

Εγχειρίδιο κιτ *artus*[®] HBV RG PCR



24 (αρ. καταλόγου 4506263)



96 (αρ. καταλόγου 4506265)

Έκδοση 1



Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q



4506263, 4506265



1046920EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANIA

R4

MAT

1046920EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:


- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Περιεχόμενο

Περιεχόμενα του κιτ	6
Σύμβολα	6
Αποθήκευση	7
Προβλεπόμενη χρήση	7
Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος	7
Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις	8
Ποιοτικός έλεγχος	8
Εισαγωγή	8
Αρχή λειτουργίας	9
Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό	9
Χαρακτηριστικά απόδοσης	10
Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που προμηθεύεται ο χρήστης	19
Σημαντικές σημειώσεις	20
Γενικές προφυλάξεις	20
Συλλογή, φύλαξη και μεταφορά δειγμάτων	20
Απομόνωση DNA	22
Εσωτερικός μάρτυρας	22
Ρύθμιση του κατωφλίου για την ανάλυση PCR	23
Ποσοτικοποίηση	23
Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων	25
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	35
Βιβλιογραφία	38
Πληροφορίες παραγγελίας	39

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

artus HBV RG PCR Kit		(24)	(96)
Αρ. καταλόγου		4506263	4506265
Αριθμός αντιδράσεων		24	96
Μπλε	HBV RG/TM Master	2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Κόκκινο	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 ⁵ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Πράσινο	HBV RG/TM IC [†]	IC 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	Νερό (βαθμού PCR)	1.000 μl	1.000 μl
	Εγχειρίδιο	 1	1

* Πρότυπο ποσοτικοποίησης.

† Εσωτερικός μάρτυρας.

Σύμβολα



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> δοκιμασίες



Ημερομηνία λήξης












In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας

	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιέχει
	Αριθμός
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Σημαντική σημείωση

Αποθήκευση

Τα συστατικά του κιτ *artus* HBV RG PCR θα πρέπει να φυλάσσονται στους -15°C έως -30°C και είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη (>2 φορές) διότι μπορεί να επιφέρει έκπτωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους $2-8^{\circ}\text{C}$ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ώρες.

Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ *artus* HBV RG PCR είναι μία δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων *in vitro* για την ποσοτικοποίηση του DNA του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) σε ανθρώπινο πλάσμα. Αυτό το κιτ διαγνωστικού ελέγχου χρησιμοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και είναι διαμορφωμένο για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene Q.

Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

Η χρήση όλων των αντιδραστηρίων επιτρέπεται αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστικούς σκοπούς.

Το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό στις *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες.

Για βέλτιστα αποτελέσματα της PCR απαιτείται αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήσης.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή τον ανιχνευτή του kit, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

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 ασφάλειας (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®.

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

Ποιοτικός έλεγχος

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του kit *artus* HBV RG PCR ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για την διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

Εισαγωγή

Το kit *artus* HBV RG PCR αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του ιού HBV με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε όργανα Rotor--Gene Q. Το HBV RG/TM Master περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 134 bp του γονιδιώματος HBV και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green του Rotor-Gene Q ή Rotor-Gene 6000, ή Cycling A.FAM™ του Rotor-Gene 3000.

Επιπλέον, το kit *artus* HBV RG PCR περιλαμβάνει ακόμη ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για τη διαπίστωση τυχόν αναστολής της PCR. Το σύστημα

αυτό ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow του Rotor--Gene Q ή Rotor-Gene 6000, ή A.JOE™ του Rotor-Gene 3000. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης HBV PCR (βλέπε «Αναλυτική ευαισθησία», σελίδα 10) δεν μειώνεται. Παρέχονται εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες (HBV RG/TM QS 1–5), οι οποίοι καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της ποσότητας του ιικού DNA. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε «Ποσοτικοποίηση», σελίδα 23.

Αρχή λειτουργίας

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου μικροοργανισμού. Στην PCR πραγματικού χρόνου, το προϊόν της ενίσχυσης ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές. Αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων που προσδένονται ειδικά στο ενισχυμένο προϊόν. Η παρακολούθηση των εντάσεων φθορισμού κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της PCR (δηλ. σε πραγματικό χρόνο) επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συσσωρευόμενου προϊόντος χωρίς να χρειάζεται να ανοιχτούν ξανά τα σωληνάρια αντίδρασης μετά το πέρας της εκτέλεσης PCR.*

Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) μεταδίδεται κυρίως με το αίμα και τα παράγωγα του αίματος. Ωστόσο, είναι επίσης δυνατή η πρόκληση λοιμώξεων με τη σεξουαλική επαφή, δια του στόματος και περιγεννητικά. Ύστερα από μία γενικευμένη αδιαθεσία που περιλαμβάνει ανορεξία, έμετο και κοιλιακές διαταραχές, περίπου το 10–20% των ασθενών εκδηλώνουν πυρετό, εξάνθημα, καθώς και ρευματοειδή προβλήματα των αρθρώσεων και των μυών. Μετά από 2–14 ημέρες εκδηλώνεται ίκτερος που μπορεί να συνοδεύεται από κνησμό. Ένα ποσοστό 1% του συνόλου των ατόμων που έχουν προσβληθεί εμφανίζει αιφνίδια οξεία ηπατίτιδα, η οποία καταλήγει συχνά στο θάνατο. Το 5–10% των ασθενών που πάσχουν από ηπατίτιδα Β εκδηλώνουν χρόνια ηπατική φλεγμονή, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση του ήπατος ή πρωτοπαθές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

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

Χαρακτηριστικά απόδοσης

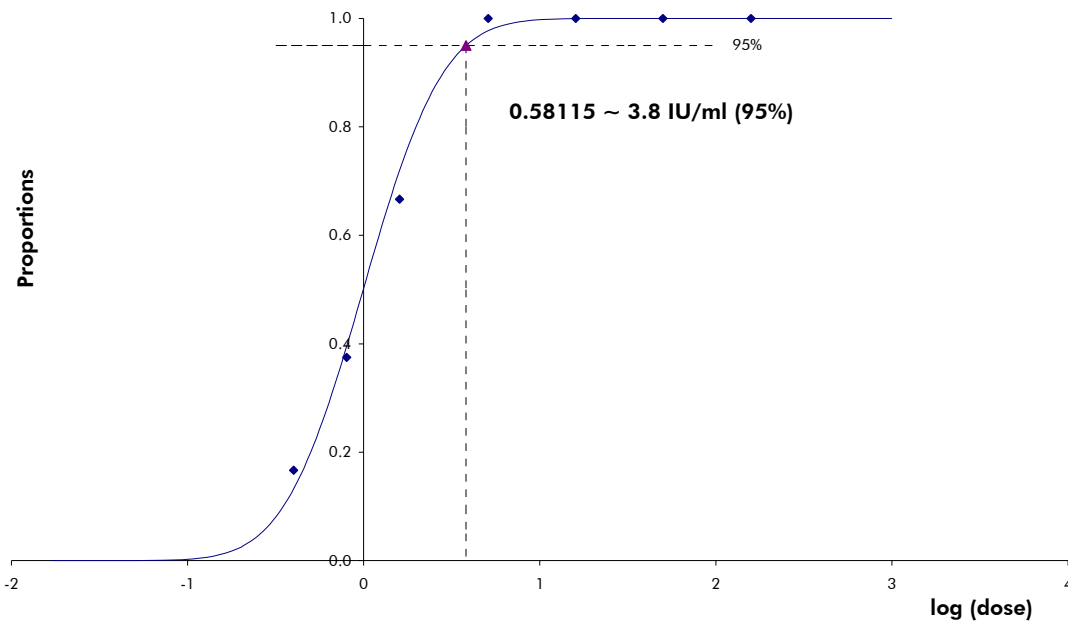
Αναλυτική ευαισθησία

Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης καθώς και το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης όσον αφορά στον καθαρισμό (όριο ευαισθησίας) αξιολογήθηκαν για το kit *artus* HBV RG PCR. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον HBV δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης. Απεναντίας, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε χωρίς κλινικά δείγματα και ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης με τη βοήθεια ενός προτύπου γνωστής συγκέντρωσης.

Για να προσδιοριστεί η αναλυτική ευαισθησία του kit *artus* HBV RG PCR, προετοιμάστηκε σειρά αραιώσης από 10 έως την ονομαστική τιμή 0,0003 HBV IU/ml και αναλύθηκε με το kit *artus* HBV RG PCR σε όργανα Rotor-Gene. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του kit *artus* HBV RG PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene 3000 είναι 0,02 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 0,02 IU/ml ανιχνεύεται με πιθανότητα 95%.

Η ισοδυναμία μεταξύ του Rotor-Gene 3000 και του Rotor-Gene Q/6000 καταδείχθηκε με βάση τις τεχνικές προδιαγραφές που επιβεβαιώθηκαν μέσω σύγκρισης της αναλυτικής απόδοσης. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις probit παράλληλα και στα δύο συστήματα. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης στο Rotor-Gene Q/6000 βρίσκεται εντός του διαστήματος εμπιστοσύνης του Rotor-Gene 3000. Επομένως, το kit *artus* HBV RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του DNA από HBV στο Rotor-Gene Q/6000 με παρόμοια ευαισθησία.

Η αναλυτική ευαισθησία όσον αφορά στον καθαρισμό (kit QIAamp[®] DSP Virus) του kit *artus* HBV RG PCR προσδιορίστηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσης του 1ου Διεθνούς Προτύπου για τον HBV (Π.Ο.Υ.) από 158 έως την ονομαστική τιμή 0,4 HBV IU/ml με εμβολιασμό σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA με το kit QIAamp DSP Virus (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 26 ml). Καθεμιά από τις 7 αραιώσεις αναλύθηκε με το kit *artus* HBV RG PCR σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό του kit *artus* HBV RG PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene 3000 είναι 3,8 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 3,8 IU/ml ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικόνα 1. Ανάλυση probit: HBV (Rotor-Gene 3000). Αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus, QIAGEN) του κιτ *artus* HBV RG PCR στο όργανο Rotor-Gene 3000.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα του κιτ *artus* HBV RG PCR διασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και από την τήρηση αυστηρών συνθηκών για την αντίδραση. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές ελέγχθηκαν ως προς πιθανές ομολογίες με όλες τις δημοσιευμένες ακολουθίες σε τράπεζες γονιδίων μέσω ανάλυσης σύγκρισης ακολουθιών. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών γονότυπων διασφαλίστηκε με ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων και μία εκτέλεση PCR σε όργανα Rotor-Gene με τους ακόλουθους γονότυπους (βλέπε Πίνακα 1).

Πίνακας 1. Εξέταση της ειδικότητας σχετικών γονότυπων

Ιός	Γονότυποι	Προέλευση	HBV (Cycling Green ή A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow ή A. JOE)
HBV	A (ΗΠΑ)	Teragenix*	+	+
HBV	B (Ινδονησία)	Teragenix	+	+
HBV	C (Ινδονησία)	Teragenix	+	+
HBV	C (Βενεζουέλα)	Teragenix	+	+
HBV	D (ΗΠΑ)	Teragenix	+	+
HBV	E (Ακτή Ελεφαντοστού)	Teragenix	+	+
HBV	F (Βενεζουέλα)	Teragenix	+	+
HBV	G (ΗΠΑ)	Teragenix	+	+
HBV	H (Νικαράγουα)	Teragenix	+	+

* Teragenix Corporation, Florida, USA.

Για περαιτέρω έλεγχο της ειδικότητας χρησιμοποιήθηκαν στελέχη HBV με γνωστές διαφορές ακολουθίας στην προπυρηνική περιοχή του γονιδιώματος HBV (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Florida, ΗΠΑ). Και τα 9 στελέχη με μεταλλαγμένη προπυρηνική περιοχή αυτού του σετ ήταν ανιχνεύσιμα με το kit *artus* HBV RG PCR.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση 100 διαφορετικών δειγμάτων πλάσματος, τα οποία ήταν αρνητικά στον HBV. Τα δείγματα δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για τον HBV εκκινητές και ανιχνευτές που περιλαμβάνονται στο HBV RG/TM Master.

Μία εν δυνάμει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του kit *artus* HBV RG PCR ελέγχθηκε με χρήση της ομάδας ελέγχου που παρατίθεται στον Πίνακα 2 (σελίδα 13). Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση. Δεν παρουσιάστηκαν διασταυρούμενες αντιδραστικότητες σε μεικτές λοιμώξεις.

Γραμμικό εύρος

Το γραμμικό εύρος (αναλυτική μέτρηση) του kit *artus* HBV RG PCR προσδιορίστηκε αναλύοντας μια σειρά αραίωσης ενός προτύπου ποσοτικοποίησης HBV από 1×10^8 IU/μl έως 1×10^{-2} IU/μl. Η σειρά

αραιώσης βαθμονομήθηκε έναντι του 1ου Διεθνούς Προτύπου για το DNA από HBV του Π.Ο.Υ.

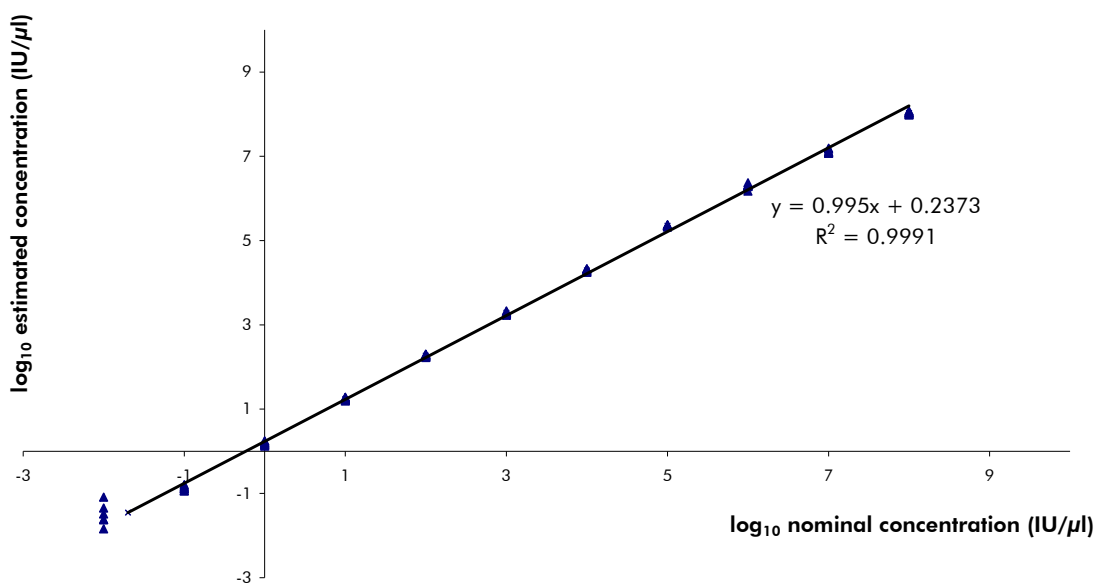
Κάθε αραιώση εξετάστηκε σε θυγατρικούς κλώνους (n = 8 για συγκεντρώσεις $\geq 1 \times 10^0$ IU/μl, n = 16 για συγκεντρώσεις $< 1 \times 10^0$ IU/μl) με χρήση του κιτ *artus* HBV RG PCR σε όργανα Rotor-Gene.

Πίνακας 2. Έλεγχος της ειδικότητας του κιτ με δυνητικώς διασταυρούμενα αντιδρώντα παθογόνα

Ομάδα ελέγχου	HBV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow ή Cycling A.JOE)
Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (ιός απλού έρπητα 1)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (ιός απλού έρπητα 2)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (ιός ανεμοβλογιάς-έρπητα)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 4 (ιός Epstein-Barr)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (κυτταρομεγαλοϊός)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6	–	+
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV) 1	–	+
Ιός ηπατίτιδας A	–	+
Ιός ηπατίτιδας C	–	+
Παρβοϊός B19	–	+
Ιός κίτρινου πυρετού	–	+
Ανθρώπινος ιός T-κυτταρικής λευχαιμίας τύπος 1 και τύπος 2	–	+
Ιός Coxsackie B3	–	+
Ιός δάγγειου πυρετού 1–4	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+

Το γραμμικό εύρος του κιτ *artus* HBV RG PCR προσδιορίστηκε ότι καλύπτει συγκεντρώσεις από 0,02 IU/μl έως τουλάχιστον 1×10^8 IU/μl (Εικόνα 2).

Υπό την παραδοχή ότι το κιτ QIAamp DSP Virus χρησιμοποιείται για εκχύλιση DNA, το κιτ *artus* HBV RG PCR καλύπτει ένα γραμμικό εύρος από 1,1 IU/ml έως τουλάχιστον 4×10^9 IU/ml.



Εικόνα 2. Γραμμικό εύρος του κιτ *artus* HBV RG PCR. Υπολογισμός του γραμμικού εύρους της ποσοτικοποίησης. Η ευθεία γραμμή προσδιορίστηκε με γραμμική παλινδρόμηση των log₁₀ υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων με τις log₁₀ ονομαστικές συγκεντρώσεις. Η εξίσωση της γραμμής παλινδρόμησης περιλαμβάνεται στην εικόνα.

Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του κιτ *artus* HBV RG PCR παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού της ολικής διακύμανσης του προσδιορισμού. Η ολική διασπορά αποτελείται από τη μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης, στα πλαίσια ενός πειράματος), τη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού που παρήχθησαν σε διαφορετικά όργανα του ίδιου τύπου από διαφορετικούς χειριστές εντός του ίδιου εργαστηρίου) και τη μεταβλητότητα μεταξύ των παρτίδων (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού με χρήση περισσότερων παρτίδων). Τα ληφθέντα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της τυπικής απόκλισης, της διασποράς και του συντελεστή διακύμανσης για το ειδικό παθογόνο και την PCR εσωτερικού μάρτυρα.

Τα δεδομένα ακρίβειας του κιτ *artus* HBV RG PCR συλλέχθηκαν με χρήση του προτύπου ποσοτικοποίησης της χαμηλότερης συγκέντρωσης (QS 5, 10 IU/μl).

Η δοκιμασία εκτελέστηκε με 8 θυγατρικούς κλώνους. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές C_T των καμπυλών ενίσχυσης (C_T : κύκλος κατωφλίου, βλέπε Πίνακα 3, σελίδα 15). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε IU/μl προσδιορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών C_T (Πίνακας 4). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η γενική στατιστική διασπορά οποιουδήποτε δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση είναι 1,29% (C_T) ή 8,99% (συγκέντρωση), και 1,87% (C_T) για την ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα. Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 3. Δεδομένα ακρίβειας με βάση τις τιμές C_T

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: HBV RG/TM QS 5	0,09	0,01	0,32
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: Εσωτερικός μάρτυρας	0,10	0,01	1,06
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HBV RG/TM QS 5	0,14	0,02	0,49
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	0,29	0,08	1,00
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: HBV RG/TM QS 5	0,38	0,15	1,39
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: Εσωτερικός μάρτυρας	0,62	0,39	2,23
Συνολική διασπορά: HBV RG/TM QS 5	0,36	0,13	1,29
Συνολική διασπορά: Εσωτερικός μάρτυρας	0,52	0,27	1,87

Πίνακας 4. Δεδομένα ακρίβειας στη βάση των ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε IU/ml)

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: HBV RG/TM QS 5	0,93	0,87	9,28
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HBV RG/TM QS 5	0,79	0,63	7,92
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: HBV RG/TM QS 5	1,03	1,05	10,21
Συνολική διασπορά: HBV RG/TM QS 5	0,90	0,81	8,99

Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του κιτ *artus* HBV RG PCR. Για την επικύρωση της ανθεκτικότητας εμβολιάσθηκαν 100 HBV αρνητικά δείγματα πλάσματος με 0,05 IU/ml όγκο έκλουσης μάρτυρα DNA HBV (περίπου τριπλάσια συγκέντρωση του ορίου αναλυτικής ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 22), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το κιτ *artus* HBV RG PCR. Το ποσοστό αποτυχίας για τον HBV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα του εσωτερικού μάρτυρα αξιολογήθηκε με τον καθαρισμό και ανάλυση των 100 HBV αρνητικών δειγμάτων πλάσματος. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Για το λόγο αυτό, η ανθεκτικότητα του κιτ *artus* HBV RG PCR είναι $\geq 99\%$.

Αναπαραγωγιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του κιτ *artus* HBV RG PCR καθώς και μία σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Σε μια μελέτη σε 2 ανεξάρτητα εργαστήρια, το kit *artus* HBV RG PCR συγκρίθηκε με τη δοκιμασία COBAS® TaqMan® HBV. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκαν 287 αναδρομικά και προοπτικά δείγματα πλάσματος.

DNA από HBV για την εξέταση του kit *artus* HBV RG PCR απομονώθηκε με χρήση του kit QIAamp DSP Virus, και διενεργήθηκε ανάλυση στο όργανο Rotor-Gene 3000. Για συγκριτική εξέταση με τη δοκιμασία COBAS TaqMan HBV, DNA από HBV απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που παρέχονται στο ένθετο της συσκευασίας. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με χρήση του kit *artus* HBV RG PCR συγκρίθηκαν με εκείνα της δοκιμασίας COBAS TaqMan HBV.

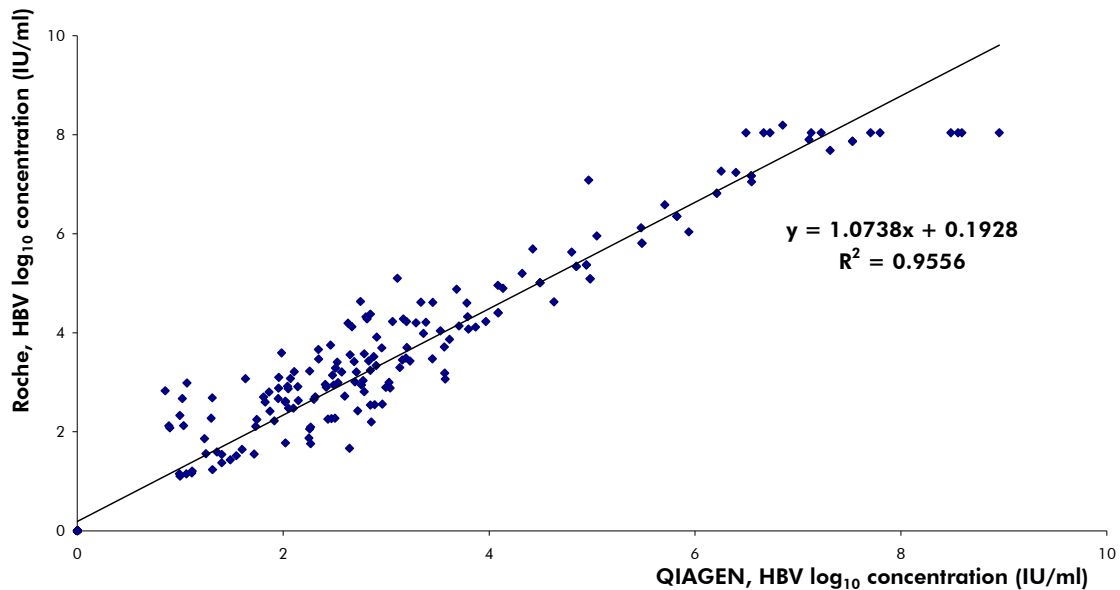
Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν με τη δοκιμασία COBAS TaqMan HBV ως δοκιμασία αναφοράς, προσδιορίστηκε διαγνωστική ευαισθησία του kit *artus* HBV RG PCR 100% και διαγνωστική ειδικότητα 97% για το σύνολο όλων των δειγμάτων πλάσματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης επικύρωσης

		Δοκιμασία COBAS TaqMan HBV		
		+	-	Σύνολο
Kit <i>artus</i> HBV RG PCR	+	186	3	189
	-	0	98	98

Περαιτέρω εξέταση των 3 ασύμφωνων αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του kit *artus* HBV RG PCR. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ασυμφωνία βασίζεται σε μια υψηλότερη ευαισθησία του kit *artus* HBV RG PCR.

Η διόρθωση των ποσοτικών αποτελεσμάτων και των δύο συστημάτων δοκιμασίας αναλύθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα και των δύο kit παρουσιάζονται σε σύγκριση στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Σύγκριση της δοκιμασίας COBAS TaqMan HBV (Roche, HBV· με καθαρισμό δείγματος με χρήση του συστήματος High Pure) με το kit *artus* HBV RG PCR (QIAGEN, HBV· με καθαρισμό δείγματος με χρήση του kit QIAamp DSP Virus). Η συσχέτιση των ποσοτικών αποτελεσμάτων και από τα δύο συστήματα δοκιμασίας (Πίνακας 5) αναλύθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα από τα δύο kit παρουσιάζονται σε ένα γράφημα (νεφελόγραμμα) ΧΥ με κλίμακα log–log.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που προμηθεύεται ο χρήστης

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.

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 22)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Αναδευτήρας τύπου vortex*
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Όργανο Rotor-Gene Q ή Rotor-Gene* με κανάλια φθορισμού για τα Cycling Green και Cycling Yellow ή με κανάλια φθορισμού για τα Cycling A.FAM και Cycling A.JOE
- Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 με έκδοση λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94· Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23) ή υψηλότερη
- Σωληνάρια και καπάκια ταινιών, 0,1 ml, για χρήση με στροφέα 72 φρεατίων (αριθμός καταλόγου 981103 ή 981106)
- Εναλλακτικά: Σωληνάρια PCR, 0,2 ml, για χρήση με στροφέα 36 φρεατίων (αριθμός καταλόγου 981005 ή 981008)
- Τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72 σωληναρίων των 0,1 ml, αριθμός καταλόγου 9018901 ή τεμάχιο φόρτωσης 96 σωληναρίων των 0,2 ml, αριθμός καταλόγου 9018905)

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

Σημαντικές σημειώσεις

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει πάντοτε να λαμβάνει υπόψη του τα ακόλουθα σημεία:

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Φυλάσσετε και λαμβάνετε θετικά υλικά (δείγματα, θετικούς μάρτυρες και προϊόντα πολλαπλασιασμού) χωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε χωρικά διαχωρισμένη εγκατάσταση.
- Αποψύχετε σχολαστικά όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.
- Μετά την απόψυξη, αναμίξτε τα συστατικά (πιέζοντας την πιπέτα επαναλαμβανόμενα προς τα επάνω και προς τα κάτω ή με παλμική ανάδευση (vortex)) και φυγοκεντρήστε σύντομα.
- Εργάζεστε γρήγορα και διατηρείτε τα συστατικά σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72/96 φρεατίων).

Συλλογή, φύλαξη και μεταφορά δειγμάτων

i Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

i Τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα καταδεικνύουν το μείγμα πλάσμα-EDTA ή πλάσμα-κιτρικό ως το καταλληλότερο υλικό δείγματος για την ανίχνευση του HBV. Για το λόγο αυτό, συνιστάται να χρησιμοποιείτε αυτά τα υλικά σε συνδυασμό με το kit *artus* HBV RG PCR.

Η εσωτερική πιστοποίηση του kit *artus* HBV RG PCR διεξήχθη με χρήση δειγμάτων EDTA ανθρώπινου πλάσματος. Άλλα υλικά δείγματος δεν έχουν επαληθευτεί. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά το συνιστώμενο kit απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 22) για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Κατά τη χρήση ορισμένων υλικών δειγμάτων πρέπει να τηρούνται αυστηρά συγκεκριμένες οδηγίες σχετικές με τη συλλογή, τη μεταφορά και την φύλαξη.

Συλλογή δειγμάτων

Κάθε αιματοληψία έχει σαν αποτέλεσμα τον τραυματισμό αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες, τριχοειδή αγγεία). Επιτρέπεται μόνο η χρήση αβλαβούς και αποστειρωμένου υλικού. Για τη λήψη αίματος διατίθενται υλικά μίας χρήσης. Για φλεβοκέντηση, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται υπερβολικά λεπτές τριχοειδικές βελόνες. Η λήψη φλεβικού αίματος πρέπει να πραγματοποιείται σε κατάλληλα μέρη της καμπής του αγκώνα, του αντιβραχιόνιου ή της ράχης του

καρπού. Το αίμα παραλαμβάνεται με τυποποιημένα σωληνάρια (κόκκινο κάλυμμα, Sarstedt ή ομοιότυπα σωληνάρια άλλου κατασκευαστή). Πρέπει να λαμβάνεται όγκος 5–10 ml αίματος EDTA. Τα σωληνάρια πρέπει να αναδεύονται με ανατροπή αμέσως μετά τη δειγματοληψία (8 x, χωρίς ανατάραξη).

i Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ηπαρινισμένα ανθρώπινα δείγματα (βλέπε «Παρεμβαλλόμενες ουσίες», παρακάτω).

Αποθήκευση δειγμάτων

Το πλήρες αίμα πρέπει να διαχωρίζεται σε πλάσμα και κυτταρικά συστατικά με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 800–1.600 x g εντός 6 ωρών. Το απομονωμένο πλάσμα πρέπει να μεταφερθεί σε αποστειρωμένα σωληνάρια από πολυπροπυλένιο. Η ευαισθησία της εξέτασης μπορεί να μειωθεί μέσω κατάψυξης ρουτίνας ή μακροχρόνιας φύλαξης των δειγμάτων. Το ενθυλακωμένο DNA του ιού είναι σταθερό για πολλές ημέρες όταν αποθηκεύεται στους 4°C, για εβδομάδες όταν αποθηκεύεται στους -20°C, αλλά και για μήνες όταν αποθηκεύεται στους -70°C.*

Μεταφορά δειγμάτων

Το υλικό των δειγμάτων θα πρέπει κατ' αρχήν να μεταφέρεται σε άθραυστο δοχείο μεταφοράς. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποτραπεί ο εν δυνάμει κίνδυνος μόλυνσης λόγω διαφυγής του δείγματος. Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται σύμφωνα με τις τοπικές και εθνικές οδηγίες για τη μεταφορά παθογόνων υλικών.†

Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται εντός 6 ωρών. Δεν συνιστούμε να αποθηκεύετε τα δείγματα στο χώρο στον οποίο έχουν συλλεχθεί. Ταχυδρομική αποστολή είναι δυνατή, σύμφωνα με τις νομικές υποδείξεις για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Συνιστούμε τη μεταφορά δειγμάτων μέσω ιδιωτικής υπηρεσίας ταχυμεταφορών. Τα δείγματα αίματος πρέπει να αποστέλλονται ψυχόμενα (2–8°C) και εκείνα του διαχωρισμένου πλάσματος σε κατάψυξη (-15 έως -30°C).

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Τα αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης (≤ 15 mg/dl) και λιπιδίων (≤ 800 mg/dl) και τα αιμολυτικά δείγματα δεν επηρεάζουν το σύστημα. Η ηπαρίνη (≥ 10 IU/ml) επηρεάζει την PCR. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα τα οποία έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Επίσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα ασθενών που υποβάλλονται σε αγωγή με ηπαρίνη.

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

† International Air Transport Association (Διεθνής Ένωση Αεροπορικών Μεταφορών, IATA). Dangerous Goods Regulations (Κανονισμοί περί Επικίνδυνων Εμπορευμάτων).

Απομόνωση DNA

Το kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, αρ. καταλόγου 60704) έχει επικυρωθεί για τον καθαρισμό ιικού DNA από ανθρώπινο πλάσμα για χρήση μαζί με το kit *artus* HBV RG PCR. Εκτελέστε τον καθαρισμό του ιικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

i Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Για την αύξηση της σταθερότητας του φορέα RNA που παρέχεται με το kit QIAamp DSP Virus, συνιστούμε να ακολουθείτε τις πληροφορίες σχετικά με την ανασύσταση και τη φύλαξη του φορέα RNA που δίνονται στο εγχειρίδιο οδηγιών («Προετοιμασία αντιδραστηρίων και ρυθμιστικών διαλυμάτων»).

i Ο εσωτερικός μάρτυρας του kit *artus* HBV RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», παρακάτω). Βεβαιωθείτε ότι συμπεριλαμβάνετε στη διαδικασία ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος στον καθαρισμό. Το αντίστοιχο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα χρησιμεύει ως βάση για την αξιολόγηση του καθαρισμού.

Εσωτερικός μάρτυρας

Παρέχεται ένας εσωτερικός μάρτυρας (HBV RG/TM IC). Με τη βοήθειά του, ο χρήστης παρακολουθεί τη διαδικασία απομόνωσης DNA και ελέγχει τυχόν αναστολή της PCR. Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα στην απομόνωση, σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, με χρήση του kit QIAamp DSP Virus, το DNA εκλούεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AVE). Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 6 μl του εσωτερικού μάρτυρα. Η ποσότητα του εσωτερικού μάρτυρα που χρησιμοποιείται εξαρτάται μόνο από τον όγκο έκλουσης.

i Ο εσωτερικός μάρτυρας και ο φορέας RNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 22) πρέπει να προστίθενται μόνο στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Ο εσωτερικός μάρτυρας δεν πρέπει να προστίθεται στο υλικό δείγματος απευθείας. Εάν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, παρακαλούμε σημειώστε ότι το μείγμα εσωτερικού μάρτυρα και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης-φορέα RNA πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο και να χρησιμοποιείται αμέσως (η φύλαξη του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο για μόνο μερικές ώρες μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία του εσωτερικού μάρτυρα και μειωμένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης).

i Μην προσθέτετε τον εσωτερικό μάρτυρα και το φορέα RNA απευθείας στο υλικό του δείγματος.

Για να θεωρηθεί επιτυχής ένας καθαρισμός, η τιμή C_T του εσωτερικού μάρτυρα ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος το οποίο έχει υποβληθεί σε επεξεργασία κατά τη διάρκεια του καθαρισμού (κιτ QIAamp DSP Virus) πρέπει να φθάσει το $C_T = 29 \pm 3$ (κατώφλι: 0,03) με χρήση οργάνων Rotor-Gene Q. Η αναφερόμενη διασπορά οφείλεται σε διακύμανση μεταξύ μηχανημάτων και διαδικασιών καθαρισμού. Μία υψηλότερη απόκλιση υποδεικνύει την παρουσία προβλημάτων κατά τη διαδικασία καθαρισμού. Σε αυτή την περίπτωση, η διαδικασία καθαρισμού πρέπει να ελεγχθεί και, εάν είναι απαραίτητο, να επικυρωθεί εκ νέου. Εάν έχετε οποιοσδήποτε περαιτέρω ερωτήσεις ή εάν συναντήσετε προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN.

Προαιρετικά, ο εσωτερικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για τον έλεγχο τυχόν αναστολής της PCR. Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο HBV RG/TM Master, όπως περιγράφεται στο βήμα 2β του πρωτοκόλλου (σελίδα 26).

Ρύθμιση του κατωφλίου για την ανάλυση PCR

Οι βέλτιστες ρυθμίσεις κατωφλίου για ένα δεδομένο συνδυασμό του οργάνου Rotor-Gene Q και του κιτ *artus* RG PCR πρέπει να καθορίζονται εμπειρικά δοκιμάζοντας κάθε επιμέρους συνδυασμό, εφόσον πρόκειται για σχετική τιμή ανάλογα με τη συνολική διαγνωστική ροή εργασίας. Ως σημείο εκκίνησης, το κατώφλι μπορεί να ρυθμιστεί σε μια προκαταρκτική τιμή 0,04 για την ανάλυση της πρώτης εκτέλεσης PCR, αλλά αυτή η τιμή θα πρέπει να ρυθμιστεί περαιτέρω σε μια συγκριτική ανάλυση των επόμενων εκτελέσεων της ροής εργασίας. Το κατώφλι πρέπει να ρυθμιστεί χειροκίνητα μόλις πάνω από το σήμα υποβάθρου των αρνητικών μαρτύρων και αρνητικών δειγμάτων. Η μέση τιμή κατωφλίου που υπολογίζεται από αυτά τα πειράματα το πιθανότερο είναι ότι θα λειτουργεί για την πλειονότητα των μελλοντικών εκτελέσεων, αλλά ο χρήστης θα πρέπει παρόλ' αυτά να πραγματοποιεί ανασκόπηση της παραγόμενης τιμής κατωφλίου σε τακτικά διαστήματα. Η τιμή κατωφλίου θα βρίσκεται συνήθως στο εύρος από 0,03–0,05 και πρέπει να στρογγυλοποιείται σε έως και τρία δεκαδικά ψηφία.

Ποσοτικοποίηση

Τα εσώκλειστα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HBV RG/TM QS 1–5) αντιμετωπίζονται ως προηγούμενως καθαρισμένα δείγματα και χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος (20 μl). Για να δημιουργήσετε μία πρότυπη καμπύλη σε όργανα Rotor-Gene Q θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε και τα 5 πρότυπα ποσοτικοποίησης και να τα ορίσετε στο πλαίσιο διαλόγου «Edit Samples» (Επεξεργασία δειγμάτων) ως πρότυπα με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (βλέπε εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου).

ⓘ Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης ορίζονται ως IU/μl.* Για τη μετατροπή των τιμών που έχουν καθοριστεί με βάση την πρότυπη καμπύλη σε IU/ml υλικού δείγματος πρέπει να εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Αποτέλεσμα (IU/ml)} = \frac{\text{Αποτέλεσμα (IU/μl)} \times \text{Όγκος έκλουσης (μl)}}{\text{Όγκος δείγματος (ml)}}$$

Κατ' αρχήν, ο αρχικός όγκος δείγματος πρέπει να καταχωρηθεί στην παραπάνω εξίσωση. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περίπτωση τροποποίησης του όγκου δείγματος πριν από την εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέος (π.χ., μείωση του όγκου με φυγοκέντρηση ή αύξηση του όγκου με προσθήκη του απαιτούμενου για την απομόνωση όγκου).

Το πρότυπο έχει βαθμονομηθεί με χρήση του 1ου Διεθνούς Προτύπου για τον HBV (Π.Ο.Υ.).

Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων



Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε «Σημαντικές σημειώσεις», σελίδες 20–23.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
- Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό, βαθμού PCR) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για να δημιουργήσετε μία πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιήστε και τα 5 παρεχόμενα πρότυπα διαλύματα ποσοτικοποίησης (HBV RG/TM QS 1–5) για κάθε εκτέλεση PCR.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q) έχει προψυχθεί στους 2–8°C.
- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται πλήρως, να αναμειγνύονται (με επαναλαμβανόμενη πίεση προς τα επάνω και προς τα κάτω της πιπέτας ή με ταχεία ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex) και να φυγοκεντρούνται σύντομα.

Διαδικασία

1. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων PCR στους προσαρμογείς του τεμαχίου ψύξης.
 2. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας απομόνωσης DNA και τον έλεγχο ως προς τυχόν αναστολή της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2α. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2β.
- 2α. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 22). Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της απομόνωσης DNA και τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HBV RG/TM Master	30 μl	360 μl
HBV RG/TM IC	0 μl	ανά 0 μl
Συνολικός όγκος	30 μl	ανά 360 μl

2β. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστίθεται απευθείας στο HBV RG/TM Master. Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 7.

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

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HBV RG/TM Master	30 μl	360 μl
HBV RG/TM IC	2 μl	24 μl
Συνολικός όγκος	32 μl*	384 μl*

* Η αύξηση του όγκου λόγω της προσθήκης του εσωτερικού μάρτυρα δεν λαμβάνεται υπόψη κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού PCR. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

3. Διανείμετε με πιπέτα 30 μl του μείγματος master σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του εκλουσμένου DNA δείγματος (βλέπε Πίνακα 8). Αντίστοιχα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 20 μl τουλάχιστον ενός από τα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HBV RG/TM QS 1–5) ως θετικός μάρτυρας και 20 μl νερού (νερό, βαθμού PCR) ως αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 8. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR

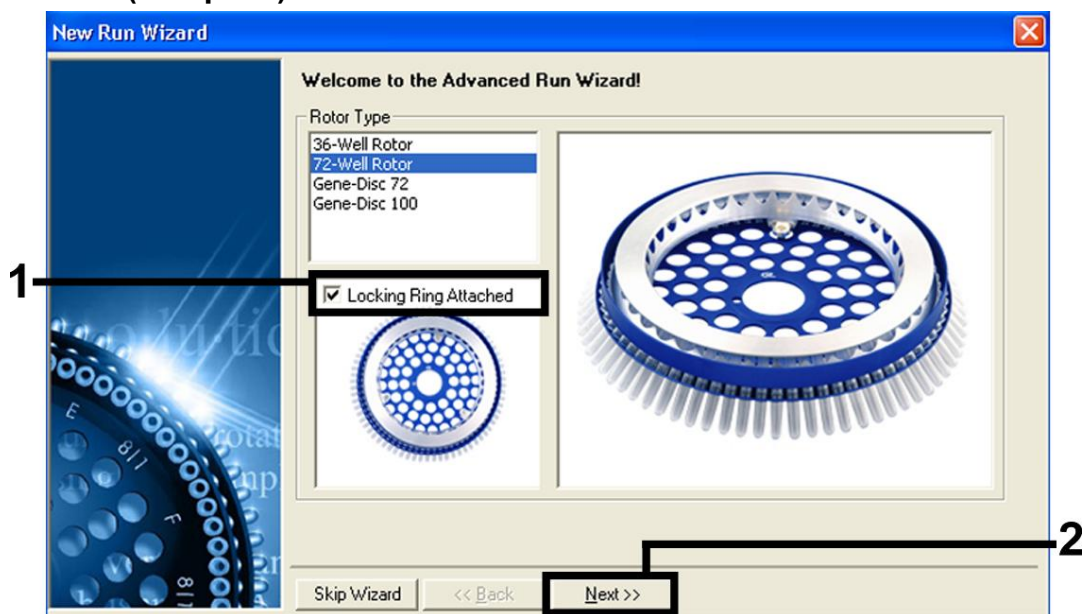
Αριθμός δειγμάτων	1	12
Μείγμα master	30 μl	ανά 30 μl
Δείγμα	20 μl	ανά 20 μl
Συνολικός όγκος	50 μl	ανά 50 μl

4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene) έχει τοποθετηθεί επάνω από το στρόφειο για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
5. Για την ανίχνευση DNA από HBV, δημιουργήστε ένα θερμοκρασιακό προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Σχήματα 4, 5, 6
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start	Σχήμα 7
Ενίσχυση του DNA	Σχήμα 8
Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Σχήμα 9
Έναρξη της εκτέλεσης	Σχήμα 10

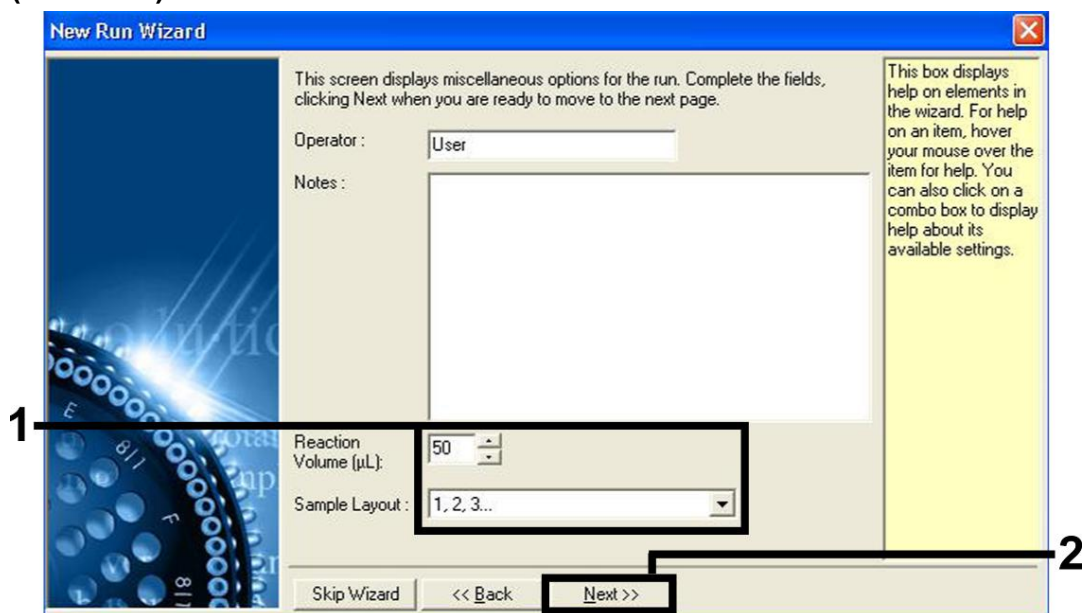
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94, Rotor-Gene 6000 με εκδόσεις λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, και Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene παρακαλείστε να ανατρέξετε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q. Όπου απαιτούνται διαφορετικές τιμές για το Rotor-Gene 3000, αυτές οι διαφορές περιγράφονται στο κείμενο.

6. Ανοίξτε καταρχήν το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 4). Επιλέξτε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Προσαρτημένος δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο).



Εικόνα 4. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard».

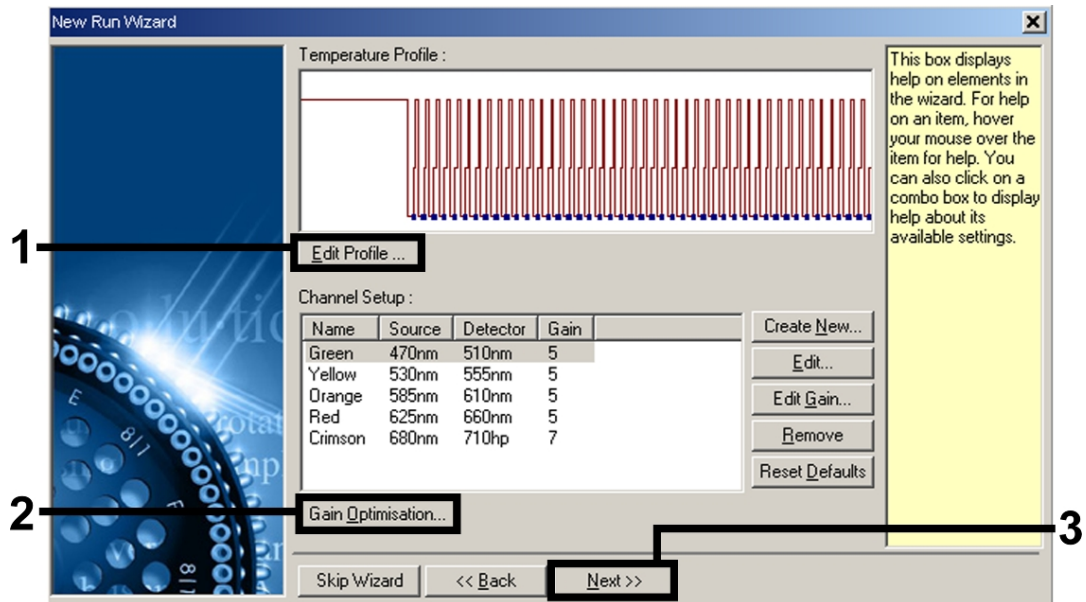
7. Επιλέξτε 50 ως τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στο «Next» (Εικόνα 5).



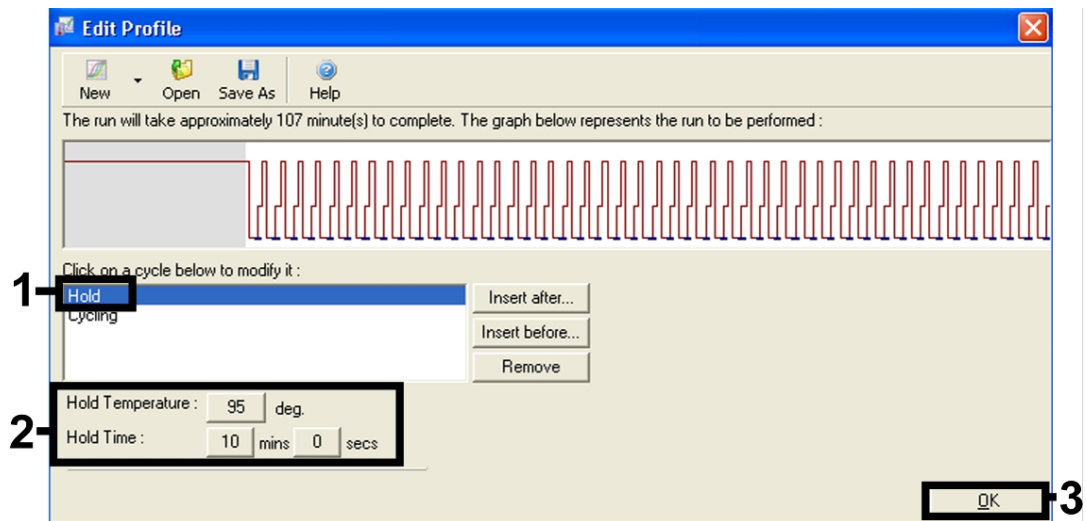
Εικόνα 5. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

8. Κάντε κλικ στο κουμπί «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο ακόλουθο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Εικόνα 6) και

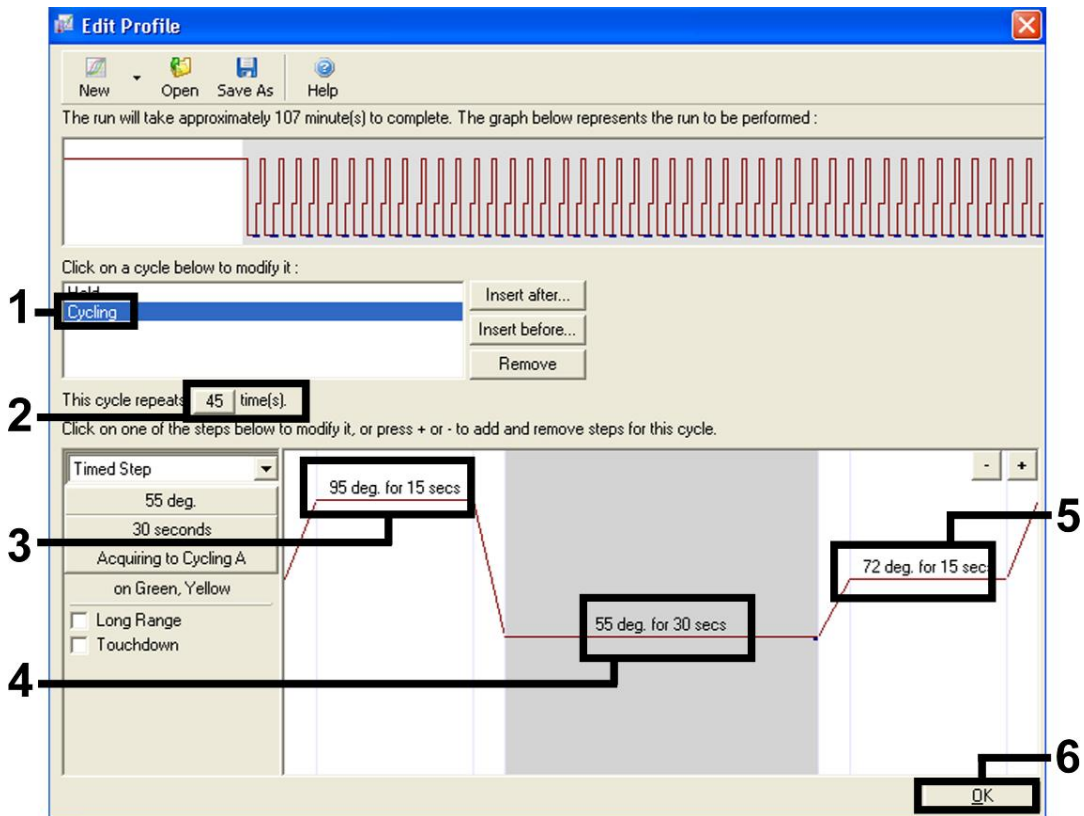
προγραμματίστε το θερμοκρασιακό προφίλ με τον τρόπο που φαίνεται στις Εικόνες 6–8.



Εικόνα 6. Επεξεργασία του προφίλ.

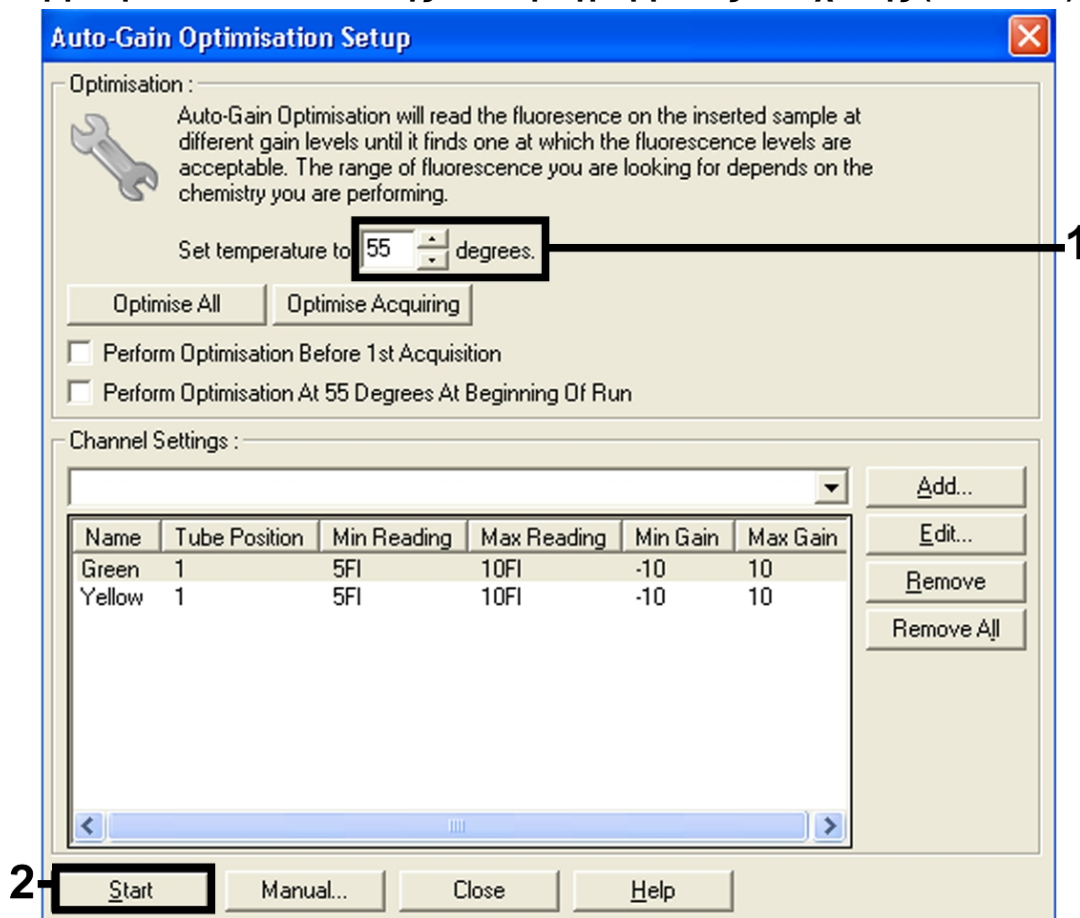


Εικόνα 7. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start.



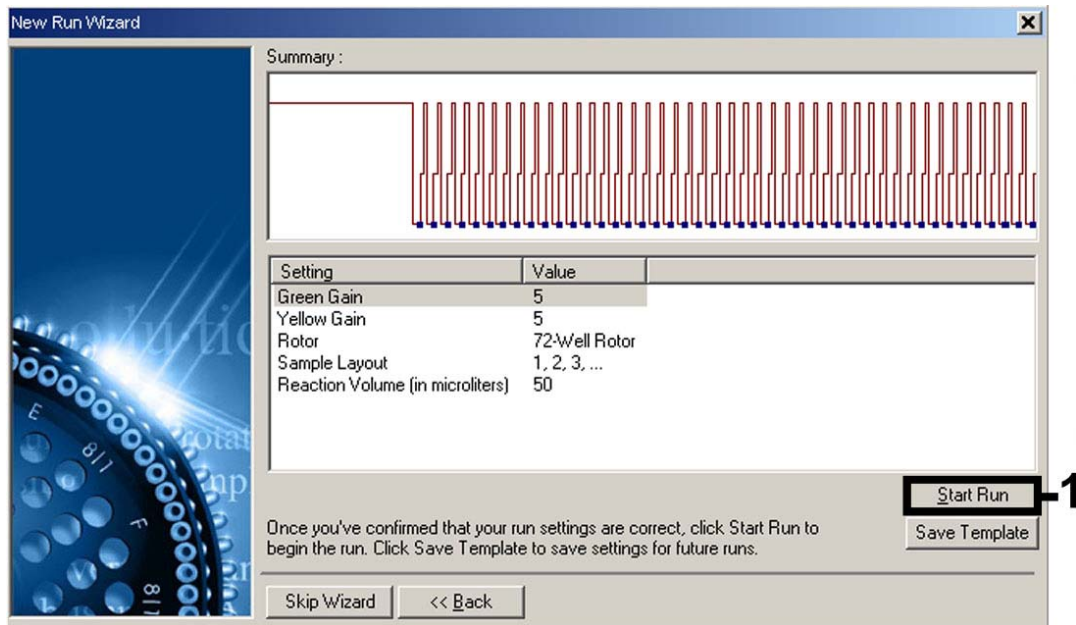
Εικόνα 8. Ενίσχυση του DNA. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr, JOE».

9. Τό εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθορισθεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Κάντε κλικ στο «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Βλέπε Εικόνα 6) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου «Auto-Gain Optimisation Setup» (Ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής). Ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στο 55 για να αντιστοιχεί στη θερμοκρασία ανασύνδεσης του προγράμματος ενίσχυσης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «JOE».

10. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση του καναλιού αποθηκεύονται αυτομάτως και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (Εικόνα 10). Κάντε κλικ στο «Start Run» (Εκκίνηση εκτέλεσης).



Εικόνα 10. Έναρξη της εκτέλεσης. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «JOE».

11. Μόλις ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων. Τα ακόλουθα αποτελέσματα (11α, 11β και 11γ) είναι διαθέσιμα.

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR παρέχονται στην Εικόνα 11 και στην Εικόνα 12.

- 11α. **Ανιχνεύτηκε σήμα στο κανάλι φθορισμού Cycling Green.**
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει DNA από HBV.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cyclin Yellow μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από HBV (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Green) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (ανταγωνισμός).



Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM για το θετικό σήμα και Cycling A.JOE για τον εσωτερικό μάρτυρα.

11β. Στο κανάλι φθορισμού Cycling Green δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow.

Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA από HBV. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

Στην περίπτωση αρνητικής PCR για τον HBV, το ανιχνευμένο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

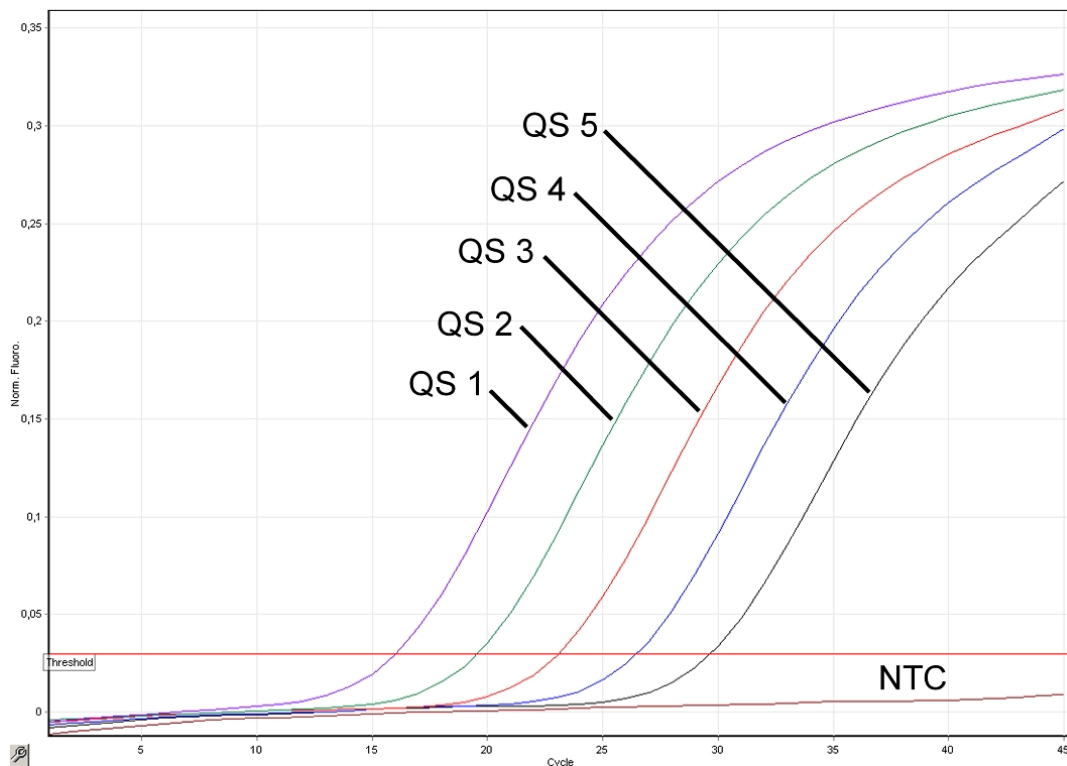
i Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.JOE για τον εσωτερικό μάρτυρα και απουσία σήματος για το Cycling A.FAM.

11γ. Κανένα σήμα δεν ανιχνεύεται στο κανάλι Cycling Green ή στο κανάλι Cycling Yellow.

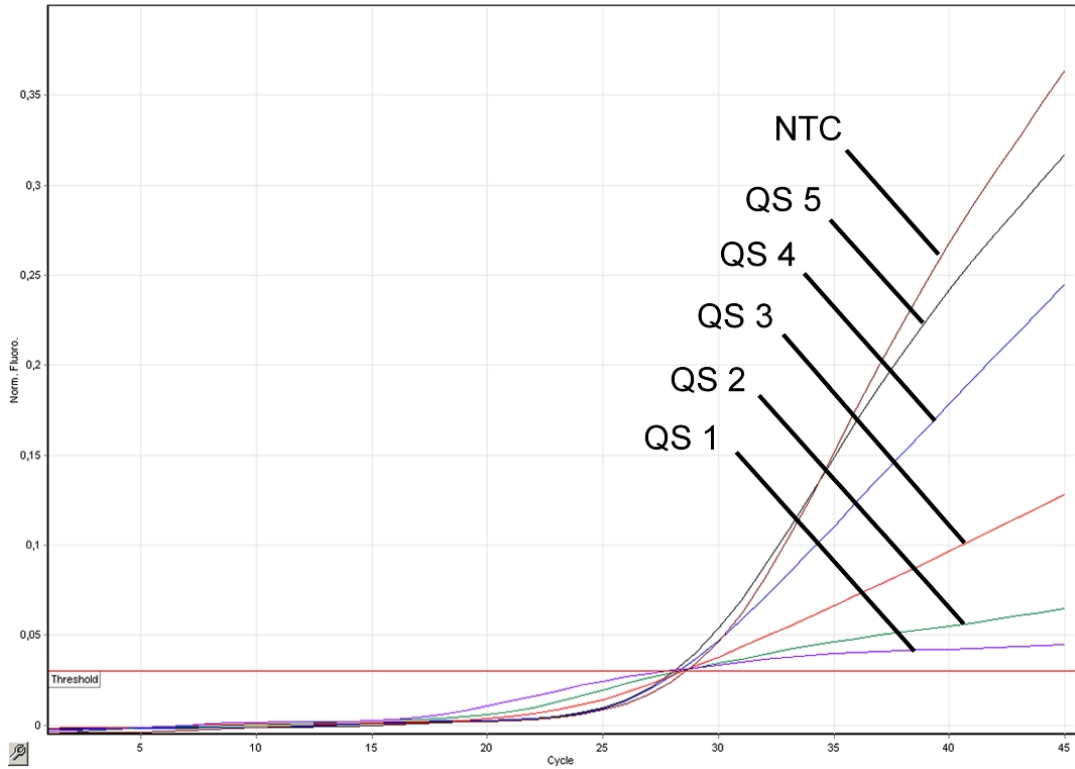
Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι δυνατή.

Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στο «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», σελίδα 35.

i Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM και Cycling A.JOE.



Εικόνα 11. Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (HBV RG/TM QS 1–5) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 12. Ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (HBV RG/TM QS 1–5). NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).

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 του Τμήματος τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε 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

Απουσία σήματος με θετικούς μάρτυρες (HBV RG/TM QS 1–5) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM

- α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο
- β) Λανθασμένος προγραμματισμός του θερμοκρασιακού προφίλ στο όργανο Rotor-Gene
- γ) Λανθασμένη διαμόρφωση της PCR
- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση» (σελίδα 7)
- ε) Το κιτ *artus* HBV RG PCR έχει λήξει
- ⓘ Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM για την ανάλυση HBV PCR και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow ή Cycling A.JOE για την PCR εσωτερικού μάρτυρα.
- ⓘ Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 25.
- ⓘ Ελέγξτε τα βήματα του σχήματος διανομής με πιπέτα και επαναλάβετε την PCR εάν είναι απαραίτητο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 25.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Αδύναμο σήμα ή απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος που υποβλήθηκε σε διαδικασία καθαρισμού με χρήση του kit QIAamp DSP Virus ($C_T = 29 \pm 3$ · κατώφλι, 0,03) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow ή Cycling A.JOE και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι Cycling Green ή Cycling A.FAM

- α) Οι συνθήκες PCR δεν συμμορφώνονται με το πρωτόκολλο  Ελέγξτε τις συνθήκες PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- β) Συνέβη αναστολή της PCR  Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- γ) Χάθηκε DNA κατά την εκχύλιση  Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε στην εκχύλιση, η απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα μπορεί να υποδεικνύει απώλεια κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 22) και ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση» (σελίδα 7)  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο kit, εάν χρειαστεί.
- ε) Το kit *artus* HBV RG PCR έχει λήξει  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο kit, εάν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Σήματα με τους αρνητικούς μάρτυρες στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM της ανάλυσης PCR

α) Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR

ⓘ Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε αντίγραφα.

ⓘ Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.

ⓘ Βεβαιωθείτε πως οι θετικοί μάρτυρες διανέμονται με πιπέτα τελευταίοι.

ⓘ Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

β) Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση

ⓘ Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο, χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.

ⓘ Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μία μεγάλη, ενημερωμένη online βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της QIAGEN. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε – είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού ή ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κτλ.

Για ένα πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Master, 5 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4506263
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: Master, 5 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4506265
QIAamp DSP Virus Kit — για τον καθαρισμό ιικών νουκλεϊκών οξέων από ανθρώπινο πλάσμα για in vitro διαγνωστικούς σκοπούς		
QIAamp DSP Virus Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες περιδίνισης QIAamp MinElute [®] , ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, επεκτάσεις στήλης και σύνδεσμοι VacConnector	60704
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002022

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
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, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
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, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση δεν συμπεριλαμβάνονται	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002003

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002013
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002012
Rotor-Gene Q — για εξαιρετική απόδοση στην PCR πραγματικού χρόνου		
Rotor-Gene Q 5plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001640

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001570
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, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001650
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, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001660

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001550
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001560

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Παρελκόμενα Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με μία πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml.	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης σε τυπική διάταξη 8 x 12 με χρήση 96 σωληναρίων των 0,2 ml.	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 1000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2.500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 10.000 αντιδράσεις	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1.000)	1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10.000)	10 x 1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981008

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποτοποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Οι οδηγίες ή τα εγχειρίδια χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στο www.qiagen.com ή μπορούν να ζητηθούν από το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή από τον τοπικό σας διανομέα.

Η αγορά αυτού του προϊόντος παρέχει στον αγοραστή τη δυνατότητα της χρήσης του για την εκτέλεση διαγνωστικών υπηρεσιών για in vitro διάγνωση σε ανθρώπους. Με τον παρόν δεν παρέχεται κανένα γενικό δικαίωμα ευρεσιτεχνίας ή άλλη άδεια οποιουδήποτε είδους, εκτός από το παρόν, συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης από την αγορά.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group)· COBAS®, TaqMan® (Roche Group)· FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

Το kit *artus* HBV RG PCR και το kit QIAamp DSP Virus είναι διαγνωστικά kit που φέρουν τη σήμανση CE σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα για τη διάγνωση in vitro. Δεν διατίθεται σε όλες τις χώρες.

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του kit *artus* HBV RG PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του kit *artus* HBV RG PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το εγχειρίδιο kit *artus* HBV RG PCR (*artus HBV RG PCR Kit Handbook*) και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτά τα kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο εγχειρίδιο kit *artus* HBV RG PCR (*artus HBV RG PCR Kit Handbook*) και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit 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 οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει 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 οποιοσδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

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

© 2009–2014 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

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)

