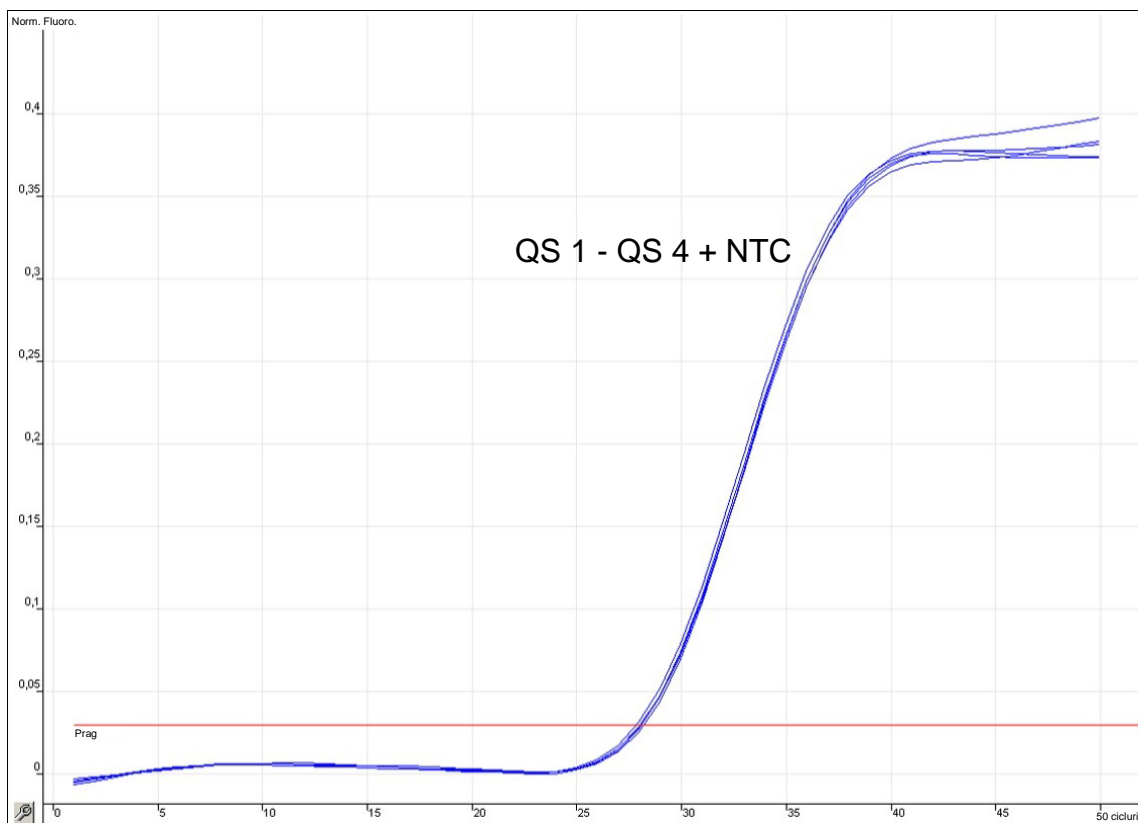
Informații privitoare la sursele de eroare și la soluțiile acestora pot fi găsite în „Ghid de remediere a problemelor”, pagina 34.

**i** Rețineți că, pe Rotor-Gene 3000, canalele relevante sunt Cycling A.FAM și Cycling A.ROX.



**Figura 13. Detectarea substanțelor standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4) pe canalul de fluorescență Cycling Green. NTC: No template control (substanță de control fără șablon) (substanță de control negativă).**





**Figura 14. Detectarea substanței de control interne (internal control, IC) pe canalul de fluorescență Cycling Orange cu amplificarea simultană a substanțelor standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (substanță de control fără șablon) (substanță de control negativă).**

### Tabelul 9. Interpretarea rezultatelor cantitative

Rezultat	Interpretare
ARN HIV >72 UI/ml	Rezultatul se încadrează în intervalul de testare determinat. Probabilitatea de detectare a ARN-ului HIV este > 95%. Rezultatul pozitiv al testării este asigurat din punct de vedere statistic.
ARN HIV <72 UI/ml	Rezultatul nu se încadrează în intervalul de testare determinat. Reproducibilitatea rezultatului pozitiv nu este asigurată.
ARN HIV negativ	Nu s-a detectat niciun ARN HIV.






## Ghid de remediere a problemelor

Acest ghid de remediere a problemelor poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, a se vedea și pagina „Întrebări frecvente” din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Cercetătorii din cadrul Serviciilor Tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocoalele din acest manual, precum și despre tehnologiile de prelevare și dozare (pentru datele de contact, a se vedea coperta a patra sau vizitați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Comentarii și sugestii

---






#### Niciun semnal cu substanțe de control pozitive (HI Virus-1 RG QS 1–4) pe canalul de fluorescență Cycling Green sau Cycling A.FAM

- a) Canalul de fluorescență selectat pentru analiza datelor PCR nu respectă protocolul  Pentru analiza datelor selectați canalul de fluorescență Cycling Green sau Cycling A.FAM pentru HI Virus-1 RT-PCR analitică și canalul de fluorescență Cycling Orange sau Cycling A.ROX pentru RT-PCR cu substanță de control internă.
- b) Programarea incorectă a profilului de temperatură al instrumentului Rotor-Gene  Comparați profilul de temperatură cu protocolul. Consultați „Protocol: PCR și analiza datelor”, pagina 24.
- c) Configurarea incorectă a PCR  Verificați etapele de lucru prin confruntare cu schema de pipetare, apoi repetați PCR, dacă este necesar. Consultați „Protocol: PCR și analiza datelor”, pagina 24.
- d) Condițiile de depozitare pentru una sau mai multe componente ale kitului nu au respectat instrucțiunile din „Depozitarea” (pagina 6)  Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.
- e) *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a expirat  Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.

## Comentarii și sugestii

---

### **Semnal slab sau lipsă al substanței de control interne pe canalul de fluorescență Cycling Orange sau Cycling A.ROX și absența simultană a unui semnal pe canalul Cycling Green sau Cycling A.FAM**

- a) Condițiile PCR nu respectă protocolul  Verificați condițiile PCR (a se vedea mai sus) și repetați PCR cu setările corectate, dacă este necesar.
- b) PCR a fost inhibată  Asigurați-vă că utilizați metoda de izolare recomandată și că respectați cu strictețe instrucțiunile producătorului.
- c) ARN-ul s-a pierdut în timpul extracției  Dacă substanța de control internă a fost adăugată în extracție, un semnal absent al substanței de control interne poate indica pierderea ARN-ului în timpul extracției. Asigurați-vă că utilizați metoda de izolare recomandată (consultați „Izolarea ARN-ului”, pagina 21) și că respectați cu strictețe instrucțiunile producătorului.
- d) Condițiile de depozitare pentru una sau mai multe componente ale kitului nu au respectat instrucțiunile din „Depozitarea” (pagina 6)  Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.
- e) *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit a expirat  Verificați condițiile de depozitare și data de expirare (consultați eticheta kitului) ale reactivilor și utilizați un kit nou, dacă este necesar.

## Comentarii și sugestii

---

### Semnale cu substanțe de control negative pe canalul de fluorescență Cycling Green sau Cycling A.FAM al PCR analitică

- a) A avut loc contaminarea în timpul pregătirii PCR
- ① Repetați PCR cu reactivi noi în duplicate.
  - ① Dacă este posibil, închideți eprubetele PCR imediat după adăugarea probei care trebuie testată.
  - ① Asigurați-vă că substanțele de control pozitive sunt pipetate ultimele.
  - ① Asigurați-vă că spațiul de lucru și instrumentele sunt decontaminate la intervale regulate.
- b) A avut loc contaminarea în timpul extracției
- ① Repetați extracția și PCR ale probei care urmează să fie testată folosind reactivi noi.
  - ① Asigurați-vă că spațiul de lucru și instrumentele sunt decontaminate la intervale regulate.

## Referințe

QIAGEN păstrează o bază de date online generoasă și actualizată, de publicații științifice privind utilizarea produselor QIAGEN. Opțiunile comprehensive de căutare vă permit să găsiți articolele necesare, fie prin intermediul unei căutări simple după cuvinte-cheie, fie prin specificarea aplicației, a domeniului de cercetare, a titlului etc.

Pentru o listă completă a referințelor, vizitați QIAGEN Reference Database online, la [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) sau contactați Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local.

## Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	Pentru 24 de reacții: 2 soluții master, 4 substanțe standard de cuantificare, substanță de control internă, apă (clasa PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	Pentru 96 de reacții: 2 soluții master, 4 substanțe standard de cuantificare, substanță de control internă, apă (clasa PCR)	4513265
<b>QIAamp DSP Virus Kit – pentru purificarea acizilor nucleici virali din plasma umană în scopul diagnosticării in vitro</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Pentru 50 de preparări: Coloane QIAamp MinElute® Spin, soluții tampon, reactivi, eprubete, prelungitoare pentru coloane și conectori VacConnector	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx – pentru analiza PCR în timp real validată de IVD în aplicații clinice</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclator pentru PCR în timp real cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclator pentru PCR în timp real cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclator pentru PCR în timp real și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002033

<b>Produs</b>	<b>Cuprins</b>	<b>Nr. cat.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclator pentru PCR în timp real și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrument pentru PCR în timp real cu 6 canale (albastru, verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), inclusiv laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrument pentru PCR în timp real cu 6 canale (albastru, verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), inclusiv laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002042
<b>Rotor-Gene Q – pentru o performanță remarcabilă în PCR în timp real</b>		
Rotor-Gene Q 5plex System	Ciclator pentru PCR în timp real cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Ciclator pentru PCR în timp real cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Ciclator pentru PCR în timp real și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9001650

<b>Produs</b>	<b>Cuprins</b>	<b>Nr. cat.</b>
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Ciclator pentru PCR în timp real și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrument pentru PCR în timp real cu 6 canale (albastru, verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), inclusiv laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Instrument pentru PCR în timp real cu 6 canale (albastru, verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins), inclusiv laptop, software, accesorii, garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9001590
<b>Accesorii Rotor-Gene Q</b>		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc din aluminiu pentru configurarea manuală a reacției, cu o pipetă cu un singur canal, în 72 x eprubete de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloc din aluminiu pentru configurarea manuală de reacției pe o serie standard de 8 x 12, utilizând 96 x eprubete de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 de benzi de câte 4 eprubete și capace pentru 1000 de reacții	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 de benzi de câte 4 eprubete și capace pentru 10.000 de reacții	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 de eprubete cu pereți subțiri, pentru 1000 de reacții	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 de eprubete cu pereți subțiri, pentru 1000 de reacții	981008



Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kit-ului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kit-urile QIAGEN sunt disponibile pe [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sau pot fi solicitate de la Serviciul tehnic QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat

Această pagină a fost lăsată liberă în mod intenționat



Achiziționarea acestui produs îi permite cumpărătorului să îl utilizeze pentru a efectua servicii de diagnosticare pentru diagnosticare in vitro la om. Nu se acordă niciun brevet general sau nicio altă licență, de altă natură, decât acest drept specific de utilizare de la cumpărare.

Mărci comerciale: 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 Kit și QIAamp DSP Virus Kit sunt kituri de diagnosticare cu marcaj CE, în conformitate cu Directiva europeană 98/79/CE privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro. Nu sunt disponibile în toate țările.

#### **Acord de licență limitată**

Utilizarea acestui produs implică acceptarea următoarelor clauze de către oricare cumpărător sau utilizator al *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit:

1. *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit poate fi utilizat numai în conformitate cu Manualul *artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit* și numai împreună cu componentele conținute în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, cu excepția celor descrise în Ghidul *artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit* și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

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)

