

Ιούνιος 2015

Εγχειρίδιο πάνελ RespiFast RG



Έκδοση 1

IVD

Ποιοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene® Q

CE
0120

REF

4693163



PathoFinder B.V., Randwycksingel 45, 6229 EG
Maastricht, ΚΑΤΩ ΧΩΡΕΣ (ΟΛΛΑΝΔΙΑ)

Διανέμεται από την QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse
1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R1 **MAT** 1090425EL



Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περίληψη και επεξήγηση.....	5
Αρχές της διαδικασίας	5
Γονίδια-στόχοι	7
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του κιτ	10
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	12
Γενικές προφυλάξεις	12
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	14
Χειρισμός και φύλαξη δειγμάτων.....	14
Διαδικασία.....	15
Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και προετοιμασία.....	15
Χρήση αρνητικού μάρτυρα.....	16
Χρήση εσωτερικού μάρτυρα και φορέα RNA.....	16
Χρήση του μάρτυρα ενίσχυσης.....	19
Χρήση του θετικού μάρτυρα.....	19
Πρωτόκολλο: Ενίσχυση PCR και ανάλυση τήξης.....	21
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων.....	45
Κανονικοποίηση	45
Ανάλυση	45

Κατώφλι.....	46
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	50
Ποιοτικός έλεγχος.....	51
Περιορισμοί.....	51
Χαρακτηριστικά απόδοσης.....	52
Σύμβολα.....	53
Πληροφορίες επικοινωνίας.....	54
Πληροφορίες παραγγελίας.....	55

Προβλεπόμενη χρήση

Το πάνελ RespiFast RG είναι μια ποιοτική δοκιμασία multiplex PCR για την ανίχνευση και διαφοροποίηση 16 RNA ιών,^{*} 2 DNA ιών, και 4 βακτηρίων, όλα από τα οποία μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις του αναπνευστικού στους ανθρώπους: αδενοϊός, μποκαϊός, κορωναιός OC43, κορωναιός 229E, κορωναιός NL63/HKU1, ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός (hMPV), ιός της γρίπης A, ιός της γρίπης B, ιός της γρίπης A υπότυπου H1N1pdm09, ιός της παραγρίπης τύπου 1, ιός της παραγρίπης τύπου 2, ιός της παραγρίπης τύπου 3, ιός της παραγρίπης τύπου 4, ρινοϊός / εντεροϊός, αναπνευστικός συγκυτιακός ιός τύπου A (RSVA), αναπνευστικός συγκυτιακός ιός τύπου B (RSVB), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, και *Mycoplasma pneumoniae*.

Το πάνελ RespiFast RG βοηθά στη διάγνωση λοίμωξης του αναπνευστικού όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν υποδεικνύουν απαραίτητα την απουσία ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης του αναπνευστικού· τα αρνητικά αποτελέσματα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση για τη διάγνωση, τη θεραπεία, ή άλλες θεραπευτικές αποφάσεις. Τα θετικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη συνυπάρχουσα λοίμωξη με άλλα παθογόνα. Το(α) ανιχνευόμενο(α) παθογόνο(α) ενδέχεται να μην αποτελεί(ούν) την οριστική αιτία της νόσου.

Στην τελική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνονται και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις καθώς και αξιολόγηση της κλινικής εικόνας. Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνο από επαγγελματίες εργαστηρίων.

^{*} Το πάνελ RespiFast RG ανιχνεύει 16 RNA ιούς αλλά δεν διαφοροποιεί το ρινοϊό από τον εντεροϊό, και τον κορωναιό HKU1 από τον κορωναιό NL63.

Περίληψη και επεξήγηση

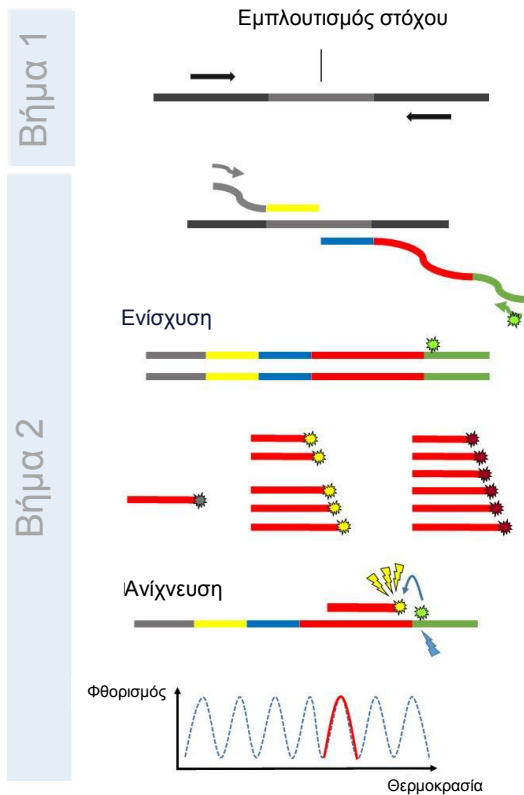
Οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος οξείας λοίμωξης σε ενήλικες και παιδιά και αποτελεί σημαντική αιτία νόσου σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού (RTI) συνήθως χωρίζονται σε λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού (URTI) και λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού (LRTI). Οι URTI περιλαμβάνουν ρινόρροια, επιπεφυκίτιδα, φαρυγγίτιδα, μέση ωτίτιδα, και παραρρινοκολπίτιδα. Οι LRTI περιλαμβάνουν πνευμονία, βρογχιολίτιδα, και βρογχίτιδα. Τόσο οι ιοί όσο και τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν οξείες RTI, και ο αριθμός των αιτιολογικών παραγόντων είναι μεγάλος, καθώς και ποικίλος, αποτελώντας μια σημαντική πρόκληση για τη διάγνωση.

Οι δοκιμασίες ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές εναλλακτικές λύσεις είτε σε singleplex είτε σε multiplex μορφή. Οι προσδιορισμοί multiplex επιτρέπουν την ταυτόχρονη ενίσχυση περισσότερων του ενός στόχων, παρέχοντας στοιχεία για τη σημασία των μικτών λοιμώξεων και την πρόγνωση και υποτροπή των αναπνευστικών παθήσεων.

Αρχές της διαδικασίας

Το πάνελ RespiFast RG βασίζεται στην τεχνολογία SmartFinder[®] η οποία επιτρέπει μια εξαιρετικά σύνθετη ανάλυση έως και 14 στόχων σε μία μόνο αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου. Το πάνελ RespiFast RG περιέχει 23 διαφορετικά σύνολα εκκινητών RespiFast συνδυασμένα με 15 φθορίζοντες ανιχνευτές σήμανσης SMART (ενίσχυση multiplex ενός μόνο σωληναρίου σε πραγματικό χρόνο) οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση 22 διαφορετικών παθογόνων συν έναν εσωτερικό μάρτυρα και 2 μάρτυρες ενίσχυσης. Η αντίδραση ξεκινά με μια προενίσχυση, η οποία συνδυάζει ένα βήμα αντίστροφης μεταγραφής με ένα βήμα PCR για την ενίσχυση του cDNA ή DNA-στόχου. Ακολούθως, ένα μέρος της αντίδρασης προενίσχυσης μεταφέρεται σε δύο σωληνάρια PCR.

Πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις βήματος 2. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με χρήση ανάλυσης καμπύλης τήξης. Μια σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας του προσδιορισμού παρουσιάζεται στην εικόνα **Εικόνα 1**.



Εικόνα 1. Επισκόπηση της ροής εργασίας με το πάνελ RespiFast RG.

Το πάνελ RespiFast RG χρησιμοποιεί το όργανο Rotor-Gene Q MDx ή Rotor-Gene Q για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων του(ων) παθογόνου(ων).

Ένας εσωτερικός μάρτυρας (IC) περιλαμβάνεται στον προσδιορισμό για τη διάκριση μεταξύ πραγματικών αρνητικών δειγμάτων και ψευδών αρνητικών δειγμάτων λόγω αποδόμησης των νουκλεϊκών οξέων, αναστολής της PCR, ή αστοχίας της δοκιμασίας. Το πάνελ RespiFast RG επιπροσθέτως περιέχει 2 μάρτυρες ενίσχυσης (AC) οι οποίοι επιτρέπουν την ενδεχόμενη διάκριση μεταξύ αποτυχίας εκχύλισης και αποτυχίας ενίσχυσης στον προσδιορισμό.

Το δείγμα εισόδου είναι ολικά νουκλεϊκά οξέα εκχυλισμένα και καθαρισμένα από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα. Η προετοιμασία των δειγμάτων αποτελεί ξεχωριστή διαδικασία από το πεδίο εφαρμογής του πάνελ. Χρησιμοποιήστε κατάλληλες μεθόδους ή προϊόντα για το χειρισμό των δειγμάτων και την εκχύλιση και τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων (βλ. «Χειρισμός και φύλαξη δειγμάτων», σελ. 14, και «Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και προετοιμασία», σελ. 15).

Γονίδια-στόχοι

Τα γονίδια-στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό των ανιχνευτών και των εκκινητών παρουσιάζονται στον

Πίνακας 1.

Πίνακας 1. Γονίδια-στόχοι του πάνελ RespiFast RG

Στόχος	Γονίδιο	Κωδικός παθογόνου
Μάρτυρας		
Εσωτερικός μάρτυρας	Γονίδιο πρωτεΐνης λύσης φάγων MS2	IC
Μάρτυρας ενίσχυσης 1	μοναδική τεχνητή αλληλουχία	AC1
Μάρτυρας ενίσχυσης 2	μοναδική τεχνητή αλληλουχία	AC2
Ιοί		
Αδενοϊός	Γονίδιο εξονίου (H)	Adeno
Μποκαϊός	Γονίδιο μη καψιδίου (NP1)	Boca
Κορωναϊός 229E	Γονίδιο πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (NP)	229E
Κορωναϊός HKU1	Γονίδιο φωσφοπρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (N)	HKU1
Κορωναϊός NL63	Γονίδιο πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (NP)	NL63
Κορωναϊός OC43	Γονίδιο πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (NP)	OC43
Ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός	Γονίδιο πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (NP)	hMPV
Ιός της γρίπης A	Γονίδιο πρωτεΐνης μεσοκυττάριας ουσίας (M1)	InfA
Ιός της γρίπης B	Γονίδιο πρωτεΐνης μεσοκυττάριας ουσίας (M1)	InfB
Ιός της γρίπης A υπότυπου H1N1pdm09	Γονίδιο νευραμινιδάσης	H1N1
Ιός της παραγρίπης τύπου 1	Γονίδιο αιμοσυγκολλητίνης-νευραμινιδάσης (HN)	PIV1
Ιός της παραγρίπης τύπου 2	Γονίδιο αιμοσυγκολλητίνης-νευραμινιδάσης (HN)	PIV2
Ιός της παραγρίπης τύπου 3	Γονίδιο αιμοσυγκολλητίνης-νευραμινιδάσης (HN)	PIV3
Ιός της παραγρίπης τύπου 4	Γονίδιο μειζονος πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (N)	PIV4
Ρινοϊός / εντεροϊός	Γονίδιο πολυπρωτεΐνης 5' μη μεταφρασμένης περιοχής (PP)	Rhino/Entero
Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός τύπου A	Γονίδιο μη δομικής πρωτεΐνης	RSVA
Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός τύπου B	Γονίδιο νουκλεοπρωτεΐνης	RSVB
Βακτήρια		
<i>Bordetella pertussis</i>	Αλληλουχία περεμβολής 481 (IS481)	B. pert
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Γονίδιο μειζονος πρωτεΐνης εξωτερικής μεμβράνης (OmpA)	C. pneu
<i>Legionella pneumophila</i>	Γονίδιο ενισχυτή αναστολέα μακροφάγων (Mip)	L. pneu
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Γονίδιο πρωτεΐνης κυταδεσίνης (P1)	M. pneu

Για κάθε δείγμα, διενεργείται μία προενίσχυση (βήμα 1) και δύο αντιδράσεις βήματος 2. Τα παθογόνα, οι επισημάνσεις και το υποδεικνυόμενο T_m των αντίστοιχων ανιχνευτών υβριδισμού SMART στις 2 αντιδράσεις RespiFast παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Οι στόχοι και οι αντίστοιχες τιμές T_m των ανιχνευτών SMART

Επισημάνση	Ανιχνευτής SMART	Αποδεκτό εύρος T_m (°C)	Κωδικός παθογόνου (μείγμα 1)	Κωδικός παθογόνου (μείγμα 2)
Cy5 [®] 5	Cy5 ανιχνευτής 1	50,5–53,5*	L. pneu	OC43
	Cy5 ανιχνευτής 2a	55–58	B. pert	–
		52,5–55,5	–	HKU1/NL63
	Cy5 ανιχνευτής 2b	60,5–63,5 58,5–61,5	Rhino/Entero	229E
				–
	Cy5 ανιχνευτής 4	66,5–69,5	C. pneu	–
	Cy5 ανιχνευτής 5	70,5–73,5	M. pneu	–
Cy5 ανιχνευτής 6	76–79	–	H1N1	
ROX™	ROX ανιχνευτής 1	53,5–56,5	RSVA	PIV1
	ROX ανιχνευτής 2	58–61	Adeno	PIV2
	ROX ανιχνευτής 3	62,5–65,5	hMPV	PIV3
	ROX ανιχνευτής 4	66,5–69,5	RSVB	PIV4
	ROX ανιχνευτής 5	72,5–75,5	InfA	Boca
	ROX ανιχνευτής 6	76,5–79,5	InfB	–
BHQ [®] 1	BHQ1 ανιχνευτής 1	70,5–73,5	IC	IC
		61–64	AC1	–
	BHQ1 ανιχνευτής AC1	55,5–58,5	–	AC2
	BHQ1 ανιχνευτής AC2			

* Οι κορυφές του Cy5 ανιχνευτή 1 μερικές φορές εμφανίζονται ως διπλή κορυφή. Η τιμή T_m της δεύτερης κορυφής είναι η σωστή.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

RespiFast RG Panel		(25)
Αρ. καταλόγου		4693163
Αριθμός αντιδράσεων		25
Περιεχόμενα	Χρώμα πύματος	Όγκος
Κύριο μείγμα προενίσχυσης	Μοβ	>160 μl
Μείγμα εκκνητών προενίσχυσης	Λευκό	>220 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα RespiFast 1 (περιέχει AC1)	Κόκκινο	>500 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα RespiFast 2 (περιέχει AC2)	Μπλε	>500 μl
Ένζυμο RespiFast	Πορτοκαλί	>55 μl
Εσωτερικός μάρτυρας (IC)	Μαύρο	>450 μl
Θετικός μάρτυρας (PC)	Πράσινο	>50 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Διαφανές	>1.500 μl
<i>RespiFast RG Panel Handbook</i> (Εγχειρίδιο πάνελ RespiFast RG) (αγγλικά)		1 τεμ.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Kit εκχύλισης RNA/DNA (βλ. «Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και προετοιμασία», σελ. 15)
- Νερό απαλλαγμένο από RNάση/DNάση

Αναλώσιμα

- Αναλώσιμα ρύγχη που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα
- Αναλώσιμα ρύγχη χαμηλής κατακράτησης που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα
- Σωληνάρια των 1,5 ml απαλλαγμένα από RNάση/DNάση
- Σωληνάρια PCR των 0,2 ml απαλλαγμένα από RNάση/DNάση (μεμονωμένα σωληνάρια με πώματα ή σωληνάρια ταινιών με ατομικά πώματα)
- Strip Tubes and Caps (σωληνάρια ταινιών και πώματα), 0,1 ml (αρ. καταλ. 981103 ή 981106) για χρήση με όργανα Rotor-Gene Q

Εξοπλισμός

- Ρυθμιζόμενες πιπέτες: * 0,1–2 μl, 2–20 μl, 20–200 μl
- Αναδευτήρας τύπου vortex*
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με στροφέα για σωληνάρια των 2 ml
- Φυγόκεντρος* για σωληνάρια αντίδρασης των 0,2 ml
- Τεμάχιο ψύξης ή πάγος
- Θερμικός κυκλοποιητής* για σωληνάρια PCR των 0,2 ml με θερμαινόμενο καπάκι και ρυθμούς διάκλισης 1–5°C/δευτερόλεπτο (για προενίσχυση και υβριδισμό, π.χ. βασισμένος σε μπλοκ θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp® PCR System 9700)
- Όργανο και παρελκόμενα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* ή Rotor-Gene Q 5plex HRM*

* Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN®.

Για πληροφορίες ασφαλείας σχετικά με το χρησιμοποιούμενο kit καθαρισμού, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του σχετικού kit. Για πληροφορίες ασφαλείας σχετικά με όργανα, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του εκάστοτε οργάνου.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

Γενικές προφυλάξεις

Λαμβάνετε πάντοτε υπόψη τα ακόλουθα:

- Αυτός ο μοριακός προσδιορισμός πρέπει να εκτελείται μόνο από εξειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό.
- Φυλάσσετε και λαμβάνετε θετικά υλικά (δείγματα και θετικούς μάρτυρες) χωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετε τα στο μείγμα αντίδρασης σε χωρικά διαχωρισμένη εγκατάσταση.
- Φοράτε αναλώσιμα γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.

- Χρησιμοποιείτε αναλώσιμα ρύγχη που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση.
- Χρησιμοποιείτε αναλώσιμα ρύγχη χαμηλής κατακράτησης που περιέχουν υδρόφοβα φίλτρα κατά το χειρισμό του κύριου μείγματος προενίσχυσης και του ενζύμου RespiFast.
- Χρησιμοποιείτε φιαλίδια PCR απαλλαγμένα από RNάση/DNάση.
- Πάντα να αποψύχετε τα δείγματα RNA/DNA σε πάγο και να τα διατηρείτε σε πάγο ή σε τεμάχιο ψύξης.
- Πάντα να διατηρείτε τα ένζυμα σε πάγο ή σε τεμάχιο ψύξης όταν τα βγάζετε από τον καταψύκτη. Χειρίζεστε τα ένζυμα με προσοχή και αναμειγνύετε πολύ απαλά.
- Όταν αποψυχθούν, φυγοκεντρίστε τα αντιδραστήρια για 5 δευτερόλεπτα σε φυγόκεντρο και αναμείξτε με απαλό πιπετάρισμα πάνω-κάτω.
- Η είσοδος σε όλα τα προγράμματα κυκλοποίησης στο λογισμικό Rotor-Gene Q πρέπει να γίνεται πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού.
- Πάντα να φυγοκεντρίζετε τα φιαλίδια και τα πλακίδια PCR για σύντομο χρονικό διάστημα και να ανοίγετε με προσοχή προκειμένου να αποφύγετε τα αερολύματα.

Σημείωση: Για να αποφευχθεί η μόλυνση, συνιστούμε ιδιαίτερα να εκτελείτε τις πειραματικές δραστηριότητες σε σταθμούς εργασίας PCR, στις ακόλουθες 3 ξεχωριστές περιοχές:

Περιοχή 1: Προετοιμάστε τα κύρια μείγματα για προενίσχυση και βήμα 2/ανάλυση τήξης.

Περιοχή 2: Προσθέστε δείγμα RNA/DNA στο μείγμα.

Περιοχή 3: Εκτελέστε το βήμα 2 της προενίσχυσης και την ανάλυση καμπύλης τήξης σε 2 βήματα:

- Εκτελέστε την προενίσχυση.

- Προσθέστε τα προϊόντα προενίσχυσης στο μείγμα βήματος 2 (κατά προτίμηση μέσα σε σταθμό εργασίας PCR) και εκτελέστε το βήμα 2 και την ανάλυση καμπύλης τήξης.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα συστατικά του πάνελ RespiFast RG θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο στους -30°C έως -15°C και είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη (>5 φορές) διότι μπορεί να επιφέρει έκπτωση της απόδοσης του προσδιορισμού.

Χειρισμός και φύλαξη δειγμάτων

Η ανίχνευση των παθογόνων του αναπνευστικού εξαρτάται από τη συλλογή δειγμάτων υψηλής ποιότητας, τη γρήγορη μεταφορά τους στο εργαστήριο, καθώς και την κατάλληλη φύλαξή τους πριν από τις εργαστηριακές εξετάσεις. Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα είναι κατάλληλα για την ανίχνευση ιογενών και/ή βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού.

Τα κλινικά δείγματα πρέπει να μεταφέρονται στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατόν, σε υποπολλαπλάσια, και να υποβάλλονται σε επεξεργασία. Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στους 4°C . Εάν τα δείγματα δεν μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία εντός 48 ωρών, πρέπει να φυλαχθούν κατεψυγμένα σε θερμοκρασία ίση με ή χαμηλότερη από -20°C , κατά προτίμηση -70°C .

Διαδικασία

Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και προετοιμασία

Το κιτ QIAamp® MinElute® Virus Spin και το QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Mini της QIAGEN, που φαίνονται στον Πίνακας 3, είναι επικυρωμένα για καθαρισμό DNA και RNA από τον ενδεικνυόμενο τύπο ανθρώπινων δειγμάτων για χρήση με το RespiFast RG. Εκτελέστε τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο των κιτ.

Πίνακας 3. Κιτ καθαρισμού επικυρωμένο για χρήση με το πάνελ RespiFast RG

Τύπος δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου (QIAGEN)
Ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (κιτ QIAamp MinElute Virus Spin) (50)	57704
	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (κιτ QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini) με πρωτόκολλο Complex 200	937036

Χρησιμοποιήστε 200 μl υλικού δείγματος και εκλούστε σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης. Συνιστούμε ιδιαίτερα να μην επιχειρήσετε να συμπυκνώσετε τα νουκλεϊκά οξέα, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αναστολής των ενζύμων RT-PCR. Ένας εσωτερικός μάρτυρας προστίθεται στο λυμένο δείγμα (βλ. «Χρήση εσωτερικού μάρτυρα και φορέα RNA», σελ. 16).

Κατά τη χρήση του κιτ QIAamp MinElute Virus Spin, συνιστούμε την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης στο δείγμα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία εκχύλισης μπορεί να συνεχιστεί σε πάγκο μετά τη λύση του δείγματος. Μετά τη χρήση,

συνιστάται να απολυμαίνετε το θάλαμο νηματικής ροής με διάλυμα απολύμανσης (π.χ. υποχλωριώδες νάτριο 1.000 ppm)^{*} και λειτουργώντας τη λυχνία UV για 30 λεπτά.

Αποφεύγετε κύκλους κατάψυξης/απόψυξης του εκχυλισμένου DNA/RNA όσο είναι δυνατόν, και φυλάσσετε τα εκχυλίσματα νουκλεϊκών οξέων στους 4°C όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία εντός μίας ημέρας. Για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, φυλάσσετε το εκχυλισμένο RNA/DNA στους -20°C ή -70°C.

Χρήση αρνητικού μάρτυρα



Κάθε εκτέλεση πρέπει να συμπεριλαμβάνει έναν αρνητικό μάρτυρα. Ένας αρνητικός μάρτυρας αποτελείται από 200 μl νερού ποιότητας εφαρμογών PCR συν εσωτερικό μάρτυρα (IC). Αυτός ο αρνητικός μάρτυρας υποβάλλεται σε επεξεργασία ως κανονικό δείγμα, συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων. Στην τελική ανάλυση, το σήμα αρνητικού μάρτυρα χρησιμεύει ως αναφορά για το σήμα υποβάθρου στα κανάλια FAM/ROX και FAM/Cy5 και για τα σήματα θετικού IC και AC στο κανάλι Green.

Χρήση εσωτερικού μάρτυρα και φορέα RNA

Η χρήση του kit QIAamp MinElute Virus Spin ή του kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini σε συνδυασμό με το πάνελ RespiFast RG απαιτεί την εισαγωγή του εσωτερικού μάρτυρα (IC) στη διαδικασία καθαρισμού, για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της προετοιμασίας των δειγμάτων και του καθοδικού προσδιορισμού. Επιπροσθέτως, τόσο το kit QIAamp MinElute Virus Spin όσο και το kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini απαιτούν την προετοιμασία του φορέα RNA.

^{*} Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Ο IC είναι ένας φάγος MS2 και παρέχεται ως μάρτυρας για λύση, την εκχύλιση RNA/DNA, την απόδοση προσδιορισμού του πάνελ RespiFast RG, καθώς και τον έλεγχο για πιθανή αναστολή της PCR. Ο IC προστίθεται μαζί με το φορέα RNA στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης πριν από την προσθήκη στο δείγμα. Η ποσότητα του εμβολιασμένου IC είναι ανεξάρτητη από τον αρχικό όγκο του δείγματος.

Η ποσότητα του εμβολιασμένου IC εξαρτάται από τον όγκο έκλουσης. Χρησιμοποιώντας το κιτ QIAamp MinElute Virus Spin, το εκχυλισμένο RNA/DNA θα εκλουστεί σε 60 μl. Ο όγκος του IC που θα προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα AL είναι 5,5 μl ανά δείγμα (βλ. Πίνακας 4).

Σε περίπτωση ισχυρής λοίμωξης και/ή πολλαπλών λοιμώξεων, η κορυφή τήξης του IC ενδέχεται να μην είναι ορατή στην τελική ανάλυση. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι υψηλές ποσότητες παθογόνων νουκλεϊκών οξέων καταναλώνουν το μεγαλύτερο μέρος των αντιδραστηρίων στον προσδιορισμό. Κατά συνέπεια, όταν το σήμα IC είναι απόν υπό την παρουσία ενός ή περισσότερων ειδικών κορυφών τήξης υποδεικνύοντας λοίμωξη, ο προσδιορισμός εξακολουθεί να είναι έγκυρος.

Πίνακας 4. Όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος AL, μείγματος φορέα RNA–ρυθμιστικού διαλύματος AVE, και IC που απαιτούνται για την εκχύλιση με το κιτ QIAamp MinElute Virus Spin

Αριθμός δειγμάτων	Όγκος ρυθμ. διαλύματος AL (ml)	Όγκος φορέα RNA–AVE (μl)	Όγκος εσωτερικού μάρτυρα (μl)
1	0,22	6,2	5,5
2	0,44	12,3	11
3	0,66	18,5	16,5
4	0,88	24,6	22
5	1,1	30,8	27,5
6	1,32	36,9	33
7	1,54	43,1	38,5
8	1,76	49,2	44
9	1,98	55,4	49,5
10	2,2	61,5	55
11	2,42	67,7	60,5

Αριθμός δειγμάτων	Όγκος ρυθμ. διαλύματος AL (ml)	Όγκος φορέα RNA-AVE (μl)	Όγκος εσωτερικού μάρτυρα (μl)
12	2,64	73,8	66

Η χρήση του κιτ QIASymphony DSP QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini σε συνδυασμό με το πάνελ RespiFast RG απαιτεί την εισαγωγή του εσωτερικού μάρτυρα στη διαδικασία καθαρισμού, για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της προετοιμασίας των δειγμάτων και του καθοδικού προσδιορισμού.

Για υπολογισμό εσωτερικού μάρτυρα (IC), πρέπει να χρησιμοποιηθεί το «IC Calculator» (υπολογιστής εσωτερικού μάρτυρα) εντός του QIASymphony Management Console (QMC).

Ο εγγυημένος όγκος έκλουσης των 60 μl χρειάζεται πραγματικό όγκο 90 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης που προστίθεται από το όργανο στο δείγμα. Η ποσότητα του προστιθέμενου IC ανά δείγμα είναι 7,5 μl. Συνεπώς, ρυθμίστε την αναλογία εσωτερικού μάρτυρα/δείγμα στο 7,5 εντός του «IC Calculator» του QIASymphony Management Console (QMC).

Ο Πίνακας 5 δείχνει την προσθήκη του εσωτερικού μάρτυρα στο δείγμα σε αναλογία 7,5 μl ανά δείγμα. Συνιστάται η προετοιμασία φρέσκων μειγμάτων για κάθε εκτέλεση αμέσως πριν από τη χρήση.

Πίνακας 5. Προετοιμασία φορέα RNA και εσωτερικού μάρτυρα

Συστατικό	n = αριθμός δειγμάτων και μαρτύρων	
	n ≤ 13	n ≥ 13
	Όγκος (μl) (σωληνάρια Sarstedt)*	Όγκος (μl) (σωληνάρια CO)†
Βασικό διάλυμα φορέα RNA (CARRIER)	(n + 3) x 3	(n + 5) x 3
Εσωτερικός μάρτυρας	(n + 3) x 7,5	(n + 5) x 7,5
Ρυθμιστικό διάλυμα AVE	(n + 3) x 109,5	(n + 5) x 109,5
Τελικός όγκος ανά δείγμα (αποκλείοντας το νεκρό όγκο)	120	120
Συνολικός όγκος για n δείγματα	(n + 3) x 120	(n + 5) x 120

* Μικροσωληνάρια 2,0 ml τύπου H και μικροσωληνάρια 2,0 ml τύπου I (Sarstedt, αρ. καταλ. 72.693 και 72.694). Εάν προετοιμάζετε IC ως πρωτογενές διάλυμα σε μεγαλύτερο σωληνάριο, πολλαπλασιάστε το συνολικό όγκο κάθε συστατικού επί τον αριθμό των σωληναρίων IC που χρησιμοποιούνται. Απαιτείται μείγμα εσωτερικών μαρτύρων που αντιστοιχεί σε 3 πρόσθετα δείγματα (δηλ. 360 μl). Μη γεμίζετε πάνω από 1,92 ml συνολικού όγκου (που αντιστοιχεί σε μέγιστο αριθμό 13 δειγμάτων).

Εάν χρησιμοποιείτε περισσότερες από 13 αντιδράσεις σε μικροσωληνάρια των 2,0 ml, ρυθμίστε τις αντιδράσεις σε μεγαλύτερο σωληνάριο και φορτώστε σε πολλαπλά σωληνάρια. Διασφαλίστε ότι για κάθε σωληνάριο προστίθεται ο απαιτούμενος περίσσιος όγκος 3 πρόσθετων αντιδράσεων.

† Σωληνάρια των 14 ml, 17 x 100 mm πολυστυρενίου, με στρογγυλό πυθμένα (Coming πρώην Becton Dickinson, αρ. καταλ. 352051). Απαιτείται μείγμα εσωτερικών μαρτύρων που αντιστοιχεί σε 5 πρόσθετα δείγματα (δηλ. 600 μl). Μη γεμίζετε περισσότερο από 13,92 ml συνολικό όγκο.

Χρήση του μάρτυρα ενίσχυσης

Και τα δύο ρυθμιστικά διαλύματα RespiFast 1 και 2 περιέχουν ένα μάρτυρα ενίσχυσης (AC) ειδικό για το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα RespiFast. Ο AC ελέγχει το δεύτερο μέρος του πρωτοκόλλου RespiFast: σωστή προσθήκη αντιδραστηρίων και εφαρμογή του σωστού πρωτοκόλλου PCR και ανάλυσης τήξης. Οι AC 1 και AC 2 ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή με επισήμανση BHQ1 και εμφανίζουν διαφορετικές τιμές T_m , επιτρέποντας την ανίχνευση της ανάμειξης των αντιδράσεων μείγματος 1 και μείγματος 2.

Η αντίδραση AC μπορεί να εκποτιστεί στην αντίδραση όποτε ανιχνεύεται μια ισχυρή λοίμωξη. Εάν δεν ανιχνευτεί παθογόνο στην αντίδραση, ο AC πρέπει να εμφανίσει μια κορυφή τήξης, για την επικύρωση της απουσίας αντιδράσεων παθογόνου στη συγκεκριμένη αντίδραση.

Όταν είναι παρούσα ισχυρή λοίμωξη σε ένα από τα μείγματα RespiFast ενός δείγματος, ο IC μπορεί να παραμείνει μη ανιχνευθείς σε αυτό το μείγμα RespiFast και στο αντίστοιχο μείγμα RespiFast διότι εκτοπίστηκε από το παθογόνο κατά τη διάρκεια της προενίσχυσης. Στην περίπτωση αυτή, η παρουσία του AC στο αντίστοιχο μείγμα RespiFast διασφαλίζει ότι πραγματοποιήθηκε σωστή ενίσχυση και στα δύο μείγματα RespiFast.

Χρήση του θετικού μάρτυρα

Το πάνελ RespiFast RG περιέχει ένα θετικό μάρτυρα ο οποίος αποτελείται από ένα πλασμίδιο DNA που περιέχει τις αλληλουχίες-στόχους των 4 παθογόνων που μπορούν να ανιχνευθούν με τον προσδιορισμό. Πίνακας 6 παρέχει μια επισκόπηση του περιεχομένου του θετικού μάρτυρα. Ο θετικός μάρτυρας δεν χρειάζεται εκχύλιση και ο περαιτέρω χειρισμός του γίνεται ως κανονικό δείγμα στο πρωτόκολλο RespiFast RG. Η χρήση του θετικού μάρτυρα σε μια εκτέλεση του πάνελ RespiFast RG συνιστάται αλλά δεν είναι υποχρεωτική.

Πίνακας 6. Θετικός μάρτυρας

Στόχος	Μείγμα ανίχνευσης	Κανάλι ανίχνευσης	Μέσος όρος T_m
Γρίπη A	Μείγμα 1	FAM/ROX	74°C
<i>Bordetella pertussis</i>	Μείγμα 1	FAM/Cy5	56,5°C
Ιός της παραγρίπης τύπου 2	Μείγμα 2	FAM/ROX	59,5°C
Κορωνοϊός 229E	Μείγμα 2	FAM/Cy5	60°C

Πρωτόκολλο: Ενίσχυση PCR και ανάλυση τήξης

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Αποψύξτε τη μήτρα RNA/DNA (εάν έχει καταψυχθεί) και όλα τα αντιδραστήρια, και διατηρήστε τα σωληνάρια επάνω σε πάγο.
- Προετοιμάστε ελαφρώς μεγαλύτερες από τις απαιτούμενες ποσότητες των διαφόρων μειγμάτων για να αντισταθμίσετε τις απώλειες από τη μεταφορά με πιπέτα.

Διαδικασία

Προενίσχυση

1. Αναστρέψτε το κύριο μείγμα προενίσχυσης αρκετές φορές για να διασφαλίσετε την πλήρη απόψυξη και ομογενοποίηση του κύριου μείγματος. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο για σύντομο χρονικό διάστημα. Προετοιμάστε το μείγμα αντίδρασης προενίσχυσης σύμφωνα με τον Πίνακα 7 και διατηρήστε το επάνω σε πάγο.

Το μείγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Σημείωση: Τα μείγματα του βήματος 2 μπορούν να προετοιμαστούν ταυτόχρονα με το μείγμα προενίσχυσης και πρέπει να φυλαχθούν σε σκοτεινό μέρος στους 4°C μέχρι τη χρήση. Η ταυτόχρονη προετοιμασία των μειγμάτων μπορεί να διενεργηθεί μόνο όταν το πλήρες πρωτόκολλο ακολουθείται χωρίς καθυστέρηση· δεν επιτρέπονται παύσεις μεταξύ των δύο βημάτων. Η σταθερότητα των μειγμάτων δεν είναι εγγυημένη μετά από φύλαξη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (όπως κατά τη διάρκεια μίας νύχτας).

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης προενίσχυσης

Αριθμός δειγμάτων (χρώμα πώματος του σωληναρίου αντιδραστήριου)	1	12
Κύριο μείγμα προενίσχυσης (μοβ)	6,25 μl	75 μl
Μείγμα εκκινητών προενίσχυσης (λευκό)	8,75 μl	105 μl
Συνολικός όγκος	15 μl	180 μl

2. Αναμείξτε το μείγμα αντίδρασης προενίσχυσης απαλά αλλά πλήρως, και μεταφέρετε με πιπέτα 15 μl του μείγματος σε κάθε σωληνάριο PCR των 0,2 ml. Στη συνέχεια προσθέστε 10 μl του εκλουσμένου DNA/RNA δείγματος, αρνητικού μάρτυρα ή θετικού μάρτυρα (βλ. Πίνακας 8).
3. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Αναμείξτε καλά. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για σύντομο χρονικό διάστημα, και τοποθετήστε τα σωληνάρια πίσω στον πάγο ή σε ένα τεμάχιο ψύξης.

Πίνακας 8. Προετοιμασία των αντιδράσεων προενίσχυσης

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Μείγμα αντίδρασης προενίσχυσης	15 μl	15 μl καθένα
Δείγμα, αρνητικός ή θετικός μάρτυρας	10 μl	10 μl καθένα
Συνολικός όγκος	25 μl	25 μl καθένα

4. Προγραμματίστε το βασισμένο σε μπλοκ θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για προενίσχυση

Αντίστροφη μεταγραφή:	10 λεπτά	50°C
Αρχικό βήμα ενεργοποίησης:	2 λεπτά	95°C
Κυκλοποίηση 3 βημάτων:		
Αποδιάταξη	20 δευτερόλεπτα	94°C
Ανασύνδεση	20 δευτερόλεπτα	55°C
Επέκταση	35 δευτερόλεπτα	72°C
Αριθμός κύκλων	40	
Διατήρηση:	–	20°C

5. Ξεκινήστε το πρόγραμμα προενίσχυσης ενώ τα σωληνάρια PCR βρίσκονται ακόμα επάνω σε πάγο. Περιμένετε μέχρι ο θερμικός κυκλοποιητής να φθάσει τους 50°C. Στη συνέχεια τοποθετήστε τα σωληνάρια μέσα στο μπλοκ του θερμικού κυκλοποιητή και κλείστε το θερμαινόμενο καπάκι.

Πάνελ RespiFast RG βήμα 2

6. Δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο Rotor-Gene Q σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα. Μια επισκόπηση του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Εικόνα 2, Εικόνα 3
Δημιουργία νέων καναλιών	Εικόνα 4 έως Εικόνα 7
Επεξεργασία της απολαβής	Εικόνα 8, Εικόνα 9
Προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας	Εικόνα 10 έως Εικόνα 15
Προγραμματισμός του προγράμματος τήξης	Εικόνα 16, Εικόνα 17
Σύνοψη και αποθήκευση του προτύπου	Εικόνα 18, Εικόνα 19
Έναρξη της εκτέλεσης	Εικόνα 20

Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene παρακαλείστε να ανατρέξετε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q.

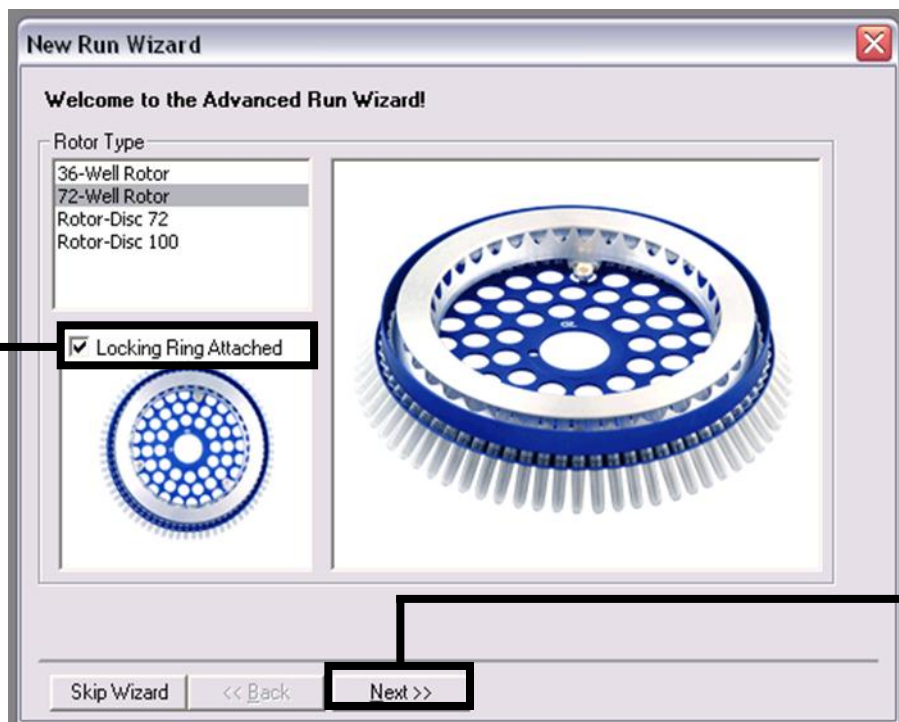
Πίνακας 10. Επισκόπηση προγράμματος θερμικού κυκλοποιητή για κυκλοποίηση βήματος 2

			Σχόλια
Αρχικό βήμα αποδιάταξης:	2 λεπτά	95°C	
PCR 1: Κυκλοποίηση 3 βημάτων:			Υψηλής ειδικότητας PCR
Αποδιάταξη	15 δευτερόλεπτα	94°C	
Ανασύνδεση	15 δευτερόλεπτα	55°C	
Επέκταση	15 δευτερόλεπτα	72°C	
Αριθμός κύκλων	10		
PCR 2: Κυκλοποίηση 3 βημάτων:			
Αποδιάταξη	15 δευτερόλεπτα	94°C	
Ανασύνδεση	15 δευτερόλεπτα	50°C	Λήψη*
Αποδιάταξη	15 δευτερόλεπτα	72°C	
Αριθμός κύκλων	23		
Αποδιάταξη:	2 λεπτά	95°C	
Πρόγραμμα τήξης:	–	40–90°C	Λήψη†

* Κανάλια λήψης: Green, απολαβή 4· Red, απολαβή 1· FAM™/ROX, απολαβή 8· και FAM/Cy5, απολαβή 10.

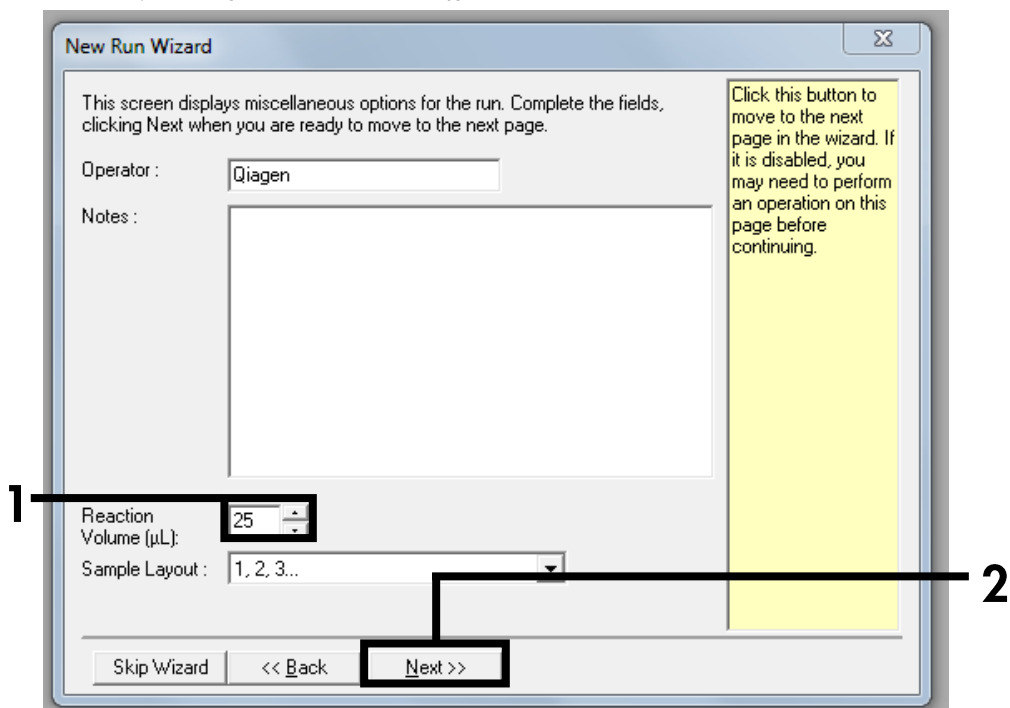
† Κανάλια λήψης: Green, Red, FAM/ROX, και FAM/Cy5. Χρησιμοποιήστε «OPTIMIZE GAIN BEFORE MELT ON ALL TUBES» (βελτιστοποίηση απολαβής πριν την τήξη σε όλα τα σωληνάκια). «THE GAIN GIVING THE HIGHEST FLUORESCENCE LESS THAN 95 WILL BE SELECTED» (θα επιλεγεί η απολαβή που δίνει τον υψηλότερο φθορισμό κάτω από 95).

7. Ανοίξτε καταρχήν το πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 2). Επιλέξτε το πλαίσιο «LOCKING RING ATTACHED» (προσαρτημένος δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «NEXT» (επόμενο).



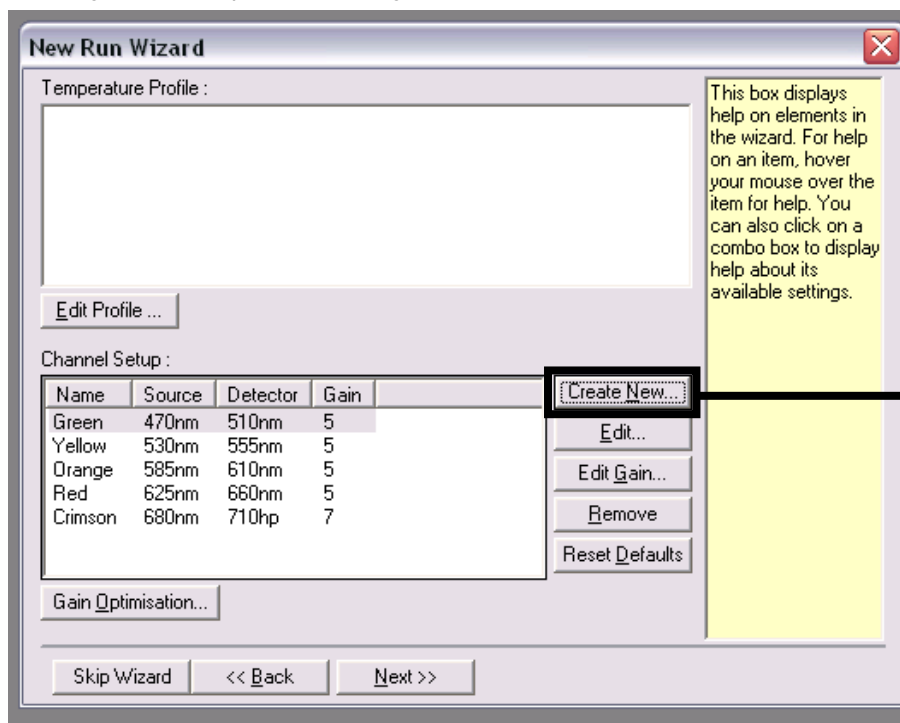
Εικόνα 2. Το πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD».

8. Επιλέξτε 25 ως τον όγκο αντίδρασης και κάντε κλικ στο «NEXT» (Εικόνα 3).

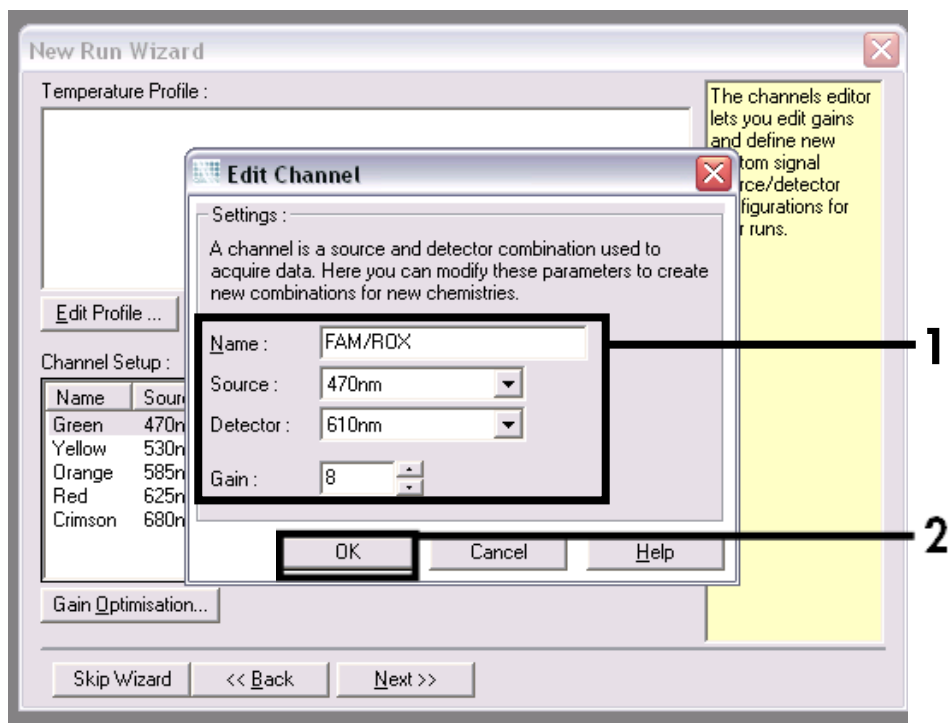


Εικόνα 3. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

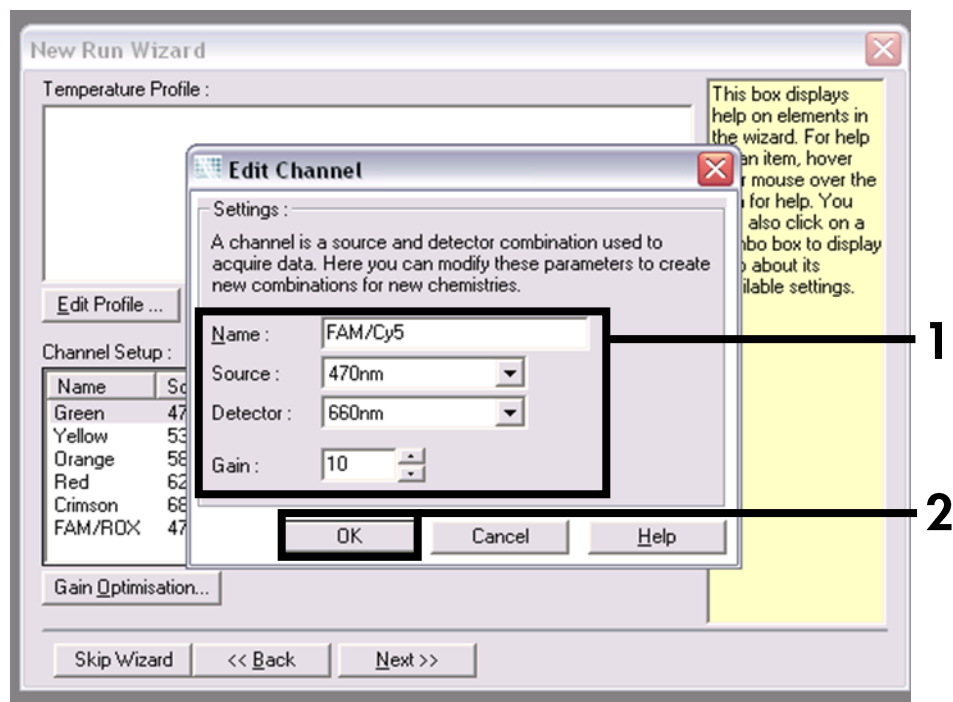
9. Κάντε κλικ στο κουμπί «CREATE NEW» (δημιουργία νέου) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (**Εικόνα 4**), και προγραμματίστε 2 πρόσθετα κανάλια, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5** έως **Εικόνα 7**.



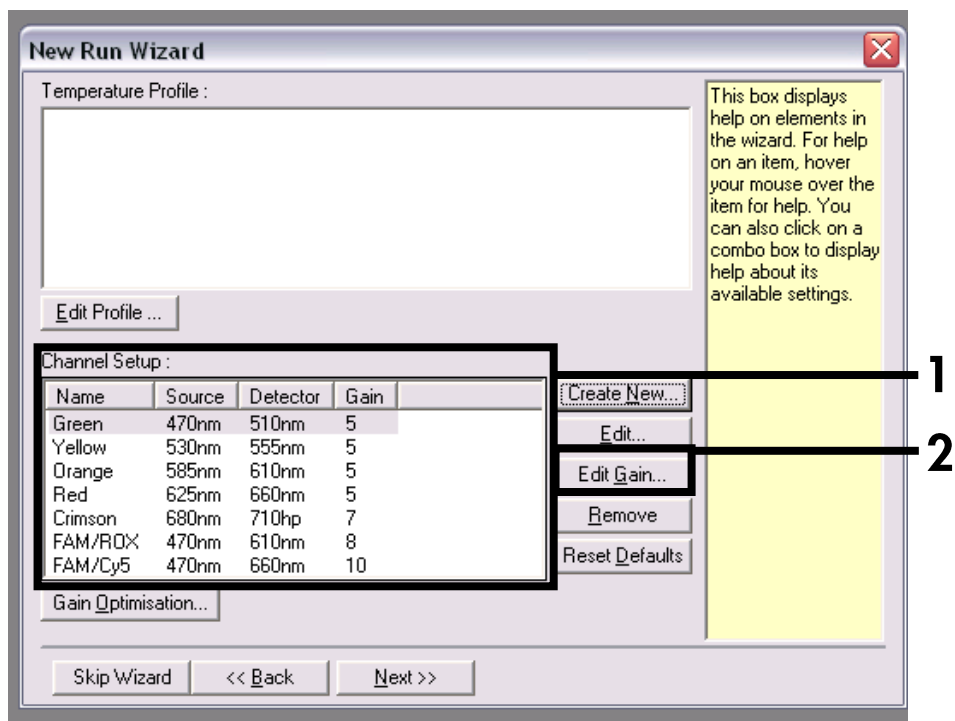
Εικόνα 4. Δημιουργία νέων καναλιών.



Εικόνα 5. Δημιουργία νέου καναλιού «FAM/ROX».



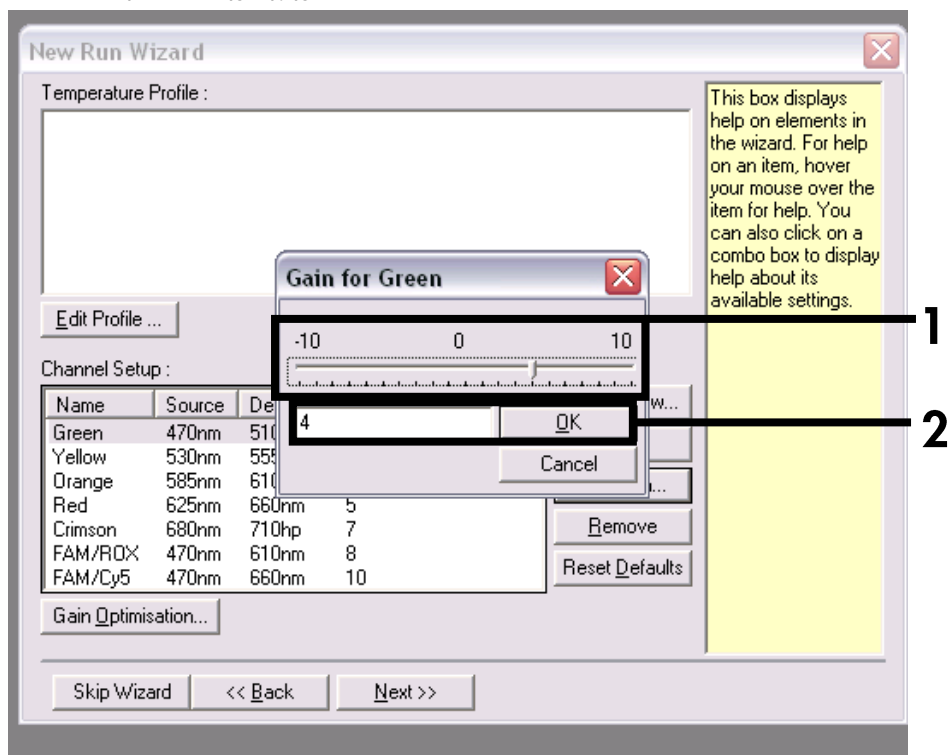
Εικόνα 6. Δημιουργία νέου καναλιού «FAM/Cy5».



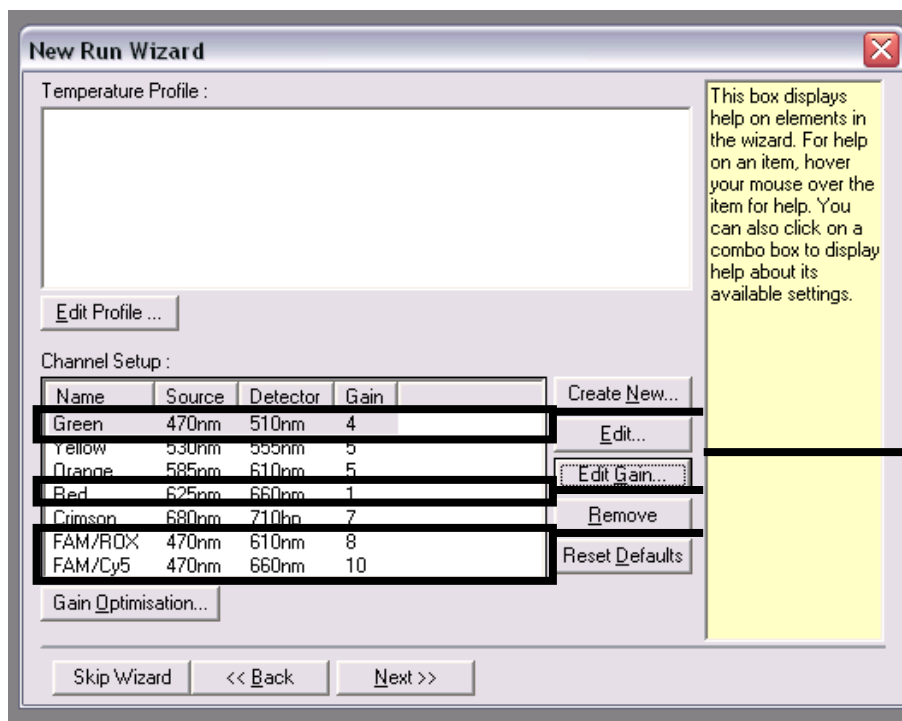
Εικόνα 7. Συμπερίληψη νέων καναλιών.

10. Επεξεργαστείτε την απολαβή για κάθε κανάλι όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8**. Οι τελικές ρυθμίσεις απολαβής για κάθε κανάλι υποδεικνύονται στην **Εικόνα 9**.

Οι ρυθμίσεις απολαβής για το όργανο Rotor-Gene Q επιλέγονται για να αποφευχθεί ο κορεσμός στα κανάλια ανίχνευσης. Ωστόσο, εάν παρατηρηθεί κορεσμός σε οποιοδήποτε από τα κανάλια ανίχνευσης, οι ρυθμίσεις απολαβής για αυτό το κορεσμένο κανάλι πρέπει να προσαρμοστούν και πρέπει να διενεργηθεί μια νέα ανάλυση καμπύλης τήξης.

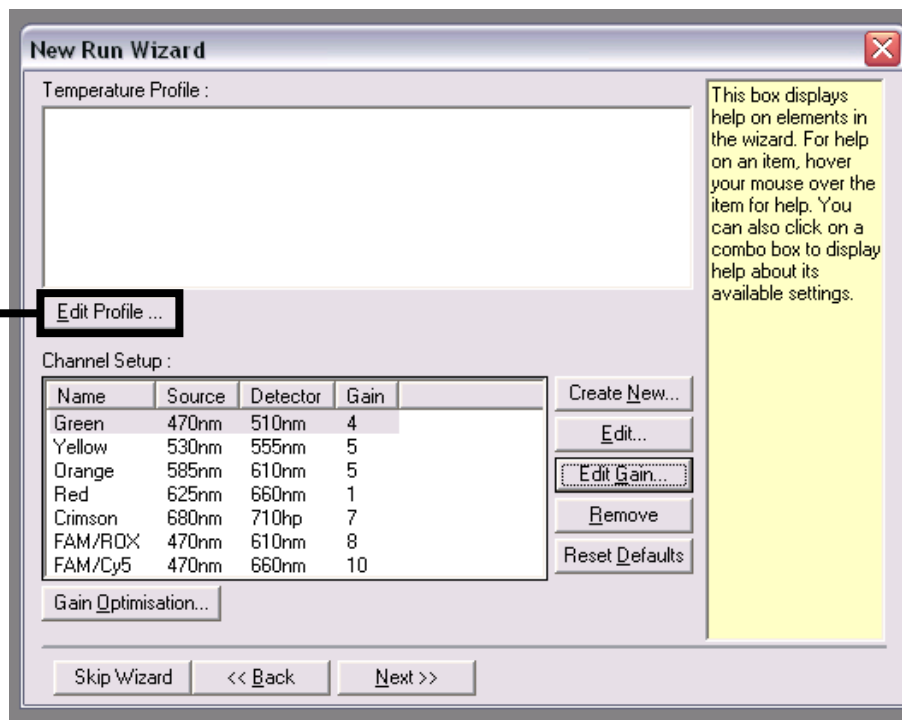


Εικόνα 8. Επεξεργασία της απολαβής. Ως παράδειγμα, η εικόνα δείχνει τη ρύθμιση της απολαβής στο 4 για το κανάλι Cycling Green.

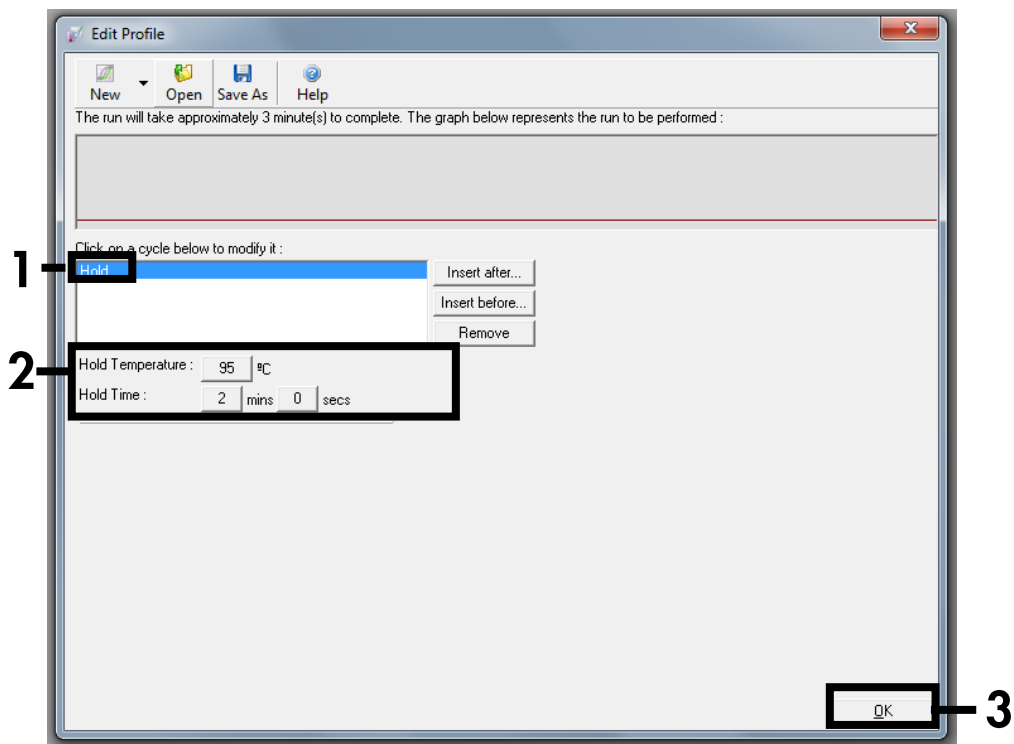


Εικόνα 9. Τελικές ρυθμίσεις απολαβής για όλα τα κανάλια. Τα κανάλια που απαιτούνται είναι: Green, απολαβή 4· Red, απολαβή 1· FAM/ROX, απολαβή 8· και FAM/Cy5, απολαβή 10.

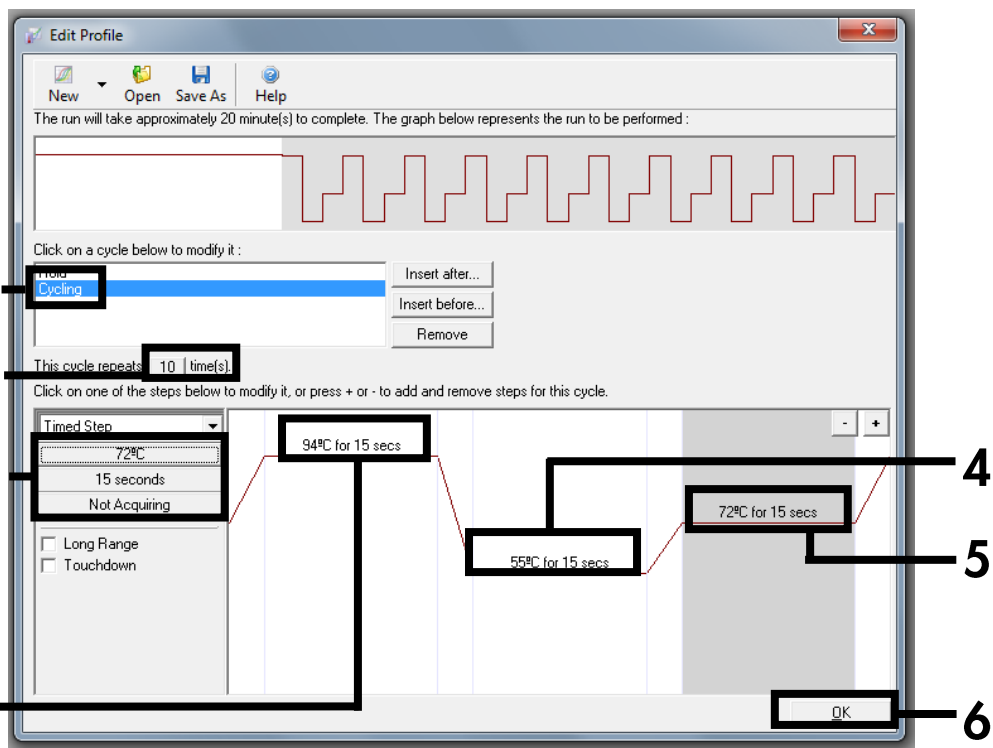
11. Κάντε κλικ στο κουμπί «EDIT PROFILE» (επεξεργασία προφίλ) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (**Εικόνα 10**), και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** έως **Εικόνα 16**.



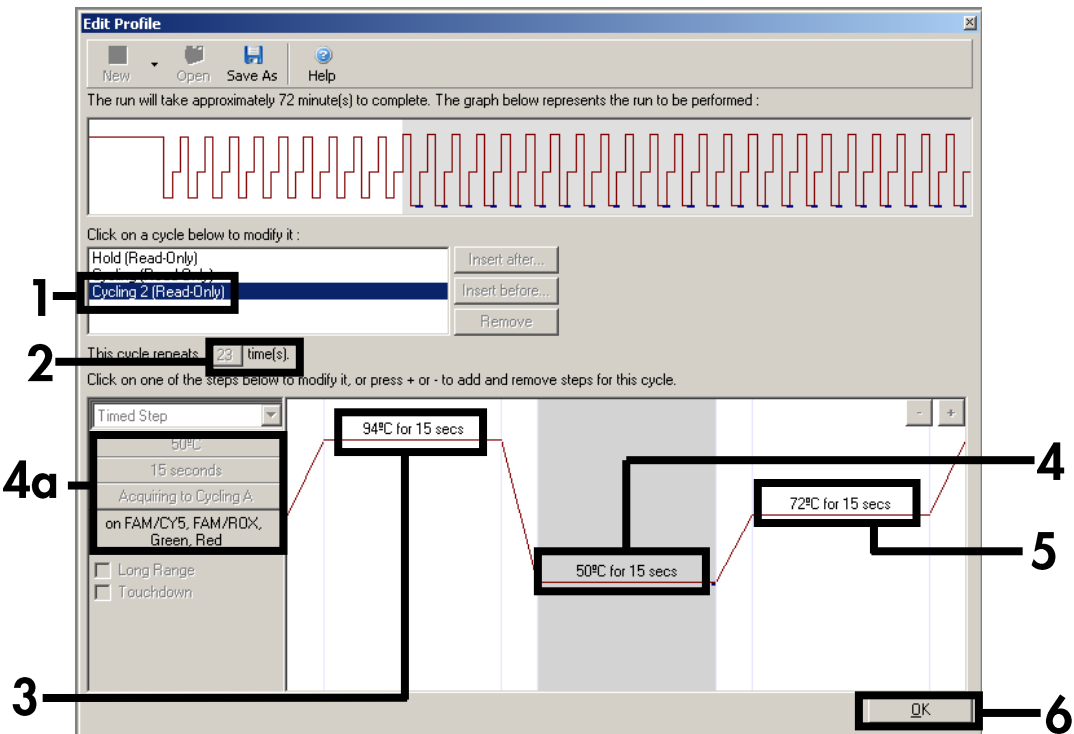
Εικόνα 10. Επεξεργασία του προφίλ.



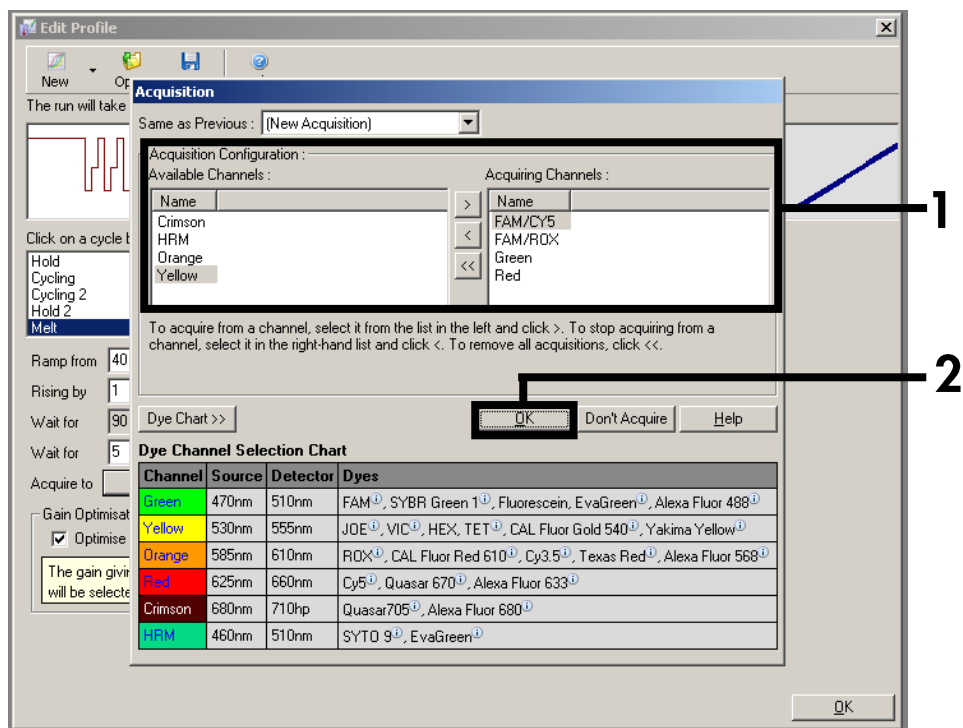
Εικόνα 11. Αρχικό βήμα αποδιάταξης.



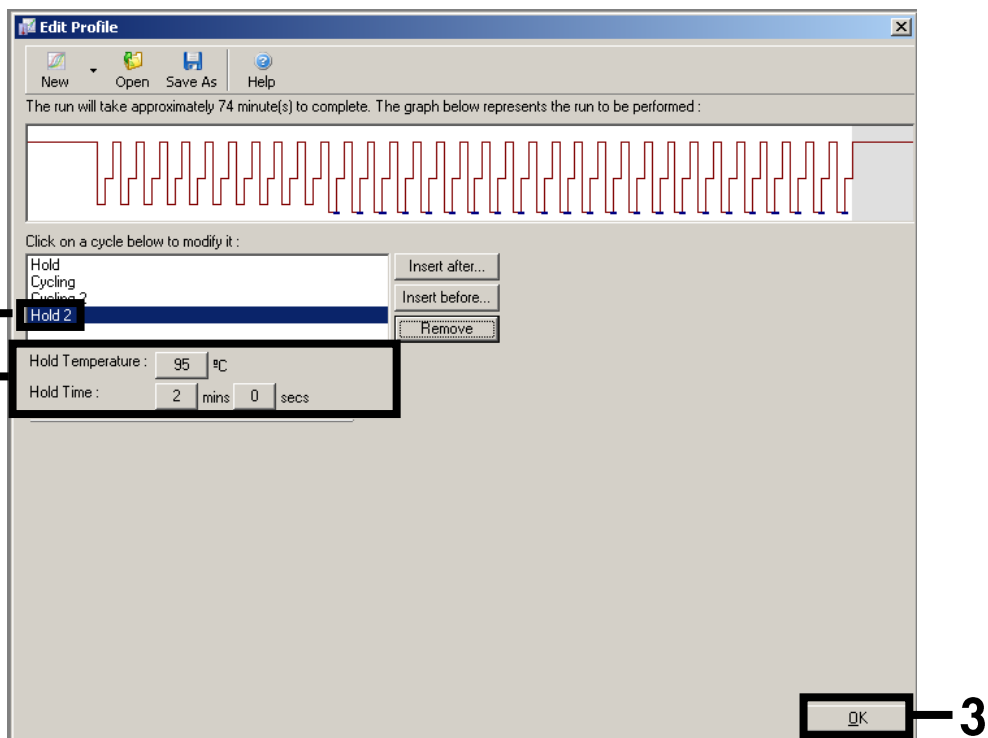
Εικόνα 12. PCR 1.



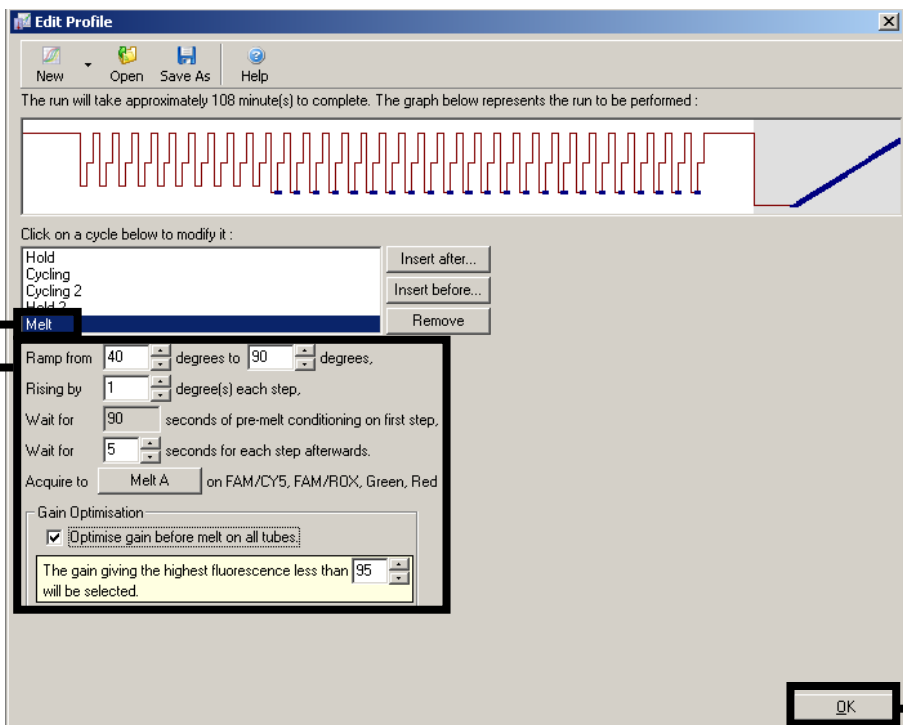
Εικόνα 13. PCR 2 συμπεριλαμβανομένης λήψης σήματος στους 50°C. Τα κανάλια που απαιτούνται για τη λήψη παρουσιάζονται στην Εικόνα 14.



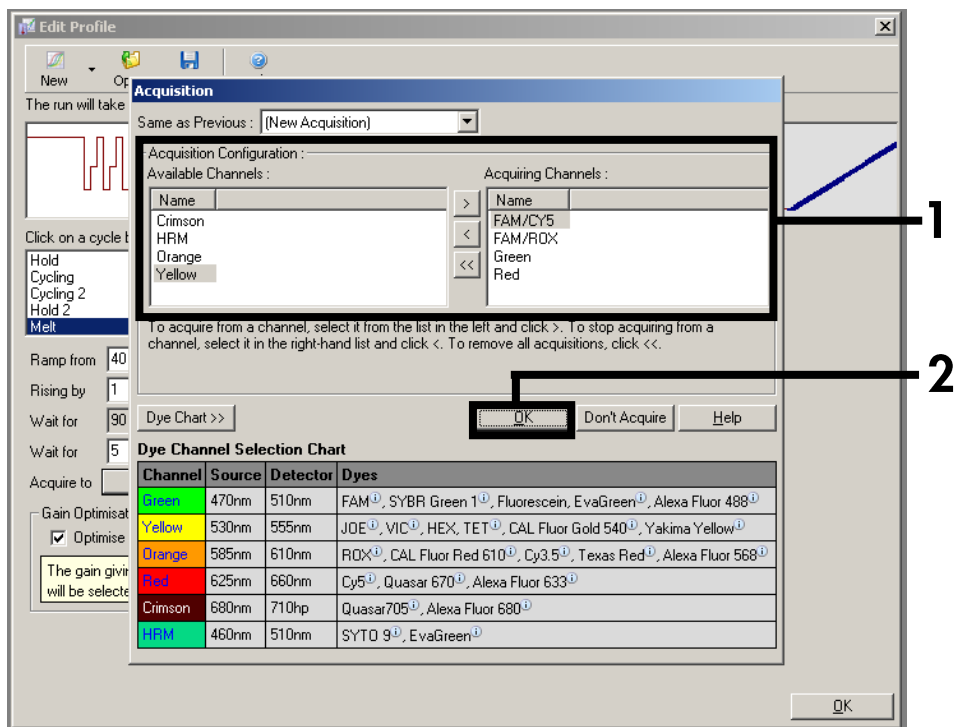
Εικόνα 14. Επιλογή όλων των καναλιών που απαιτούνται για τη λήψη.



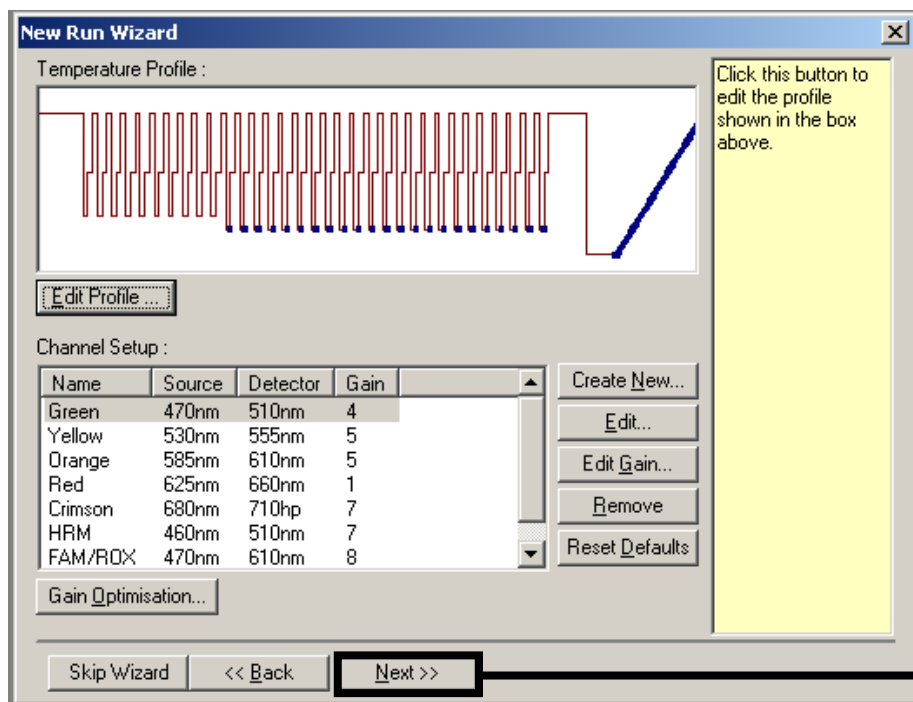
Εικόνα 15. Αποδιάταξη των προϊόντων PCR.



Εικόνα 16. Πρόγραμμα τήξης.

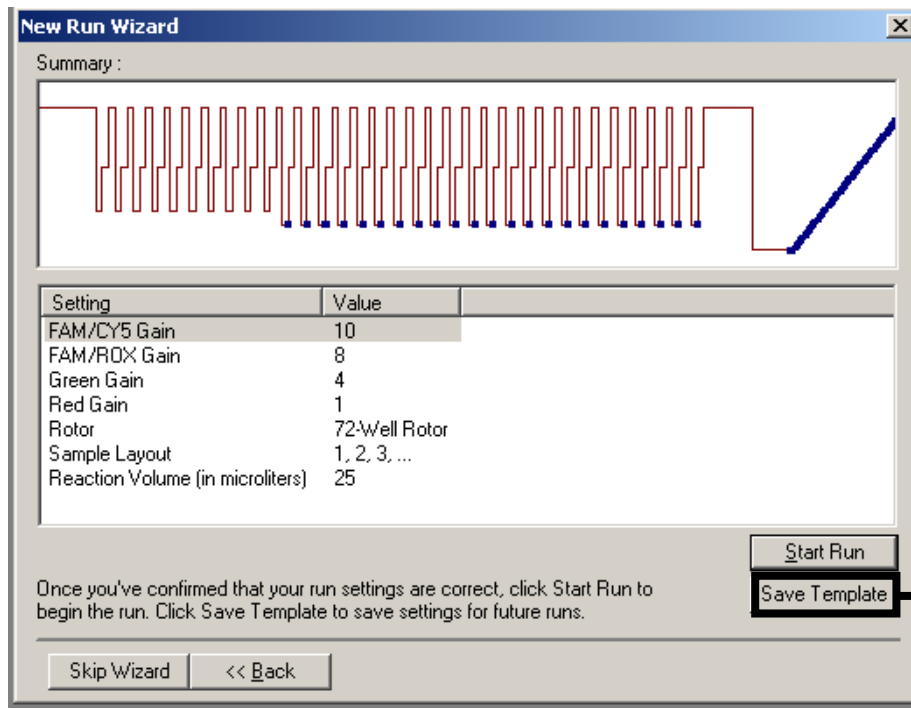


Εικόνα 17. Λήψη κατά τη διάρκεια του προγράμματος τήξης.



Εικόνα 18. Σύνοψη του προφίλ θερμοκρασίας.

12. Αποθηκεύστε το πρότυπο για μεταγενέστερη χρήση (Εικόνα 19)._



Εικόνα 19. Αποθήκευση προτύπου για μεταγενέστερη χρήση.

13. Προετοιμάστε το μείγμα 1 του βήματος 2 σύμφωνα με τον Πίνακα 11 και το μείγμα 2 του βήματος 2 σύμφωνα με τον Πίνακα 12, και αναμείξτε απαλά αλλά πλήρως.

Εάν τα μείγματα του βήματος 2 είχαν ήδη προετοιμαστεί στο βήμα 1, περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί το πρόγραμμα προενίσχυσης, και στη συνέχεια προχωρήστε στο βήμα 14.

Πίνακας 11. Προετοιμασία μείγματος 1 βήματος 2

Αριθμός δειγμάτων (χρώμα πώματος του σωληναρίου αντιδραστηρίου)	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα RespiFast 1 (κόκκινο)	19 μl	228 μl
Ένζυμο RespiFast (πορτοκαλί)	1 μl	12 μl
Συνολικός όγκος μείγματος 1 βήματος 2	20 μl	240 μl

Πίνακας 12. Προετοιμασία μείγματος 2 βήματος 2

Αριθμός δειγμάτων (χρώμα πώματος του σωληναρίου αντιδραστηρίου)	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα RespiFast 2 (μπλε)	19 μl	228 μl
Ένζυμο RespiFast (πορτοκαλί)	1 μl	12 μl
Συνολικός όγκος μείγματος 2 βήματος 2	20 μl	240 μl

14. Για κάθε δείγμα, μεταφέρετε με πιπέτα 20 μl του μείγματος 1 βήματος 2 σε ένα σωληνάριο ταινίας PCR για το Rotor-Gene, και μεταφέρετε με πιπέτα 20 μl του μείγματος 2 βήματος 2 σε ένα σωληνάριο ταινίας PCR για το Rotor-Gene.

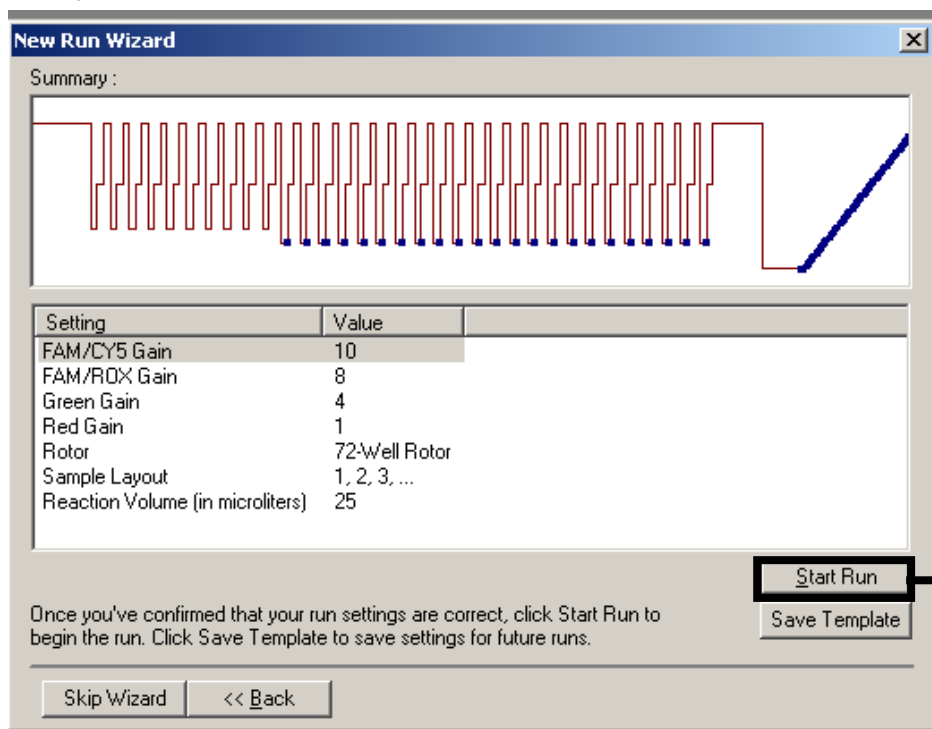
15. Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα προενίσχυσης (βήμα 5), αφαιρέστε τα σωληνάρια PCR από το θερμικό κυκλοποιητή και φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα. Μεταφέρετε με πιπέτα 5 μl κάθε αντιδραστή προενίσχυσης σε καθένα από τα 2 σωληνάρια ταινίας PCR — ένα με μείγμα 1 βήματος 2 και ένα με μείγμα 2 βήματος 2 (βλ. Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Προετοιμασία των αντιδράσεων βήματος 2

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Μείγμα 1 βήματος 2	20 μl	20 μl καθένα
Αντίδραση προενίσχυσης	5 μl	5 μl καθένα
Συνολικός όγκος	25 μl	25 μl καθένα
Μείγμα 2 βήματος 2	20 μl	20 μl καθένα
Αντίδραση προενίσχυσης	5 μl	5 μl καθένα
Συνολικός όγκος	25 μl	25 μl καθένα

16. Κλείστε τα σωληνάρια ταινίας με τα κατάλληλα πώματα και τοποθετήστε τα στο στροφέα του οργάνου Rotor-Gene Q.

17. Τοποθετήστε το στροφέα στο όργανο Rotor-Gene Q. Βεβαιωθείτε πως ο δακτύλιος ασφάλισης (παρελκόμενο του οργάνου Rotor-Gene) έχει τοποθετηθεί επάνω από το στροφέα για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
18. Ξεκινήστε την εκτέλεση (**Εικόνα 20**) χρησιμοποιώντας το αποθηκευμένο πρότυπο (βήμα 12).



Εικόνα 20. Έναρξη της εκτέλεσης.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Κανονικοποίηση

Στα όργανα Rotor-Gene Q, τα ακατέργαστα δεδομένα για το κανάλι FAM/Cy5 πρέπει πρώτα να κανονικοποιηθούν για να αντισταθμιστεί η αλληλοπαρεμβολή μεταξύ των διαφορετικών καναλιών.

Για την κανονικοποίηση των σημάτων Cy5, ανοίξτε το ακατέργαστο κανάλι Melt A.FAM/Cy5 (ρυθμίσεις φίλτρου 470–660 nm). Κάντε κλικ στο κουμπί «OPTION» (επιλογή) και επιλέξτε «NORMALIZE TO MELT A.FAM/ROX» (κανονικοποίηση στο Melt A.FAM/ROX). Το νεοδημιουργημένο αρχείο ακατέργαστων δεδομένων Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX πρέπει επιπροσθέτως να κανονικοποιηθεί για το κανάλι Red (ρυθμίσεις φίλτρου 625/660 nm). Αυτό γίνεται ανοίγοντας το νέο αρχείο ακατέργαστων δεδομένων Melt A.FAM/Cy5/ Melt A.FAM/ROX, κάνοντας κλικ στο κουμπί «OPTION» και επιλέγοντας «NORMALIZE TO MELT A.RED» (κανονικοποίηση στο Melt A.Red). Με αυτήν την κανονικοποίηση, ο εξαρτώμενος από τη θερμοκρασία φθορισμός του Cy5 διορθώνεται, με αποτέλεσμα μια πιο συμμετρική κορυφή τήξης.

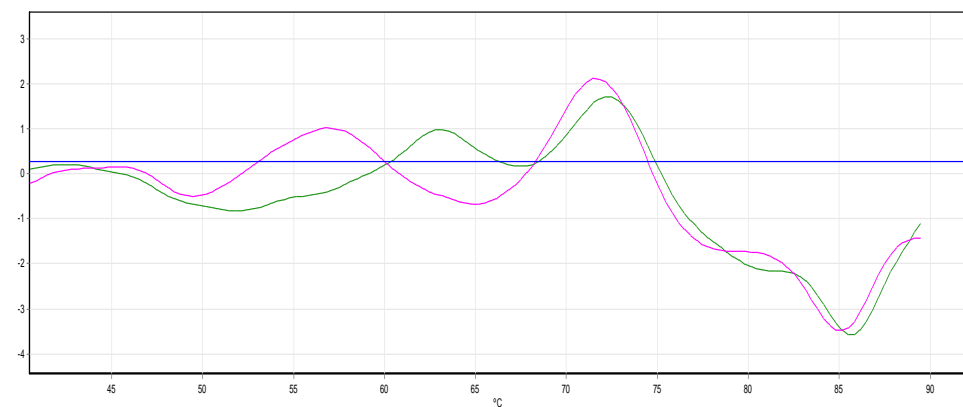
Ανάλυση

Για την ανάλυση του αρχείου ακατέργαστων δεδομένων, ανοίξτε το παράθυρο «ANALYSIS» (ανάλυση) και επιλέξτε το κατάλληλο κανονικοποιημένο αρχείο ακατέργαστων δεδομένων για FAM/Cy5 υπό την καρτέλα «MELT» (τήξη). Τα σήματα στο κανάλι Green (IC) (ρυθμίσεις φίλτρου 470–510 nm) και το κανάλι FAM/ROX (ρυθμίσεις φίλτρου 470–610 nm) δεν χρειάζονται κανονικοποίηση· τα αντίστοιχα αρχεία ακατέργαστων δεδομένων για τα κανάλια FAM/ROX και Green επιλέγονται επίσης. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης των ανιχνευτών SMART υποδεικνύονται στον Πίνακα Πίνακας 14, σελ. 47.

Κατώφλι

Χρησιμοποιώντας τη βελτιστοποίηση απολαβής στο λογισμικό του Rotor-Gene Q στο πρόγραμμα τήξης της αντίδρασης βήματος 2 του πάνελ RespiFast RG, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 10 (σελ. 24) και **Εικόνα 16** (σελ. 39), πρέπει να ρυθμιστούν οι ακόλουθες τιμές κατώφλιου στα διαγράμματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανάλυση των αποτελεσμάτων δειγμάτων.

- Κανάλι FAM/ROX: Κατώφλι = 1
- Κανάλι FAM/Cy5 (κανονικοποιημένο): Κατώφλι = 0
- Κανάλι Green (IC): Αναστρέψτε το σύμβολο του dF/dT, και επιλέξτε όλα τα δείγματα που δεν αποκάλυψαν θετική κορυφή τήξης στα κανάλια FAM/ROX και FAM/Cy5 και με τα δύο μείγματα. Ρυθμίστε το κατώφλι χειροκίνητα στο υψηλότερο επίπεδο φθορισμού μεταξύ 40 και 45°C που λαμβάνεται με αυτά τα αρνητικά δείγματα. Τα δείγματα που αποκαλύπτουν κορυφές τήξης και με τα δύο μείγματα εντός των τιμών εύρους αποδοχής T_m του εσωτερικού μάρτυρα και των μαρτύρων ενίσχυσης μπορούν τώρα να θεωρηθούν ως πραγματικά αρνητικά δείγματα (βλ. παράδειγμα στην **Εικόνα 21**). Τα δείγματα που αποκαλύπτουν μόνο ένα ή κανένα θετικό αποτέλεσμα εσωτερικού ελέγχου ή ένα ή κανένα αποτέλεσμα μάρτυρα ενίσχυσης πρέπει να θεωρηθούν ως μη έγκυρα. Τα μη έγκυρα δείγματα πρέπει να επαναληφθούν.



Εικόνα 21. Παράδειγμα αρνητικού δείγματος που ανιχνεύθηκε στο κανάλι Green: Με πράσινο η αντίδραση μείγματος 1, με ροζ η αντίδραση μείγματος 2. Το κατώφλι ρυθμίζεται στο υψηλότερο επίπεδο φθορισμού μεταξύ 40 και 45°C.

Πίνακας 14. Οι στόχοι και οι αντίστοιχες τιμές T_m των ανιχνευτών SMART

Επισήμανση	Ανιχνευτής SMART	Αποδεκτό εύρος T_m (°C)	Κωδικός παθογόνου (μείγμα 1)	Κωδικός παθογόνου (μείγμα 2)	
Cy5	Cy5 ανιχνευτής 1	50,5–53,5*	L. pneu	OC43	
	Cy5 ανιχνευτής 2a	55-58	B. pert	–	
	Cy5 ανιχνευτής 2b	52,5-55.	–	HKU1/NL63	
	Cy5 ανιχνευτής 3		60,5–63,5	Rhino/Entero	
			58,5-61,5		229E
	Cy5 ανιχνευτής 4	66,5–69,5	C. pneu	–	
	Cy5 ανιχνευτής 5	70,5-73,5	M. pneu	–	
Cy5 ανιχνευτής 6	76–79	–	H1N1		
ROX	ROX ανιχνευτής 1	53,5–56,5	RSVA	PIV1	
	ROX ανιχνευτής 2	58-61	Adeno	PIV2	
	ROX ανιχνευτής 3	62,5–65,5	hMPV	PIV3	
	ROX ανιχνευτής 4	66,5–69,5	RSVB	PIV4	
	ROX ανιχνευτής 5	72,5–75,5	InfA	Boca	
	ROX ανιχνευτής 6	76,5–79,5	InfB	–	
BHQ1	BHQ1 ανιχνευτής 1	70,5-73,5	IC	IC	
	BHQ1 ανιχνευτής AC1	61-64	AC1	–	
	BHQ1 ανιχνευτής AC	55,5-58,5	–	AC2	

* Οι κορυφές του Cy5 ανιχνευτή 1 μερικές φορές εμφανίζονται ως διπλή κορυφή. Η τιμή T_m της δεύτερης κορυφής είναι η σωστή.

Μια επισκόπηση των αποτελεσμάτων της καμπύλης τήξης δίνεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα καμπύλης τήξης πάνελ RespiFast RG

Αντίδραση δείγματος RespiFast									
Μείγμα 1				Μείγμα 2				Αποτέλεσμα δείγματος	
		FAM				FAM			
ROX	Cy5	IC	AC1	ROX	Cy5	IC	AC2		
+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Στόχος θετικού ROX 1*	
-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Στόχος θετικού Cy5 1*	
-	-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	Στόχος θετικού ROX 2*	
-	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	Στόχος θετικού Cy5 2*	
-	-	+	+	-	-	+	+	Αρνητικό	
+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Στόχοι θετικού ROX1 και Cy5 1*	
-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	Στόχοι θετικού ROX 2 και Cy5 2*	
+	-	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Στόχοι θετικού ROX1 και ROX 2*†	
-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Στόχοι θετικού Cy5 1 και Cy5 2*†	
+	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Στόχοι θετικού ROX1 και Cy5 2*†	
-	+	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Στόχοι θετικού Cy5 1 και ROX 2*†	
+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	Μη έγκυρο λόγω απουσίας αντίδρασης μείγματος 2	
-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	Μη έγκυρο λόγω απουσίας αντίδρασης μείγματος 2	
-	-	-	-	+	-	+/-	+/-	Μη έγκυρο λόγω απουσίας αντίδρασης μείγματος 1	
-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	Μη έγκυρο λόγω απουσίας αντίδρασης μείγματος 1	
-	-	-	-	-	-	-	-	Μη έγκυρο	
-	-	-	+	-	-	-	+	Μη έγκυρη εσφαλμένη εκχύλιση/δεν προστέθηκε δείγμα στην αντίδραση 2SMART	

* Το(α) αντίστοιχο(α) παθογόνο(α) μπορεί να βρεθεί στον Πίνακα 14.

† Οποιοσδήποτε συνδυασμός αυτών των αποτελεσμάτων είναι δυνατός, οδηγώντας σε θετικό αποτέλεσμα για πολλαπλούς στόχους που ανιχνεύθηκαν με το μείγμα 1 και το μείγμα 2 και στα δύο κανάλια ανίχνευσης ROX και Cy5.

Σημείωση: μια αντίδραση μείγματος του πάνελ RespiFast RG επικυρώνεται από την παρουσία κάποιου από τα ακόλουθα:

- Θετική κορυφή τήξης παθογόνου
- Θετική κορυφή τήξης AC και θετική κορυφή IC
- Θετική κορυφή τήξης AC (ο IC εκτοπίζεται λόγω ισχυρής λοίμωξης με παθογόνο που ανιχνεύθηκε με το αντίστοιχο μείγμα βήματος 2 RespiFast).

Οι μη έγκυρες αντιδράσεις πρέπει να επαναληφθούν. Όταν μόνο μία από τις δύο αντιδράσεις βήματος 2 RespiFast αποκαλύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, η μη έγκυρη αντίδραση του πάνελ RespiFast RG πρέπει να επαναληφθεί, ξεκινώντας με την αντίδραση προενίσχυσης (χρησιμοποιώντας διαθέσιμο εκχύλισμα νουκλεϊκών οξέων).

Όταν ένα δείγμα αποκαλύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα δείγματος λόγω απουσίας παθογόνου, IC και AC ή λόγω απουσίας παθογόνου και IC, η αντίδραση του πάνελ RespiFast RG πρέπει να επαναληφθεί ξεκινώντας από την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων του αρχικού δείγματος.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τεχνικών υπηρεσιών της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιεσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com).

Σχόλια και προτάσεις

Δεν υπάρχουν ορατές ειδικές κορυφές τήξης και η κορυφή τήξης IC δεν είναι ορατή

- | | |
|--|--|
| α) Σφάλμα(τα) προγραμματισμού στο πρόγραμμα θερμοκικής κυκλοποίησης | Προγραμματίστε το θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με την ενότητα «Πρωτόκολλο: Ενίσχυση PCR και ανάλυση τήξης», σελ. 21, και επαναλάβετε τον προσδιορισμό. |
| β) Σφάλμα μεταφοράς με πιπέτα ή απουσία αντιδραστηρίου | Επαναλάβετε τον προσδιορισμό RespiFast, ακολουθώντας την ενότητα «Πρωτόκολλο: Ενίσχυση PCR και ανάλυση τήξης», σελ. 21. |
| β) Δεν προστέθηκε IC ή ο IC προστέθηκε πριν προστεθεί το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης στο δείγμα | Είναι σημαντικό να προστεθεί ο IC και φορέας RNA στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, κατά προτίμηση αφού προστεθεί στο δείγμα, ανεξαρτήτως του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιείται (βλ. «Χρήση εσωτερικού μάρτυρα και φορέα RNA», σελ. 16). Διαφορετικά, ο IC θα μπορούσε να υποβαθμιστεί, λόγω νουκλεασών στο δείγμα. Επαναλάβετε την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων και τον προσδιορισμό RespiFast. |
| δ) Παρουσία αναστολέων της PCR στο δείγμα | Επαναλάβετε τον προσδιορισμό χρησιμοποιώντας πενταπλάσια αραιώση του απομονωμένου RNA/DNA. |

Απουσία ορατής κορυφής τήξης IC υπό την παρουσία ειδικών για το παθογόνο κορυφών τήξης

Ισχυρή λοίμωξη και/ή πολλαπλή λοίμωξη

Ο IC εκτοπίστηκε στον προσδιορισμό. Το αποτέλεσμα εξακολουθεί να είναι έγκυρο.

Είναι ορατές παρασιτικές κορυφές τήξης

Σχόλια και προτάσεις

Διασταυρούμενη μόλυνση

Διασφαλίστε ότι τα βήματα της αντίδρασης εκτελούνται σε ξεχωριστούς χώρους για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση.

Επαναλάβετε τον προσδιορισμό RespiFast.

Ελέγξτε το πρόγραμμα κυκλοποίησης και διασφαλίστε ότι όλα τα βήματα χειρισμού εκτελούνται όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Ενίσχυση PCR και ανάλυση τήξης», σελ. 21. Διασφαλίστε ότι εργάζεστε σε πάγο όπου υποδεικνύεται στο πρωτόκολλο.

Επαναλάβετε τον προσδιορισμό RespiFast.

Ποιοτικός έλεγχος

Το πάνελ RespiFast RG κατασκευάζεται από την PathoFinder BV στο Maastricht, Κάτω Χώρες (Ολλανδία), εντός συστημάτων ποιότητας πιστοποιημένων κατά EN ISO 13485:2012.

Περιορισμοί

Το πάνελ RespiFast RG βοηθά στη διάγνωση λοίμωξης του αναπνευστικού όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν υποδεικνύουν απαραίτητως την απουσία ιογενούς ή βακτηριακής λοίμωξης του αναπνευστικού. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μοναδική βάση για τη διάγνωση, τη θεραπεία ή άλλες θεραπευτικές αποφάσεις. Τα θετικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη συνυπάρχουσα λοίμωξη με άλλα παθογόνα. Το(α) ανιχνευόμενο(α) παθογόνο(α) ενδέχεται να μην αποτελεί(ούν) την οριστική αιτία της νόσου.

Στην τελική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνονται και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις καθώς και αξιολόγηση της κλινικής εικόνας.













Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνο από επαγγελματίες εργαστηρίων.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Επισκεφθείτε το www.giagen.com/p/RespiFast-RG-Panel-CE για τα χαρακτηριστικά απόδοσης του πάνελ RespiFast RG.

Σύμβολα

Τα ακόλουθα σύμβολα μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και στην επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Προσοχή
	Να φυλάσσεται μακριά από ηλιακή ακτινοβολία

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support, καλέστε 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιον από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
RespiFast RG Panel	CE IVD, για 25 αντιδράσεις: Κύριο μείγμα προενίσχυσης, εσωτερικός μάρτυρας, μείγμα εκκινητών προενίσχυσης, ρυθμιστικά διαλύματα RespiFast, ένζυμο RespiFast, θετικός μάρτυρας	4693163
Κιτ QIAamp MinElute Virus Spin — για τον ταυτόχρονο καθαρισμό ιικού DNA και RNA από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Για 50 μίνι παρασκευές: 50 στήλες QIAamp MinElute, πρωτεάση QIAGEN, φορέας RNA, ρυθμιστικά διαλύματα, σωληνάρια συλλογής (2 ml)	57704
Κιτ QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini — για τον ταυτόχρονο αυτοματοποιημένο καθαρισμό ιικού DNA και RNA από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα για χρήση σε συνδυασμό με το όργανο QIASymphony SP		
QIASymphony Virus/Pathogen Mini Kit	DSP Για 192 παρασκευές (200 μl έκαστο): περιλαμβάνει 2 φύσιγγες αντιδραστηρίων και στατώ ενζύμων και παρελκόμενα	937036
QIASymphony SP		

Μονάδα προετοιμασίας δειγμάτων QIASymphony, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία

9001297

**Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR
πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές**

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform

Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση

9002032

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System

Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση

9002033

Rotor-Gene Q — για εξαιρετική απόδοση στην PCR πραγματικού χρόνου

Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001580
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001650

Παρελκόμενα Rotor-Gene Q

Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1.000 αντιδράσεις των 10–50 μl	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2.500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 10.000 αντιδράσεις των 10–50 μl	981106

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Οι οδηγίες ή τα

εγχειρίδια χρήσης των κιτ QIAGEN είναι διαθέσιμα στο www.qiagen.com ή μπορούν να ζητηθούν από τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή από τον τοπικό σας διανομέα.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (Όμιλος QIAGEN)· BHQ® (Biosearch Technologies, Inc.)· Cy® (GE Healthcare)· FAM™, GeneAmp®, ROX™ (Life Technologies Corporation)· SmartFinder (PathoFinder B.V.).

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το πάνελ RespiFast RG

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του προϊόντος των εξής όρων:

1. Το προϊόν επιτρέπεται να χρησιμοποιείται μόνο σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που παρέχονται με το προϊόν και αυτό το εγχειρίδιο και για χρήση με τα συστατικά που περιέχονται στο πάνελ μόνο. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του πάνελ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το πάνελ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στα πρωτόκολλα που παρέχονται με το προϊόν, αυτό το εγχειρίδιο και πρόσθετα πρωτόκολλα που είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βεβαιτοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται γι' αυτά, και δεν παρέχει καμία εγγύηση πως δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το πάνελ και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το πάνελ και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιασδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του πάνελ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιασδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιασδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το πάνελ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

Ειδοποίηση προς τον αγοραστή

Αυτό το προϊόν κατασκευάζεται από την PathoFinder BV στο Maastricht, Κάτω Χώρες (Ολλανδία) εντός συστημάτων ποιότητας πιστοποιημένων κατά EN ISO 13485:2012. Αυτά τα προϊόντα πωλούνται για χρήση μόνο από τον τελικό χρήστη και δεν επιτρέπεται η μεταπώληση, διανομή ή επανασυσκευασία τους.

© 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Παραγγελίες www.qiagen.com/contact | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com | Δικτυακός τόπος www.qiagen.com