

2017. március

artus[®] BK Virus RG PCR Kit Kézikönyv



24 (katalógusszám 4514263)



96 (katalógusszám 4514265)

Első verzió

IVD

Kvantitatív *in vitro* diagnosztikai használatra

Rotor-Gene[®] Q készülékkel való használatra



REF

4514263, 4514265

HB

1056823EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden. GERMANY

R4

MAT

1056823HU



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN, élvonalbeli termékkörrel rendelkezik az innovatív mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák terén, lehetővé téve bármely biológiai minta tartalmának izolálását és detektálását. Korszerű, magas színvonalú termékeink és szolgáltatásaink biztosítják a sikert ügyfeleinknek a mintáktól az eredményekig.

A QIAGEN meghatározó az alábbi területeken:

- DNS, RNS és fehérjék tisztítása
- Nukleinsav- és fehérjevizsgálatok
- mikro-RNS kutatás és RNSi
- Mintafeldolgozási és vizsgálati technológiák automatizálása

Küldetésünk, hogy Ön kimagasló sikereket és tudományos áttörést érjen el. További információkért látogasson el honlapunkra: www.qiagen.com.

Tartalomjegyzék

Alkalmazási terület	4
Összefoglalás és magyarázat	4
Pathogén információk	4
Az eljárás (meghatározás) elve	5
Mellékelt anyagok	5
A kit tartalma	5
A felhasználó által biztosítandó anyagok	6
Figyelmeztetések és óvintézkedések	6
Általános óvintézkedések	7
Reagens tárolása és kezelése	7
Eljárás	8
DNS izolálás	8
Belső kontroll	8
Protokoll: PCR és adatelemzés	10
Eredmények értékelése	16
Kvantitálás	16
Eredmények	17
Hibaelhárítási útmutató	18
Minőség-ellenőrzés	20
Korlátozások	20
Teljesítmény jellemzők	21
Analitikai érzékenység	21
Specifitás	21
Pontosság	23
Robosztusság	24
Reprodukálhatóság	24
Diagnosztikai kiértékelés	24
Referenciák	24
Jelmagyarázat	25
Elérhetőség	25
Rendelési információk	26

Alkalmazási terület

Az *artus* BK Virus PCR Kit a humán plazmában vagy vizeletben lévő BK vírus DNS kvantifikálására szolgáló in vitro diagnosztikai amplifikációs teszt. Ez a diagnosztikai teszt polimeráz láncreakción (PCR) alapuló technológiát használ és a Rotor-Gene Q készülékkel együtt használható.

Megjegyzés: Az *artus* BK Virus RG PCR Kit nem használható a Rotor-Gene Q 2plex típusú készülékével.

Összefoglalás és magyarázat

Az *artus* BK Virus RG PCR Kit egy használatrakész, BK vírus DNS detektálására szolgál, polimeráz láncreakción (PCR) alapuló technológiát használ a Rotor-Gene Q készüléken. A BK vírus RG Master a BK vírus genom 274 bp-os régiójának specifikus amplifikálásához szükséges reagenseket és enzimeket tartalmazza, a Rotor Gene Q MDx, Rotor-Gene Q vagy a Rotor-Gene 6000 készülék Cycling Green/Zöld fluoreszcens csatornájában történő közvetlen kimutatásra.

Emellett, az *artus* BK Virus RG PCR Kit tartalmaz egy heterológ amplifikációs rendszert a lehetséges PCR gátlások azonosítására. Ezt belső kontrollként a Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q vagy Rotor-Gene 6000 Cycling Orange/Narancssárga fluoreszcens csatornája detektálja. A BK Virus PCR analitikai kimutatási határa (lásd „**Analitikai érzékenység**”, 21. oldal) nem csökken. A kit külső pozitív kontrollokat (BK Virus RG QS 1-4) tartalmaz, melyek lehetővé teszik a virális DNS mennyiségének meghatározását. További információért nézze meg, az „**Eredmények értékelése**” című fejezetet a 16. oldalon.

Pathogén információk

A BK vírus (BKV) a poliomavírusok családjába tartozó DNS vírus. Az elsődleges fertőzések többnyire a gyermekkorban fordulnak elő és általában tünetmentesek. Felnőttkorban az előfordulási gyakoriság eléri a 90%-ot. Az elsődleges fertőzés után a BKV látens marad a vesesejtekben, de immunhiányos állapotban, mint például transzplantáció során, reaktiválódhat.

A BKV fertőzés vese transzplantációs betegeknél összefüggésbe hozható a tubulointerstitialis nephritis-el és az ureterostenosis-al csakúgy, mint a haemorrhagiás cystis-el a csontvelő transzplantált pácienseknél. A BK vírusfertőzés vasculopathia, vírusos tüdőgyulladás, encephalitis, retinitis betegségmintázattal együtt valamint több szervre kiterjedő elégtelenséggel társulhat.


Az állandó magas szintű BKV replikáció a poliomavirus-asszociált nephropathia tipikus jellemzője a vese transzplantált pácienseknél. A klinikai relevanciájú fertőzések többnyire az immunszuppresszált egyénekre korlátozódnak.

Az eljárás (meghatározás) elve

A polimeráz lánreakcióval történő patogén detektálás a patogén genom specifikus régióinak amplifikációján alapul. A real-time PCR segítségével amplifikált termékek fluoreszcens festékek segítségével detektálhatók. Ezek a festékek általában oligonukleotid próbákhoz vannak kötve, melyek specifikusan kapcsolódnak az amplifikálandó termékhez. A PCR futás alatt a fluoreszcens intenzitás nyomonkövetése (pl. real-time PCR-nél) lehetővé teszi az eljárás során felhalmozódott termékek detektálását és kvantitálását a reakció csövek PCR futás utáni újbóli kinyitása nélkül.*

Mellékelt anyagok

A kit tartalma

artus BK Virus RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalógusszám		4514263	4514265
Reakciók száma		24	96
Kék	BK Virus RG Master	2 x 12 reakció	8 x 12 reakció
Sárga	BK Virus RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol 400 µl	400 µl
Piros	BK Virus RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kópia/µl)	QS 200 µl	200 µl
Piros	BK Virus RG QS2 [‡] (1 x 10 ³ kópia/µl)	QS 200 µl	200 µl
Piros	BK Virus RG QS3 [‡] (1 x 10 ² kópia/µl)	QS 200 µl	200 µl
Piros	BK Virus RG QS4 [‡] (1 x 10 ¹ kópia/µl)	QS 200 µl	200 µl
Zöld	BK Virus RG IC [§]	IC 1000 µl	2 x 1000 µl
Fehér	Water (PCR grade) Víz (PCR minőségű)	1000 µl	1000 µl
	Kézikönyv	 1	1

[†] Magnézium oldat.

[‡] Kvantitációs standard.

[§] Belső kontroll (Internal Control).

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

A felhasználó által biztosítandó anyagok

Vegyianyagokkal történő munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információ érdekében tájékozódjon a megfelelő biztonsági adatlapokból (safety data sheets, SDSs), melyek a termék forgalmazójánál elérhetőek.

Reagensek

- DNS izoláló kit (lásd „DNS izolálás”, 8. oldal)

Fogyóeszközök

- Filterrel rendelkező steril pipetta hegyek
- Strip csövek és tetők, 0.1 ml, 72-well rotor adapterhez (katalógusszám 981103 vagy 981106)
- Vagy: PCR csövek, 0.2 ml, 36-well rotor adapterhez (katalógusszám 981005 vagy 981008)

Eszközök

- Pipetták (állítható)*
- Vortex mixer*
- Asztali centrifuga* 2 ml reakció csöves rotorral
- Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, vagy Rotor-Gene Instrument*† Cycling Green és Cycling Orange fluoreszcens csatornákkal
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q szoftver 1.7.94 verziója vagy újabb (Rotor-Gene 6000 szoftver 1.7.65 verzió)
- Hűtőblokk (Adapter blokk 72 x 0.1 ml csövek, katalógusszám 9018901, vagy adapter blokk 96 x 0.2 ml csövek, katalógusszám 9018905)

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra

Kémiai anyagokkal történő munka során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget. További információ érdekében tájékozódjon a megfelelő biztonsági adatlapokból (safety data sheets, SDSs), melyek a terméket forgalmazóknál érhetőek el. Ezek online felületen kényelmesen elérhetőek, a teljes PDF formátumot a

* Bizonyosodjon meg róla, hogy a készülék a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizve és kalibrálva legyen.

† Az *artus* BK Virus RG PCR Kit nem használható Rotor-Gene Q 2plex készülékekkel nem használható.

www.qiagen.com/safety oldalon található meg, megnézheti, letöltheti, és az SDS lap minden egyes QIAGEN® kithoz és kit komponenshez kinyomtatható.

A megmaradt mintát és assay hulladékot a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kezelje.

Általános óvintézkedések

A felhasználó mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- Használjon szűrős, steril pipettákat.
- A pozitív anyagokat (minták, pozitív kontrollok és amplikonok) minden más reagenstől elkülönítve tárolja és dolgozza fel, és a reakciómixhez térben elkülönített helyen adja hozzá.
- Olvassa fel az összes komponenst szobahőmérsékleten (15-25°C) a vizsgálat előtt.
- Amikor felolvadt, keverje össze a komponenseket (fel-le pipettázással, vagy vortex-el) és röviden centrifugálja le
- Dolgozzon gyorsan és tartsa a PCR reagenseket bemérés előtt jégen vagy a hűtőblokkban (72/96-well adapter blokk).

Reagens tárolása és kezelése

Az *artus* BK Virus PCR Kit komponenseit -15°C és -30°C között kell tárolni. Szavatosságát a jelzett lejáratú időpontig őrzi meg. Az ismételt fagyasztás és felolvasztás (>2 x) kerülendő, mert az az assay érzékenységének csökkenéséhez vezethet. Amennyiben a reagensek csak alkalmasszerűen vannak használva, alikvótokban kell őket lefagyasztani. A tárolásuk 2–8°C-on nem haladhatja meg az 5 órát.

Eljárás

DNS izolálás

Az EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat.szám 62724)* a humán plazmából és vizeletből történő virális eredetű nukleinsavak izolálására validált kit, az *artus* BK Virus RG PCR Kit-el együtt használatos. A virális DNS tisztítását az *EZ1 DSP Virus Kit Kézikönyvének* utasításai alapján végezzük, 400 µl kiindulást mintából.

Megjegyzés: Az *artus* BK Virus RG PCR Kit-et ne használjuk fenol alapú izolálási eljárásokhoz.

Megjegyzés: A hordozó (carrier) RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és ennek következtében a DNS/RNS kinyerésre. Követve az *EZ1 DSP Virus Kit Kézikönyv* utasításait, minden egyes extrakcióhoz adja hozzá a megfelelő mennyiségű hordozó RNS-t.

Megjegyzés: Az *artus* BK Virus RG PCR Kit belső kontrollját használhatja közvetlenül az izolálási eljárásban (lásd „**Belső kontroll**”, 8. oldal).

Megjegyzés: Erősen ajánlott az EZ1 DSP Virus Kit által kinyert, tisztított DNS, közvetlenül az extrakció utáni felhasználása a PCR reakcióban. Alternatívaként, az eluátumok 3 napig 4°C-on tárolhatóak a PCR elemzés előtt.

Belső kontroll

A belső kontrollt (BK Virus RG IC) a kit tartalmazza. Ezáltal a felhasználó a DNS izolálási eljárást és az esetleges PCR gátlást is tudja ellenőrizni. Függetlenül attól, hogy melyik módszert/rendszert használjuk, adjuk a belső kontrollt a nukleinsav izolálásához 0.1 µl/1 µl elúciós térfogat mennyiségben. Például az EZ1 DSP Virus Kit használatakor, amennyiben a virális nukleinsavat 60 µl elúciós AVE pufferbe (Elution Buffer (AVE)) eluáljuk, akkor előzetesen 6 µl belső kontrollt kell adni minden egyes minta/lízispuffer keverékéhez.

Fontos: A belső kontrollt és a hordozó RNS-t (lásd „**DNS izolálás**”, 8. oldal) a lízispuffer és a minta keverékéhez kell adni vagy közvetlenül a lízispufferhez.

A belső kontrollt ne adja hozzá közvetlenül a mintához. Ha már a lízispufferhez hozzáadta fontos megjegyezni, hogy a belső kontroll és lízispuffer-hordozó RNS keverékét mindig frissen készítse elő és azonnal használja fel (a keverék szobahőmérsékleten, vagy hűtőben történő pár órányi tárolása is a belső kontroll hibáját okozza és az extrakció hatékonyságát csökkenti).

* Az EZ1 DSP Virus Kit CE-IVD-jelzésű EASY*artus*® BK Virus RG PCR Kit-ek formájában is elérhető, kombinálható az *artus* BK Virus RG PCR Kit-el (**Rendelési információk** a 26. oldalon).

Közvetlenül ne adja hozzá a mintához sem a belső kontrollt sem/vagy a hordozó RNS-t.

A belső kontrollt használhatja kizárólag csak a lehetséges PCR gátlás ellenőrzésére is. Ebben az esetben közvetlenül a BK Virus RG Master és BK Virus RG Mg-Sol keverékéhez adja hozzá a protokoll 2b pontjában leírtak alapján (11. oldal).

Protokoll: PCR és adatelemzés

A kezdés előtti fontos lépések

- Szánjon időt arra, hogy megismerje a Rotor-Gene Q készüléket mielőtt elkezdené a protokollt. Nézze meg a készülék használati utasítását.
- Győződjön meg róla, hogy legalább egy kvantifikációs standardot, valamint egy negatív kontrollt (víz, PCR-tisztaságú) is tartalmaz a PCR futásonként. Standard görbe elkészítéséhez használja mind a négy, kitben lévő, kvantifikációs standardot (BK Virus RG QS 1–4) a PCR futás.

Teendők a kezdés előtt

- Győződjön meg róla, hogy a hűthető adapter (Rotor-Gene Q készülék tartozéka) előhűtött állapotban van: 2-8°C-on.
- Minden használat előtt az összes reagenst teljesen fel kell olvasztani, össze kell keverni (ismételt fel és le pipetázással vagy gyors vortexeléssel), és röviden centrifugálni.

A folyamat

1. Helyezze el a kívánt mennyiségű PCR csövet a hűtőblokk adaptereibe.
2. Amennyiben a belső kontrollt a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR inhibíció ellenőrzésére szeretné használni, kövesse a 2a lépést. Ha a belső kontrollt kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésre használná, kövesse a 2b lépésben leírtakat.
- 2a. A belső kontroll már az izoláláshoz lett adva (lásd „Belső kontroll”, 8. oldal). Ebben az esetben a master mixet az 1. táblázatnak megfelelően.

A reakció mix alapértelmezésben a PCR-hez szükséges minden komponenst tartalmazza, kivéve a mintát.

1. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használata a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR gátlás ellenőrzésére)

Mintaszám	1	12
BK Virus RG Master	7 µl	84 µl
BK Virus RG Mg-Sol	3 µl	36 µl
BK Virus RG IC	0 µl	0 µl
Teljes térfogat	10 µl	120 µl

- 2b. A belső kontrollt közvetlenül a BK Virus RG Master és BK Virus RG Mg-Sol keverékéhez kell adni. Ebben az esetben a master mixet a 2. táblázatnak megfelelően készítse el.**

A reakció mix a PCR-hez szükséges minden komponenst tartalmazza, kivéve a mintát.

2. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használata kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésére)

Mintaszám	1	12
BK Virus RG Master	7 µl	84 µl
BK Virus RG Mg-Sol	3 µl	36 µl
BK Virus RG IC	1.5 µl	18 µl
Teljes térfogat	11.5 µl*	138 µl*

* A PCR assay előkészítése során a belső kontroll hozzáadásával okozott térfogatnövekedés elhanyagolható. A Detektáló rendszer érzékenysége ezáltal nem romlik.

- 3. Pipettázon 10 µl master mixet minden egyes PCR csőbe. Ezután adjon hozzá 15 µl-t a DNS minta eluátumból (lásd 3. táblázatnak). Ennek megfelelően adjon hozzá 15 µl-t legalább az egyik kvantifikációs standardból (BK Virus RG QS 1–4) pozitív kontrollként és 15 µl vizet (Víz, PCR-tisztaságú) negatív kontrollként.**

3. Táblázat: PCR assay összemérése

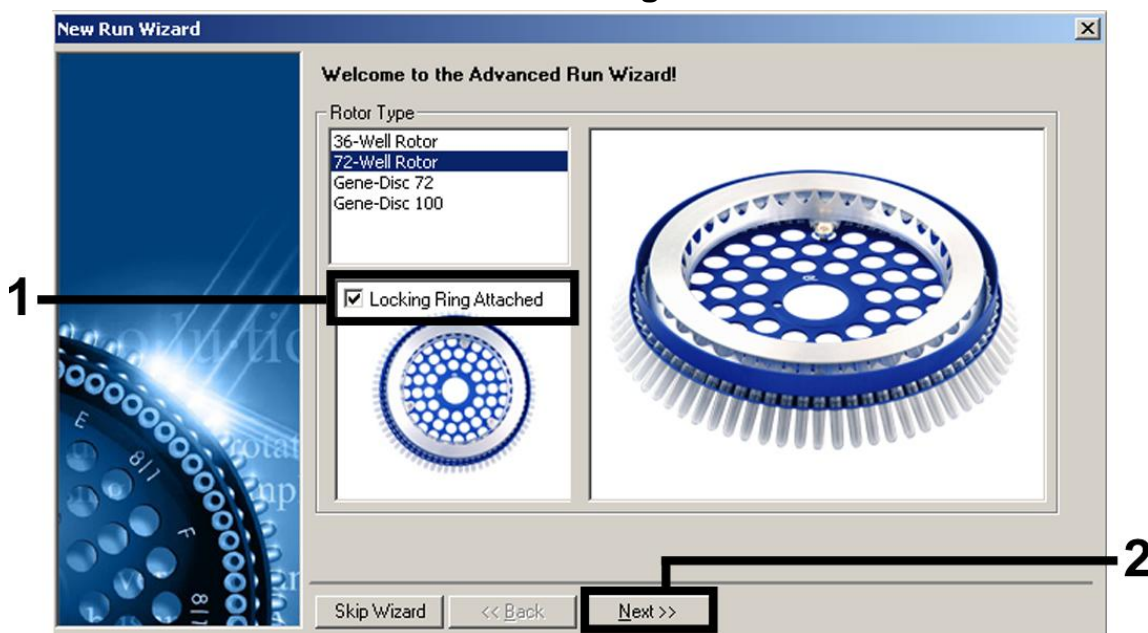
Mintaszám	1	12
Master mix	10 µl	10 µl per minta
Minta	15 µl	15 µl per minta
Teljes térfogat	25 µl	25 µl per minta

- 4. Zárja le a PCR csöveket. Győződjön meg róla, hogy a zárógyűrű (a Rotor-Gene Q készülék tartozéka) a rotor tetején helyezkedik el, megakadályozva ezzel a csövek kinyílását a futás alatt.**
- 5. A BK vírus DNS detektálására készítsen el egy hőmérséklet profilt az alábbi lépések alapján.**

Általános assay paraméterek beállítása	1, 2, 3. ábrák
A hot-start enzim kezdeti aktiválása	4. ábra
DNS amplifikáció	5. ábra
Fluoreszcens csatornák érzékenységének beállítása	6. ábra
A futás indítása	7. ábra

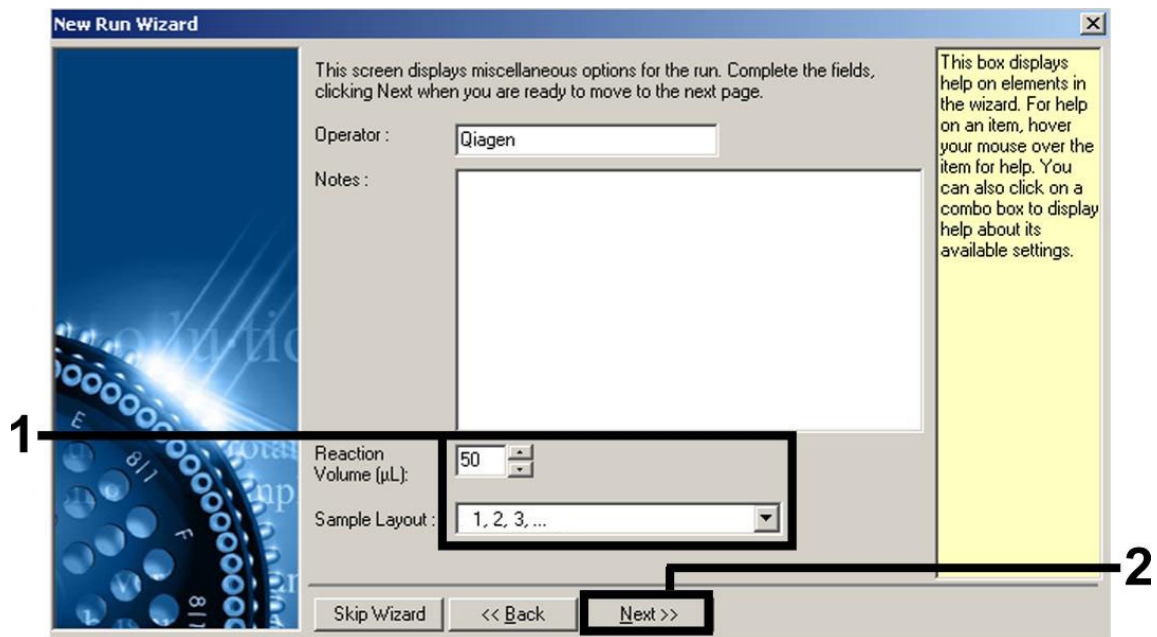
Minden specifikáció a Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software 1.7.94 és Rotor-Gene 6000 software 1.7.65 verzióihoz ajánlott. További programozási információt a Rotor-Gene készülékhez, annak használati útmutatójában talál. Ezeket a beállításokat az illusztrációban vastag, fekete kerettel jelöltük.

6. Először nyissa meg a „New Run Wizard” Új Futás párbeszéd ablakot (1.ábra). Pipálja be a „Locking Ring Attached” (Záró gyűrű rögzítve) sort és kattintson a „Next” Következő gombra.



1. ábra: Új futás párbeszédablak.

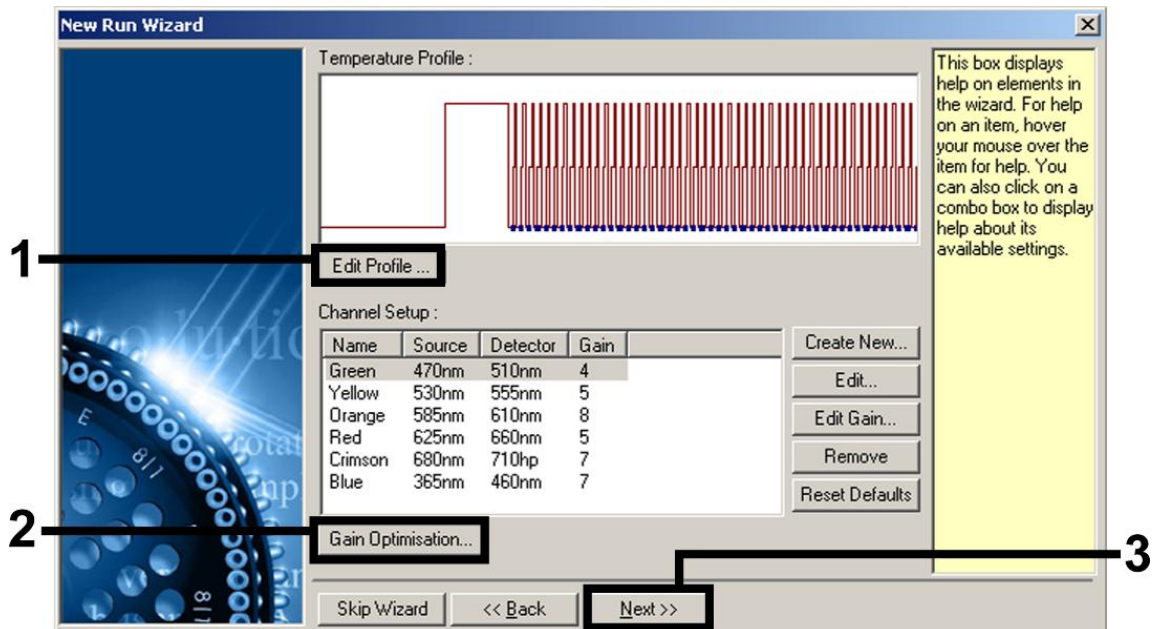
7. Válassza a PCR-hez az 50 (µl) reakció térfogatot és kattintson a „Next” (Következő) gombra (2.ábra)



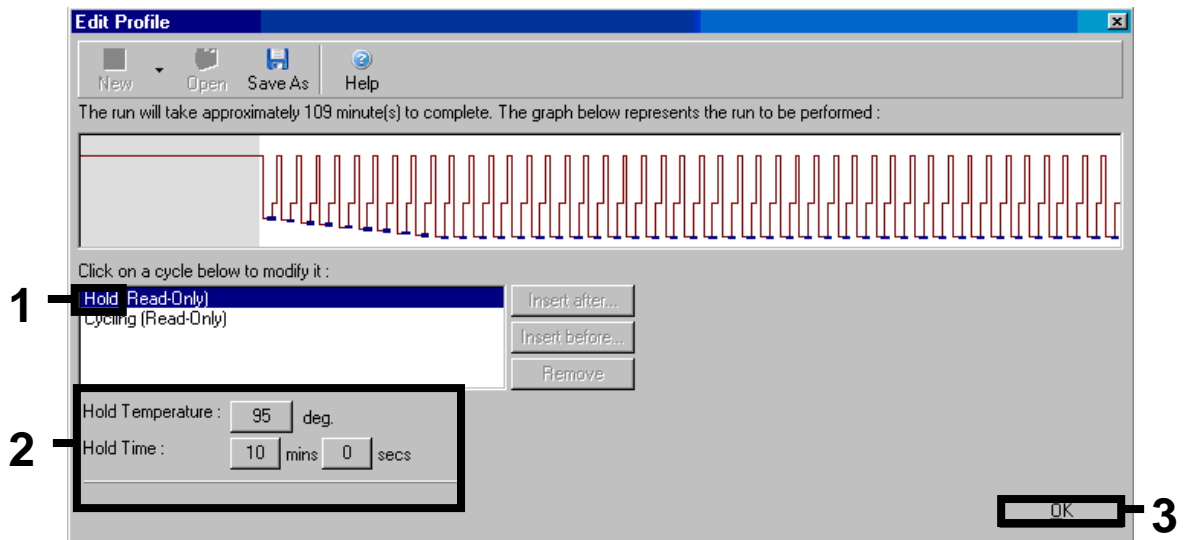
2. ábra: Assay paraméterek általános beállítása

Megjegyzés: Bár a reakció térfogat fizikailag 25 µl, ügyeljen arra, hogy a Rotor-Gene software-ben az 50 (µl)-es reakció térfogatot válassza ki.

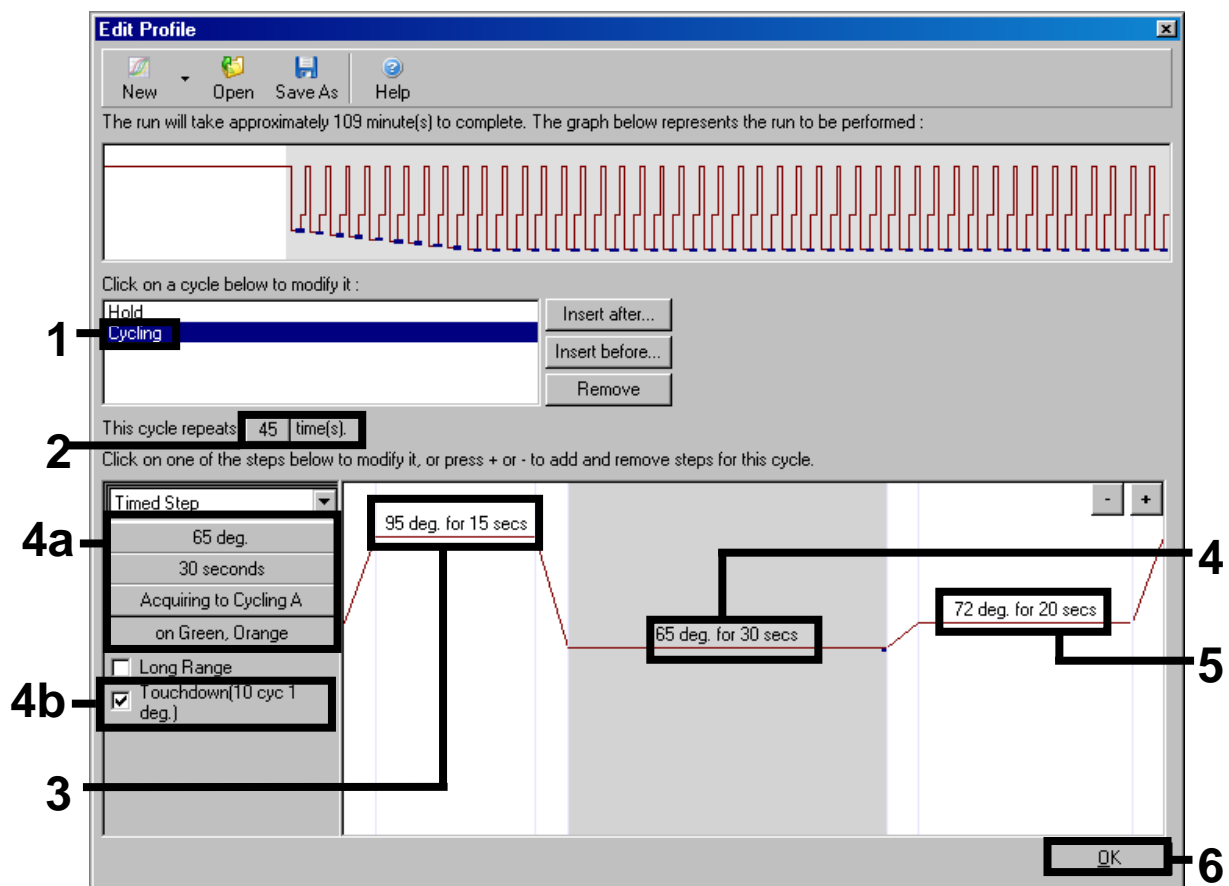
8. Kattintson az „Edit Profile” (Profil szerkesztése) gombra majd a következőkben a „New Run Wizard” (Új futás varázsló) párbeszédablakba (3.ábra), és programozza a hőmérsékleti profilt, amint azt 3-5. ábra mutatja.



3. ábra: Profil szerkesztése.



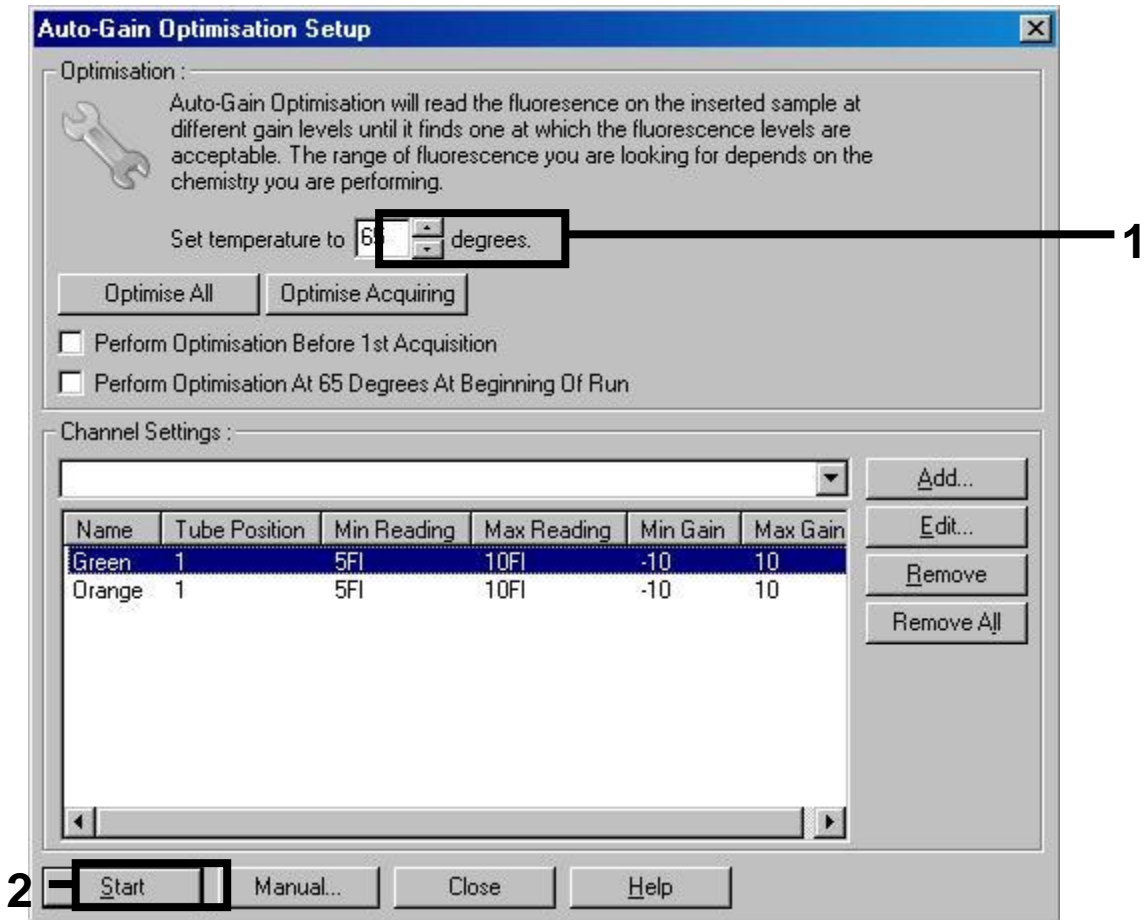
4. ábra: Hot-start enzim kezdeti aktiválása.



5. ábra: DNS amplifikálás. Győződjön meg róla, hogy a „Touchdown” funkciót 10 ciklusra kipipálta az „Annealing” (Primer bekötődés) lépésben.

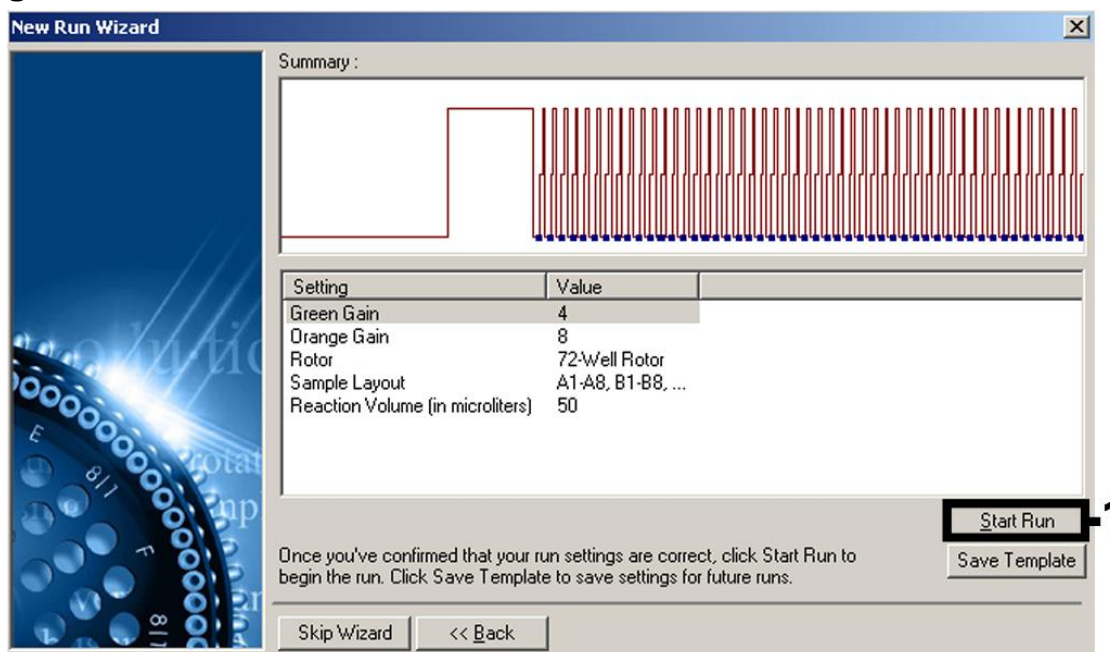
9. A fluoreszcens csatornák érzékelési tartományát a PCR-csőekben található fluoreszcencia intenzitása alapján kell meghatározni. Kattintson a „Gain Optimisation” (Nyereség/Erősítés optimalizálás) gombra a „New Run Wizard” párbeszédablakban (lásd 3.ábra), majd nyissa meg az „Auto-Gain Optimisation Setup” (Automatikus jeloptimalizálás beállítása) párbeszédablakot. Állítsa a kalibrációs

**hőmérsékletet 65 („degree”; fokra), hogy megegyezzen az
amplifikációs program „annealing” hőmérsékletével (6. ábra).**



6. ábra: A fluoreszcens csatorna érzékenységének beállítása.

10. A csatorna kalibrációval meghatározott értékek automatikusan mentésre kerülnek és a programozási eljárás utolsó menü ablakában vannak listázva (7.ábra). Kattintson a „Start Run” (Futtatás indítása) gombra.



7. ábra: Futtatás indítása.

Eredmények értékelése

Kvantitálás

A kitben található kvantifikációs standardokat (BK Virus RG QS 1–4) előzetesen tisztított mintaként kezelje és azonos mennyiséget használjon belőlük (15 µl). A standard görbe Rotor-Gene készüléken történő létrehozásához mind a 4 kvantifikációs standard használata szükséges és az „Edit Samples” (Minták szerkesztése) párbeszédablakban standardként állítsa be a meghatározott koncentrációkkal (lásd készülék felhasználói kézikönyve).

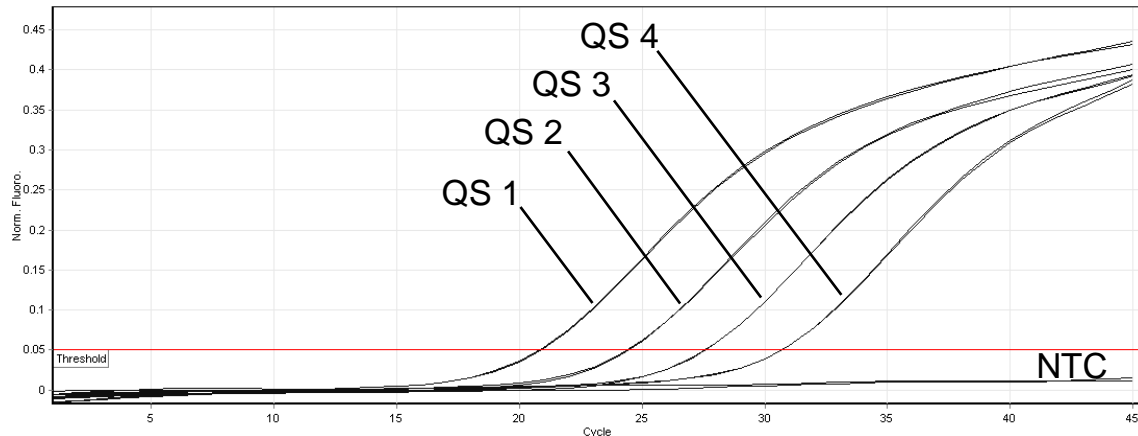
Fontos: A kvantifikációs standardok koncentrációja kópia/µl egységben van megadva. A standard görbe által meghatározott értékeket az alábbi egyenlet segítségével lehet átszámolni a minták kópia/ml értékeire:

$$\text{Eredmény (kópia/ml)} = \frac{\text{Eredmény (kópia/}\mu\text{l)} \times \text{Elúciós térfogat (}\mu\text{l)}}{\text{Mintatérfogat (ml)}}$$

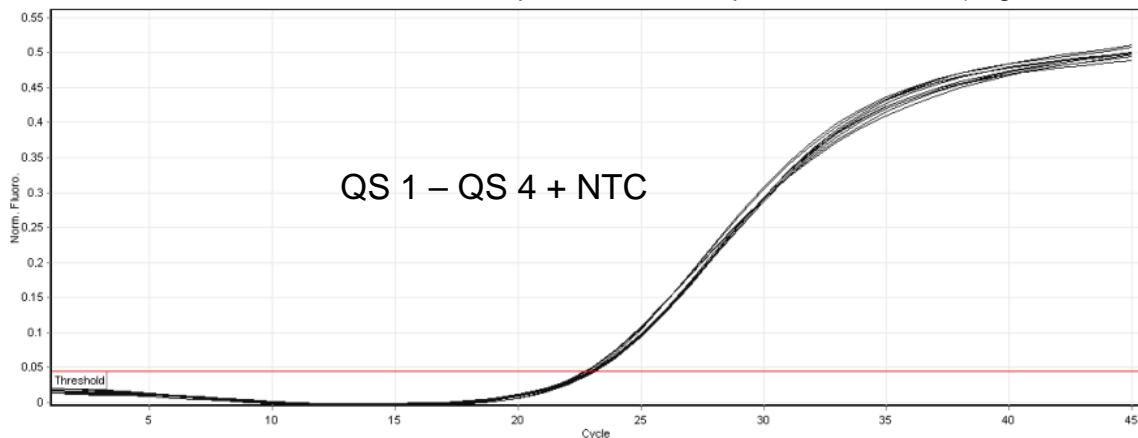
Felhívjuk figyelmét, hogy a fenti egyenletben a kezdeti minta térfogatával kell számolni. Ezt figyelembe kell venni, amikor a minta térfogata (különösen a nukleinsav extrakció során) megváltozik (pl. centrifugálásnál csökken a térfogat vagy növekedhet a térfogat a megfelelő mennyiség izolálásához szükséges térfogat kiegészítés miatt).

Eredmények

Példák pozitív és negatív PCR reakcióra a 8. ábrán és a 9. ábrán láthatóak.



8. ábra: Kvantifikációs standardok detektálása (BK Virus RG QS 1–4) „Cycling Green” fluoreszcens csatornában. NTC: „No template control” Templát nélküli kontroll (negatív kontroll).



9. ábra: Belső kontroll detektálása (IC) a „Cycling Orange” fluoreszcens csatornájában a kvantifikációs standardok (BK Virus RG QS 1–4) egyidejű amplifikálásával. NTC: Templát nélküli kontroll (negatív kontroll).

A jel detektálása a „Cycling Green” fluoreszcens csatornában történik. A vizsgálat eredménye pozitív: a minta BK vírus DNS-t tartalmaz.

Ebben az esetben a jel detektálása a „Cycling Orange” csatornában elhanyagolható, míg a BV vírus DNS kezdeti magas koncentrációja (pozitív jel a „Cycling Green” csatornában) a belső kontroll fluoreszcens jelének csökkenését vagy hiányát eredményezheti a „Cycling Orange” csatornában (kompetíció).

A „Cycling Green” fluoreszcens csatornában nincs detektált jel. Ugyanakkor, ezzel egyidőben megjelenik a belső kontroll fluoreszcens jele a „Cycling Orange” csatornában.

A mintában BK Vírus DNS nem detektálható. Negatívnak tekinthető.

A negatív BK Vírus PCR esetében a belső kontroll detektált jele alapján kizárható a PCR gátlás lehetősége.

Nincs detektált jel a „Cycling Green” vagy a „Cycling Orange” csatornában. Nem lehet eredményre következtetni.

A hibaforrásokat és ezek megoldására vonatkozó információkat a „Hibaelhárítási útmutatóban” találja, alább.

Hibaelhárítási útmutató

Jelen Hibaelhárítási útmutató hasznos lehet bármilyen felmerülő probléma megoldása esetén. További információért látogasson el a Technikai Támogatói Központunk „Frequently Asked Questions” (FAQ; Gyakran ismételt kérdések) oldalára: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN Technikai Szolgálat kutatói a szívesen válaszolnak különböző kérdésekre és/vagy a kézikönyvben található protokollokra irányuló megkeresésekre, valamint egyéb minta és detektáló technológiákkal kapcsolatos kérdésekre (az elérhetőségekhez látogasson el www.qiagen.com weboldalra).

Megjegyzések és javaslatok

Nincs detektált jel a pozitív kontrollokban (BK Virus RG QS 1–4) a „Cycling Green” fluoreszcens csatornában.

- | | |
|---|--|
| a) A PCR adatok elemzéséhez választott fluoreszcens csatorna nem felel meg a protokollnak | Az adatelemzéshez válassza ki a „Cycling Green” fluoreszcens csatornát az analitikai BK Vírus PCR-nél és a „Cycling Orange” fluoreszcens csatornát a belső kontroll PCR-hez. |
| b) A Rotor-Gene készülék hőmérséklet profiljának helytelen programozása | Hasonlítsa össze a hőmérséklet profilt a protokollal. Lásd „ Eljárás : PCR és adatelemzés”, 10. oldal. |
| c) PCR reakció helytelen konfigurálása | Ellenőrizze a munkalépéseket a pipettázási vázlat alapján és ismétlje meg a PCR futtatást, amennyiben szükséges. Lásd „ Protokoll: PCR és adatelemzés ”, 10. oldal. |
| d) A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a „Reagensek tárolása és kezelése” részben leírt útmutatások szerint történt (7. oldal) | Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejárat idejét (Lásd a kit jelzése alapján) és használjon új kitet, ha szükséges. |

Megjegyzések és javaslatok

- e) Az *artus* BK Virus RG PCR Kit lejárt Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejárat idejét (Lásd a kit jelzéseinél) és használjon új kitet, ha szükséges.

A „Cycling Orange” fluoreszcens csatornában az *artus* BK Virus RG PCR Kit segítségével tisztított negatív plazmának vagy vizeletnek a belső kontroll jele gyenge vagy egyáltalán nem detektálható, ezzel egyidejűleg a „Cycling Green” csatornában jel nem detektálható.

- a) A PCR körülményei nem felelnek meg a protokollnak Ellenőrizze a PCR körülményeket (lásd fentebb) és ismételje meg a PCR futtatást a helyes beállításokkal, amennyiben szükséges.
- b) A PCR gátolt Bizonyosodjon meg róla, hogy a javasolt izoláló módszert használta és megfelelően követte a gyártó utasításait.
- c) Az extrakció során a DNS elveszett Amennyiben a belső kontroll hozzá lett adva az extrakcióhoz, a belső kontroll meglévő jele utalhat a DNS elvesztésére az extrakciós lépés alatt. Győződjön meg arról, hogy a javasolt izolálási módszer szerint járt el (lásd „**DNS izolálás**”, 8. oldal) és megfelelően követte a gyártó utasításait.
- d) A kit egy vagy több összetevőjének a tárolási körülménye nem a „Reagensek tárolása és kezelése” fejezetben leírt útmutatások szerint történt (8. oldal) Kérjük, ellenőrizze a tárolási körülményeket és a reagensek lejárat dátumát (lásd a kit jelzéseinél), használjon új kitet, amennyiben szükséges.
- e) Az *artus* BK Virus RG PCR Kit lejárt Ellenőrizze a reagensek tárolási körülményét és a lejárat idejét (Lásd a kit jelzése alapján) és használjon új kitet, ha szükséges.

Megjegyzések és javaslatok

Az analitikai PCR „Cycling Green” fluoreszcens csatornában detektált jelei negatív kontrollokkal.

- a) Szennyeződés történt a PCR előkészítése során
- Ismételje meg a PCR futást ismétlésben új reagensekkel.
- Amennyiben lehetséges, zárja le a PCR csövet közvetlenül a vizsgálati minta hozzáadása után.
- A pozitív kontrollt a végén pipettázza az elegyhez.
- Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörténjen.
- b) Szennyeződés történt az extrakció során
- Ismételje meg az extrakciót és a PCR futást a vizsgálni kívánt mintával és új reagensekkel.
- Győződjön meg róla, hogy a munkafelület és a készülékek tisztítása rendszeresen megtörtént.

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősítésű Minőségirányítási Rendszerének megfelelően, az *artus BK Virus RG PCR Kit* minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

Korlátozások

A terméket csak az in vitro diagnosztikai eljárások terén képzett és betanított szakemberek használhatják.

Az optimális PCR-eredmények eléréséhez a felhasználói kézikönyv pontos követése szükséges.

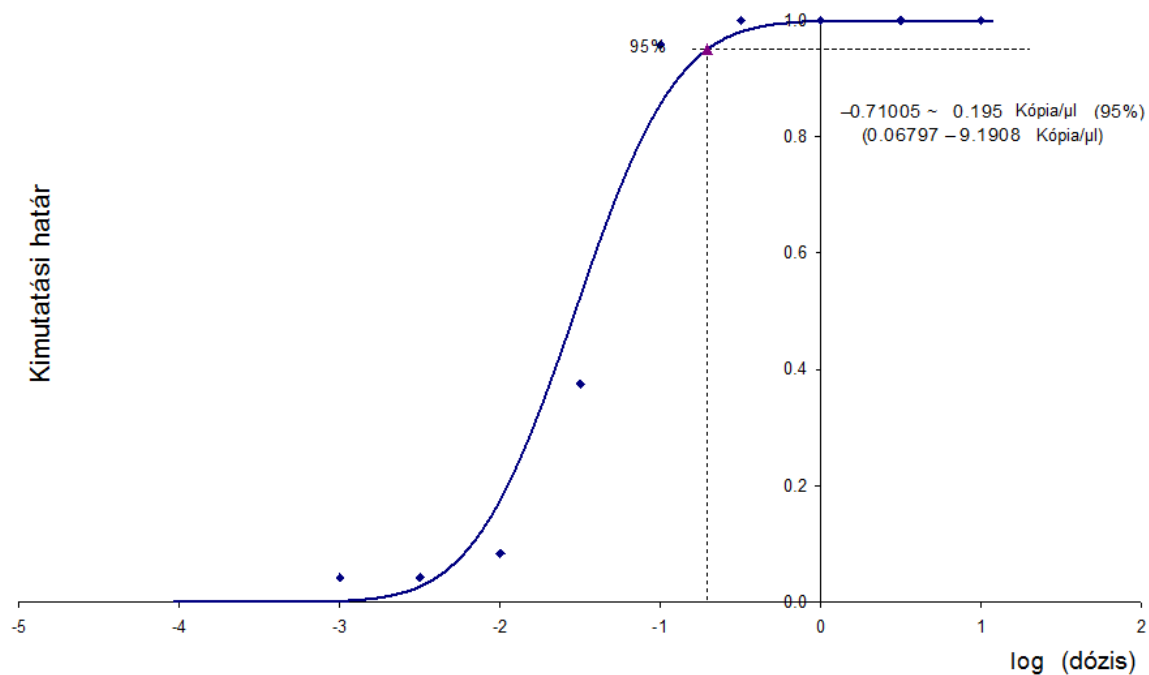
Figyelni kell a dobozon és minden összetevő címkéjén található lejáratidőkre. Ne használjon lejárt reagenst.

A kitben használt primerek és/vagy próbák által lefedett virális genom célzott régióiban lévő potenciális mutációk megakadályozhatják a patogének jelenlétének kimutatását. Az assay érzékenysége és teljesítményadatai rendszeresen felülvizsgálatra kerülnek.

Teljesítmény jellemzők

Analitikai érzékenység

Az *artus* BK Virus RG PCR Kit analitikai érzékenységének meghatározásához egy 10 – 0.001 nominális kópia/μl-nek megfelelő standard hígítási sort készítettek, amelyet az *artus* BK Virus RG PCR Kit segítségével a Rotor-Gene 6000 készüléken analizáltak. A vizsgálatot három különböző napon nyolc párhuzamos mintával végezték. Az eredményeket probit-elemzéssel határozták meg. A probit-elemzés Rotor-Gene 6000 készüléken történt, melynek grafikai megjelenítését a 10. ábra mutatja. Az *artus* BK Virus RG PCR Kit analitikai kimutatási határát a Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 -el egységesen 0.195 kópia/μl-ben állapították meg ($p = 0.05$). Ez azt jelenti, hogy az 0.195 kópia/μl 95%-os valószínűséggel detektálásra kerül.



10. ábra: Probit-elemzés: BK Virus (Rotor-Gene 6000). Az *artus* BK Virus RG PCR Kit analitikai érzékenysége Rotor-Gene 6000 készüléken.

Specifititás

Az *artus* BK Virus PCR Kit specifitása elsősorban és leginkább a primerek és próbák kiválasztásán, illetve a szigorúan meghatározott reakciófeltételeken alapul. A primereket és próbákat szekvencia-összehasonlítási elemzés során nyilvánosan hozzáférhető szekvenciákkal ellenőrizték. Az összes törzs detektálhatóságát az adatbázis egyezések alapján biztosított. A Rotor-Gene készüléken a PCR futások a következő törzsek detektálását teszik lehetővé (lásd 4. táblázat).

4. táblázat: Releváns törzsek specificitásának tesztelése

Vírus	Törzs	Forrás	BK Vírus (Cycling Green)	Belső kontroll (Cycling Orange)
BK vírus	Dunlop	ATCC*	+	+
BK vírus	Gardner	ATCC	+	+
BK vírus	AB269822	Geneart	+	+
BK vírus	S72390	Geneart	+	+

* American Type Culture Collection.

Emellett a specificitást 30 különböző BK vírus negatív plazma mintán is validálták. Ezek nem adtak jelet az BK Vírus RG Master mixben lévő BK vírus specifikus primerekkel és próbákkal.

Az *artus* BK Vírus RG PCR Kit lehetséges keresztreaktivitása az 5. táblázatban található kontrollcsoporttal lett tesztelve. A tesztelt patogének egyike sem mutatott keresztreaktivitást. Nem jelent meg keresztreaktivitás a kevert fertőzéseknél sem.

5. táblázat: A kit specificitásának vizsgálata potenciális keresztreaktív patogénekkal

Kontroll csoport	BK vírus (Cycling Green)	Belső kontroll (Cycling Orange)
Cytomegalovírus	–	+
Epstein-Barr vírus	–	+
Humán herpeszvírus 1 (herpesz szimplex vírus 1)	–	+
Humán herpeszvírus 2 (herpesz szimplex vírus 2)	–	+
Humán herpeszvírus 3 (varicella-zoster vírus)	–	+
Humán herpeszvírus 6	–	+
JC vírus	–	+
Simian vírus 40	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+

Pontosság

Az *artus* BK Virus RG PCR Kit precíziós adatait Rotor-Gene készülék segítségével gyűjtötték össze. Ezek alapján meghatározható a vizsgálat teljes variabilitásata. A teljes variabilitás a vizsgálaton belüli variabilitásból (intra-assay variability) (azonos koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), a vizsgálatok közötti variabilitásból (inter-assay variability) (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több operator által végzett vizsálatok eredményeinek variabilitása) és a gyártási tételek közötti variabilitásból (inter-batch variability) (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett vizsgálatok eredményeinek variabilitása) tevődik össze. A mért adatok alapján meghatározásra került a patogén-specifikus, illetve a belső kontroll PCR eredmények szórása, varianciája és variációs koefficiense.

Az *artus* BK Virus RG PCR pontossági adatait a legkisebb koncentrációjú kvantitációs standard (QS 4; 1×10^1 kópia/ μ l) használatával határozták meg. A vizsgálatot 8 párhuzamos mintával végezték. A pontossági adatokat az amplifikációs görbe C_T -értéke alapján határozták meg (C_T : küszöbciklus, lásd 6. táblázat). Ezen eredmények alapján bármely, a fenti koncentrációjú adott minta átlagos statisztikai eloszlása 2.11% (C_T), és 3.59% (C_T) a belső kontroll detektálásakor. Ezek az értékek az egyedileg meghatározott variabilitási értékek összességén alapszanak.

6. táblázat: C_T értékeken alapuló pontossága adatok

	C_T érték	Standard deviáció	Variációs koefficiens (%)
Vizsgálaton belüli variabilitás: BK Virus RG QS 4	29.45	0.17	0.56
Vizsgálaton belüli variabilitás: Belső kontroll	24.31	0.12	0.49
Vizsgálatok közötti variabilitás: BK Virus RG QS 4	29.42	0.25	0.85
Vizsgálatok közötti variabilitás: Belső kontroll	23.30	0.77	3.30
Gyártási tételek közötti variabilitás: BK Virus RG QS 4	30.31	0.64	2.10
Gyártási tételek	22.53	0.40	1.78

közötti variabilitás: Belső kontroll			
Teljes variancia: BK Virus RG QS 4	29.80	0.63	2.11
Teljes variancia: Belső kontroll	23.12	0.83	3.59

Robosztusság

Az *artus* BK Virus RG PCR Kit robusztusságának ellenőrzése lehetővé teszi a kit teljes hibaszázalékának meghatározását. 30 darab BK vírus negatív mintát 1 kópia/μl elúciós térfogatú BK vírus kontroll DNS hozzáadásával kezeltek (spiking, a kimutatási határ ötszörös koncentrációjával). EZ1[®] DSP Virus Kit-el történő extrakció után (lásd „**DNS izolálás**”, 8. oldal), a mintákat az *artus* BK Virus RG PCR Kit segítségével vizsgálták. A belső kontroll robusztusságának értékelése 30 BK vírus negatív minta tisztítása és vizsgálata alapján történt. Mind a 30 darab mintánál a teljes hibaszázalék 0% volt. Gátlást nem figyeltek meg. Így az *artus* BK Virus RG PCR Kit robusztussága $\geq 99\%$.

Reprodukálhatóság

A reprodukálhatósági adatok lehetővé teszik az *artus* BK Virus RG PCR Kit teljesítmény-jellemzőinek rendszeres mérését, valamint más termékekkel történő hatékonysági összehasonlítást. Ezek az adatok laboratóriumi szakmai alkalmassági programokban történő részvételből származnak.

Diagnosztikai kiértékelés

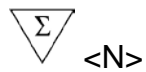
Jelenleg az *artus* BK Virus RG PCR Kit egy sor kiértékelési tanulmányban vesz részt.

Referenciák

A QIAGEN a QIAGEN termékeket felhasználó tudományos publikációkból kiterjedt, naprakész online adatbázist tart fenn. Átfogó keresési lehetőséget kínál, hogy megtalálja a szükséges közleményt, akár egy egyszerű kulcsszóra vagy specifikus alkalmazásra, kutatási területre, vagy címre stb. keres rá.

A teljes referencia listához látogasson el a QIAGEN Referencia Adatbázisához, www.qiagen.com/RefDB/search.asp vagy lépjen kapcsolatba a QIAGEN Technikai Szervizével vagy a helyi forgalmazóval.

Jelmagyarázat



<N>

A kit tartalma <N> tesztre elegendő



Lejárat



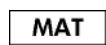
In vitro diagnosztikai orvosi eszköz



Katalógusszám



Tételszám



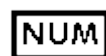
Anyagszám



Komponensek



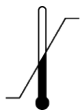
Tartalmaz



Szám



Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)



Hőmérséklet-korlátozás



Gyártó



Olvassa el a használati utasítást

Elérhetőség

Szakmai támogatásért és több információért kérjük, látogasson el a Technikai Támogatás Központ oldalára www.qiagen.com/Support vagy hívja a QIAGEN Technikai Szervizét vagy helyi forgalmazót (lásd fentebb vagy látogasson el a www.qiagen.com oldalra).

Rendelési információk

Termék	A kit tartalma	Kat.szám
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	For 24 reactions: Master, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Magnesium Solution, Water (PCR grade)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96)	For 96 reactions: Master, 4 Quantitation Standards, Internal Control, Magnesium Solution, Water (PCR grade)	4514265
EASY<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kitek — teljesen CE-IVD megfelelő, integrált automatikus minta tisztításra és patogén detektálásra		
EASY <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit 1	For 48 viral nucleic acid preps and 24 assays: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11423
EASY <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit 2	For 48 viral nucleic acid preps and 48 assays: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11424
EZ1 DSP Virus Kit — automatizált, virális DNS és RNS egyidejű tisztításához, 1–14 humán plazmából, szérumból, vagy CSF-ből (agy-gerincvelői folyadék).		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	For 48 viral nucleic acid preps: Prefilled Reagent Cartridges, Disposable Tip Holders, Disposable Filter-Tips, Sample Tubes, Elution Tubes, Buffers, Carrier RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx és tartozékok		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002023

Termék	A kit tartalma	Kat.szám
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyclers and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyclers and High Resolution Melt analyzer with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM channel, laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction setup with a single-channel pipet in 72 x 0.1 ml tubes	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction set-up in a standard 8 x 12 array using 96 x 0.2 ml tubes	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips of 4 tubes and caps for 1000 reactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips of 4 tubes and caps for 10,000 reactions	981106

Termék	A kit tartalma	Kat.szám
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 thin-walled tubes for 1000 reactions	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 thin-walled tubes for 10,000 reactions	981008

A naprakész licenz információkért és a termék specifikus nyilatkozatokért tanulmányozza át a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvet. A QIAGEN kitek kézikönyvei és használati útmutatói a www.qiagen.com oldalon megtalálhatóak vagy a QIAGEN Technikai szolgálatától vagy a helyi forgalmazótól kérhetők.

Ez az oldal szándékosan maradt üresen

Ez az oldal szándékosan maradt üresen

Ez az oldal szándékosan maradt üresen

Ennek a terméknek a megvásárlása feljogosítja a vevőt a kit humán in vitro diagnosztikai szolgáltatás teljesítményszinten való használatra. A vásárlással megszerzett használati jogon kívül semmilyen általános szabadalmi vagy bármilyen más licenz engedélyre nem jogosít ez a megállapodás.

Védjegyek: QIAGEN®, *artus*®, EASY*artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Csoport).

Korlátozott Licenz megállapodás

Az *artus* BK Virus RG PCR Kit terméknek a használatával bármely a kit-et beszerző és használó kinyilvánítja beleegyezését a következő feltételekbe:

1. Az *artus* BK Virus RG PCR Kit a hozzá adott *artus BK Virus RG PCR Kit Handbook*-ban szereplő protokollokkal összhangban és csak a készletben található elemekkel együtt használható. A QIAGEN valamennyi szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják és beleépítsék a készletben lévő elemeket a készletben nem megtalálható elemekkel, kivéve abban az esetben, ha az szerepel a termékhez biztosított *artus BK Virus RG PCR Kit Handbook*-ban, valamint további a www.qiagen.com oldalon elérhető protokollokban.
2. A kifejezett licenzeken kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a készlet és/vagy ennek használata harmadik fél jogait nem sérti
3. A kit és összetevőinek licenze csak egyszeri használatra érvényes, nem szabad azt újra felhasználni, felújítani vagy újra értékesíteni.
4. A QIAGEN egyértelműen elutasít minden más (kifejezett vagy hallgatólagosan beleértett) licenst, amelyet külön nem nyilvánított ki.
5. A kit vevője és felhasználója elfogadja, hogy sem ő maga nem teszi és senki másnak sem engedélyez semmilyen lépést, amely a fenti pontokban tiltott cselekményre vezet vagy elősegíti azt. A korlátozott licenz egyezménybe foglalt korlátozásokat a QIAGEN bármely bíróságon keresztül érvényesítheti, továbbá a licenz megszegőjét a nyomozati és bírósági eljárás teljes költségének megtérítésére kötelezheti, beleértve az ügyvédi díjakat is abban az eljárásban, amelynek célja a korlátozott licenz, valamint a kit-hez és összetevőikhez kapcsolódó szellemi tulajdonjog betartatása.

A legfrissebb licenz feltételekért látogassa meg a www.qiagen.com honlapot.

© 2009–2014 QIAGEN, minden jog fenntartva.

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)

