

Příručka pro sadu *artus*[®] HCV QS- RGQ



24 (katalogové č. 4518363)



72 (katalogové č. 4518366)

Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístroji QIASymphony[®] SP/AS a Rotor-Gene[®] Q



REF

4518363, 4518366



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R6 **MAT** 1060924CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Zamýšlené použití	4
Souhrn a vysvětlení	4
Informace o patogenu	5
Dodávané materiály	6
Obsah sady	6
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	7
Varování a bezpečnostní opatření	7
Všeobecná bezpečnostní opatření	8
Uchovávání a nakládání s reagensy	8
Uchovávání a nakládání se vzorky	8
Postup	9
Práce s přístroji QIASymphony SP/AS	9
Purifikace virové RNA	9
Použití interní kontroly a nosiče RNA (CARRIER)	9
Kontrolní soupravy analýz a soupravy parametrů analýz	9
Výtěžky nukleových kyselin	10
Uchovávání nukleových kyselin	10
Protokoly	
■ Izolace RNA a nastavení analýzy na přístroji QIASymphony SP/AS	11
■ RT-PCR na Rotor-Gene Q	16
Interpretace výsledků	17
Řešení problémů	17
Řízení jakosti	21
Omezení	22
Charakteristiky chování	22
Literatura	23
Symboly	23
Kontaktní informace	24
Informace o způsobu objednávání	25

Zamýšlené použití

Sada *artus* HCV QS-RGQ je test amplifikace nukleových kyselin in vitro pro kvantifikaci RNA viru hepatitidy C (HCV) v lidské EDTA plazmě. Tato diagnostická sada využívá polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí (RT-PCR) a je konfigurována pro použití s přístroji QIASymphony SP/AS a Rotor-Gene Q.

Sada *artus* HCV QS RGQ je určena k použití ve spojení s klinickou prezentací a dalšími laboratorními ukazateli pro stanovení prognózy onemocnění a slouží jako pomůcka při posuzování virologické odpovědi na léčbu antivirotiky hodnocené podle změn hladiny RNA viru HCV v lidské EDTA plazmě. Sada *artus* HCV QS-RGQ není míněna jako screeningový test na HCV ani jako diagnostický test k potvrzení přítomnosti infekce HCV.



Další informace o specifických lidských biologických vzorcích, se kterými byla sada validována, viz příslušné aplikační listy, které jsou k dispozici online na adrese www.qiagen.com/products/artushcivrqpckitce.aspx.

Vzhledem k tomu, že společnost QIAGEN kontinuálně monitoruje účinnost analýzy a validuje nové nároky, uživatelé musí zajistit, že pracují s poslední revizí návodu k použití.



Před samotným testem si ověřte dostupnost nových revizí elektronického značení na adrese www.qiagen.com/products/artushcivrqpckitce.aspx.

Všechny soupravy lze použít s příslušnými návody, pokud se číslo verze příručky a další informace o označování shoduje s číslem verze soupravy. Číslo verze je viditelně vyznačeno na každém štítku krabice soupravy. Společnost QIAGEN zajišťuje kompatibilitu mezi všemi šaržemi testovacích souprav se stejným číslem verze.

Souhrn a vysvětlení

Sada *artus* HCV QS-RGQ je systém k přímému použití pro průkaz RNA HCV pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na přístrojích Rotor-Gene Q s přípravou vzorků a nastavením rozboru za užití přístrojů QIASymphony SP/AS. Směsi Hep. C Virus RG Master A a B obsahují reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci úseku 240 bp genomu HCV a také pro bezprostřední detekci specifického amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q.

Kromě toho sada *artus* HCV QS-RGQ obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange přístroje Rotor-Gene Q. Limit detekce analytické HCV PCR přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (Hep. C Virus RG QS 1–4), s jejichž pomocí lze určit množství virové RNA. Další

informace získáte na příslušném aplikačním listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcvrgpckitce.aspx.

Informace o patogenu

Hepatitis C je zánět jater způsobený virem stejného názvu. Na rozdíl od ostatních virů hepatitidy A, B, D nebo E způsobuje infekce virem hepatitidy C (HCV) ve vysokém počtu případů chronické jaterní onemocnění. Infekce HCV se často po relativně dlouhou dobu neprojevuje žádnými příznaky. Z tohoto důvodu většina pacientů o své infekci HCV neví. Léčba je však nejúčinnější v prvních stádiích onemocnění. V současné době je jedinou prokázanou účinnou léčbou interferon α (v kombinaci s Ribavirinem). Je však také známo, že na léčbu interferonem reagují pouze někteří pacienti s chronickou hepatitidou C. Za určitých okolností může být proto tato nákladná léčba pacienta nepříznivá a může mít závažné nežádoucí účinky, jako je narušení imunitního systému vedoucímu ke zhoršení (např. opary na rtech, pásový opar). (1–4)

Dodávané materiály

Obsah sady

artus HCV QS-RGQ Kit		(24)	(72)
Katalogové č.		4518363	4518366
Počet reakcí		24	72
Modrá	Hep. C Virus RG Master A (směs Hep. C Virus RG Master A)	4 x 144 µl	8 x 144 µl
Fialová	Hep. C Virus RG Master B (směs Hep. C Virus RG Master B)	4 x 216 µl	8 x 216 µl
Červená	Hep. C Virus RG QS 1* (10 ⁴ IU/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	Hep. C Virus RG QS 2* (10 ³ IU/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	Hep. C Virus RG QS 3* (10 ² IU/µl)	QS 200 µl	200 µl
Červená	Hep. C Virus RG QS 4* (10 ¹ IU/µl)	QS 200 µl	200 µl
Zelená	Hep. C Virus RG IC [†]	IC 1000 µl	2 x 1000 µl
Bílá	Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	1000 µl	1000 µl
	<i>artus HCV QS-RGQ Kit Handbook</i> (Příručka pro sadu artus HCV QS-RGQ) (anglicky)	1	1

* Kvantifikační standard.

† Interní kontrola.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

- Pipety (nastavitelné)* a sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Třepačka vortex*
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 2 ml reakční zkumavky, schopná centrifugace o 6800 x g

Pro přípravu vzorků

- QIASymphony SP instrument (Přístroj QIASymphony SP) (kat. č. 9001297)*
- QIASymphony AS instrument (Přístroj QIASymphony AS) (kat. č. 9001301)*

Pro PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*†
- Software Rotor-Gene Q, verze 2.1 nebo vyšší
- Volitelné: Rotor-Gene AssayManager, verze 1.0 nebo vyšší

Poznámka: Další informace o materiálech požadovaných pro specifické aplikace jsou uvedeny na příslušném aplikačním listu na adrese www.qiagen.com/products/artushcvgpcrkitce.aspx.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN® a pro každou komponentu těchto sad.

Bezpečnostní informace pro používanou purifikační soupravu naleznete v odpovídající příručce k soupravě. Bezpečnostní informace k přístrojům naleznete v odpovídajících uživatelských manuálech dodávaných s přístroji.

*Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

†Pokud to bude vhodné, přístroj Rotor-Gene Q 5plex HRM s datem výroby leden 2010 nebo pozdějším. Datum výroby lze získat ze sériového čísla na zadní straně přístroje. Sériové číslo je ve formátu „mmrrnnn“, kde „mm“ označuje měsíc výroby jako dvojce čísel, „rr“ označuje poslední dvě číslice roku výroby a „nnn“ označuje jedinečný identifikátor přístroje.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Vždy dbejte na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Během manuálních kroků ponechávejte zkumavky pokud možno zavřené, aby se předešlo kontaminacím.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Následně komponenty řádně promíchejte (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo pulzní třepačka) a krátce centrifugujte. Ujistěte se, že v reagenčních zkumavkách není žádná pěna nebo bubliny.
- Nepoužívejte dohromady komponenty souprav jiných šarží.
- Ověřte, že jsou potřebné adaptéry předem vychlazený na 2–8 °C.
- Pracujte rychle a udržujte reagenty PCR před vkládáním na ledu nebo v chladicím bloku.
- Pracujte plynule od jedné části pracovního procesu ke druhé. Nepřekročte dobu 30 minut při přenosech mezi jednotlivými moduly (QIASymphony SP do QIASymphony AS do Rotor-Gene Q).

Uchovávání a nakládání s reagenty

Komponenty sady *artus* HCV QS-RGQ se skladují při teplotě –15 až –30 °C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (>2 x), snižuje se tím účinnost analýzy.

Uchovávání a nakládání se vzorky

Informace o nakládání se vzorky a jejich uchovávání pro specifické aplikace jsou uvedeny na příslušném aplikačním listu na adrese www.qiagen.com/products/artushcvcrgpcrkitce.aspx.

Postup

Práce s přístroji QIA Symphony SP/AS

Zavřete všechny zásuvky a víka.

Zapněte přístroje QIA Symphony SP/AS a vyčkejte, dokud se neobjeví obrazovka „Sample Preparation“ (Příprava vzorků) a nedokončí se inicializační proces.

Přihlaste se do systému přístroje (zásuvky se odemknou).

Purifikace virové RNA

Sada *artus* HCV QS-RGQ byla validována purifikací virové RNA provedenou na přístroji QIA Symphony SP použitím sady QIA Symphony DSP Virus/Pathogen. Veškeré informace o přípravě zásobníku s reagenциemi pro krok purifikace vzorku u QIA Symphony SP viz *Příručka QIA Symphony DSP Virus/Pathogen*.

Použití interní kontroly a nosiče RNA (CARRIER)

Použití sad QIA Symphony DSP Virus/Pathogen ve spojení se sadou *artus* HCV QS-RGQ vyžaduje zapojení interní kontroly (Hep. C Virus RG IC) do purifikační procedury, aby se mohla monitorovat efektivita přípravy vzorku a následných rozborů. Kromě toho mohou sady QIA Symphony DSP Virus/Pathogen vyžadovat přípravu nosiče RNA (CARRIER). Specifické informace týkající se interní kontroly a použití nosiče RNA (CARRIER) získáte na příslušném aplikačním listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcvgpcrkitce.aspx.

Kontrolní soupravy analýz a soupravy parametrů analýz

Kontrolní soupravy analýzy jsou kombinací protokolu a dodatečných parametrů, jako např. interní kontroly, pro purifikaci vzorku na QIA Symphony SP. U každého protokolu je předinstalována výchozí kontrolní souprava analýzy.

Soupravy parametrů analýzy jsou kombinací definice analýzy s dodatečnými definovanými parametry, jako např. počtem replikátů a počtem standardů v analýze, pro nastavení analýzy na QIA Symphony AS.

Pro integrované běhy na QIA Symphony SP/AS je sada parametrů analýzy přímo spojena s kontrolní sadou analýzy specifikující související proces purifikace vzorku.

Výtěžky nukleových kyselin

Eluáty připravené pomocí nosiče RNA (CARRIER) mohou obsahovat mnohem více nosiče RNA (CARRIER) než cílové nukleové kyseliny. Pro určení výtěžků doporučujeme používat kvantitativní metody amplifikace.

Uchovávání nukleových kyselin

V případě krátkodobého uchovávání do 24 hodin doporučujeme uchovávat purifikované nukleové kyseliny při teplotě 2–8 °C. Pro dlouhodobé uchovávání delší než 24 hodin doporučujeme uchovávat při teplotě –20 °C.

Protokol: Izolace RNA a nastavení analýzy na přístroji QIASymphony SP/AS

Následující popis je obecný protokol pro používání sad QIASymphony DSP Virus/Pathogen. Podrobné informace o specifickém použití, včetně objemů a zkumavek, jsou uvedeny na příslušném aplikačním listu na adrese www.qiagen.com/products/artushcvcrgpcrkitce.aspx.

Důležité body před zahájením

- Ujistěte se, že jste dobře obeznámeni s obsluhou přístrojů QIASymphony SP/AS. Návod k použití je součástí uživatelských příruček dodaných spolu s přístroji a většina aktuálních verzí je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/qiasymphonyrgq.aspx.
- Před prvním použitím zásobníku s reagensy (RC) zkontrolujte, zda pufrы QSL2 a QSB1 v zásobníku (RC) neobsahují precipitát. V případě potřeby vyjměte vaničky obsahující pufrы QSL2 a QSB1 ze zásobníku s reagensy (RC) a inkubujte je po dobu 30 minut při teplotě 37 °C za občasného třepání, aby se precipitát rozpustil. Ujistěte se, že jsou vaničky znovu umístěny do správných pozic. Pokud je zásobník s reagensy (RC) již propíchnut, ujistěte se, že jsou vaničky utěsněny pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků a inkubujte celý zásobník s reagensy (RC) ve vodní lázni po dobu 30 minut při teplotě 37 °C za občasného třepání.*
- Pokuste se předejít prudkému třepání zásobníkem s reagensy (RC), jinak by se mohla vytvořit pěna, která může vést k problémům s detekcí hladiny tekutiny.
- Pracujte rychle a udržujte reagenty PCR před vkládáním na led nebo v chladicím bloku.
- Objemy reagentů jsou optimalizované pro 24 nebo 72 reakcí na jednu soupravu a na jeden běh (kat. č. 4518363 a 4518366 v daném pořadí).
- Před každým použitím musí být všechny reagenty zcela rozmrazeny, promíchány (opakovaným náběrem pipetou a vypuštěním pipety nebo krátkým vortexem) a minimálně 3 sekundy centrifugovány při 6800 x g. Zamezte vytvoření pěny.
- Eluáty z přípravy vzorku a všechny komponenty sady *artus* HCV QS-RGQ byly v přístrojích prokázány jako stabilní minimálně po běžnou dobu potřebnou pro purifikaci 96 vzorků a pro nastavení testu pro 72 rozborů, včetně doby přenosu z QIASymphony SP do QIASymphony AS o délce až 30 minut a doby přenosu z QIASymphony AS do Rotor-Gene Q o délce až 30 minut.

*Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Připravit všechny potřebné směsi. Potřebné směsi obsahující nosič RNA (CARRIER) a interní kontroly připravte bezprostředně před začátkem procesu. Další informace získáte na příslušném aplikačním listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcsvgpckitce.aspx.
- Před začátkem procedury se ujistěte, že jsou magnetické částice plně resuspendovány. Vaničku obsahující magnetické částice před prvním použitím minimálně 3 minuty rázně vortexujte.
- Před vložením zásobníku s reagensy (RC) odstraňte víčko z vaničky obsahující magnetické částice a otevřete zkumavky s enzymy. Ujistěte se, že byl stojánek s enzymy vytemperován na pokojovou teplotu (15–25 °C).
- Ujistěte se, že je děrovací víčko (PL) umístěno na zásobníku s reagensy (RC) a že víčko vaničky s magnetickými částicemi bylo odstraněno nebo - pokud používáte částečně použitý zásobník s reagensy (RC) - se ujistěte, že byly odstraněny opětovně použitelné uzavírací proužky.
- Pokud jsou vzorky opatřeny čárovým kódem, vložte je do nosiče zkumavky nasměrované tak, aby čárový kód ležel pod čtečkou čárových kódů v zásuvce „Sample“ (Vzorek) na levé straně přístroje QIASymphony SP.

Postup

Purifikace virové RNA na přístroji QIASymphony SP

1. **Zavřete všechny zásuvky a víka přístrojů QIASymphony SP/AS.**
2. **Zapněte přístroje a vyčkejte, dokud se neobjeví obrazovka „Sample Preparation“ a nedokončí se inicializační proces.**
Vypínač je umístěn v levém spodním rohu přístroje QIASymphony SP.
3. **Přihlaste se do systému přístrojů.**
4. **Připravte následující zásuvky podle příslušného aplikačního listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcsvgpckitce.aspx.**
 - Zásuvka „Waste“ (Odpad); po přípravě proveďte kontrolu vloženého obsahu.
 - Zásuvka „Eluate“ (Eluát); po přípravě proveďte kontrolu vloženého obsahu.
 - Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál); po přípravě proveďte kontrolu vloženého obsahu.
 - Zásuvka „Sample“

- 5. Pomocí nastavení „Integrated run“ (Integrovaný běh) na dotykové obrazovce QIASymphony zadejte požadované informace o každé zpracovávané sadě vzorků. Zvolte sadu parametrů analýzy pro daný běh a přiřadte odpovídající sadu AS pro vzorky.**

Informace o sadě parametrů analýzy a předvolené eluční objemy jsou uvedeny v příslušném aplikačním listu.

Více informací o integrovaných bězích u přístrojů QIASymphony SP/AS naleznete v uživatelských manuálech dodávaných s přístroji.

- 6. Při nastavování integrovaného běhu zkontrolujte správné přiřazení laboratorních přístrojů pro vzorky, typ vzorku (vzorek, EC+ a EC–) a objemy.**

Informace o spotřebních materiálech a komponentech vkládaných do jednotlivých zásuvek jsou uvedeny v příslušném aplikačním listu.

- 7. Po zadání informací o všech sadách integrovaného běhu klepněte na tlačítko „Ok“ pro opuštění nastavení aplikace „Integrated run“. Stav všech sad v přehledu integrovaného běhu se mění z „LOADED“ (VLOŽENO) na „QUEUED“ (ZAŘAZENO). Jakmile je jedna sada zařazena, objeví se tlačítko „Run“ (Spustit). Stiskněte tlačítko „Run“ pro spuštění procedury.**

Všechny kroky zpracování jsou plně automatizované.

Vložení zásuvek QIASymphony AS pro nastavení analýzy

- 8. Po zařazení integrovaného běhu otevřete zásuvky QIASymphony AS. Potřebné komponenty pro vložení jsou zobrazeny na dotykové obrazovce.**
- 9. Před integrovaným během nezapomeňte provést následující.**
 - Vložte odpadní žlábek na špičky
 - Zlikvidujte odpadní sáček na špičky
 - Nasaďte prázdný odpadní sáček na špičky
- 10. Definujte a vložte stojánek (stojánky) v analýze. Stojánek (stojánky) v analýze v předem vychlazeném adaptéru (adaptérech) se vloží do drážky (drážek) „Assay“ (analýza). Informace o stojáncích v analýze jsou uvedeny v příslušném aplikačním listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcivrqpckitce.aspx.**
- 11. Zkontrolujte teplotu na chladicích pozicích.**

Jsou-li cílové teploty chlazení dosaženy, barva malé hvězdičky vedle drážek se změní na zelenou.
- 12. Před použitím sdružte všechny zkumavky s HCV RG Master A jedné sady do jedné zkumavky. Před použitím sdružte všechny zkumavky s HCV RG Master B jedné sady do jedné zkumavky.**

Poznámka: S viskózními reagensii může být obtížné manipulovat pomocí manuálních pipet. Ujistěte se, že byl do zkumavky převeden celý objem Master.

13. Naplňte každou reagenční zkumavku požadovaným množstvím správné reagenzie podle informací o vkládání určených softwarem přístroje.

Poznámka: Před každým použitím musí být všechny reagenzie zcela rozmrazeny, dobře promíchány (opakovaným náběrem pipetou a vypuštěním pipety nebo krátkým vortexem) a minimálně 3 sekundy centrifugovány při 6800 x g. Zamezte vytvoření bublin nebo pěny, které mohou způsobit chyby při detekci. Pracujte rychle a udržujte PCR komponenty před vkládáním na ledu nebo v chladičím bloku.

14. Vložte zásobník s reagensii a reagenční zkumavky bez uzávěrů umístěte do vhodných pozic předem vychlazených adaptérů na reagenzie podle příslušného aplikačního listu.

15. Vložte jednorázové špičky s filtrem do zásuvek „Eluate and Reagents“ (Eluáty a reagenzie) a „Assays“ (Rozbory) v souladu s požadovaným počtem pro každý typ špičky uvedený na příslušném aplikačním listu.

16. Zavřete zásuvky „Eluate and Reagents“ a „Assays“.

17. Při zavírání každé zásuvky stiskněte „Scan“ (Skenovat) pro spuštění kontroly vloženého obsahu u každé zásuvky.

Při kontrole vloženého obsahu se kontrolují drážky, adaptéry, špičky s filtrem a odpadní žlábk na špičky, stejně tak správné vložení specifických objemů reagenzií. Je-li vyžadováno, opravte případné chyby.

Nastavení analýzy se spustí automaticky po dokončení kroku purifikace na přístroji QIASymphony SP a poté, co se stojánky s eluátem přenesou do QIASymphony AS.

18. Po skončení běhu stiskněte „Remove“ (Odstranit) na obrazovce „Overview“ (Přehled) z nastavení analýzy. Otevřete zásuvku „Assays“ a vyjměte stojánek (stojánky).

19. Stáhněte si soubory s výsledky a soubor cykléru.

20. Jestliže je v integrovaném běhu nakonfigurováno více sad na QIASymphony AS, znovu vložte zásuvky QIASymphony AS, počínaje krokem 8.

21. Pokračujte na „Protokol: RT-PCR na Rotor-Gene Q“, strana 16.

22. Proved'te pravidelnou údržbu přístroje QIASymphony AS během běhu na přístroji Rotor-Gene Q nebo později.

Jelikož je pracovní proces integrovanou operací, na konci celého pracovního procesu vyčistěte všechny přístroje.

Postupujte podle pokynů k údržbě v *Příručce uživatele QIASymphony SP/AS — Všeobecný popis*. Zajistěte pravidelnou údržbu, aby se minimalizovalo riziko křížových kontaminací.

Protokol: RT-PCR na Rotor-Gene Q

Důležité body před zahájením

- Před zahájením protokolu si najdete čas a seznámte se s přístrojem Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Pro automatickou interpretaci výsledků PCR lze místo softwaru Rotor-Gene Q použít Rotor-Gene AssayManager.
- Dbejte na to, aby byly v každém běhu PCR zahrnuty všechny 4 kvantifikační standardy a alespoň jedna negativní kontrola (voda, čistota pro PCR). Pro vytvoření standardní křivky použijte u každého běhu PCR všechny 4 kvantifikační standardy (Hep. C Virus RG QS 1–4) dodávané spolu s produktem.

Postup

1. **Zavřete zkumavky PCR a umístěte je do 72jamkového rotoru přístroje Rotor-Gene Q. Ujistěte se, že jsou 4-stripy Rotor-Gene Q zkumavek umístěny ve správném směru tak, aby si ukazatelé pozic chladicího adaptéru a rotoru odpovídaly. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen Locking Ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.**
2. **Přeneste soubor cykléru z přístroje QIA Symphony AS do počítače přístroje Rotor-Gene Q.**
3. **Pro detekování RNA HCV vytvořte teplotní profil a spusťte běh podle příslušného aplikačního listu, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcivrpgpckitce.aspx. Informace specifické pro daný software o programování přístroje Rotor-Gene Q se uvádí v příslušném listu protokolu „Settings to run *artus* QS-RGQ Kits“ (Nastavení pro spuštění sad *artus* QS-RGQ) na adrese www.qiagen.com/products/artushcivrpgpckitce.aspx.**

Interpretace výsledků

Podrobné informace o interpretaci výsledků naleznete v příslušném aplikačním listu na adrese

www.qiagen.com/products/artushcvrgpcrkitce.aspx.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a protokolu v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozboru (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Obecná manipulace

Chybová zpráva na dotykové obrazovce	Pokud se objevila chybová zpráva během běhu protokolu, nahlédněte do uživatelské příručky dodávané s Vaším přístrojem.
--------------------------------------	--

Precipitáty ve vaničkách s reagensiemi otevřeného zásobníku sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen

- | | |
|--|---|
| a) Odpařování pufry | Rozsáhlé vypařování může vést ke zvýšené koncentraci soli nebo ke snížené koncentraci alkoholu v pufrech. Zlikvidujte zásobník s reagensiemi (RC). Pokud je nepoužíváte při purifikaci, ujistěte se, že jste uzavřeli vaničky s pufry částečně použitých zásobníků s reagensiemi (RC) pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků. |
| b) Uchovávání zásobníků s reagensiemi (RC) | Skladování zásobníků s reagensiemi (RC) při teplotách nižších než 15 °C může vést k tvorbě precipitátů. V případě potřeby vyjměte vaničky obsahující pufry QSL2 a QSB1 ze zásobníku s reagensiemi (RC) a inkubujte je po dobu 30 minut ve vodní lázni* při teplotě 37 °C za občasného třepání, aby se precipitát rozpustil. Ujistěte se, že jsou vaničky znovu umístěny do správných pozic. Pokud je zásobník s reagensiemi (RC) již propíchnut, ujistěte se, že jsou vaničky zapečetěny pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků a inkubujte celý zásobník s reagensiemi (RC) po dobu 30 minut ve vodní lázni* při teplotě 37 °C za občasného třepání. |

*Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

Komentáře a návrhy

Nízký výtěžek nukleových kyselin

- a) Magnetické částice nebyly plně resuspendovány Před začátkem procedury se ujistěte, že jsou magnetické částice plně resuspendovány. Před použitím je minimálně 3 minuty vortexujte.
- b) Zmrazené vzorky nebyly po rozmrazení důkladně promíchány Rozmrazte zmrazené vzorky pomocí jemného třepání, aby se zajistilo důkladné promíchání.
- c) Nebyl přidán nosič RNA (CARRIER) Rekonstituujte nosič RNA (CARRIER) v pufru AVE (AVE) a smíchejte s příslušným objemem pufru AVE (AVE), jak je to popsáno v příslušném aplikačním listě na adrese www.qiagen.com/products/artushcvtgpcrkitce.aspx. Zopakujte purifikační proceduru s novými vzorky.
- d) Degradace nukleových kyselin Vzorky byly nesprávně uchovávány nebo podrobeny příliš mnoha rozmrazovacím/zmrazovacím cyklům. Zopakujte purifikační proceduru s novými vzorky.
- e) Neúplná lýza vzorků Před použitím zkontrolujte, zda pufrы QSL2 a QSB1 neobsahují precipitát. V případě potřeby vyjměte vaničky obsahující pufrы QSL1 a QSB1 ze zásobníku s reagensy (RC) a inkubujte je po dobu 30 minut při teplotě 37 °C za občasného třepání, aby se precipitát rozpustil. Pokud je zásobník s reagensy (RC) již propíchnut, ujistěte se, že jsou vaničky znovu uzavřeny pomocí opětovně použitelných uzavíracích proužků a inkubujte celý zásobník s reagensy (RC) ve vodní lázni po dobu 30 minut při teplotě 37 °C za občasného třepání.*
- f) Ucpávání pipetovacích špiček v důsledku nerozpustného materiálu Ze vzorků nebyl před začátkem QIASymphony purifikační procedury vyjmut nerozpustný materiál. Pro vyjmutí nerozpustného materiálu pro virové aplikace centrifugujte vzorek 1 minutu při 3000 x g a přeneste supernatant do nové zkumavky na vzorky.

*Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

Komentáře a návrhy

QIASymphony AS detekuje nedostatek Masteru

- Do zkumavky nebyl přenesen celý Master
- Před použitím sdružte všechny zkumavky s HCV RG Master A jedné sady do jedné zkumavky. Před použitím sdružte všechny zkumavky s HCV RG Master B jedné sady do jedné zkumavky. S viskózními reagensy může být obtížné manipulovat pomocí manuálních pipet. Ujistěte se, že byl do zkumavky převeden celý objem Master.
- Pokud se u viskózních reagensů používají manuální pipety, doporučujeme nasátí dodatečného objemu o 5 % (např. nastavte pipety na 840 µl pro objem o 800 µl).
- Alternativě lze po pomalém nadávkování tekutiny a ofouknutí u stěny cílové zkumavky vyjmout špičku z tekutiny, uvolnit píst pipety a počkat dalších 10 sekund. Zbytková tekutina vyteče špičkou a lze ji vyfouknout opětovným stisknutím pístu pipety. Použití špiček s filtrem v kvalitě vhodné pro PCR s označením „nízká retence“ může zlepšit výtěžek tekutiny.

Žádný signál u pozitivních kontrol (Hep. C Virus RG QS 1–4) v fluorescenčním kanálu Cycling Green

- a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu PCR dat neodpovídá protokolu
- K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling Green pro analytickou HCV PCR a fluorescenční kanál Cycling Orange pro PCR interní kontroly.
- b) Chybné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene
- Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu. Viz příslušný aplikační list, který je k dispozici na adrese www.qiagen.com/products/artushcvgpckitce.aspx.
- c) Chybná konfigurace PCR
- Ujistěte se, že bylo nastavení rozboru provedeno správně a že byla použita správná sada parametrů. Popřípadě PCR zopakujte. Viz příslušný aplikační list na adrese www.qiagen.com/products/artushcvgpckitce.aspx.

Komentáře a návrhy

- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 8) Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Vypršela doba životnosti sady *artus* HCV QS-RGQ Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál interní kontroly negativního vzorku plazmy podrobeného purifikaci pomocí sady QIASymphony DSP Virus/Pathogen ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling Green

- a) Podmínky PCR neodpovídají protokolu Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- b) Došlo k inhibici PCR Ujistěte se, že používáte validovanou izolační metodu (viz „Protokol: Izolace RNA a nastavení analýzy na přístroji QIASymphony SP/AS“, strana 11) a držte se přesně pokynů.
- c) Během extrakce došlo k úbytku RNA Nepřítomnost signálu interní kontroly může znamenat úbytek RNA během extrakce. Ujistěte se, že používáte validovanou izolační metodu (viz „Protokol: Izolace RNA a nastavení analýzy na přístroji QIASymphony SP/AS“, strana 11) a držte se přesně pokynů.
Viz také „Nízký výtěžek nukleových kyselin“ výše.

Komentáře a návrhy

- d) Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole „Uchovávání a nakládání s reagensy“ (strana 8) Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.
- e) Vypršela doba životnosti sady *artus* HCV QS-RGQ Prosím zkontrolujte jak podmínky uchovávání, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály u negativních kontrol ve fluorescenčním kanálu Cycling Green při analytické PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- b) Během extrakce došlo ke kontaminaci Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Řízení jakosti

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* HCV QS-RGQ testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Omezení

Všechny reagensie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.

Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagensie s prošlou trvanlivostí.

V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

Charakteristiky chování

Viz www.qiagen.com/products/artushcvtgpcrkitce.aspx, kde jsou uvedeny výkonnostní charakteristiky sady *artus* HCV QS-RGQ.

Literatura

1. Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. a Wedemeyer, H., eds. (2012) *The Flying Publisher Short Guide to Hepatitis C*. 2012, místo vydání neznámé: Flying Publisher.
2. Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. a Wedemeyer, H., eds. (2012) *Hepatitis: A Clinical Textbook*. 2012, místo vydání neznámé: Flying Publisher.
3. Munir, S. et al. (2010) Hepatitis C treatment: current and future perspectives. *Virology* **7**, 296.
4. Harrington, P. R., Zeng, W. a Naeger, L. K. (2012) Clinical relevance of detectable but not quantifiable hepatitis C virus RNA during boceprevir or telaprevir treatment. *Hepatology* **55**, 1048.

Symboly



Obsahuje reagenty pro <N> reakcí



Použijte do



Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Díly



Obsahuje



Počet



Globální číslo obchodní položky GTIN



Teplotní rozmezí



Výrobce



Další informace viz návod k použití



Upozornění

Kontaktní informace

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na adrese www.qiagen.com/Support, volejte 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení QIAGEN nebo naše místní distributory (viz poslední stránka obalu nebo navštivte www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit (24)	Pro 24 reakcí: 2 směsi Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4518363
<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit (72)	Pro 72 reakcí: 2 směsi Master, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, voda (v kvalitě vhodné pro PCR)	4518366
Systém QIASymphony RGQ		
QIASymphony RGQ, System	QIASymphony SP, QIASymphony AS, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, požadované příslušenství a spotřební materiál, instalace a školení	9001850

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní in vitro diagnostiku. Tímto se neuděluje žádný jiný obecný patent nebo licenci jiného druhu než toto specifické právo k používání vyplývající z nákupu.

Ochranné známky: QIAGEN[®], QIASymphony[®], artus[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group).

Sada *artus* HCV QS-RGQ je diagnostická sada označená značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkt není dostupný ve všech zemích.

Omezená licenční smlouva pro sadu *artus* HCV QS-RGQ

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel tohoto produktu souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento produkt může být používán pouze v souladu s protokoly, které jsou součástí produktu a této příručky a pouze pro použití s komponenty obsaženými v soupravě. QIAGEN neuděluje žádnou licenci podle žádného svého práva k duševnímu majetku na používání přiložených komponent této sady s jakýmkoliv komponenty, které nejsou součástí této soupravy, s výjimkami popsány v protokolech dodávaných s produktem, v této příručce a v dalších protokolech dostupných na adrese www.qiagen.com. Některé z těchto dalších protokolů byly poskytnuty uživateli společnosti QIAGEN dalším uživatelům QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN podrobně testovány ani optimalizovány. Společnost za ně neručí ani neposkytuje záruky za to, že nebudou porušovat práva třetích stran.
2. Mimo výslovně uvedené licence QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její komponenty jsou licencovány pro jedno použití a nesmí být znovu použity, obnoveny či znovu prodány.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne nebo nikomu neumožní podniknout kroky, které by mohly vést nebo usnadnit zakázané úkony uvedené výše. QIAGEN může zákazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

© 2010-2014 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

