# Εγχειρίδιο *artus*® Parvo B19 RG PCR Kit

Σ 24 (αρ. καταλόγου 4504263)

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το *όργανο Rotor-Gene*® *Q*

Ιούνιος 2018 – Έκδοση 1

CE

IVD

REF 4504263, 4504265

HB 1112933 EL

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R4 MAT 1112933 EL

QIAGEN®

Sample & Assay Technologies

# 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.

# Πίνακας περιεχομένων

**1. Περιεχόμενο ..... 5**

**2. Αποθήκευση ..... 5**

**3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές ..... 6**

**4. Γενικές Προφυλάξεις ..... 6**

**5. Προβλεπόμενη χρήση ..... 7**

**6. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες ..... 7**

**7. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου ..... 7**

**8. Περιγραφή προϊόντος ..... 8**

**9. Πρωτόκολλο ..... 9**

9.1 Απομόνωση DNA ..... 9

9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου ..... 12

9.3 Ποσοτικοποίηση ..... 13

9.4 Προετοιμασία της PCR ..... 14

9.5 Προγραμματισμός του *οργάνου Rotor-Gene Q* ..... 18

**10. Ανάλυση δεδομένων ..... 23**

**11. Αντιμετώπιση προβλημάτων ..... 25**

**12. Ειδικά χαρακτηριστικά ..... 28**

12.1 Αναλυτική ευαισθησία ..... 28

12.2 Ειδικότητα ..... 29

12.3 Ακρίβεια ..... 30

12.4 Ανθεκτικότητα ..... 32

12.5 Επαναληψιμότητα ..... 32

**13. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος ..... 32**

**14. Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις.....33**

**15. Ποιοτικός έλεγχος .....33**

**16. Βιβλιογραφία .....34**

**17. Επεξήγηση των συμβόλων .....35**

# *artus* Parvo B19 RG PCR Kit

Για χρήση με το *όργανο Rotor-Gene Q.*

## 1. Περιεχόμενο

| | Επισήμανση και περιεχόμενο | Αρ. κατ. 4504263 24 αντιδράσεις |
|---|---|---|
| **Μπλε** | *Parvo B19 RG/TM Master* | 2 x 12 rxns |
| **Κόκκινο** | *Parvo B19 RG/TM QS 1[a] 1 x $10^5$ IU/µl* | 1 x 200 µl |
| **Κόκκινο** | *Parvo B19 RG/TM QS 2[a] 1 x $10^4$ IU/µl* | 1 x 200 µl |
| **Κόκκινο** | *Parvo B19 RG/TM QS 3[a] 1 x $10^3$ IU/µl* | 1 x 200 µl |
| **Κόκκινο** | *Parvo B19 RG/TM QS 4[a] 1 x $10^2$ IU/µl* | 1 x 200 µl |
| **Κόκκινο** | *Parvo B19 RG/TM QS 5[a] 1 x $10^1$ IU/µl* | 1 x 200 µl |
| **Πράσινο** | *Parvo B19 RG/TM IC[a]* | 1 x 1.000 µl |
| **Λευκό** | *Νερό (κατηγορίας PCR)* | 1 x 1.000 µl |

*QS = Quantitation Standard (Πρότυπο ποσοτικοποίησης)*
*IC = Internal Control (Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου)*

## 2. Αποθήκευση

Τα υλικά του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit πρέπει να αποθηκεύονται στους -15 °C έως -30 °C και διατηρούνται σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επαναληπτική ψύξη/απόψυξη (> 2 x) θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί με αυτό τον τρόπο μειώνεται η ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους +4°C δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

## 3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε **Ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- *Όργανο Rotor-Gene Q* με λογισμικό έκδοσης 2.3 ή μεταγενέστερη
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, (Σωληνάρια και καπάκια ταινιών) για χρήση με στροφέα 72 βυθισμάτων (αριθμός καταλόγου 981103 ή 981106)
- Τεμάχιο ψύξης [Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (τεμάχιο φόρτωσης 72 σωληναρίων των 0,1 ml), αριθμός καταλόγου 9018901]

## 4. Γενικές Προφυλάξεις

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

- Χρησιμοποίηση στείρων ρυγχών πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου και προϊόντα πολλαπλασιασμού) πρέπει να εκχυλίζεται, να αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Πλήρη απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση τους.
- Στη συνέχεια, καλή ανάμειξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρησης.
- Εργάζεστε γρήγορα επάνω σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72 βυθισμάτων).

## 5. Προβλεπόμενη χρήση

Το artus Parvo B19 RG PCR Kit είναι μια in vitro δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση DNA του παρβοϊού B19 σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα με EDTA. Το κιτ χρησιμοποιεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) σε πραγματικό χρόνο και είναι διαμορφωμένο για χρήση με το QIAamp UltraSens Virus Kit, το QIAamp DNA Mini Kit και το όργανο Rotor-Gene Q.

Το κιτ δεν προορίζεται για χρήση ως εξέταση διαλογής αίματος/προϊόντων αίματος για λοίμωξη από τον παρβοϊό B19. Το artus Parvo B19 RG PCR Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση από επαγγελματίες του τομέα της υγείας.

## 6. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες

Η πλειονότητα των λοιμώξεων με παρβοϊό B19 είναι κλινικά ασυμπτωματικές. Τα συμπτώματα μιας οξείας λοίμωξης με παρβοϊό B19 είναι παρόμοια με εκείνα της γρίπης, αλλά μπορεί επίσης να μοιάζουν με εκείνα της ερυθράς (γερμανική ιλαρά) και, ιδίως στους ενήλικες, με εκείνα των ρευματισμών. Ο παρβοϊός B19 είναι μια σημαντική αιτία απλαστικής κρίσης σε ασθενείς με αιμολυτική αναιμία. Ορισμένες φορές παρατηρούνται θανατηφόρες επιπλοκές, ιδίως μετά από λοιμώξεις της μητέρας κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου.

## 7. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Η διάγνωση παθογόνων οργανισμών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου παράγοντα. Στην PCR πραγματικού χρόνου, το προϊόν της ενίσχυσης ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές. Οι ουσίες αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσκολλώνται ειδικά στο προϊόν της ενίσχυσης. Η παρακολούθηση των εντάσεων φθορισμού κατά την εξέλιξη της PCR (δηλ. σε πραγματικό χρόνο)

επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων, χωρίς να χρειάζεται να ανοιχθούν και πάλι τα σωληνάρια των δειγμάτων μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR (Mackay, 2004).

## 8. Περιγραφή προϊόντος

Το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit αποτελεί ένα έτοιμο-για-χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του παρβοϊού B19 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στο *όργανο Rotor-Gene Q*. Το *Parvo B19 RG/TM Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μιας περιοχής 76 bp του γονιδιώματος του παρβοϊού B19 και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο) του *οργάνου Rotor-Gene Q*. Πέραν αυτού, το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit περιέχει ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* (*IC*) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο). Δεν μειώνεται το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής PCR του παρβοϊού B19 (βλέπε **ενότητα 12.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην **ενότητα 9.3 Ποσοτικοποίηση**.

# 9. Πρωτόκολλο

## 9.1 Απομόνωση DNA

Κιτ απομόνωσης DNA διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Οι ποσότητες δείγματος για τη διαδικασία απομόνωσης DNA εξαρτώνται από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο. Παρακαλούμε εκτελείτε την απομόνωση DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης:

| Υλικό δείγματος | Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων | Αρ. καταλόγου | Κατασκευαστής | Φορέας RNA |
|---|---|---|---|---|
| Ορός, πλάσμα | QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50) | 53 704 | QIAGEN | περιέχεται |
| | QIAamp DNA Mini Kit (50) | 51 304 | QIAGEN | δεν περιέχεται |

- Η χρήση του **φορέα RNA** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Εάν το επιλεγμένο κιτ απομόνωσης δεν περιέχει φορέα RNA, παρακαλούμε σημειώστε ότι η προσθήκη του φορέα [RNA-Homopolymer Poly(A) (RNA-ομοπολυμερές πολυ(A)), Amersham Biosciences, αρ. καταλ. 27-4110-01] συνιστάται θερμά για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από σωματικά υγρά ελεύθερα κυττάρων και υλικό με χαμηλή περιεκτικότητα σε DNA/RNA (π.χ. ENY). Παρακαλούμε προχωρήστε ως εξής σε αυτές τις περιπτώσεις:

  a) Επανεναιωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) του κιτ εκχύλισης (π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα AE του QIAamp DNA Mini Kit) και προετοιμάστε αραίωση με συγκέντρωση 1 μg/μl. Χωρίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους

-15°C έως -30°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (> 2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.

b) Χρησιμοποιήστε 1 μg φορέα RNA ανά 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Για παράδειγμα, εάν το πρωτόκολλο εκχύλισης υποδεικνύει 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, παρακαλούμε προσθέστε 2 μl φορέα RNA (1 μg/μl) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Πριν από την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, όπου εφαρμόζεται, βλέπε **ενότητα 9.2 Πρότυπο εσωτερικού** ελέγχου) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα μεταφοράς με πιπέτα:

| **Αριθμός δειγμάτων** | **1** | **12** |
|---|---|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης | π.χ. 200 μl | π.χ. 2.400 μl |
| Φορέας RNA (1 μg/μl) | 2 μl | 24 μl |
| **Συνολικός όγκος** | **202 μl** | **2.424 μl** |
| **Όγκος ανά εκχύλιση** | **200 μl** | **ανά 200 μl** |

c) Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.

- Η χρήση του **φορέα RNA** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Για να αυξήσετε τη σταθερότητα του φορέα RNA που παρέχεται με το QIAamp UltraSens Virus Kit, συνιστούμε την ακόλουθη διαδικασία κατά παρέκκλιση του εγχειριδίου χρήστη του κιτ εκχύλισης:

  a. Επανεναιωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA πριν από την πρώτη χρήση του κιτ εκχύλισης σε 310 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης που παρέχεται με το κιτ (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Καταμερίστε

αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -15°C έως -30°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (> 2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.

b. Πριν από την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, όπου εφαρμόζεται, βλέπε **ενότητα 9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα μεταφοράς με πιπέτα:

| **Αριθμός δειγμάτων** | **1** | **12** |
|---|---|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης AC | 800 µl | 9.600 µl |
| Φορέας RNA (1 µg/µl) | 5,6 µl | 67,2 µl |
| **Συνολικός όγκος** | **805,6 µl** | **9.667,2 µl** |
| **Όγκος ανά εκχύλιση** | **800 µl** | **ανά 800 µl** |

c. Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.

- Συνιστάται η έκλουση του DNA σε 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης για να λάβετε τη μέγιστη ευαισθησία του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.
- Το **QIAamp UltraSens Virus Kit** επιτρέπει τη συμπύκνωση του δείγματος. Εάν χρησιμοποιείτε υλικό δείγματος άλλο από ορό ή πλάσμα, παρακαλούμε προσθέστε τουλάχιστον 50% (v/v) αρνητικού ανθρώπινου πλάσματος στο δείγμα.
- Κατά τη χρήση πρωτοκόλλων απομόνωσης με ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης που περιέχουν **αιθανόλη**, βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την έκλουση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (τρία λεπτά, 13.000 rpm) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει πιθανή αναστολή της PCR.
- Η χρήση του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit δεν επιτρέπεται μαζί με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη **φαινόλη**.

**Σημαντικό:** Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **ενότητα 9.2 Πρότυπο εσωτερικού** ελέγχου).

## 9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* (*Parvo B19 RG/TM IC*). Με αυτό ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να **ελέγξει τόσο τη διαδικασία απομόνωσης του DNA όσο και μια ενδεχόμενη αναστολή της PCR** (βλέπε Εικ. 1). Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 µl ανά 1 µl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, με χρήση του QIAamp UltraSens Virus Kit, το DNA εκλούεται σε 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος AVE. Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 5 µl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλουσης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και ο φορέας RNA (βλέπε **ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

- στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή
- κατευθείαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* δεν επιτρέπεται να προστεθεί απευθείας στο υλικό δείγματος. Κατά την προσθήκη στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης λάβετε υπόψη ότι το μείγμα *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης/φορέα RNA πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του (αποθήκευση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο μπορεί να οδηγήσει, μετά από μερικές ώρες, σε αποτυχία του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης). **Μην** προσθέτετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και το φορέα RNA απευθείας στο υλικό δείγματος.

Προαιρετικά, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* μπορεί να χρησιμοποιηθεί **αποκλειστικά για τον έλεγχο μιας ενδεχομένης αναστολής της PCR** (βλέπε Εικ. 2). Για το σκοπό αυτό, προσθέστε για κάθε αντίδραση 2 µl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* απευθείας σε 30 µl

*Parvo B19 RG/TM Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 30 µl του παρασκευασμένου όπως αναφέρεται παραπάνω Master Mix* και στη συνέχεια προσθέστε 20 µl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *Parvo B19 RG/TM Master* και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **ενότητα 9.4 Προετοιμασία της PCR**).

## 9.3 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (20 µl). Για την παραγωγή μιας πρότυπης καμπύλης στο *όργανο Rotor-Gene Q*, πρέπει να χρησιμοποιούνται και τα πέντε *πρότυπα ποσοτικοποίησης* και να καθορίζονται στο παράθυρο μενού *Edit Samples* (Επεξεργασία δειγμάτων) ως πρότυπα με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις (βλέπε *εγχειρίδιο χρήστη Rotor-Gene Q*). Η πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται όπως παραπάνω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα εκτελέσεις, υπό τον όρο ότι χρησιμοποιείται τουλάχιστον ένα πρότυπο **μίας** δεδομένης συγκέντρωσης στην τρέχουσα εκτέλεση. Για τον σκοπό αυτό, χρειάζεται να εισαχθεί η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε προηγουμένως (βλέπε *εγχειρίδιο χρήστη Rotor-Gene Q*). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις στα αποτελέσματα λόγω διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών εκτελέσεων PCR.

**Προσοχή:** 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:

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

* Η αύξηση όγκου μέσω της προσθήκης του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, κατά την προετοιμασία της αντίδρασης PCR, είναι αμελητέα. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

Παρακαλούμε προσέξτε ότι στον παραπάνω αναφερόμενο τύπο, κατά κανόνα, τοποθετείται ο αρχικός όγκος δείγματος. Αυτό λαμβάνεται υπόψη όταν ο όγκος δείγματος μεταβάλλεται πριν την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων (π.χ. μείωση λόγω φυγοκέντρησης ή αύξηση λόγω συμπληρώματος για τον απαιτούμενο όγκο προς απομόνωση).

## 9.4 Προετοιμασία της PCR

Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (προαιρετικό εξάρτημα του *οργάνου Rotor-Gene Q*) έχει προψυχθεί στους +4 °C. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων PCR στο τεμάχιο ψύξης. Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* καθώς και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*νερό*, *κατηγορίας PCR*) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμειγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και στη συνέχεια να φυγοκεντρούνται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* **για να ελέγξετε τόσο την απομόνωση του DNA όσο και μια ενδεχομένη αναστολή της PCR**, αυτό πρέπει ήδη να έχει προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε **ενότητα 9.2 Πρότυπο εσωτερικού** ελέγχου). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 1):

| | **Αριθμός δειγμάτων** | **1** | **12** |
|---|---|---|---|
| **1. Προετοιμασία του Master Mix** | *Parvo B19 RG/TM Master* | 30 µl | 360 µl |
| | *Parvo B19 RG/TM IC* | 0 µl | 0 µl |
| | **Συνολικός όγκος** | **30 µl** | **360 µl** |
| **2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR** | Master Mix | 30 µl | ανά 30 µl |
| | Δείγμα | 20 µl | ανά 20 µl |
| | **Συνολικός όγκος** | **50 µl** | **ανά 50 µl** |

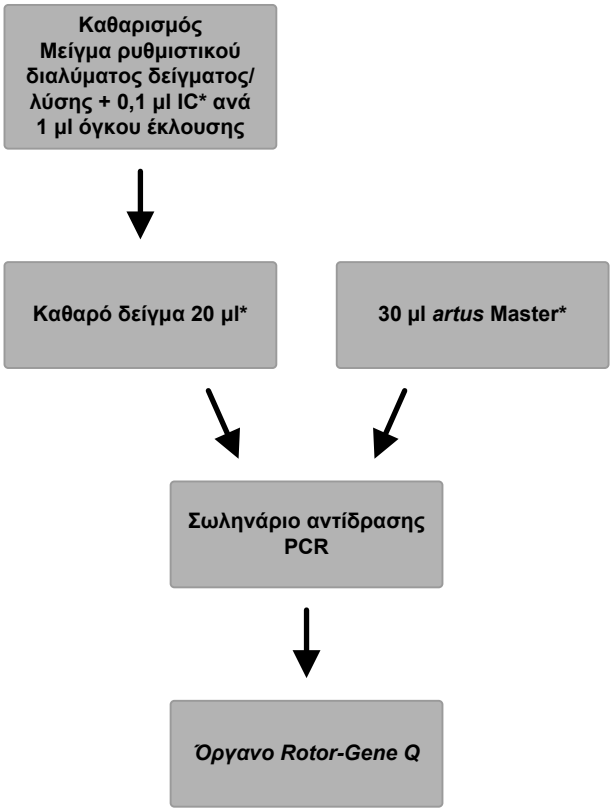
Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* **αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR**, θα πρέπει αυτό να προστεθεί απευθείας στο *Parvo B19 RG/TM Master*. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 2):

| | **Αριθμός δειγμάτων** | **1** | **12** |
|---|---|---|---|
| **1. Προετοιμασία του Master Mix** | *Parvo B19 RG/TM Master* | 30 µl | 360 µl |
| | *Parvo B19 RG/TM IC* | 2 µl | 24 µl |
| | **Συνολικός όγκος** | **32 µl*** | **384 µl** |
| **2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR** | Master Mix | 30 µl | ανά 30 µl |
| | Δείγμα | 20 µl | ανά 20 µl |
| | **Συνολικός όγκος** | **50 µl** | **ανά 50 µl** |

Διανείμετε με πιπέτα 30 µl του Master Mix σε κάθε σωληνάριο PCR. Προσθέστε κατόπιν 20 µl του εκλουσμένου DNA δείγματος σε κάθε σωληνάριο και αναδεύστε καλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα. Αντιστοίχως, 20 µl τουλάχιστον ενός από τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) πρέπει να χρησιμοποιούνται ως θετικό πρότυπο ελέγχου και 20 µl νερού (*νερό*, *κατηγορίας PCR*) ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Φροντίστε ώστε ο *δακτύλιος ασφάλισης* (προαιρετικό εξάρτημα του *οργάνου Rotor-Gene Q*) να έχει τοποθετηθεί επάνω από τον στροφέα για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.

* Η αύξηση όγκου μέσω της προσθήκης του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, κατά την προετοιμασία της αντίδρασης PCR, είναι αμελητέα. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

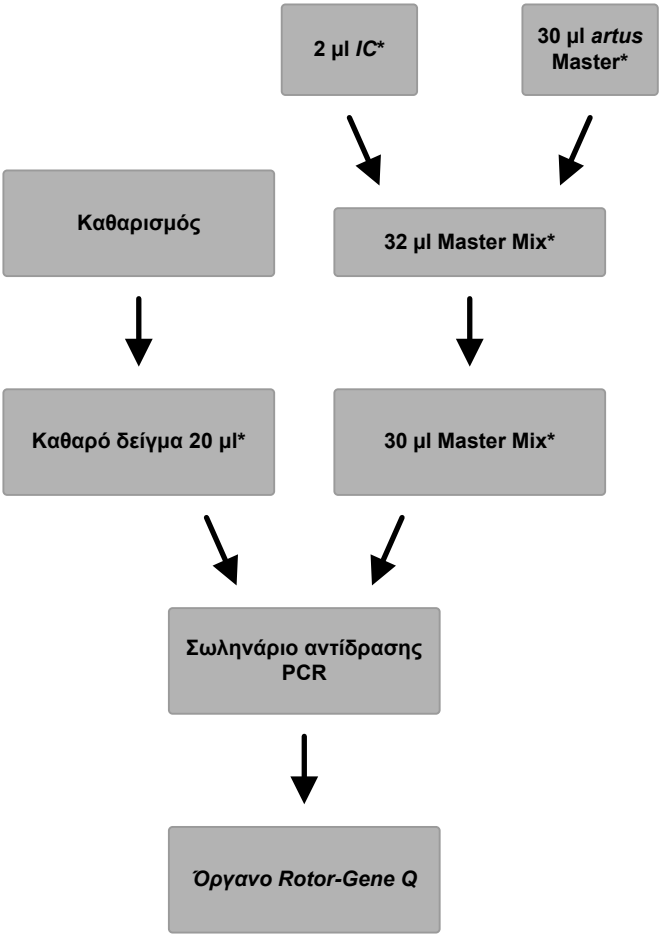
**Προσθήκη του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία καθαρισμού**




Εικ. 1: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών για τον έλεγχο της διαδικασίας καθαρισμού και της αναστολής της PCR.

*Φροντίστε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμειξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

## Προσθήκη του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο *artus* Master




Εικ. 2: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών για τον έλεγχο της αναστολής της PCR.

*Φροντίστε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμειξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

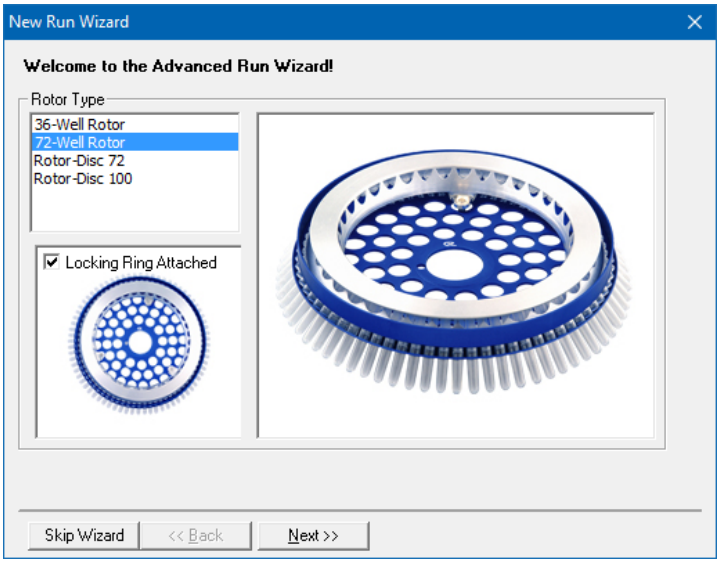
## 9.5 Προγραμματισμός του *οργάνου Rotor-Gene Q*

Για την ανίχνευση του Parvo B19 DNA, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο *όργανο Rotor-Gene Q* σύμφωνα με τα ακόλουθα πέντε βήματα (βλέπε Εικ. 4 - 7).

| | | |
|---|---|---|
| Α. | Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού | Εικ. 4 |
| Β. | Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης | Εικ. 5 |
| Γ. | Ενίσχυση του DNA | Εικ. 6 |
| Δ. | Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού | Εικ. 7 |
| Ε. | Έναρξη της εκτέλεσης του *οργάνου Rotor-Gene Q.* | Εικ. 8 |

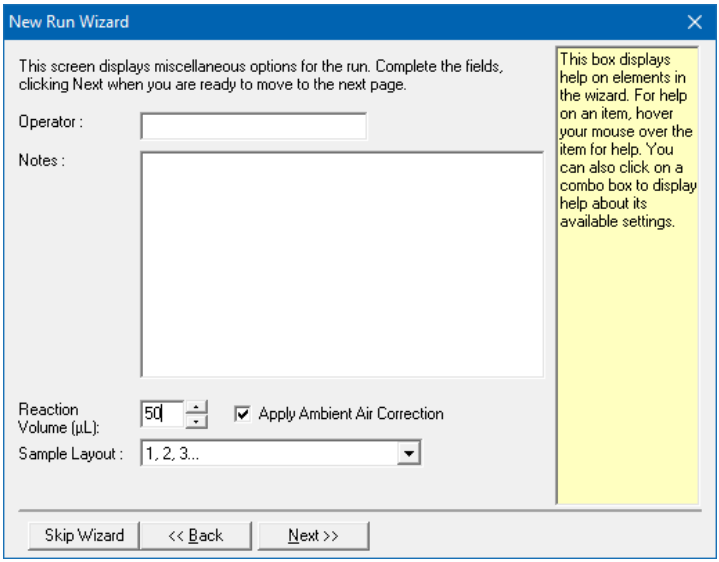
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο λογισμικό *Rotor-Gene*, έκδοση 2.3. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό του *οργάνου Rotor-Gene Q*, ανατρέξτε στο *εγχειρίδιο χρήστη Rotor-Gene Q*.

Αρχικά, επιλέξτε «Empty Run» (Κενή ανάλυση) στην καρτέλα «Advanced» (Για προχωρημένους) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα ανάλυση). Στο πλαίσιο ομάδας «Rotor type» (Τύπος στροφέα), επιλέξτε «72-Well Rotor» (Στροφέας 72 βυθισμάτων), επιλέξτε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Προσαρτημένος Δακτύλιος Ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο).



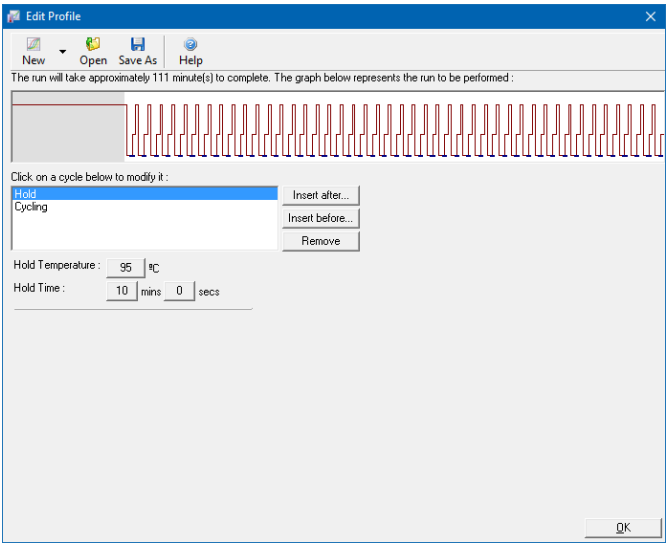

Εικ. 3: Οθόνη υποδοχής οδηγού νέας εκτέλεσης.

Πρώτα, εισαγάγετε τον όγκο αντίδρασης PCR στο επόμενο παράθυρο μενού *New Run Wizard (Οδηγός νέας εκτέλεσης)* (βλέπε Εικ. 4).

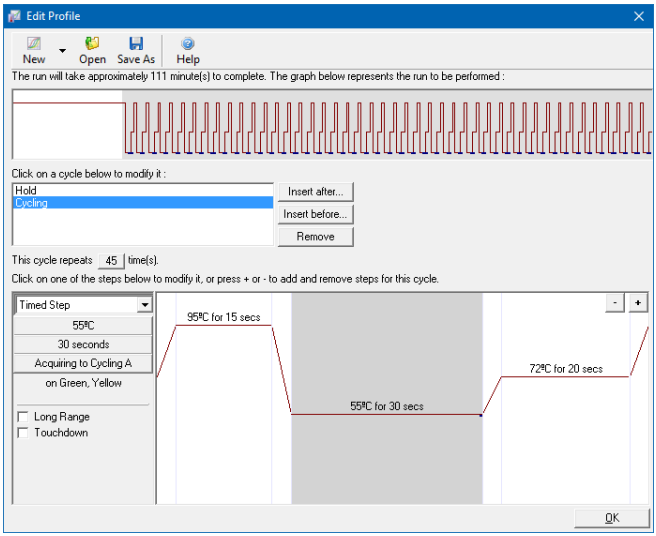



Εικ. 4: Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας πραγματοποιείται ενεργοποιώντας το κουμπί *Edit* (Επεξεργασία) στο επόμενο παράθυρο μενού *New Run Wizard (Οδηγός νέας εκτέλεσης)* (βλέπε Εικ. 5 και 6).

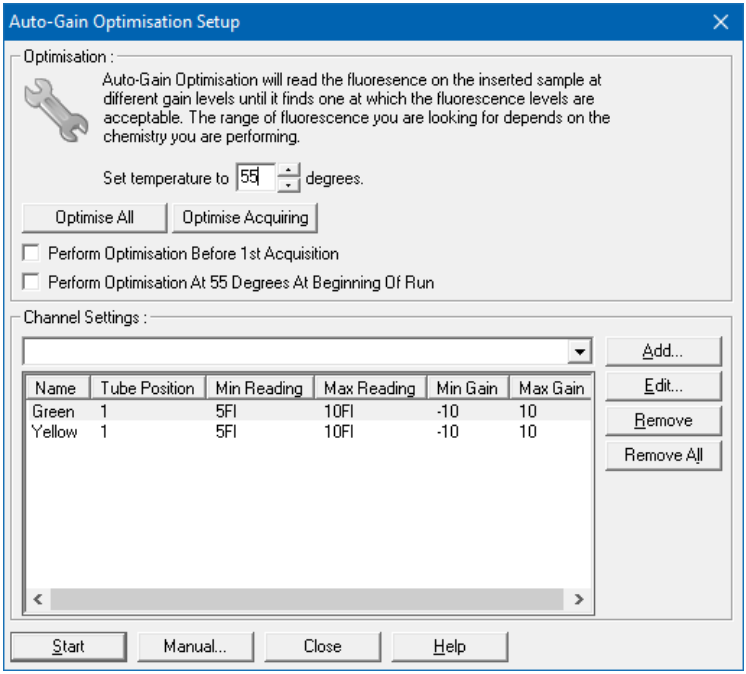



Εικ. 5: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.



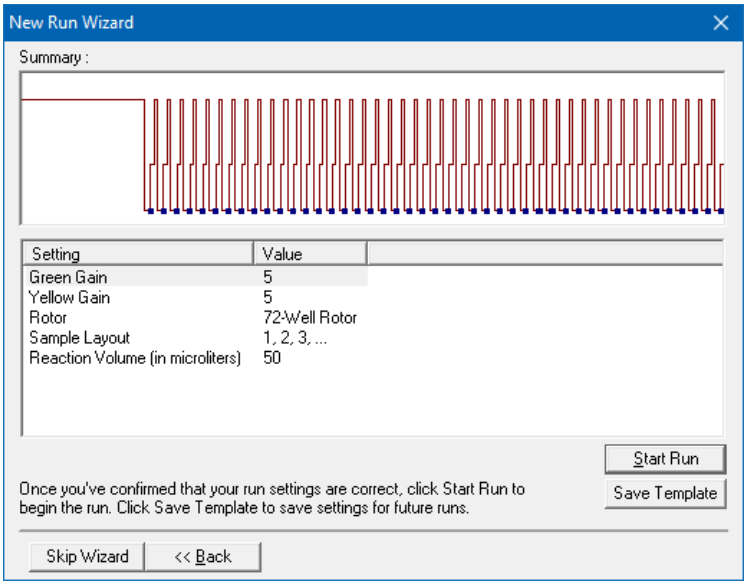

Εικ. 6: Ενίσχυση του DNA.

Το εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Αυτή η ρύθμιση πραγματοποιείται στο παράθυρο μενού *Auto Gain Optimisation Setup (Ρύθμιση αυτόματης βαθμονόμησης απολαβής)* [ενεργοποίηση το παράθυρο μενού *New Run Wizard (Οδηγός νέας εκτέλεσης)* κάτω από το *Gain Optimisation (Βαθμονόμηση απολαβής)*]. Παρακαλούμε ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στη θερμοκρασία ανασύνδεσης του προγράμματος πολλαπλασιασμού (βλέπε Εικ. 7), επιλέξτε «Optimise Acquiring» (Βελτιστοποίηση λήψης) και ξεκινήστε τη διαδικασία.




Εικ. 7: Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού.

Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από την αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής αποθηκεύονται αυτομάτως και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (βλέπε Εικ. 8).




Εικ. 8: Έναρξη της εκτέλεσης του *οργάνου Rotor-Gene Q*.

## 10. Ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιείται με το λογισμικό του *Rotor-Gene* σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (*εγχειρίδιο χρήστη Rotor-Gene Q*).

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο).

   **Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: Το δείγμα περιέχει DNA του παρβοϊού B19.**

   Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο) μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από παρβοϊό B19 (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο)) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο) (ανταγωνισμός).

2. Στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο) δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο).

   **Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA του παρβοϊού B19. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.**

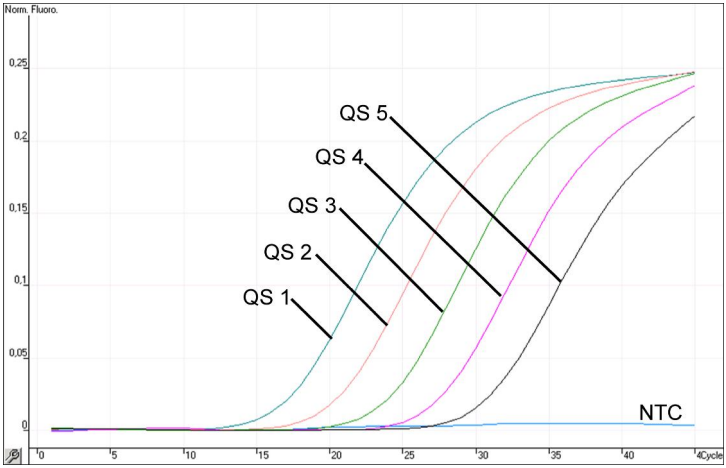
   Όταν η PCR του παρβοϊού B19 είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

3. Στο κανάλι Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο) ή στο κανάλι Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο) δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα.

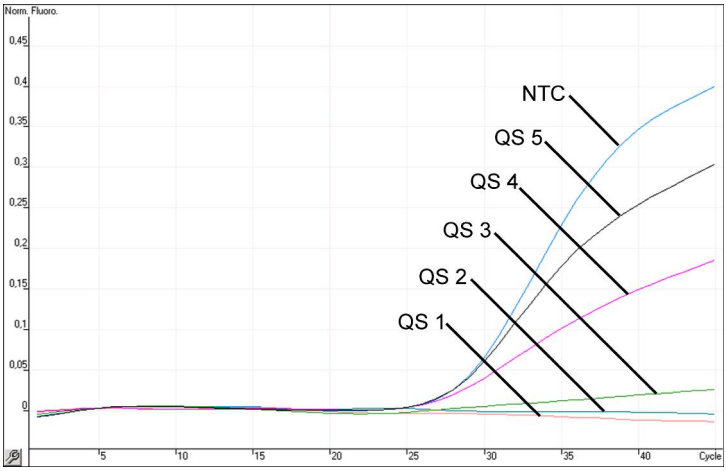
   **Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι δυνατή.**

   Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στην **ενότητα 11. Αντιμετώπιση** προβλημάτων.

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στην Εικ. 9 και Εικ. 10.




Εικ. 9: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).




Εικ. 10: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* (*IC*) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο) με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).

# 11. Αντιμετώπιση προβλημάτων

**Απουσία σήματος με θετικά πρότυπα ελέγχου (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο):**

- Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.
  - ➔ Για ανάλυση δεδομένων, επιλέξτε το κανάλι φθορισμού A.Green για την αναλυτική PCR του παρβοϊού B19 και το κανάλι φθορισμού A.Yellow για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*
- Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας στο *όργανο Rotor-Gene Q*.
  - ➔ Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο (βλέπε **ενότητα 9.5 Προγραμματισμός του οργάνου *Rotor-Gene Q***).

- Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης της PCR.
  - ➔ Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα βλέπε **ενότητα 9.4 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της **ενότητας 2. Αποθήκευση** ή το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit έχει λήξει.
  - ➔ Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

**Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Yellow (Κύκλοι Α. Κίτρινο) και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι Cycling A.Green (Κύκλοι Α. Πράσινο):**

- Οι συνθήκες της PCR δεν αντιστοιχούν στο πρωτόκολλο.
  - ➔ Ελέγξτε τις συνθήκες της PCR (βλέπε ανωτέρω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- Έγινε αναστολή της PCR.
  - ➔ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μια διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
  - ➔ Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA έχει εκτελεστεί το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την έκλουση (βλέπε **ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**).
- Υφίστανται απώλειες DNA κατά την εκχύλιση.
  - ➔ Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην εκχύλιση, μπορεί η απουσία του σήματος του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* να σημαίνει απώλειες DNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της **ενότητας 2. Αποθήκευση** ή το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit έχει λήξει.
  - ➔ Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

**Σήματα με τα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο κανάλι φθορισμού Cycling A.Green (Κύκλοι A. Πράσινο) της ανάλυσης PCR.**

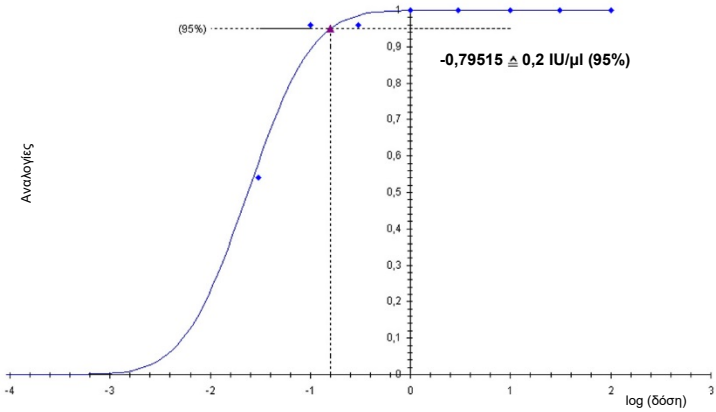
- Υφίσταται μία επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR.
  - ➔ Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια κατ' επανάληψη.
  - ➔ Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.
  - ➔ Εισάγετε με πιπέτα τα θετικά πρότυπα ελέγχου αυστηρά στο τέλος.
  - ➔ Βεβαιωθείτε πως ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.
- Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση.
  - ➔ Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR των εξεταζόμενων δειγμάτων με τη χρησιμοποίηση νέων αντιδραστηρίων.
  - ➔ Βεβαιωθείτε πως ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Στην περίπτωση που προκύψουν άλλα ερωτήματα ή προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τεχνική μας εξυπηρέτηση.

# 12. Ειδικά χαρακτηριστικά

## 12.1 Αναλυτική ευαισθησία

Για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, δημιουργήθηκε μια πρότυπη σειρά αραιώσεων από 100 μέχρι ονομαστικά 0,03 IU*/μl παρβοϊού B19 και, στη συνέχεια, αυτή αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης Probit παρουσιάζεται στην Εικ. 11. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit είναι 0,2 IU/μl (p = 0,05). Αυτό σημαίνει ότι 0,2 IU/μl ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.




Εικ. 11: Αναλυτική ευαισθησία του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.

* Το πρότυπο που χρησιμοποιείται εδώ είναι ένα κλωνοποιημένο προϊόν PCR, η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκόπησης απορρόφησης και φθορισμού.

## 12.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο με την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές έχουν ελεγχθεί με βάση την ανάλυση της σύγκρισης αλληλουχιών για τυχόν ομολογία με κάποια από όλες τις αλληλουχίες που έχουν δημοσιευθεί σε τράπεζες γονιδίων. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών γονότυπων συνεπώς διασφαλίστηκε.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση έξι διαφορετικών δειγμάτων πλάσματος, τα οποία ήταν αρνητικά στον παρβοϊό B19. Αυτά δεν εμφάνισαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για τον παρβοϊό B19 εκκινητές και ανιχνευτές που περιέχονται στο *Parvo B19 RG/TM Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, η ομάδα προτύπων ελέγχου που παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα (βλέπε Πίνακας 1) ελέγχθηκε για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση.

Πίνακας 1: Ειδικός έλεγχος του κιτ με δυνητικά διασταυρούμενους αντιδρώντες παθογόνους παράγοντες.

| **Ομάδα ελέγχου** | **Παρβοϊός B19 (Cycling A.Green) (Κύκλοι Α. Πράσινο)** | ***Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* (Cycling A.Yellow) (Κύκλοι Α. Κίτρινο)** |
|---|---|---|
| Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (Ιός απλού έρπητα 1) | – | + |
| Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (Ιός απλού έρπητα 2) | – | + |
| Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (Ιός ανεμοβλογιάς-έρπητα ζωστήρα) | – | + |
| Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (Κυτταρομεγαλοϊός) | – | + |
| Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας Τ κυττάρων 1 | – | + |
| Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας Τ κυττάρων 2 | – | + |

## 12.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακριβείας, για το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, επιτρέπουν την εξακρίβωση της ολικής διακύμανσης (ολική διασπορά) της ανάλυσης. 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). Συγχρόνως υπολογίζεται κάθε φορά η τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής μεταβλητότητας τόσο για τη συγκεκριμένη PCR του παθογόνου παράγοντα, όσο και για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Τα δεδομένα αυτά εξετάστηκαν, για το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, βάσει του *προτύπου ποσοτικοποίησης* με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (*QS 5*, 10 IU/µl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές Ct των καμπυλών ενίσχυσης (Ct: κύκλος κατωφλίου, βλέπε Πίνακας 2). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε IU/µl προσδιορίσθηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών Ct (βλέπε Πίνακας 3). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση ανέρχεται σε 1,66 % (Ct) ή 17,65 % (συγκέντρωση), για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* σε 0,90 % (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των τιμών Ct.

| | Τυπική απόκλιση | Διασπορά | Συντελεστής μεταβλητότητας [%] |
|---|---|---|---|
| Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 0,22 | 0,05 | 0,75 |
| Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* | 0,18 | 0,03 | 0,80 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 0,32 | 0,10 | 1,11 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών: *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* | 0,19 | 0,03 | 0,84 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 0,38 | 0,14 | 1,47 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* | 0,21 | 0,04 | 0,92 |
| Συνολική διασπορά: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 0,48 | 0,23 | 1,66 |
| Συνολική διασπορά: *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* | 0,20 | 0,04 | 0,90 |

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε IU/μl).

| | Τυπική απόκλιση | Διασπορά | Συντελεστής μεταβλητότητας [%] |
|---|---|---|---|
| Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 0,96 | 0,93 | 9,58 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 1,33 | 1,78 | 13,22 |
| Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 2,27 | 5,17 | 22,20 |
| Συνολική διασπορά: *Parvo B19 RG/TM QS 5* | 1,79 | 3,21 | 17,65 |

## 12.4 Ανθεκτικότητα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας συμβάλλει στην εξέταση του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. 30 αρνητικά στον παρβοϊό B19 δείγματα ορού εμβολιάσθηκαν με 1 IU/μl όγκου έκλουσης DNA προτύπου ελέγχου του παρβοϊού B19 (πενταπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού ορίου ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του QIAamp DNA Mini Kit (βλέπε **ενότητα 9.1 Απομόνωση DNA**), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Το ποσοστό αποτυχίας για τον παρβοϊό B19 ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Η ανθεκτικότητα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω του καθαρισμού και της ανάλυσης 30 αρνητικών στον παρβοϊό B19 δειγμάτων ορού. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Έτσι, η ανθεκτικότητα του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ανέρχεται στο ≥ 99%.

## 12.5 Επαναληψιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του artus Parvo B19 RG PCR Kit καθώς και μια σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

# 13. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για διαγνωστικούς σκοπούς in vitro.
- Η χρήση πρέπει να γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες in vitro.
- Η ακριβής τήρηση του πρωτοκόλλου είναι απολύτως απαραίτητη, για την επίτευξη άριστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

- Για ορισμένες αλληλουχίες σχετιζόμενες με το γονότυπο 3, η αξίωση απόδοσης δεν μπορεί να είναι εγγυημένη. Λόγω μεταλλάξεων στην περιοχή σύνδεσης των εκκινητών/ανιχνευτών, θα μπορούσε να προκύψει σημαντική μείωση της ευαισθησίας (Baylis and Buchheit, 2009).
- Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές ή/και τον ανιχνευτή του κιτ, 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.

## 14. 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 (safety data sheets, 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 κιτ και συστατικό των κιτ της QIAGEN®.

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

## 15. Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ελέγχθηκε έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών προκειμένου να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα του προϊόντος.

## 16. Βιβλιογραφία

Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. Vox Sang. 2009; 97 (1): 13 – 20.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

## 17. Επεξήγηση των συμβόλων

| | |
|---|---|
| | Ημερομηνία λήξης |
| LOT | Κωδικός παρτίδας |
| | Κατασκευαστής |
| REF | Αριθμός καταλόγου |
| MAT | Αριθμός υλικού |
| HB | Εγχειρίδιο |
| IVD | In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν |
| COMP | Συστατικά |
| CONT | Περιέχει |
| NUM | Αριθμός |
| GTIN | Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας |
| Σ <N> | Περιέχει ποσότητα που επαρκεί για <N> δοκιμασίες |
| | Περιορισμός θερμοκρασίας |
| | Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης |
| QS | *Πρότυπο ποσοτικοποίησης* |
| IC | *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* |

*artus* Parvo B19 RG PCR Kit

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group).

| Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου | |
|---|---|
| R4<br>06/2018 | Η έκδοση αυτή αποτελεί την αναθεώρηση 4 του εγχειριδίου του artus Parvo RG PCR Kit. Οι αλλαγές από την προηγούμενη έκδοση περιλαμβάνουν την προσθήκη μιας δήλωσης προβλεπόμενης χρήσης, την αφαίρεση της ενότητας διαγνωστικής αξιολόγησης, την αφαίρεση της αναφοράς στον στροφέα 36 βυθισμάτων και στα σωληνάρια των 0,2 ml και ενημέρωση της περιγραφής του οργάνου Rotor-Gene Q και του λογισμικού στις τρέχουσες εκδόσεις τους. |

Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λ.π. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημαίνονται ειδικά ως τέτοια.

Το *artus* Parvo B19 RG PCR Kit είναι ένα διαγνωστικό κιτ που φέρει τη σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία 98/79/ΕΚ για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση in vitro. Δεν διατίθεται σε όλες τις χώρες.

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του κιτ QIAGEN. Τα εγχειρίδια των κιτ QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο **www.qiagen.com**. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

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.

**Άδεια περιορισμένης χρήσης**

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του *artus* Parvo B19 RG PCR Kit των εξής όρων:

1. Η χρήση του artus Parvo B19 RG PCR Kit επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο artus Parvo B19 RG PCR* Kit και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *εγχειρίδιο artus Parvo B19 RG PCR* Kit 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 κιτ και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.

3. Αυτό το κιτ 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 οποιεσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.

5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του κιτ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιεσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιεσδήποτε 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 οποιουδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλέπε **www.qiagen.com**.

06/2018 1112933 HB-0048-006 © 2018 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός 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)

1112933 EL

QIAGEN

Sample & Assay Technologies