

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



24 (catalogusnr. 4513263)



96 (catalogusnr. 4513265)

Versie 1



Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met Rotor-Gene[®] Q-apparaten



4513263, 4513265



1049310NL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

DUITSLAND

R5



1049310NL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN zet de toon voor :


- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Wij stellen ons ten doel ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken kunt bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Inhoud van de kit	4
Symbolen	4
Bewaren	5
Beoogd gebruik	5
Beperkingen van het gebruik van het product	6
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	6
Kwaliteitscontrole	6
Inleiding	7
Principe	7
Informatie met betrekking tot het pathogeen	7
Prestatiekenmerken	8
Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd	17
Belangrijke opmerkingen	18
Algemene voorzorgsmaatregelen	18
Monsterafname, opslag en transport	18
RNA-isolatie	20
Interne controle	20
De drempelwaarde voor de PCR-analyse instellen	21
Quantitation (Kwantificatie)	21
Protocol: PCR en gegevensanalyse	23
Probleemoplossingsgids	33
Referenties	36
Bestelgegevens	37

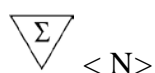
Inhoud van de kit

<i>artus</i> HI Virus -1 RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Catalogusnr.		4513263	4513265
Aantal reacties		24	96
Blauw	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 reacties	8 x 12 reacties
Paars	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 reacties	8 x 12 reacties
Rood	HI Virus-1 RG QS1* (1 x 10 ⁴ IE/μl)	QS 200 μl	200 μl
Rood	HI Virus-1 RG QS 2* (1 x 10 ³ IE/μl)	QS 200 μl	200 μl
Rood	HI Virus-1 RG QS 3* (1 x 10 ² IE/μl)	QS 200 μl	200 μl
Rood	HI Virus-1 RG QS 4* (1 x 10 ¹ IE/μl)	QS 200 μl	200 μl
Groen	HI Virus-1 RG IC [†]	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Wit	Water (PCR-kwaliteit)	1000 μl	1000 μl
	Handleiding	 1	1

* Kwantificatiestandaard.

† Interne controle.

Symbolen



Bevat voldoende reagentia voor <N> tests



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek








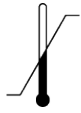



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer

	Componenten
	Bevat
	Nummer
	Guanidinehydrochloride
	Global Trade Item Number (Artikelnummer wereldhandel)
	Temperatuurbepering
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Belangrijke opmerking

Bewaren

De onderdelen van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit dienen te worden bewaard bij -30 °C tot -15 °C en blijven stabiel tot de uiterste houdbaarheidsdatum die op het etiket staat vermeld. Herhaaldelijk ontdooien en weer invriezen (> 2 x) dient te worden vermeden, aangezien dit de gevoeligheid van de assay kan verminderen. Als de reagentia slechts periodiek moeten worden gebruikt, dienen ze in kleine hoeveelheden te worden ingevroren. De bewaring bij 2–8 °C mag niet langer dan 5 uur duren.

Beoogd gebruik

De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is een in vitro nucleïnezuuraamplificatietest voor de kwantificatie van RNA van het humaan immunodeficiëntievirus type 1 (HIV-1) in humaan plasma. Deze diagnostische testkit gebruikt de omgekeerde transcriptie polymerasekettingreactie (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) en is geconfigureerd voor gebruik met Rotor-Gene Q-apparaten. De test kan HIV-1-RNA kwantificeren met een bereik van 120 - 1 x 10⁸ HIV-1 IE/ml. Plasmamonsters die Group M Subtypes A-H bevatten zijn gevalideerd voor het gebruik in de assay.

i De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit mag niet worden gebruikt met Rotor-Gene Q 2plex-apparaten.

De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is bedoeld voor gebruik in combinatie met de klinische presentatie en andere laboratoriummarkers voor ziekteprognose, en voor gebruik als hulpmiddel bij het beoordelen van de virale respons op antiretrovirale behandeling zoals gemeten door veranderingen in EDTA-plasmaniveaus van HIV-1-RNA. De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is niet bedoeld als screeningtest voor HIV of als diagnostische test om de aanwezigheid van een HIV-infectie te bevestigen.

Beperkingen van het gebruik van het product

Alle reagentia mogen uitsluitend worden gebruikt voor in-vitrodiagnostiek.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de procedures voor in-vitrodiagnostiek.

Om optimale PCR-resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk dat men zich strikt houdt aan de gebruikershandleiding.

Let goed op de uiterste houdbaarheidsdatums op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen onderdelen waarvan de uiterste houdbaarheidsdatum is verstreken.

Hoewel dit zelden voorkomt, kunnen mutaties binnen de sterk geconserveerde gebieden van het virale genoom waar de primers van de kit en/of de probe aan binden, ertoe leiden dat de aanwezigheid van het virus in deze gevallen niet wordt gedetecteerd of wordt ondergewaardeerd. De validiteit en de werking van de assay-opzet worden op regelmatige tijden herzien.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN® vinden, bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayaafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

Kwaliteitscontrole

Elke partij van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest tegen vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Inleiding

De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is een gebruiksklaar systeem voor de detectie van HIV-1-RNA met gebruikmaking van de polymerasekettingreactie (PCR) op Rotor-Gene Q-apparaten. De HI Virus-1 RG Master A en B bevat reagentia en enzymen voor de omgekeerde transcriptie en specifieke amplificatie van een gebied van 93 bp van het HIV-1-genoom, en voor de directe detectie van het specifieke amplicon in fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen) van Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000 of Cycling A.FAM™ (Cyclisch A.FAM™) (bron 470 nm, detector 510 nm) van de Rotor-Gene 3000.

Daarnaast bevat de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit een tweede heteroloog amplificatiesysteem voor de identificatie van een mogelijke PCR-inhibitie. Dit wordt gedetecteerd als een interne controle (IC) in fluorescentiekanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) van Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000 of A.ROX™ (bron 585 nm, detector 610 nm) van de Rotor-Gene 3000. De detectielimiet van de analytische HI Virus-1 RT-PCR (zie 'Analytische gevoeligheid', pagina 8) wordt niet verlaagd. Er zijn externe positieve controles (HI Virus-1 RG QS 1-4) meegeleverd die de bepaling van de hoeveelheid viraal RNA mogelijk maken. Voor meer informatie, zie 'Quantitation (Kwantificatie)', pagina 21.

Principe

Pathogeedetectie met behulp van de polymerasekettingreactie (PCR) is gebaseerd op de amplificatie van specifieke gebieden van het pathogeengenoom. Bij realtime PCR wordt het geamplificeerde product gedetecteerd door middel van fluorescerende kleurstoffen. Deze zijn doorgaans gekoppeld aan oligonucleotideprobes die specifiek aan het geamplificeerde product binden. Door het monitoren van de fluorescentie-intensiteiten tijdens de PCR-run (d.w.z. in real-time) kan het zich ophopende product worden gedetecteerd en gekwantificeerd zonder na de PCR-run de reageerbuisjes opnieuw te hoeven openen.*

Informatie met betrekking tot het pathogeen

Het humaan immunodeficiëntievirus (HIV) is een retrovirus dat het verworven immunodeficiëntiesyndroom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) veroorzaakt. Er zijn twee soorten HIV die humane infecties kunnen veroorzaken, HIV-1 en HIV-2, die verschillen in hun virulentie en prevalentie. De meeste gemelde gevallen van AIDS over de hele wereld worden toegeschreven aan HIV-1. Besmetting met HIV vindt plaats door de overdracht van geïnfecteerd bloed, vaginaal vocht, moedermelk en andere lichaamsvloeistoffen. Binnen deze lichaamsvloeistoffen is HIV aanwezig in de vorm van vrije virusdeeltjes en als virus in geïnfecteerde immuuncellen. De drie belangrijkste transmissiewegen zijn onbeschermd geslachtsgemeenschap, besmette naalden en overdracht van een besmette moeder op haar baby bij de geboorte of via de moedermelk.

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

HIV infecteert voornamelijk cellen van het menselijke immuunsysteem, zoals T-helpercellen (specifiek CD4⁺). HIV-infectie leidt tot lage niveaus CD4⁺ T-cellen. Wanneer het aantal CD4⁺ T-cellen onder een kritisch niveau daalt, gaat celgedeelteerde immuniteit verloren en wordt het lichaam steeds vatbaarder voor opportunistische infecties.

AIDS-symptomen verschijnen in een vergevorderd stadium van de HIV-infectie wanneer het aangetaste immuunsysteem opportunistische infecties niet kan bestrijden. In dit stadium ontwikkelt de geïnfecteerde persoon steeds meer symptomen die worden veroorzaakt door dergelijke infecties. De meest voorkomende infecties zijn chronische cryptosporida diarree, cytomegalovirus geïnduceerde ooginfectie, pneumocystis pneumonie, toxoplasmose en tuberculose, evenals infecties met leden van het *Mycobacterium avium* complex. Bovendien wordt de ontwikkeling van verschillende soorten kanker, zoals invasieve baarmoederhalskanker, Kaposi-sarcoom of lymfoom, vaak waargenomen. Op dit moment is er geen genezende behandeling voor AIDS en men gelooft dat de meeste HIV-geïnfecteerde mensen uiteindelijk zullen sterven aan een AIDS-gerelateerde ziekte. Echter hebben verbeteringen in de behandeling van HIV/AIDS, waaronder behandelingen die het virus zelf bestrijden, evenals die welke opportunistische infecties voorkomen of behandelen, hebben de levensverwachting en -kwaliteit van veel HIV-/AIDS-patiënten drastisch verbeterd.

Prestatiekenmerken

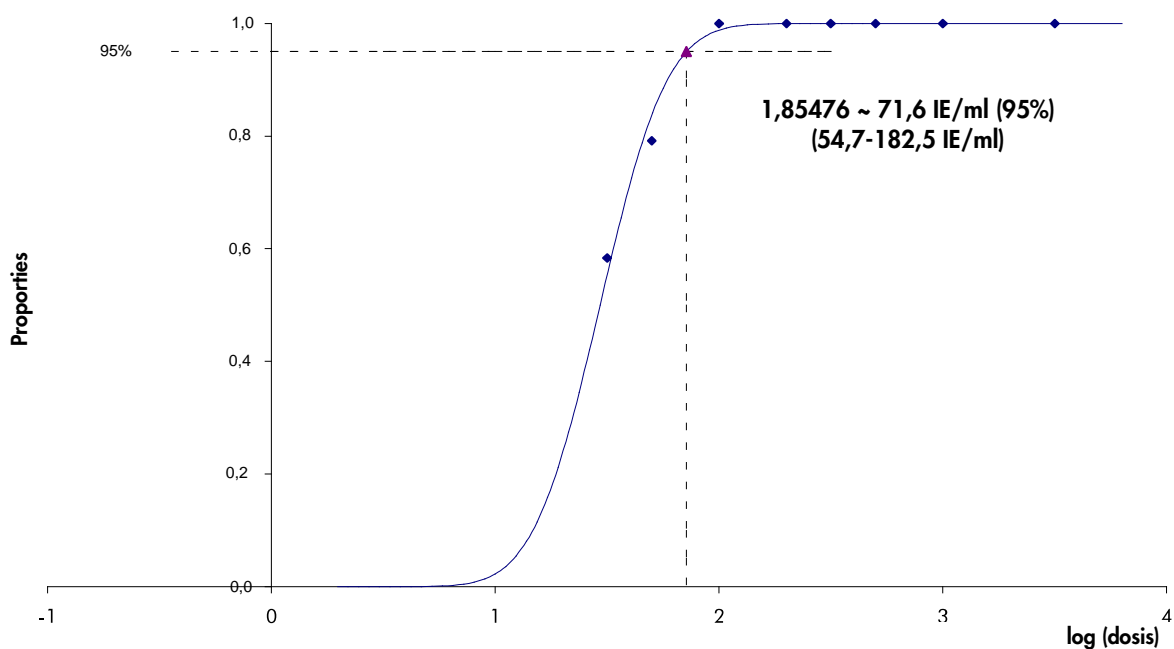
Analytische gevoeligheid

De analytische detectielimiet en de analytische detectielimiet rekening houdend met de zuivering (de sensitiviteitslimiet) voor de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. De analytische detectielimiet, rekening houdend met de zuivering wordt bepaald aan de hand van HIV-positieve klinische monsters in combinatie met een bepaalde extractiemethode. Daarentegen wordt de analytische detectielimiet bepaald onafhankelijk van de geselecteerde extractiemethode, met behulp van een standaard met een bekende concentratie.

Om de analytische gevoeligheid van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit te bepalen werd een standaardverdunningsreeks van 0,0316 tot 31,6 IE*/µl opgezet en geanalyseerd op de Rotor-Gene 3000 in combinatie met de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. De tests werden uitgevoerd op 3 verschillende dagen op 8 replica's. De resultaten werden bepaald via een probitanalyse. De analytische detectielimiet van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit in combinatie met de Rotor-Gene 3000 is 4,5 IE/µl (p = 0,05). Dit betekent dat er een waarschijnlijkheid van 95% is dat er 4,5 IE/µl zullen worden gedetecteerd.

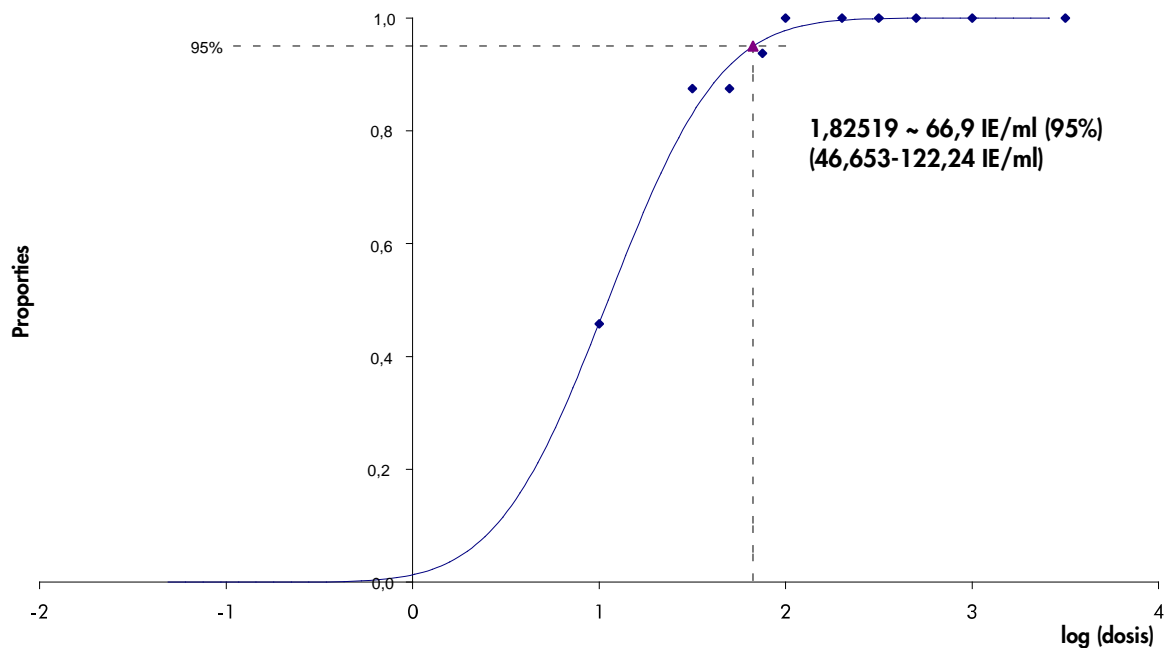
*De standaard is een in vitro getranscribeerd RNA, waarvan de concentratie is gekalibreerd met behulp van de 2e Internationale HIV-richtlijn (WHO).

De analytische gevoeligheid, rekening houdend met de zuivering (QIAamp® DSP Virus Kit, QIAGEN) van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit op Rotor-Gene-apparaten wordt bepaald aan de hand van een verdunningsreeks op basis van de 2e Internationale richtlijn voor HIV-1-RNA van de WHO voor nucleïnezuuramplificatietechnologie (NAT)-assays (NIBSC-code 97/650) van 10 tot 3160 HIV IE/ml verrijkt in klinische plasmamonsters. Deze werden onderworpen aan RNA-extractie met behulp van de QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, extractievolumen: 0,5 ml, elutievolume: 25 µl). Elk van de verdunningen werd op 3 verschillende dagen geanalyseerd met de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit op 8 replica's. De resultaten werden bepaald via een probitanalyse. Afbeelding 1 toont een grafische illustratie van de probitanalyse. De analytische detectielimiet rekening houdend met de zuivering van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit in combinatie met de Rotor-Gene 3000 is 71,6 IE/ml ($p = 0,05$). Dit betekent dat er een waarschijnlijkheid van 95% is dat er 71,6 IE/ml zullen worden gedetecteerd.



Afbeelding 1. Probitanalyse: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000). Analytische sensitiviteit, rekening houdend met de zuivering (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit op de Rotor-Gene 3000.

De analytische detectielimiet rekening houdend met de zuivering van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit in combinatie met de Rotor-Gene Q/6000 is 66,9 IE/ml ($p = 0,05$). Dit betekent dat er een waarschijnlijkheid van 95% is dat er 66,9 IE/ml zullen worden gedetecteerd.



Afbeelding 2. Probitanalyse: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). Analytische sensitiviteit, rekening houdend met de zuivering (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit op de Rotor-Gene 6000.

Specificiteit

De specificiteit van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit wordt in de eerste plaats gegarandeerd door de selectie van de primers en probes, en daarnaast door de selectie van strikte reactiecondities. De primers en probes zijn door middel van sequentievergelijkinganalyse gecontroleerd op mogelijke homologieën met alle sequenties die in genenbibliotheken gepubliceerd zijn. De detecteerbaarheid van alle relevante genotypen is geverifieerd door een database-alignment en een PCR-run op Rotor-Gene-apparaten met de volgende genotypen (zie tabel 1).

Verder werd de specificiteit gevalideerd met 100 verschillende HIV-negatieve plasmamonsters. Deze genereerden geen signalen met de voor HIV-specifieke primers en probes die zijn inbegrepen in de HI Virus-1 RG Master.

Mogelijke kruisreactiviteit van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd getest met de controlegroep die in tabel 2 wordt vermeld. Geen van de geteste pathogenen was reactief. Er waren geen kruisreactiviteiten bij gemengde infecties.

Tabel 1. Tests van de specificiteit van relevante genotypen

Virus	Genotype	Bron	HIV (FAM)	Interne controle (RO X)
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, Hertfordshire.

Tabel 2. Tests van de specificiteit van de kit met mogelijk kruisreactieve pathogenen

Controlegroep	HIV (Cycling Green of Cycling A.FAM) (Cyclisch groen of Cyclisch A.FAM)	Interne controle (Cycling Orange of Cycling A.RO X) (Cyclisch oranje of Cyclisch A.RO X)
Hepatitis A-virus	–	+
Hepatitis B-virus	–	+
Hepatitis C-virus	–	+
Humaan herpesvirus 1 (herpes simplex-virus 1)	–	+
Humaan herpesvirus 2 (herpes simplex-virus 2)	–	+
Humaan herpesvirus 3 (varicella zoster virus)	–	+
Humaan herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+

Tabel wordt vervolgd op de volgende pagina

Tabel 2. Vervolg

Controlegroep	HIV (Cycling Green of Cycling A.FAM) (Cyclisch groen of Cyclisch A.FAM)	Interne controle (Cycling Orange of Cycling A.RO X) (Cyclisch oranje of Cyclisch A.RO X)
Humaan T-celleukemievirus type 1 en type 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Gele koorts	–	+
<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>	–	+

Lineair bereik

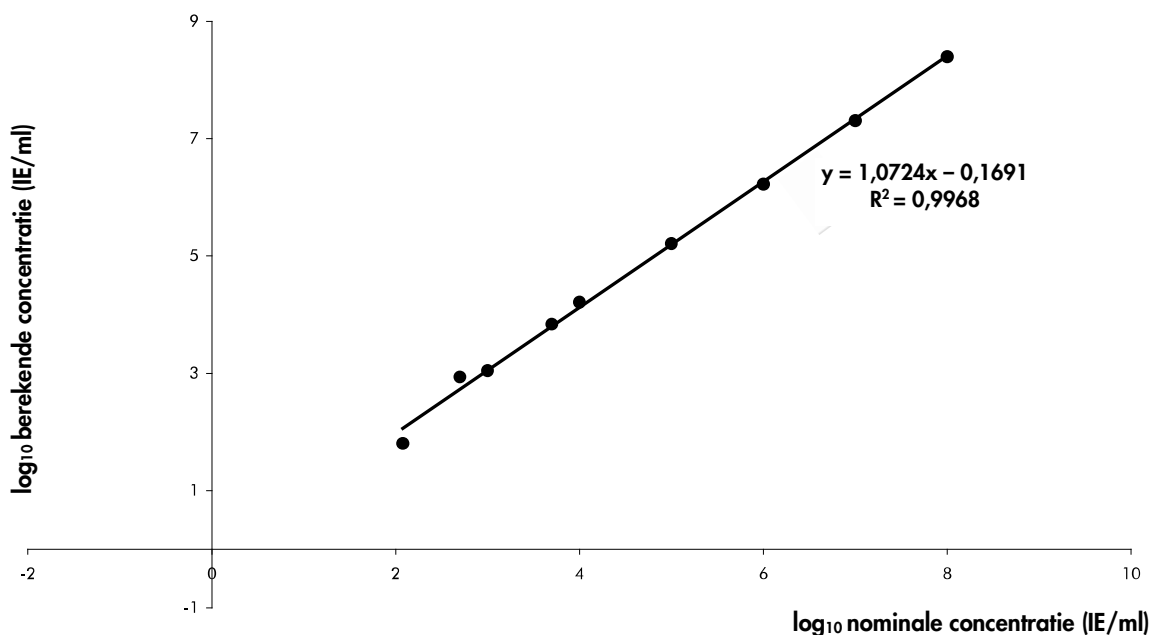
Het lineaire bereik (analytische meting) van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd bepaald aan de hand van een verdunningsreeks van een in-vitrotranscriptie van HIV van 1×10^8 IE/ μ l tot 1 IE/ μ l. De verdunningsreeks is gekalibreerd aan de Internationale richtlijn voor HIV-RNA van de WHO.

Elke verdunning werd getest in replica's ($n = 8$) met behulp van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit op Rotor-Gene-apparaten.

Het lineaire bereik van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd vastgesteld voor concentraties vanaf 5 IE/ μ l tot ten minste 1×10^8 IE/ μ l.

Het lineaire bereik, rekening houdend met de zuivering van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd bepaald aan de hand van een verdunningsreeks van de OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel van 1×10^8 IE/ml tot 120 IE/ml. De zuivering werd uitgevoerd in duplicaten met behulp van de QIAamp DSP Virus Kit (extractievolume: 0,5 ml, elutievolume: 25 μ l). Elk van de 9 monsters werd geanalyseerd met behulp van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.

Het lineaire bereik, rekening houdend met de zuivering van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd vastgesteld voor concentraties vanaf 120 IE/ml tot ten minste 1×10^8 IE/ml (zie afbeelding 3).



Afbeelding 3. Lineair bereik van de *artus* HI Virus -1 RG RT-PCR Kit. Berekening van het lineaire bereik. De rechte lijn werd bepaald door een lineaire regressie van de op basis van \log_{10} berekende concentraties met de \log_{10} nominale concentraties. De vergelijking van de regressielijn is in de afbeelding opgenomen.

Precisie

De nauwkeurighedsgegevens van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit zijn verzameld door middel van Rotor-Gene-apparaten en maken de bepaling van de totale variantie van de assay mogelijk. De totale variantie bestaat uit de intra-assayvariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van monsters van dezelfde concentratie binnen één experiment), de inter-assayvariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van de assay, gegenereerd op verschillende apparaten van hetzelfde type door verschillende operatoren binnen één laboratorium) en de inter-batchvariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van de assay met gebruikmaking van verschillende batches). De verkregen gegevens werden gebruikt voor het bepalen van de standaarddeviatie, de variantie en de variatiecoëfficiënt voor de pathogeenspecifieke PCR en de interne controle-PCR.

Nauwkeurighedsgegevens van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR werden verzameld met gebruikmaking van de kwantificatiestandaard met de laagste concentratie (QS4; 10 IE/ μ l). De tests werden uitgevoerd met 8 replica's. De precisiegegevens werden berekend op basis van de C_T -waarden van de amplificatiecurven (C_T : drempelcyclus [threshold cycle], zie tabel 3). Op basis van deze resultaten is de totale statistische spreiding van een gegeven monster met de genoemde concentratie 1,66% (C_T) en 2,15% (C_T) voor de detectie van de interne controle. Deze waarden zijn gebaseerd op het geheel van alle enkelvoudige waarden van de bepaalde variabiliteiten.

Tabel 3. Nauwkeurighedsgegevens op basis van de C_T -waarden

	C_T - waarde	Standaard- deviatie	Variatiecoëfficiënt (%)
Intra-assayvariabiliteit: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Intra-assayvariabiliteit: Interne controle	31,24	0,18	0,58
Interassayvariabiliteit: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Interassayvariabiliteit: Interne controle	31,65	0,36	1,13
Interbatchvariabiliteit: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73

Tabel 3. Vervolg

	C _T -waarde	Standaard-deviatie	Variatiecoëfficiënt (%)
Interbatchvariabiliteit: Interne controle	31,20	0,55	1,76
Totale variantie: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Totale variantie: Interne controle	31,40	0,67	2,15

Robuustheid

Op basis van de verificatie van de robuustheid kan het totale faalpercentage van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit worden bepaald. 100 HIV-negatieve monsters van plasma werden gespiked met 4,5 IE/μl elutievolume HIV-controle-RNA (concentratie van driemaal de limiet van de analytische gevoeligheid). Na extractie met gebruikmaking van de QIAamp DSP Virus Kit werden deze monsters geanalyseerd met de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. Voor alle HIV-monsters was het faalpercentage 0%. Daarnaast werd de robuustheid van de interne controle beoordeeld door zuivering en analyse van 100 HIV-negatieve plasmamonsters. Het totale faalpercentage bedroeg 0%. Remmingen werden niet waargenomen. De robuustheid van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is dus $\geq 99\%$.

Reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheidsgegevens maken een regelmatige prestatiebeoordeling van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit mogelijk, alsook een efficiëntievergelijking met andere producten. Deze gegevens worden verkregen door de deelname aan gevestigde bekwaamheidsprogramma's.

Diagnostische evaluatie

De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd geëvalueerd in een studie. Bij vergelijking van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit met de COBAS® TaqMan® HIV-1 Test werden 241 plasmamonsters achteraf geanalyseerd. Alle plasmamonsters werden eerder positief of negatief geanalyseerd met behulp van de COBAS TaqMan HIV-1 Test voor routinematige diagnostiek.

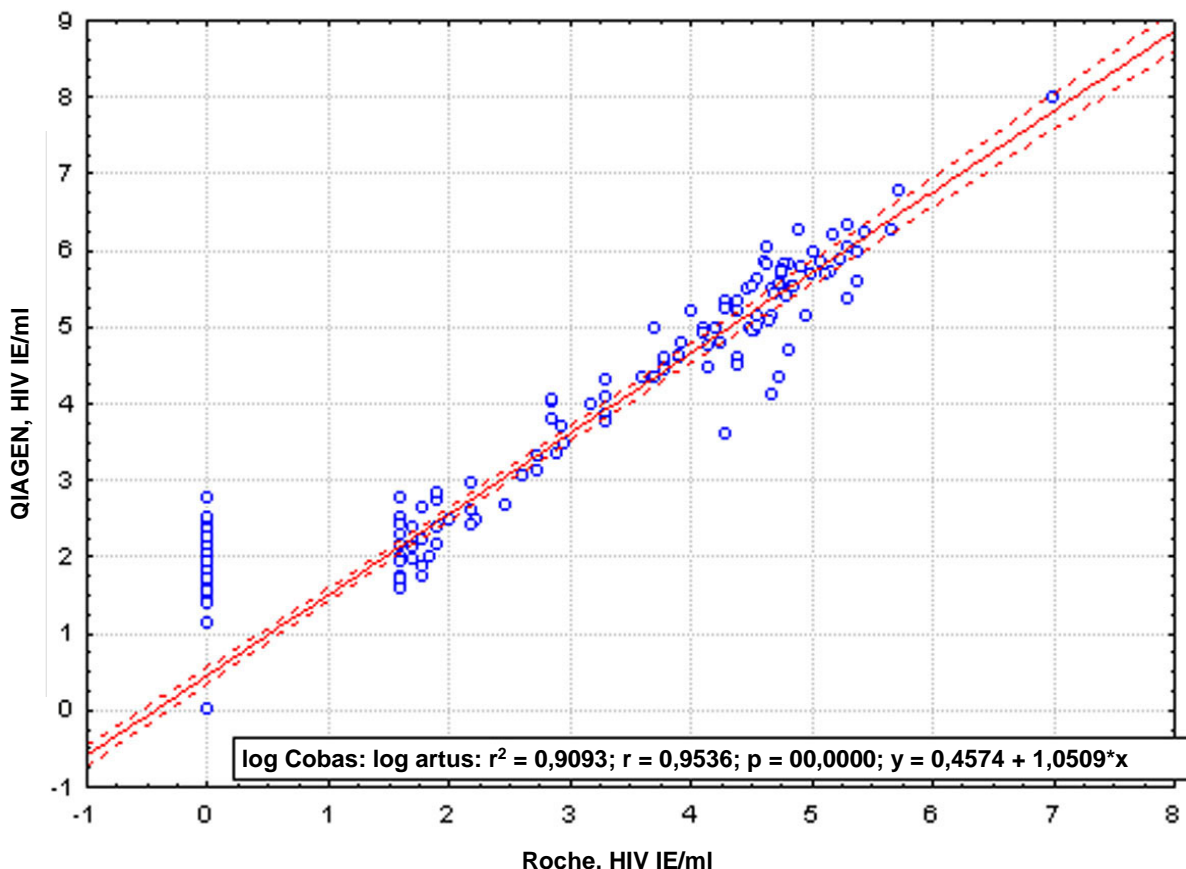
HIV-RNA voor het testen van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werd geïsoleerd met behulp van de QIAamp DSP Virus Kit en analyse werd uitgevoerd op het Rotor-Gene 6000-apparaat. Voor vergelijkende tests met de COBAS TaqMan HIV-1 Test werd HIV-RNA geïsoleerd volgens de instructies van de fabrikant zoals beschreven in de bijsluiters. De resultaten verkregen met behulp van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit werden vergeleken met die van de COBAS TaqMan HIV-1 Test (zie tabel 4 en afbeelding 4).

105 van 126 monsters die positief werden getest met de COBAS TaqMan HIV-1 Test werden ook positief gestest met de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit. 113 van 115 monsters die negatief werden getest met de COBAS TaqMan HIV-1 Test werden ook negatief gestest met de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.

Als de resultaten van de COBAS TaqMan HIV-1 Test als referentie worden genomen, is de diagnostische gevoeligheid 98,1% en de diagnostische specificiteit 84,3%.

Tabel 4. Resultaten van de 241 geanalyseerde retrospectieve EDTA-plasmamonsters

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



Afbeelding 4. Vergelijking van de COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche, HIV; met monsterzuivering met behulp van het COBAS AmpliPrep-systeem) met de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (QIAGEN, HIV; met monsterzuivering met behulp van de QIAamp DSP Virus Kit). Correlatie van kwantitatieve resultaten van beide testsystemen (tabel 4) werd geanalyseerd door middel van lineaire regressie. De resultaten van beide kits worden weergegeven in een XY (spreiding) met logaritmische schaal.

Apparatuur en reagentia die door de gebruiker moeten worden geleverd

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

- RNA-isolatiekit (zie 'RNA-isolatie', pagina 20)
- Pipetten (afstelbaar)*
- Steriele pipetpunten met filters
- Vortexmixer*
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml
- Rotor-Gene Q of Rotor-Gene-apparaat*[†] met fluorescentiekanalen voor Cycling Green (Cyclisch groen) en Cycling Orange (Cyclisch oranje) of met fluorescentiekanalen voor Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM) en Cycling A.RO X (Cyclisch A.RO X)
- Rotor-Gene Q-softwareversie 1.7.94 (Rotor-Gene 6000-softwareversie 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000-softwareversie 6.0.23) of hoger
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, voor gebruik met rotor met 72 putjes (cat.nr. 981103 of 981106)
- Alternatief: PCR Tubes, 0.2 ml, voor gebruik met rotor met 36 putjes (cat.nr. 981005 of 981008)
- Koelblok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, cat.nr. 9018901, of Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, cat.nr. 9018905)

*Zorg ervoor dat apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

[†] De *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit mag niet worden gebruikt met Rotor-Gene Q 2plex-apparaten.

Belangrijke opmerkingen

Algemene voorzorgsmaatregelen

De gebruiker dient altijd aandacht te besteden aan het volgende:

- Gebruik steriele pipetpunten met filters.
- Positieve materialen (monsters, positieve controles en amplicons) dienen apart van alle andere reagentia te worden opgeslagen en te worden geëxtraheerd en in een ruimtelijk gescheiden instelling aan het reactiemengsel te worden toegevoegd.
- Ontdooi alle onderdelen volledig bij kamertemperatuur (15 - 25 °C) voordat u een assay start.
- Als de onderdelen zijn ontdooid, mengt u deze (door herhaaldelijk op en neer te pipetteren of te mengen met een pulse-vortexmixer) en centrifugeert u ze kort.
- Werk snel en bewaar de onderdelen op ijs of in het koelblok (laadblok met 72/96 putjes).

Monsterafname, opslag en transport

i Alle monsters dienen te worden behandeld als potentieel besmettelijk materiaal.

Alleen de volgende monstermaterialen zijn toegestaan, waarvoor de volgende regels en specifieke instructies met betrekking tot afname, transport en opslag strikt in acht moeten worden genomen.

i Recente studies verwijzen naar EDTA of citraatplasma als het meest geschikte monstermateriaal voor HIV-detectie. Daarom raden we het gebruik van deze materialen aan met de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit.

De interne validatie van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is uitgevoerd met menselijke EDTA-plasmamonsters. Overige monstermaterialen zijn niet gevalideerd. Gebruik alleen de aanbevolen RNA-isolatiekit (zie 'RNA-isolatie', pagina 20) voor monstervoorbereiding.

Bij gebruik van bepaalde monstermaterialen moeten specifieke instructies met betrekking tot afname, transport en opslag strikt in acht worden genomen.

Monsterafname

Elke bloedafname veroorzaakt een beschadiging van bloedvaten (slagaders, aders, capillairen). Er mag alleen onschadelijk en steriel materiaal worden gebruikt. Voor bloedafname zijn passende wegwerpartikelen beschikbaar.

Te dunne, capillaire naalden moeten niet voor venapuncties worden gebruikt. Veneus bloed moet worden afgenomen op een geschikte plek in de elleboogplooi, de onderarm of de rug van de hand. Bloed moet worden afgenomen met standaard monsterafnabuisjes (rode dop, Sarstedt of gelijkwaardige buis van een andere fabrikant). Er dient 5-10 ml EDTA-bloed te worden afgenomen. Buizen moeten direct na afname van de monsters worden gemengd door te wentelen (8x, niet schudden).

i Gebruik geen gehepariniseerde humane monsters (zie ‘Stoffen met een storende werking’, pagina 19).

Monsteropslag

Volbloed moet worden gescheiden in plasma en cellulaire componenten door centrifugatie gedurende 20 minuten bij 800-1600 x *g* binnen 6 uur. Het geïsoleerde plasma moet worden overgebracht in een steriel buisje van polypropyleen. De sensitiviteit van de assay kan verminderd zijn als u de monsters standaard invriest of gedurende een langere tijd bewaard. Virus-ingekapseld RNA is dagenlang stabiel indien bewaard bij 4 °C, gedurende weken indien bewaard bij -20 °C en zelfs gedurende maanden en jaren indien bewaard bij -70 °C.*

Monstertransport

Monstermateriaal moet altijd worden vervoerd in een onbreekbare transportcontainer. Zo kan een mogelijk infectiegevaar ten gevolge van het lekken van monsters worden vermeden. De monsters moeten worden vervoerd volgens de lokale en nationale instructies voor transport van pathogeen materiaal.†

De monsters moeten binnen 6 uur worden verzonden. Het wordt niet aanbevolen om de monsters te bewaren waar ze zijn afgenomen. Postverzending van de monsters is mogelijk indien de wettelijke instructies voor het transport van pathogeen materiaal worden gevolgd. We bevelen aan het monstertransport door een koerier uit te laten voeren. De bloedmonsters moeten gekoeld (2-8 °C) en het gescheiden plasma diepgevroren (-15 tot -30 °C) worden verzonden.

Stoffen met een storende werking

Verhoogde niveaus van bilirubine (≤ 15 mg/dl) en lipiden (≤ 800 mg/dl), en hemolytische monsters hebben geen invloed op het systeem. Heparine (≥ 10 IE/ml) heeft een negatieve invloed op de PCR. Gebruik geen monsters die zijn afgenomen in buisjes met heparine als antistollingsmiddel. Ook mogen geen monsters van gehepariniseerde patiënten worden gebruikt.

* Arbeitskreis Blut, VI7 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452-456.

† International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations (Regelgeving voor het vervoer van gevaarlijke stoffen door de lucht).

RNA-isolatie

De QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, cat.nr. 60704) is gevalideerd voor de zuivering van viraal RNA uit humaan plasma, voor gebruik met de *artusHI* Virus-1 RG RT-PCR Kit. Voer de zuivering van viraal RNA uit volgens de instructies in het *Handleiding QIAamp DSP Virus Kit* (QIAamp DSP Virus Kit Handbook).

i Het gebruik van carrier-RNA is essentieel voor de extractie-efficiëntie en, dientengevolge, voor de opbrengst van DNA/RNA. Om de stabiliteit van het met de QIAamp DSP Virus Kit geleverde carrier-RNA te verhogen, bevelen we aan om te handelen volgens de informatie over de reconstitutie en opslag van het carrier-RNA zoals beschreven in de handleiding ('Reagentia en buffers voorbereiden').

Voordat u begint met iedere extractie dient een mengsel van lysisbuffer en carrier-RNA (en wanneer van toepassing interne controle, zie onderstaande paragraaf 'Interne controle') vers volgens het pipetteerschema in tabel 5 te worden bereid:

Tabel 5. Pipetteerschema voor gebruik met de QIAamp DSP Virus Kit

Aantal monsters	1	12
Lysisbuffer (AL)*	550 µl	6600 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	6,2 µl	74,4 µl
Totaal volume	556,2 µl	6674,4 µl
Volume per extractie	500 µl	elk 500 µl

* Bevat guanidinehydrochloride; zie de *Handleiding QIAamp DSP Virus Kit* voor veiligheidsinformatie.

i Gebruik het vers bereide mengsel van lysisbuffer en carrier-RNA onmiddellijk voor extractie. Bewaring van het mengsel is niet mogelijk.

i De interne controle van de *artusHI* Virus-1 RG RT-PCR Kit kan direct in de isolatieprocedure worden gebruikt (zie 'Interne controle', hieronder).

Interne controle

Er is een interne controle (HI Virus-1 RG IC) meegeleverd. Hierdoor kan de gebruiker zowel de RNA-isolatieprocedure controleren als op mogelijke PCR-inhibitie controleren. Voeg voor deze toepassing de interne controle aan de isolatie toe in een verhouding van 0,1 µl per 1 µl elutievolume. Als u bijvoorbeeld de QIAamp DSP Virus Kit gebruikt, wordt het RNA geëluëerd in 60 µl Elution Buffer (AVE). Daarom dient aanvankelijk 6 µl van de interne controle te worden toegevoegd.

ⓘ De interne controle en het carrier-RNA (zie RNA-isolatie', pagina 20) dienen alleen te worden toegevoegd aan het mengsel van lysisbuffer en monstermateriaal of direct aan de lysisbuffer.

De interne controle mag niet direct worden toegevoegd aan het monstermateriaal. Let op: Bij toevoeging aan de lysisbuffer moet het mengsel van interne controle en lysisbuffercarrier-RNA vers worden bereid en onmiddellijk worden gebruikt (bewaring van het mengsel bij kamertemperatuur of in de koelkast gedurende slechts een paar uur kan leiden tot een slechte werking van de interne controle en een verminderde extractieefficiëntie).

ⓘ Voeg de interne controle en het carrier-RNA niet direct aan het monstermateriaal toe.

De interne controle kan optioneel uitsluitend worden gebruikt om te controleren op mogelijke PCR-inhibitie. Voor deze toepassing voegt u de interne controle direct aan het mengsel van HI Virus 1 RG Master A en HI Virus 1 RG Master B toe, zoals beschreven in stap 2b van het protocol (pagina 24).

De drempelwaarde voor de PCR -analyse instellen

De optimale drempelinstellingen voor een gegeven combinatie van een Rotor-Gene Q-apparaat en een *artus* RG PCR Kit moeten op empirische wijze worden ingesteld door elke afzonderlijke combinatie te testen, omdat het om relatieve waarden gaat die afhankelijk zijn van de gehele diagnostische workflow. Als uitgangspunt kan de drempel voor de analyse van de eerste PCRrun worden ingesteld op een voorlopige waarde van 0,04, maar deze moet worden afgestemd in een vergelijkende analyse van de volgende runs van de workflow. De drempel moet handmatig net boven het achtergrondsignaal van de negatieve controles en negatieve monsters worden ingesteld. De gemiddelde drempelwaarde die op basis van deze experimenten wordt berekend, is waarschijnlijk geschikt voor de meeste toekomstige runs; de gebruiker moet de gegenereerde drempelwaarde echter regelmatig opnieuw beoordelen. De drempelwaarde valt gewoonlijk binnen het bereik van 0,03-0,05 en moet worden afgerond op niet meer dan drie decimalen.

Quantitation (Kwantificatie)

De bijgevoegde kwantificatiestandaarden (HI Virus 1 RG QS 1–4) worden op dezelfde wijze behandeld als vooraf gezuiverde monsters en hetzelfde volume wordt gebruikt (20 µl). Om een standaardcurve te genereren op RotorGene Q-apparaten dienen alle 4 de kwantificatiestandaarden te worden gebruikt en in het dialoogvenster 'Edit Samples' (monsters bewerken) te worden gedefinieerd als standaarden met de gespecificeerde concentraties (zie de gebruikershandleiding van het apparaat).

① De kwantificatiestandaarden worden gedefinieerd als IE/μl.* Onderstaande vergelijking moet worden gebruikt om de aan de hand van de standaardcurve bepaalde waarden om te zetten in IE/ml van het monstermateriaal:

$$\text{Resultaat (IE/ml)} = \frac{\text{Resultaat (IE/μl)} \times \text{elutievolumen (μl)}}{\text{Monstervolumen (ml)}}$$

Als uitgangspunt dient het aanvankelijke monstervolumen in bovengenoemde vergelijking te worden ingevoerd. Hiermee moet rekening worden gehouden wanneer het monstervolumen voorafgaand aan de nucleïnezuurextractie is veranderd (bijv. verkleining van het volume door middel van centrifugeren of vergroting van het volume door aanvulling tot het voor de isolatie vereiste volume).

Conversiefactor

1 IE/ml komt overeen met 0,50 kopieën/ml voor detectie van HIV-1-RNA op de Rotor-Gene Q in combinatie met handmatige monstervoorbereiding met behulp van de QIAamp DSP Virus Kit. De conversiefactor is een schatting gebaseerd op de gemiddelde factor over het dynamische bereik van de assay.

*De standaard is gekalibreerd met behulp van de Internationale HIV-richtlijn (WHO).

Protocol: PCR en gegevensanalyse

i Wat u moet weten voor u begint

- Lees voordat u met de procedure begint 'Belangrijke opmerkingen', pagina 18-21.
- Neem de tijd om vertrouwd te raken met de Rotor-Gene Q alvorens het protocol te starten. Raadpleeg de gebruikershandleiding van het apparaat.
- Zorg ervoor dat per PCR-run ten minste één kwantificatiestandaard en één negatieve controle (water, PCR-kwaliteit) worden opgenomen. Om een standaardcurve te genereren, gebruikt u voor elke PCR-run alle 4 de meegeleverde kwantificatiestandaarden (HI Virus-1 RG QS 1–4).

Wat u moet doen voor u begint

- Zorg ervoor dat het koelblok (accessoire van het Rotor-Gene Q-apparaat) is voorgekoeld op 2-8 °C.
- Voorafgaand aan elk gebruik moeten alle reagentia volledig worden ontdooid, gemengd (door ze herhaaldelijk met een pipet op te zuigen of door ze snel te vortexen) en kort worden gecentrifugeerd.

Procedure

1. Plaats het gewenste aantal PCR-buisjes in de adapters van het koelblok.
2. Volg stap 2a als u de interne controle gebruikt om zowel de RNA-isolatieprocedure te monitoren als op mogelijke PCR-inhibitie te controleren. Volg stap 2b als u de interne controle uitsluitend gebruikt om op PCR-inhibitie te controleren.
- 2a. De interne controle is al toegevoegd aan de isolatie (zie 'Interne controle', pagina 20). Bereid in dat geval een mastermengsel volgens tabel 6.

Het reactiemengsel bevat doorgaans alle onderdelen die voor de PCR nodig zijn, behalve het monster.

Tabel 6. Bereiding van mastermengsel (interne controle gebruikt voor monitoring van RNA-isolatie en controle op PCR-inhibitie)

Aantal monsters	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	0 µl	0 µl
Totaal volume	30 µl	360 µl

- 2b. De interne controle moet direct aan het mengsel van HI Virus-1 Master A en HI Virus-1 Master B worden toegevoegd. Bereid in dat geval een mastermengsel volgens tabel 7.

Het reactiemengsel bevat doorgaans alle onderdelen die voor de PCR nodig zijn, behalve het monster.

Tabel 7. Bereiding van mastermengsel (interne controle uitsluitend gebruikt voor controle op PCR-inhibitie)

Aantal monsters	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 µl	144 µl
HI Virus-1 RG Master B	18 µl	216 µl
HI Virus-1 RG IC	2 µl	24 µl
Totaal volume	32 µl*	384 µl*

*De volumetoename als gevolg van het toevoegen van de interne controle wordt bij het voorbereiden van de PCR-assay genegeerd. Dit doet geen afbreuk aan de gevoeligheid van het detectiesysteem.

3. Pipetteer 30 µl mastermengsel in elk PCR-buisje. Voeg vervolgens 20 µl van het geëluëerde monster-RNA toe (zie tabel 8). Dienovereenkomstig moet 20 µl van ten minste één van de kwantificatiestandaarden (HI Virus-1 RG QS 1–4) worden gebruikt als positieve controle, en 20 µl water (water, PCR-kwaliteit) als negatieve controle.

Tabel 8. Voorbereiding van PCR-assay

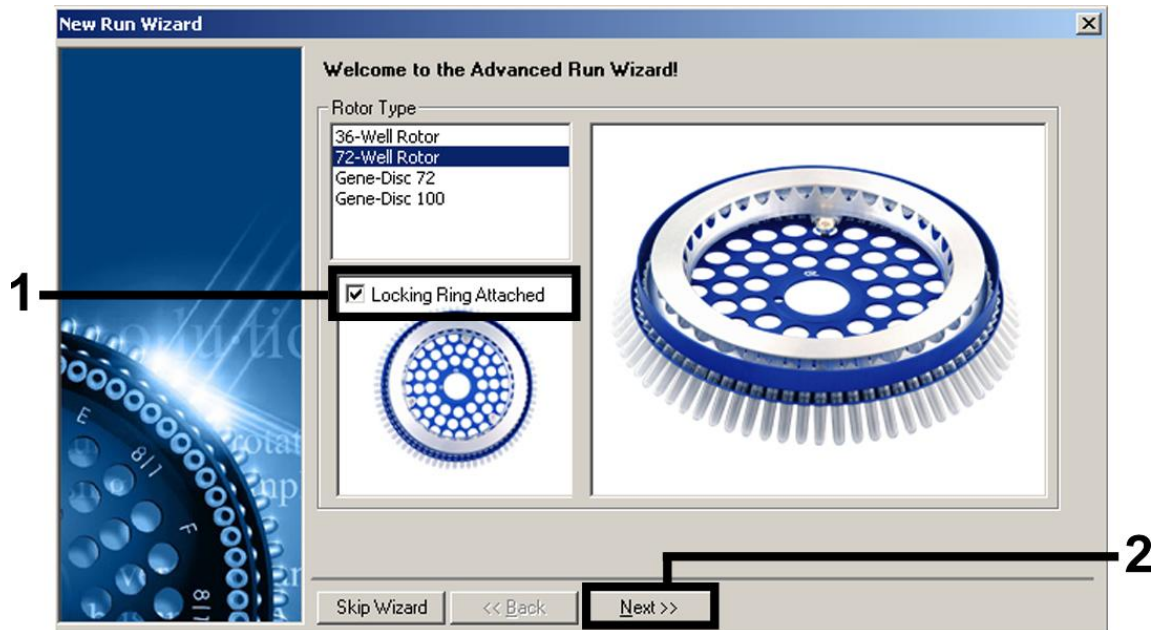
Aantal monsters	1	12
Mastermengsel	30 µl	elk 30 µl
Monster	20 µl	elk 20 µl
Totaal volume	50 µl	elk 50 µl

- Sluit de PCR-buisjes af. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (accessoire van het Rotor-Gene-apparaat) op de rotor is geplaatst om te voorkomen dat de buisjes tijdens de run per ongeluk open gaan.
- Volg de onderstaande stappen om een temperatuurprofiel aan te maken voor de detectie van HIV-1-RNA.

De algemene assayparameters instellen	Afbeeldingen 5, 6, 7
Omgekeerde transcriptie van het RNA	Afbeelding 8
Eerste activering van het hot-start-enzym	Afbeelding 9
Amplificatie van het cDNA	Afbeelding 10
Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal	Afbeelding 11
Starten van de run	Afbeelding 12

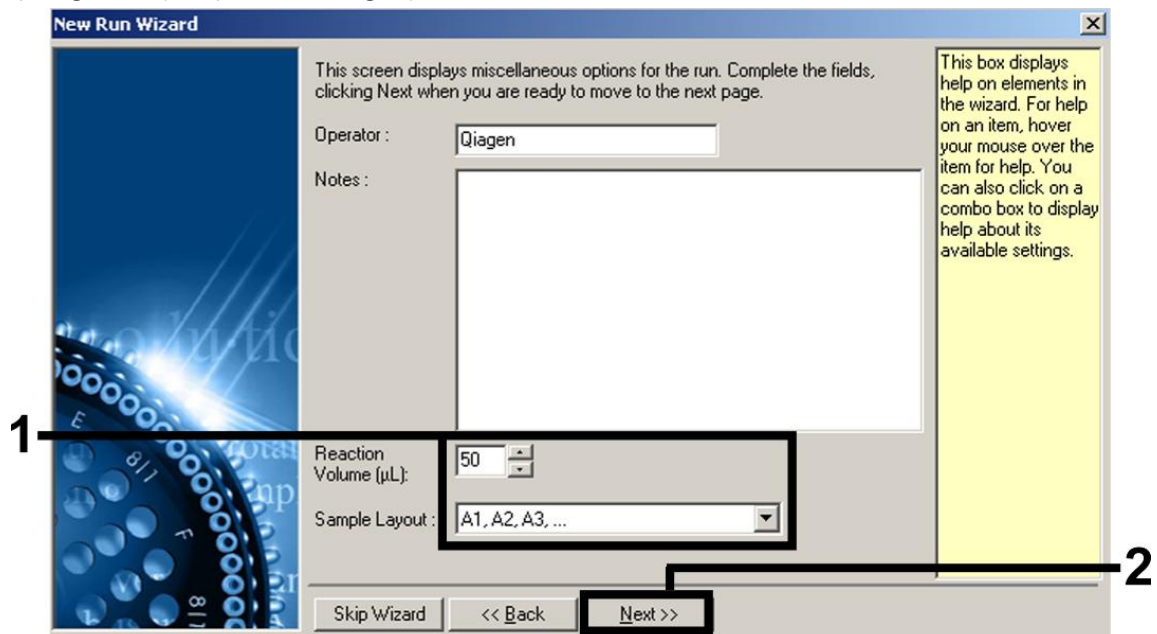
Alle specificaties verwijzen naar de Rotor-Gene Q-softwareversie 1.7.94, Rotor-Gene 6000-softwareversies 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 en de Rotor-Gene 3000-softwareversie 6.0.23. Meer informatie over het programmeren van Rotor-Gene-apparaten vindt u in de gebruikershandleiding bij het apparaat. In de illustraties hebben deze instellingen een vet zwart kader. Illustraties zijn opgenomen voor Rotor-Gene Q-apparaten. Daar waar verschillende waarden nodig zijn voor de Rotor-Gene 3000, worden deze verschillen in de tekst beschreven.

- Open in de eerste plaats het dialoogvenster 'New Run Wizard' (wizard nieuwe run) (afbeelding 5). Vink het vakje 'Locking Ring Attached' (vergrendelingsring aangebracht) aan en klik op 'Next' (volgende).



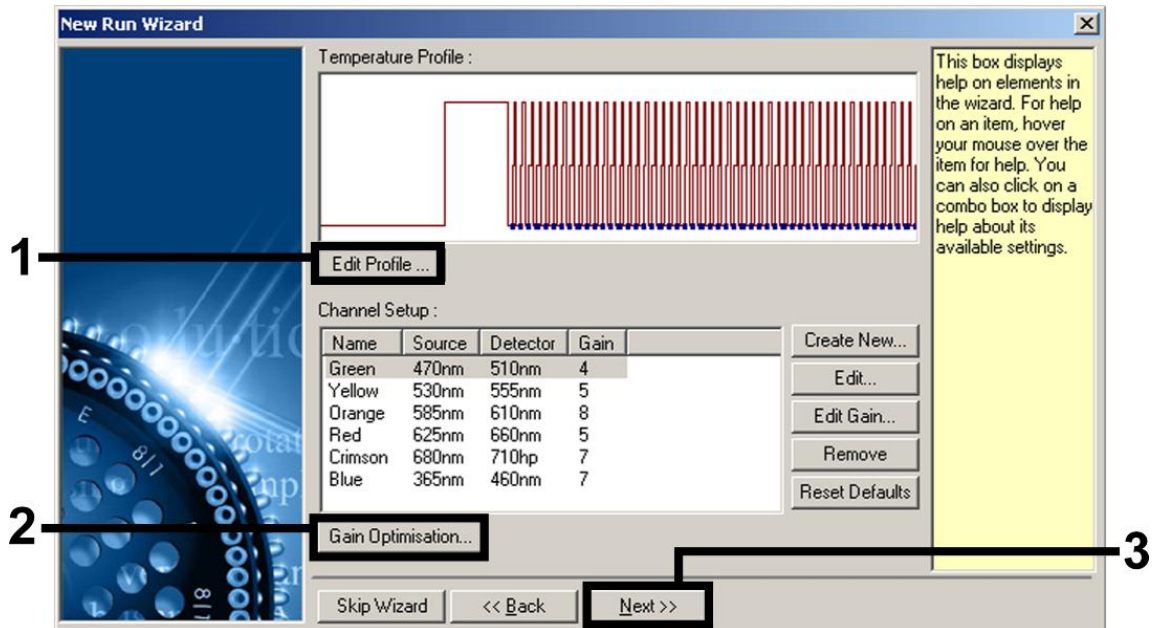
Afbeelding 5. Het dialoogvenster 'New Run Wizard' (wizard nieuwe run) .

- Selecteer 50 voor het PCR -reactievolume en klik op 'Next' (volgende). (afbeelding 6).

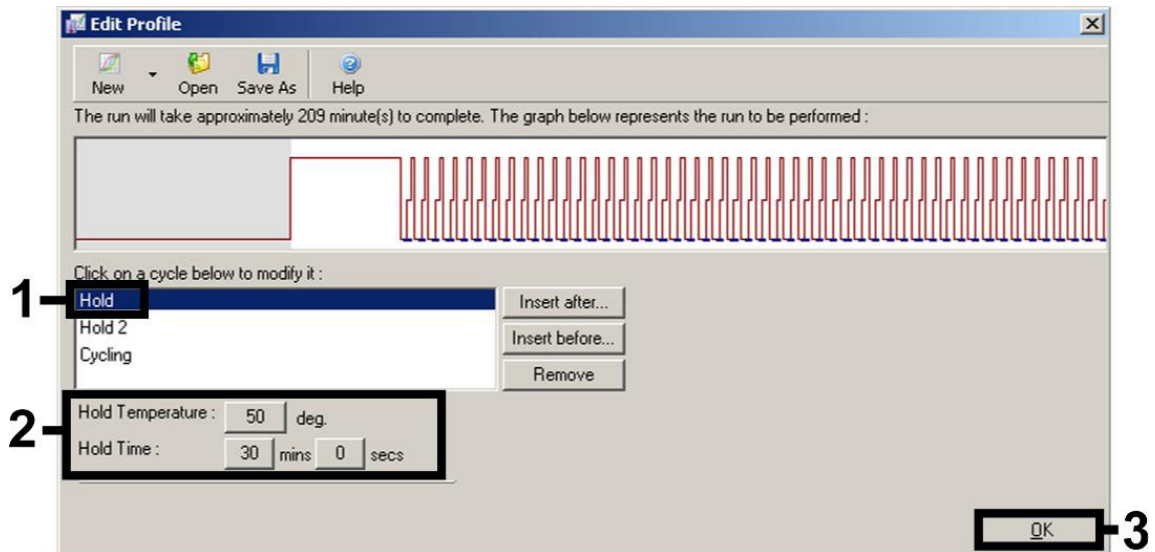


Afbeelding 6. De algemene assayparameters instellen.

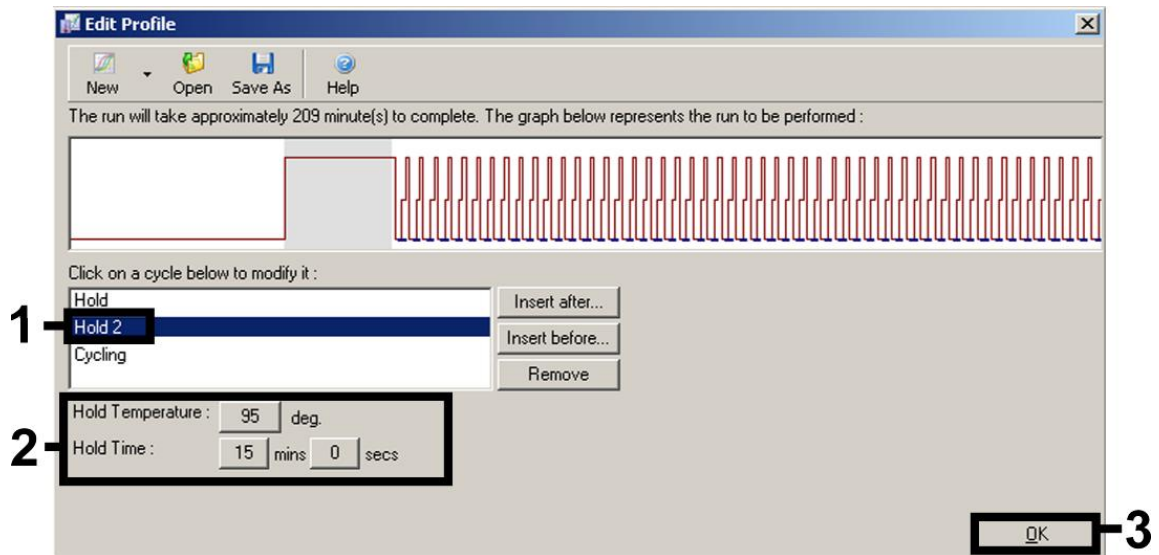
- Klik op de knop 'Edit Profile' (profiel bewerken) in het volgende dialoogvenster van de 'New Run Wizard' (wizard nieuwe run) (afbeelding 7) en programmeer het temperatuurprofiel zoals getoond in afbeeldingen 7-10.



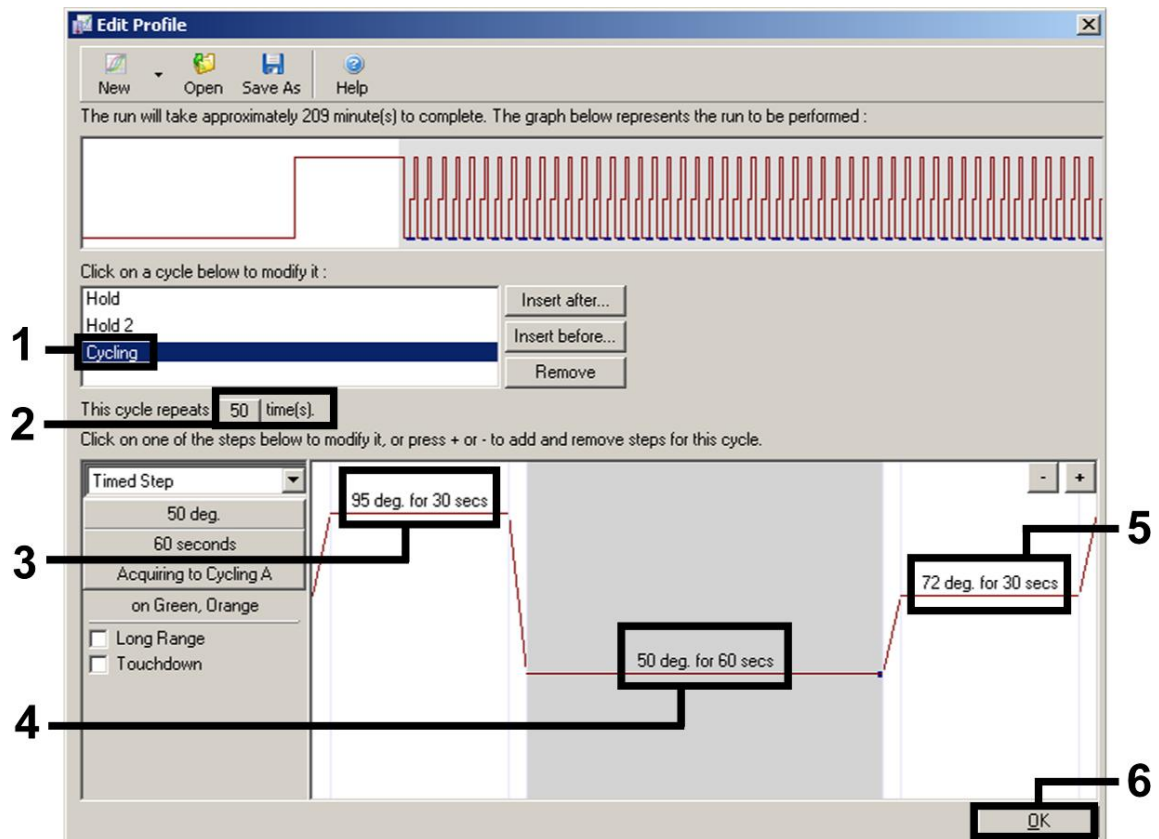
Afbeelding 7. Het profiel bewerken.



Afbeelding 8. Omgekeerde transcriptie van het RNA.

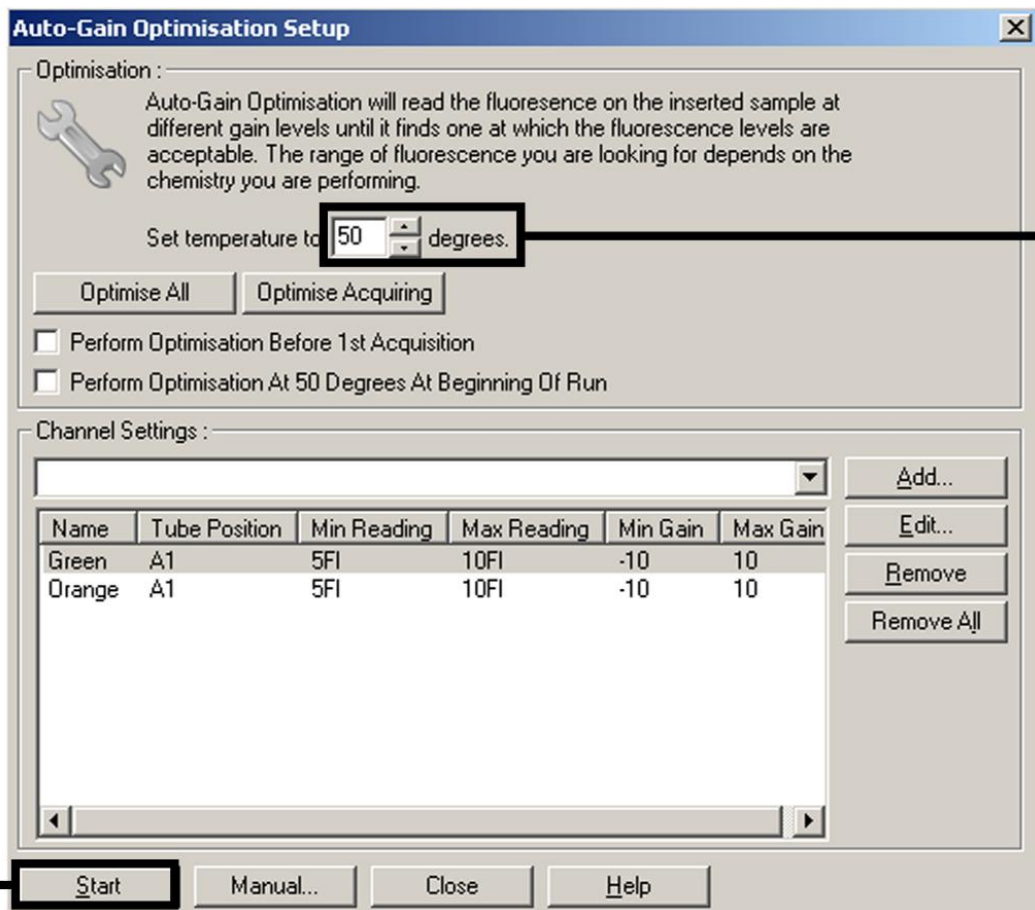


Afbeelding 9. Eerste activering van het hot-start-enzym.



Afbeelding 10. Amplificatie van het cDNA. Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zal de software de fluorescerende kleurstoffen definiëren als 'FAM/Sybr, RO X'.

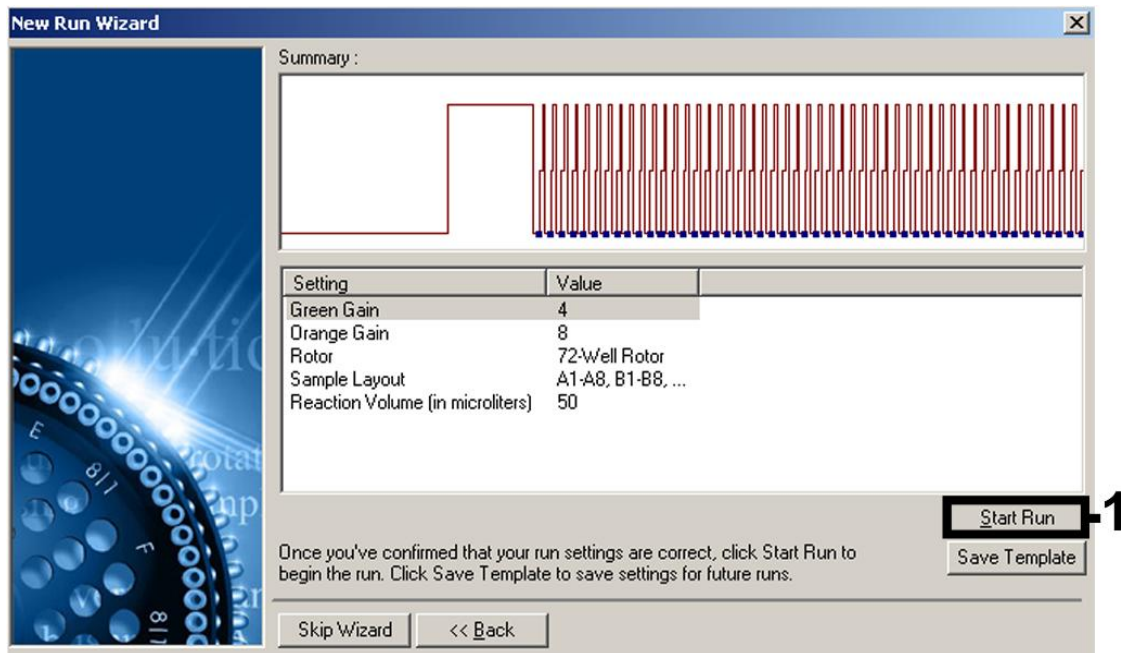
9. Het detectiebereik van de fluorescentiekanalen moet worden bepaald op basis van de intensiteit van de fluorescentie in de PCR-buisjes. Klik op 'Gain Optimisation' (gain -optimalisatie) in het dialoogvenster van de 'New Run Wizard' (wizard nieuwe run) (zie afbeelding 7) om het dialoogvenster 'Auto-Gain Optimisation Setup' (instellingen voor automatische gain -optimalisatie) te openen. Stel de kalibratietemperatuur in op 50 zodat deze overeenkomt met de versmeltingstemperatuur van het amplificatieprogramma (afbeelding 11).



Afbeelding 11. Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal.

Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zal de software de fluorescerende kleurstoffen definiëren als 'FAM/Sybr' en 'ROX'.

10. De versterkingswaarden die bepaald zijn aan de hand van de kanaalkalibratie worden automatisch opgeslagen en verschijnen in het laatste menuvenster van de programmeringsprocedure (afbeelding 12). Klik op 'Start Run' (Run starten).



Afbeelding 12. Starten van de run. Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zal de software de fluorescerende kleurstoffen definiëren als 'FAM/Sybr' en 'RO X'.

11. . De volgende resultaten (11a, 11b en 11c) zijn mogelijk.

Voorbeelden van positieve en negatieve PCR-reacties worden gegeven in afbeelding 13 en afbeelding 14.

Tabel 9 geeft richtlijnen weer voor de interpretatie van kwantitatieve resultaten.

- 11a. Er wordt een signaal gedetecteerd in fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen).

Het resultaat van de analyse is positief: het monster bevat HIV-1-RNA.

In dit geval is de detectie van een signaal in het kanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) van weinig belang, aangezien hoge aanvankelijke concentraties van HIV-1-RNA (positief signaal in het kanaal Cycling Green (Cyclisch groen) kunnen leiden tot een verminderd of afwezig fluorescentiesignaal van de interne controle in het kanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) (competitie).

i Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zijn de relevante kanalen Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM) voor het positieve signaal en Cycling A.RO X (Cyclisch A.RO X) voor de interne controle.

11b. In fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen) wordt geen signaal gedetecteerd. Tegelijkertijd verschijnt een signaal van de interne controle in het kanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje). In het monster wordt geen HIV -1-RNA gedetecteerd. Het kan worden beschouwd als negatief.

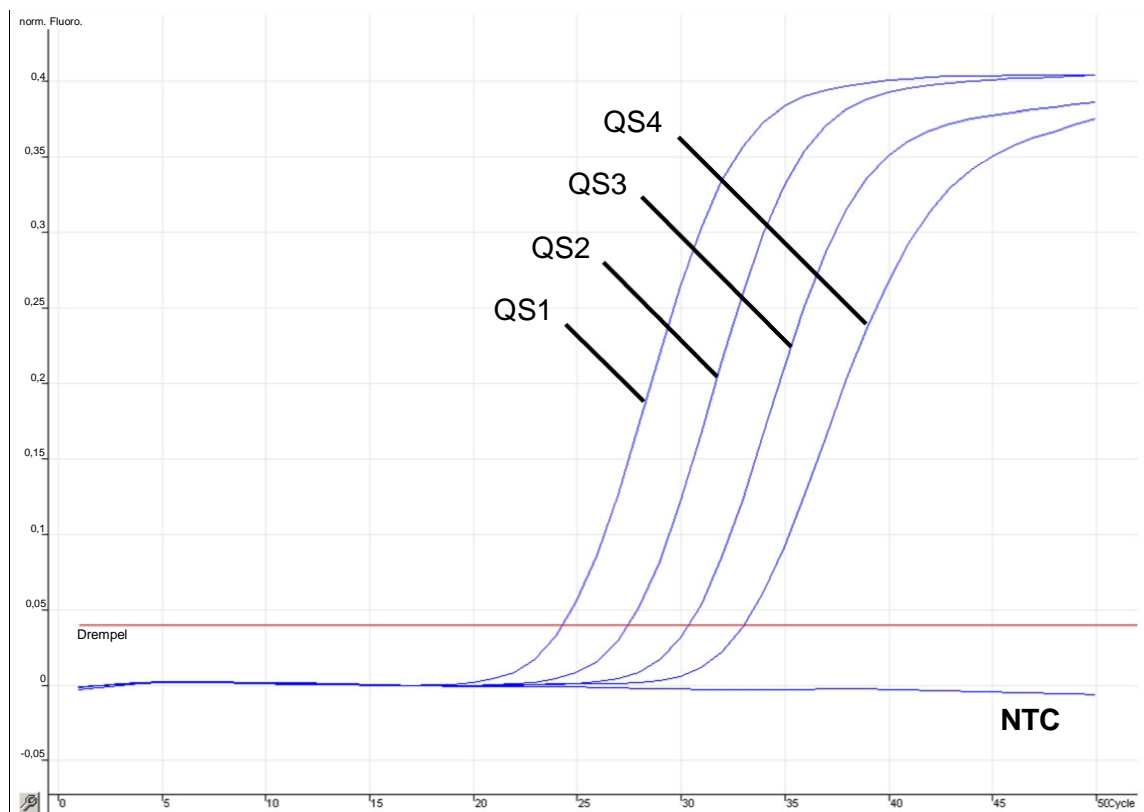
In het geval van een negatieve HI Virus1 RT-PCR, sluit het gedetecteerde signaal van de interne controle de mogelijkheid van RT-PCR-inhibitie uit.

i Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zijn de relevante kanalen Cycling A.ROX (Cyclisch A.ROX) voor de interne controle en het ontbreken van een signaal voor Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM).

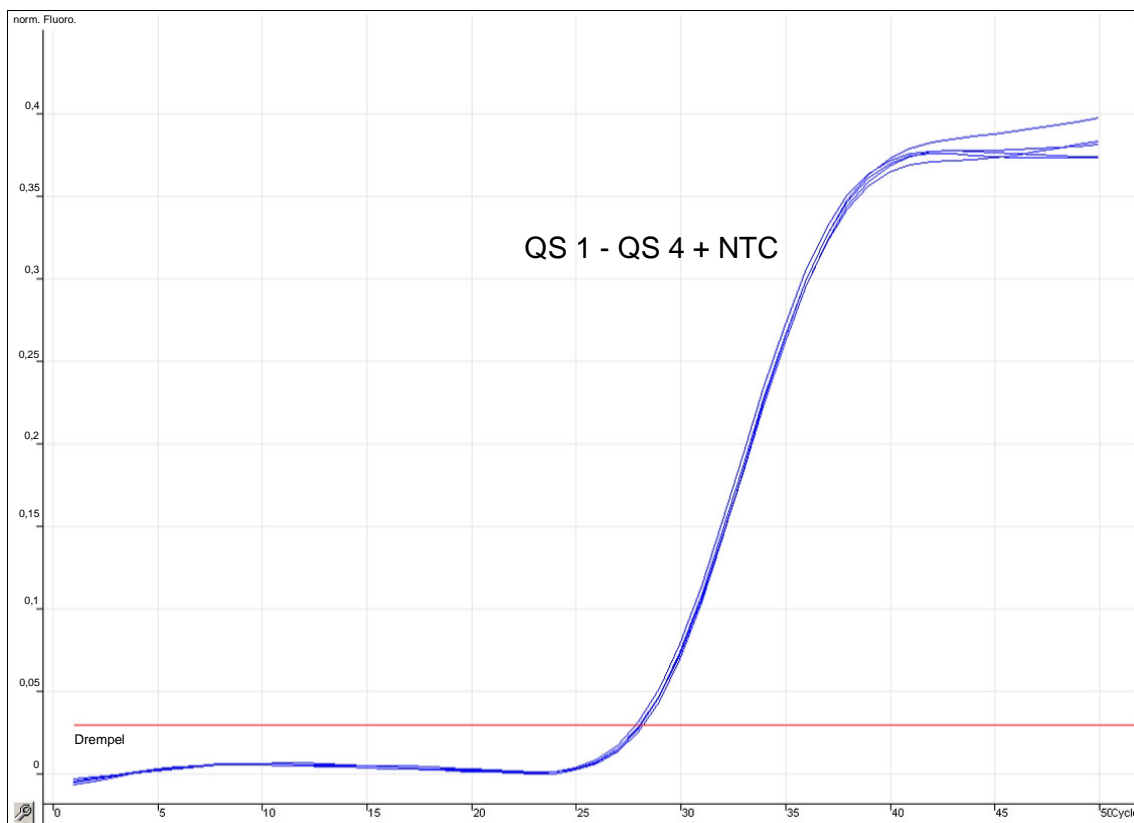
11c. Er wordt geen signaal gedetecteerd in de kanalen Cycling Green (Cyclisch groen) of Cycling Orange (Cyclisch oranje). Er kan geen resultaat worden vastgesteld.

Informatie met betrekking tot foutbronnen en de oplossing ervan kunt u vinden in 'Probleemoplossingsgids, pagina 33.

i Opmerking: Op de Rotor-Gene 3000 zijn de relevante kanalen Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM) en Cycling A.ROX (Cyclisch A.ROX).



Afbeelding 13. Detectie van de kwantificatiestandaarden (HI Virus -1 RG QS 1–4) in fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen). NTC : No template control (Controle zonder template) (negatieve controle).



Afbeelding 14. Detectie van de interne controle (IC) in fluorescentiekanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) met gelijktijdige amplificatie van de kwantificatiestandaarden (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (Controle zonder template) (negatieve controle).

Tabel 9. Interpretatie van kwantitatieve resultaten

Resultaat	Interpretatie
HIV-RNA > 72 IE/ml	Het resultaat is binnen het vastgestelde testbereik. De detectiekans van HIV-RNA is > 95%. Het positieve testresultaat is statistisch verzekerd.
HIV-RNA < 72 IE/ml	Het resultaat is buiten het vastgestelde testbereik. De reproduceerbaarheid van het positieve resultaat is niet gegarandeerd.
HIV-RNA-negatief	Er werd geen HIV-RNA gedetecteerd.





Probleemoplossingsgids

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina Veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische dienst van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

De positieve controles (HI Virus-1 RG QS 1–4) geven geen signaal in fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen) of Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM)

- | | |
|--|--|
| a) Het gekozen fluorescentiekanaal voor de analyse van PCR-gegevens voldoet niet aan het protocol |  Voor de analyse van gegevens kiest u het fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen) of Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM) voor de analytische HI Virus-1 RT-PCR en het fluorescentiekanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) of Cycling A.RO X (Cyclisch A.RO X) voor de interne controle RT-PCR. |
| b) Onjuiste programmering van het temperatuurprofiel van het Rotor-Gene-apparaat |  Vergelijk het temperatuurprofiel met het protocol. Zie 'Protocol: PCR en gegevensanalyse', pagina 23. |
| c) Onjuiste configuratie van de PCR |  Controleer uw werkstappen aan de hand van het pipetteerschema en herhaal zo nodig de PCR. Zie 'Protocol: PCR en gegevensanalyse', pagina 23. |
| d) De bewaarcondities voor een of meer kitonderdelen voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in 'Bewaren' (pagina 5) |  Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |

Opmerkingen en suggesties

- e) De uiterste houdbaarheidsdatum van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is verstreken
- ⓘ Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit.

Zwak of geen signaal van de interne controle in fluorescentiekanaal Cycling Orange (Cyclisch oranje) of Cycling A.ROX (Cyclisch A.ROX) en simultane afwezigheid van een signaal in kanaal Cycling Green (Cyclisch groen) of Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM)

- a) De PCR-condities voldoen niet aan het protocol
- ⓘ Controleer de PCR-condities (zie hierboven) en herhaal indien nodig de PCR met de gecorrigeerde instellingen.
- b) De PCR werd geremd
- ⓘ Zorg ervoor dat u de aanbevolen isolatiemethode gebruikt en volg de instructies van de fabrikant nauwkeurig op.
- c) Tijdens de extractie is RNA verloren gegaan
- ⓘ Als de interne controle aan de extractie werd toegevoegd, kan een afwezig signaal van de interne controle duiden op het verlies van RNA tijdens de extractie. Zorg ervoor dat u de aanbevolen isolatiemethode gebruikt (zie 'RNA-isolatie', pagina 20) en volg de instructies van de fabrikant nauwkeurig op.
- d) De bewaarcondities voor een of meer kitonderdelen voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in 'Bewaren' (pagina 5)
- ⓘ Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit.
- e) De uiterste houdbaarheidsdatum van de *artus*HI Virus-1 RG RT-PCR Kit is verstreken
- ⓘ Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit.

De negatieve controles in fluorescentiekanaal Cycling Green (Cyclisch groen) of Cycling A.FAM (Cyclisch A.FAM) van de analytische PCR geven signaal

a) Er is contaminatie opgetreden tijdens de voorbereiding van de PCR

① Herhaal de PCR in replica's met nieuwe reagentia.

① Sluit indien mogelijk de PCRbuisjes direct na toevoeging van het te testen monster af.

① Zorg ervoor dat u de positieve controles het laatst pipetteert.

① Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.

b) Er is contaminatie opgetreden tijdens de extractie

① Herhaal de extractie en de PCR van het te testen monster met gebruikmaking van nieuwe reagentia.

① Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.

Referenties

QIAGEN onderhoudt een grote, actuele online database van wetenschappelijke publicaties waarin producten van QIAGEN zijn gebruikt. Uitgebreide zoekopties stellen u in staat om de artikelen die u nodig hebt te vinden, door eenvoudig te zoeken op trefwoord of door de toepassing, het onderzoeksgebied, een titel, etc. op te geven.

Kijk voor de volledige lijst met referenties in de online referentiedatabase van QIAGEN via www.qiagen.com/RefDB/search.asp of neem contact op met de afdeling Technical Services van QIAGEN of met uw plaatselijke leverancier.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: 2 masters, 4 kwantificatiestandaarden, interne controle, water (PCRklasse)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT PCR Kit (96)	Voor 96 reacties: 2 masters, 4 kwantificatiestandaarden, interne controle, water (PCRklasse)	4513265
QIAamp DSP Virus Kit – voor zuivering van virale nucleïnezuren uit humaan plasma voor in-vitrodiagnostische doeleinden		
QIAamp DSP Virus Kit	Voor 50 bereidingen: QIAamp MinElute®-spinkolommen, buffers, reagentia, buisjes, kolomverlengers en VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx: voor IVD-gevalideerde, realtime PCR-analyse in klinische toepassingen		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9002033

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Realtime PCR-apparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptop, software, accessoires: 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Realtime PCR-apparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9002042
Rotor-Gene Q – voor uitstekende prestaties in realtime PCR		
Rotor-Gene Q 5plex System	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9001570

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Realtime PCRcycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Realtime PCRcycler en smeltpuntanalysator met hoge resolutie met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]) plus HRM-kanaal, laptop, software, toebehoren, 1 jaar garantie op componenten en werkuren, installatie en opleiding niet inbegrepen	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Realtime PCRapparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptop, software, accessoires: 1jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Realtime PCRapparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptop, software, accessoires: 1jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9001590
Rotor-Gene Q -accessoires		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een enkelkanaals pipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901

Product	Inhoud	Cat.nr.
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiumblok voor het handmatig opzetten van reacties in een standaard 8 x 12-opstelling met gebruikmaking van 96 buisjes van 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dunwandige buisjes voor 1000 reacties	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 dunwandige buisjes voor 1000 reacties	981008

Zie de (gebruikers)handleiding van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. De (gebruikers)handleidingen van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen bij de afdeling Technical Services van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

De aankoop van dit product geeft de koper het recht om het product te gebruiken voor het uitvoeren van diagnostische diensten voor humane in-vitrodiagnostiek. Hierbij wordt door de aanschaf geen algemeen octrooi of andere licentie van enige aard verleend anders dan dit specifieke recht van gebruik.

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

De *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit en de QIAamp DSP Virus Kit zijn diagnostische kits met G-markering volgens de Europese Richtlijn 98/79/EG betreffende in-vitrodiagnostiek. Niet in alle landen verkrijgbaar.

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit mag alleen worden gebruikt in overeenstemming met de handleiding van de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit en voor toepassing met uitsluitend de onderdelen die in de kit zitten. QIAGEN verleent geen licentie onder haar intellectuele eigendom om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of vermengen met componenten die niet met de kit zijn meegeleverd, behalve indien beschreven in de handleiding bij de *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN kan de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht met betrekking tot de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Raadpleeg www.qiagen.com voor de bijgewerkte licentievoorwaarden.

© 2015 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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)

