

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR

Σ 24 (αρ. καταλόγου 4500263)

Σ 96 (αρ. καταλόγου 4500265)

Έκδοση 1

IVD

Ποιοτικά στη διάγνωση in vitro

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q



REF

4500263, 4500265

HB

1060171EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2

MAT

1060171EL



QIAGEN Τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών

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.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα του kit	4
Σύμβολα	4
Φύλαξη	5
Προβλεπόμενη χρήση	5
Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος	6
Τεχνική υποστήριξη	6
Ποιοτικός έλεγχος	6
Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις	7
Εισαγωγή	8
Αρχή λειτουργίας	8
Πληροφορίες παθογόνων μικροοργανισμών	8
Χαρακτηριστικά απόδοσης	9
Αναλυτική ευαισθησία	9
Ειδικότητα	10
Ακρίβεια	13
Ανθεκτικότητα	16
Αναπαραγωγιμότητα	16
Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που προμηθεύεται ο χρήστης	17
Σημαντικές σημειώσεις	18
Γενικές προφυλάξεις	18
Απομόνωση DNA	18
Εσωτερικός μάρτυρας	19
Πρωτόκολλο: PCR και Ανάλυση δεδομένων	20
<i>i</i> Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη	20
Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη	20
Διαδικασία	20
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	30
Βιβλιογραφία	33
Πληροφορίες παραγγελίας	34

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

Κιτ <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR		(24)	(96)
Αρ. καταλόγου		4500263	4500265
Αριθμός αντιδράσεων		24	96
Μπλε	HSV-1/2 RG Master	2 x 300μl	8 x 300μl
Κίτρινο	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 μl	600 μl
Κόκκινο	HSV-1 RG PC [†] (100 αντ./μl)	200 μl	200 μl
Καφέ	HSV-2 RG PC [†] (100 αντ./μl)	200 μl	200 μl
Πράσινο	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 μl	2 x 1000 μl
Λευκό	Νερό (βαθμού PCR)	1000 μl	1000 μl
	Εγχειρίδιο 	1	1

* Διάλυμα μαγνησίου.

† Θετικός μάρτυρας.

‡ Εσωτερικός μάρτυρας.

Σύμβολα



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια για <N> δοκιμασίες



Ημερομηνία λήξης



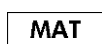
In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιέχει



Αριθμός



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμοί θερμοκρασίας



Νόμιμος κατασκευαστής



Ανατρέξτε στις πληροφορίες του εγχειριδίου



Σημαντική σημείωση

Φύλαξη

Τα συστατικά του kit *artus* HSV-1/2 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. Εάν τα αντιδραστήρια πρόκειται να χρησιμοποιούνται μόνο κατά περιόδους, 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 kit *artus* HSV-1/2 RG PCR είναι ένας προσδιορισμός αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) βασιζόμενος σε τεχνική πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση και τη διάκριση DNA των ανθρώπινων ιών του απλού έρπητα 1 και 2 στα όργανα Rotor-Gene Q μετά τον πλήρως αυτοματοποιημένο καθαρισμό δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) από ασθενείς προσβεβλημένους από τον ιό HSV με χρήση του kit EZ1[®] DSP Virus.



Η χρήση του kit *artus* HSV-1/2 RG PCR δεν επιτρέπεται μαζί με όργανα Rotor-Gene Q 2plex.

Η χρήση του kit *artus* HSV-1/2 RG PCR προορίζεται για την πρόγνωση της νόσου, σε συνδυασμό με την κλινική εμφάνιση και άλλους εργαστηριακούς δείκτες.

Περιορισμοί χρήσης 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 (EN375).

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.

Τεχνική υποστήριξη

Στην QIAGEN είμαστε υπερήφανοι για την ποιότητα και τη διαθεσιμότητα της τεχνικής υποστήρισής μας. Τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της εταιρείας μας έχουν στελεχωθεί με έμπειρους επιστήμονες που διαθέτουν μακρόχρονη πρακτική και θεωρητική εμπειρία και τεχνογνωσία σε θέματα τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών και στη χρήση των προϊόντων QIAGEN®. Μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας εάν έχετε οποιοσδήποτε ερωτήσεις ή αντιμετωπίσετε δυσκολίες με το kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ή τα προϊόντα QIAGEN γενικά.

Οι πελάτες της QIAGEN αποτελούν μία πολύτιμη πηγή πληροφοριών για τις προχωρημένες ή εξειδικευμένες χρήσεις των προϊόντων μας. Οι πληροφορίες αυτές είναι χρήσιμες τόσο για άλλους επιστήμονες όσο και για τους ερευνητές της QIAGEN. Σας ενθαρρύνουμε επομένως να επικοινωνήσετε μαζί μας εάν έχετε οποιοσδήποτε προτάσεις σχετικά με την απόδοση προϊόντων ή νέες εφαρμογές και τεχνικές.

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Support ή επικοινωνήστε τηλεφωνικά με κάποιον από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Ποιοτικός έλεγχος

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για την διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

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 ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN®.

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

Εισαγωγή

Το kit *artus* HSV-1/2 RG PCR αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA των ιών HSV-1 και HSV-2 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε όργανα Rotor-Gene Q. Το HSV-1/2 RG Master περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μιας περιοχής 154 bp των γονιδιωμάτων των HSV-1 και HSV-2, και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green (πηγή 470 nm, ανιχνευτής 510 nm) και Cycling Orange (πηγή 585 nm, ανιχνευτής 610 nm) των οργάνων Rotor-Gene Q.

Επιπλέον, το kit *artus* HSV-1/2 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 (πηγή 530 nm, ανιχνευτής 555 nm) των οργάνων Rotor-Gene Q. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης HSV-1/2 RG PCR (βλ. “Αναλυτική ευαισθησία”, σελίδα 9) δεν μειώνεται. Παρέχονται εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες (HSV-1 RG PC και HSV-2 RG PC).

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 παθογόνων μικροοργανισμών

Ο ιός του απλού έρπητα (HSV) ανευρίσκεται σε υγρά βλαβών, στη σίελο, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και σε κολπικές εκκρίσεις. Μεταδίδεται κατά κύριο λόγο μέσω άμεσης επαφής με βλάβες και με τη σεξουαλική επαφή, καθώς και περιγεννητικά. Οι περισσότερες HSV-θετικές περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από δερματικές βλάβες και βλεννώδεις μεμβράνες στη στοματική κοιλότητα και τα γεννητικά όργανα. Η λοίμωξη με HSV μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθής (> 90% αυτών των περιπτώσεων είναι ασυμπτωματικές) είτε υποτροπιάζουσα (δευτεροπαθής). Η πρωτοπαθής λοίμωξη με HSV-1 μπορεί να οδηγήσει, μεταξύ άλλων, σε ουλοστοματίτιδα,

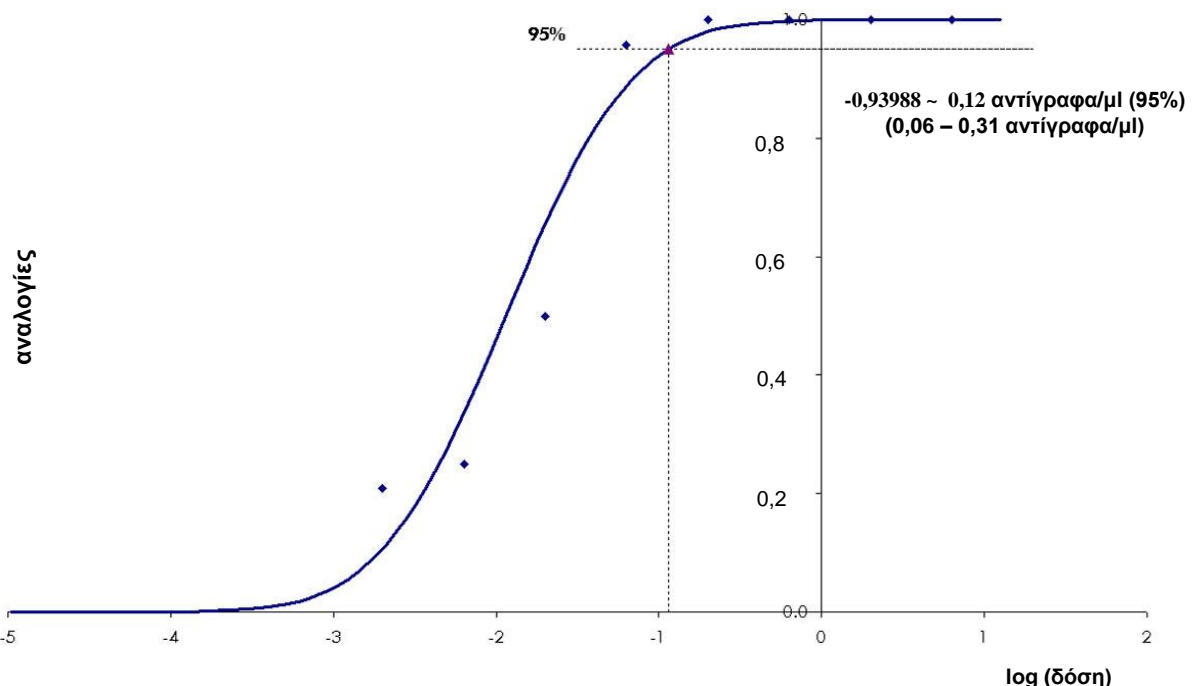
* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

ερπητικό έκζεμα, κερατοεπιπεφυκίτιδα και εγκεφαλίτιδα. Η πρωτοπαθής λοίμωξη με HSV-2 παρουσιάζεται, μεταξύ άλλων ως αιδιοκολπίτιδα, μηνιγγίτιδα και γενικευμένος έρπης σε νεογνά. Τα κύρια συμπτώματα της δευτεροπαθούς λοίμωξης είναι δερματικές βλάβες στη μύτη, το στόμα και στην περιοχή των γεννητικών οργάνων. Ακόμη βαρύτερες είναι οι υποτροπιάζουσες μορφές της κερατοεπιπεφυκίτιδας και της μηνιγγίτιδας.

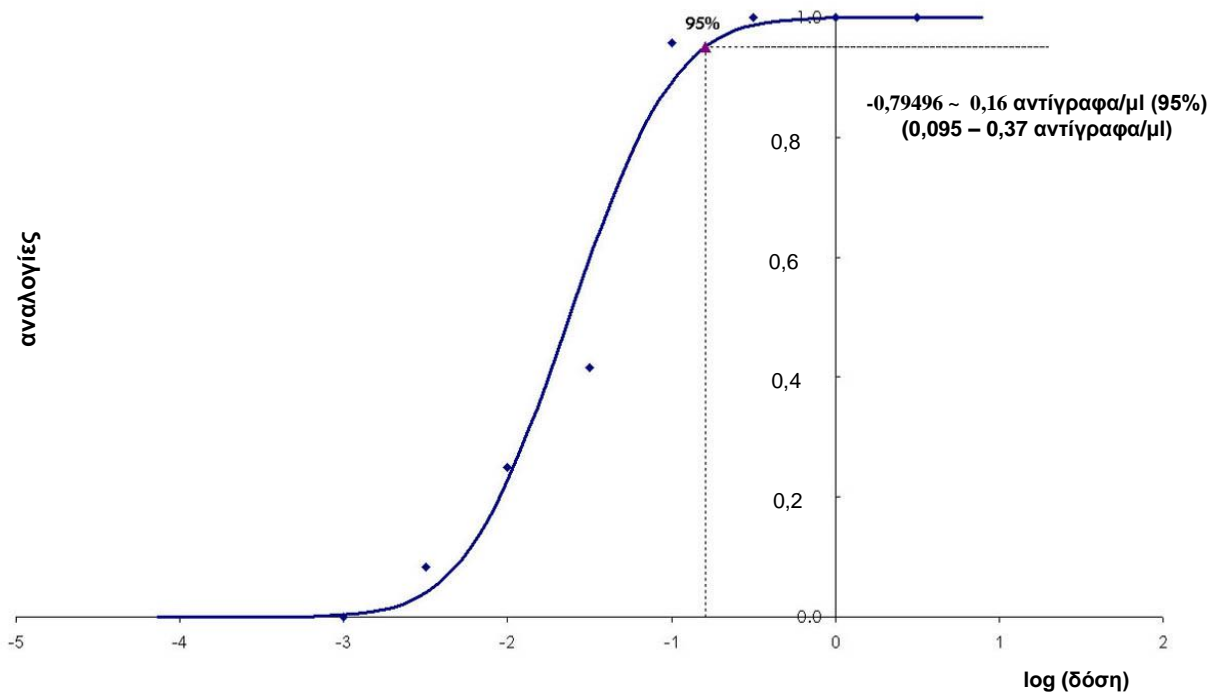
Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ευαισθησία

Για τον καθορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR, προετοιμάστηκε τυπική σειρά αραιώσης από 10 έως 0,001 αντίγραφα/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο Rotor-Gene Q/6000 σε συνδυασμό με το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Τα αποτελέσματα καθορίστηκαν μέσω ανάλυσης probit. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene Q/6000 είναι σταθερά 0,12 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$) για τον HSV-1 και 0,16 αντίγραφα/μl ($p=0,05$) για τον HSV-2. Αυτό ισοδυναμεί με 95% πιθανότητα ανίχνευσης 0,12 αντιγράφων/μl του DNA του HSV-1 ή 0,16 αντιγράφων/μl του DNA του HSV-2. Μία γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit για τον HSV-1 παρουσιάζεται παρακάτω (παρακάτω) στην εικόνα 1. Το διάγραμμα της ανάλυσης probit για τον HSV-2 παρουσιάζεται στην εικόνα Εικόνα 2.



Εικόνα 1. Ανάλυση probit: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Αναλυτική ευαισθησία για τον HSV-1 του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR στο Rotor-GeneQ/ 6000.



Εικόνα 2. Ανάλυση probit: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Αναλυτική ευαισθησία για τον HSV-2 του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR στο Rotor-Gene Q/ 6000.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα του κιτ *artus* HSV-1/2 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 τα στελέχη που παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Επιπλέον, η ειδικότητα επικυρώθηκε με 30 διαφορετικά δείγματα ENY, αρνητικά στον HSV-1 και στον HSV-2. Τα δείγματα αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για τα HSV-1 και HSV-2 εκκινητές και δείγματα, τα οποία περιλαμβάνονται στο HSV-1/2 RG Master.

Ελέγχθηκε μία πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR με χρήση της ομάδας ελέγχου που παρατίθεται στον Πίνακα 2. Κανένα από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που ελέγχθηκαν δεν βρέθηκε να είναι αντιδραστικό.

Πίνακας 1. Έλεγχος της ειδικότητας σχετικών γονοτύπων

Ιός	Στέλεχος	Προέλευση	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	-	+
HSV-1	KOS	INSTAND [†]	+	-	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD [‡]	+	-	+
HSV-2	HG-52	NCPV [§]	-	+	+
HSV-2	G	ATCC*	-	+	+
HSV-2	MS	QCMD [‡]	-	+	+

* ATCC American Type Culture Collection.

[†] INSTAND Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories.

[‡] QCMD Quality Control for Molecular Diagnostics.

[§] NCPV National Collection of Pathogenic Viruses.

Πίνακας 2. Έλεγχος της ειδικότητας του kit με παθογόνους μικροοργανισμούς δυνητικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας

Ομάδα ελέγχου	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Εσωτερι- κός μάρτυρας (Cycling Yellow)
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (ιός varicella-zoster)	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 4 (ιός Epstein-Barr)	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (κυτταρομεγαλοϊός)	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6A	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6B	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 7	–	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 8 (ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi)	–	–	+
Ιός ηπατίτιδας A	–	–	+
Ιός ηπατίτιδας B	–	–	+
Ιός ηπατίτιδας C	–	–	+
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV)	–	–	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T-κυττάρων 1	–	–	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T-κυττάρων 2	–	–	+
Εντεροϊός	–	–	+
Παρβοϊός B19	–	–	+
Ιός του Δυτικού Νείλου	–	–	+

Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του kit *artus* HSV-1/2 RG PCR συλλέχθηκαν με τη βοήθεια οργάνων Rotor-Gene και παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού της ολικής διασποράς 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 *artus* HSV-1/2 RG PCR συλλέχθηκαν με χρήση DNA από HSV-1 και HSV-2 σε συγκέντρωση 10 αντιγράφων/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, βλ. Πίνακα 3 και Πίνακα 4). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η γενική στατιστική διασπορά οποιουδήποτε δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση είναι 1,82% (C_T) για το HSV-1, 0,67% (C_T) για το HSV-2 και 1,24% (C_T) και 1,58% (C_T) αντίστοιχα για την ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα. Αυτές οι τιμές βασίζονται στο σύνολο όλων των μεμονωμένων τιμών της καθορισμένης μεταβλητότητας.

Πίνακας 3. Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-1 με βάση τις τιμές C_T

	Τιμή C _T	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: HSV-1 10 αντίγραφα/μl	30,46	0,25	0,81
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: Εσωτερικός μάρτυρας	25,29	0,08	0,3
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HSV-1 10 αντίγραφα/μl	29,69	0,69	2,05
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	24,97	0,31	1,25
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HSV-1 10 αντίγραφα/μl	29,95	0,40	1,35
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	24,90	0,30	1,20
Συνολική διασπορά: HSV-1 10 αντίγραφα/μl	29,91	0,55	1,82
Συνολική διασπορά: Εσωτερικός μάρτυρας	24,99	0,31	1,24

Πίνακας 4. Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-2 με βάση τις τιμές C_T

	Τιμή C _T	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: HSV-2 10 αντίγραφα/μl	29,85	0,15	0,50
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: Εσωτερικός μάρτυρας	25,17	0,39	1,55
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HSV-2 10 αντίγραφα/μl	29,92	0,15	0,49
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	25,11	0,41	1,63
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HSV-2 10 αντίγραφα/μl	29,80	0,23	0,79
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	24,89	0,33	1,32
Συνολική διασπορά: HSV-2 10 αντίγραφα/μl	29,88	0,20	0,67
Συνολική διασπορά: Εσωτερικός μάρτυρας	25,07	0,40	1,8

Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR. Για τη λήψη ιδιαίτερα χαμηλών τίτλων των HSV-1 και HSV-2, 30 αρνητικά δείγματα ENY επωάστηκαν με 0,36 αντίγραφα/μl όγκου έκλουσης του DNA του HSV-1 ή με 0,48 αντίγραφα/μl όγκου έκλουσης του HSV-2 DNA (τριπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού όριου ανίχνευσης). Μετά από εκχύλιση με χρήση του κιτ EZ1 DSP Virus, τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR. Και τα 30 δείγματα αξιολογήθηκαν ορθά ως ασθενώς θετικά για κάθε τύπο HSV, με αποτέλεσμα το ποσοστό αποτυχίας να είναι 0%. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα του εσωτερικού μάρτυρα αξιολογήθηκε με καθαρισμό και ανάλυση 30 δειγμάτων ENY, αρνητικών στους HSV-1 και HSV-2. Δεν ανιχνεύτηκε αναστολή της PCR, με αποτέλεσμα το ποσοστό αποτυχίας να είναι 0%. Για το λόγο αυτό, η ανθεκτικότητα του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR είναι $\geq 99\%$.

Αναπαραγωγιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR καθώς και μία σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

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 (βλ. “Απομόνωση DNA”, σελίδα 18)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Αναδευτήρας τύπου vortex*
- Φυγόκεντρος Benchtop* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Rotor-Gene Q ή όργανο Rotor-Gene*[†] με κανάλια φθορισμού για τα Cycling Green, Cycling Orange και Cycling Yellow
- Έκδοση λογισμικού Rotor-Gene Q 1.7.94 ή μεταγενέστερη (έκδοση λογισμικού Rotor-Gene 6000 1.7.65 ή μεταγενέστερη)
- 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 σωληνάρια των 0,1 ml, αριθμός καταλόγου 9018901 ή τεμάχιο φόρτωσης 96 σωληνάρια των 0,2 ml, αριθμός καταλόγου 9018905)

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

[†] Η χρήση του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR δεν επιτρέπεται μαζί με όργανα Rotor-Gene Q 2plex.

Σημαντικές σημειώσεις

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνει υπόψη του τα εξής:

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Φυλάσσετε και λαμβάνετε θετικά υλικά (δείγματα, θετικούς μάρτυρες και προϊόντα ενίσχυσης) 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 εκάστοτε προσδιορισμού.
- Μετά την απόψυξη, αναμίξτε τα συστατικά (πιέζοντας επαναλαμβανόμενα του κουμπί της πιπέτας ή με παλμική ανάδευση (vortex) και φυγοκεντρίστε σύντομα.
- Εργάζεστε γρήγορα και διατηρείτε τα συστατικά σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72/96 φρεατίων).

Απομόνωση DNA

Το κιτ EZ1 DSP Virus (QIAGEN, αριθμός καταλόγου 62724*) έχει επικυρωθεί για τον καθαρισμό ιικού DNA από ανθρώπινο ENY για χρήση μαζί με το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR. Εκτελέστε τον καθαρισμό του ιικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στο *Εγχειρίδιο κιτ EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

- ① Η χρήση του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR δεν επιτρέπεται μαζί με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη φαινόλη.
- ① Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA. Προσθέστε την κατάλληλη ποσότητα φορέα RNA σε κάθε εκχύλιση ακολουθώντας τις οδηγίες στο *Εγχειρίδιο κιτ EZ1 DSP Virus (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.
- ① Ο εσωτερικός μάρτυρας του κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλ. “Εσωτερικός μάρτυρας”, παρακάτω).

* Το κιτ EZ1 DSP Virus είναι επίσης διαθέσιμο με τη μορφή των κιτ EASYartus® HSV-1/2 RG PCR με σήμανση CE για IVD, σε συνδυασμό με το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR (βλ. σελίδα 34 για πληροφορίες παραγγελίας).

Εσωτερικός μάρτυρας

Παρέχεται ένας εσωτερικός μάρτυρας (HSV-1/2 RG 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 EZ1 DSP Virus, το DNA εκλύεται σε 60 μl Ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AVE). Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 6 μl του εσωτερικού μάρτυρα.

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

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 μίγμα HSV-1/2 RG Master και HSV-1/2 RG Mg-Sol, όπως περιγράφεται στο βήμα 2β του πρωτοκόλλου (σελίδα 21).

Πρωτόκολλο: PCR και Ανάλυση δεδομένων

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε την ενότητα “Σημαντικές σημειώσεις”, σελίδα 18.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
- Βεβαιωθείτε πως κάθε εκτέλεση PCR περιλαμβάνει θετικούς μάρτυρες και έναν αρνητικό μάρτυρα (Νερό, βαθμού PCR).

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε πως 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 αναμιγνύονται (με επαναλαμβανόμενο πάτημα του κουμπιού της πιπέτας ή με ταχεία ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex) και να φυγοκεντρίζονται 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 τυχόν αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2α.
Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2β.
Χρησιμοποιήστε τον εσωτερικό μάρτυρα σύμφωνα με το βήμα 2β για όλους τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες.
- 2α. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλ. “Σημαντικές σημειώσεις”, σελίδα 18). Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα master μείγμα, σύμφωνα με τον Πίνακα 5.

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

Πίνακας 5. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της απομόνωσης DNA και τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μl	300 μl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μl	60 μl
HSV-1/2 RG IC	0 μl	0 μl
Συνολικός όγκος	30 μl	360 μl

- 2β. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστεθεί απευθείας στο μείγμα HSV-1/2 RG Master και HSV-1/2 RG Mg-Sol. Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα master μείγμα, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.**

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

Πίνακας 6. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μl	300 μl
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μl	60 μl
HSV-1/2 RG 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 μειώνεται.

- 3. Διανείμετε με πιπέτα 30 μl του μείγματος master σε κάθε σωληνάριο PCR. Προσθέστε κατόπιν 20 μl του εκλουσμένου δείγματος DNA (βλ. Πίνακα 7) και αναδεύστε καλά, πιέζοντας επαναλαμβανόμενα την πιπέτα. Αντίστοιχα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 20 μl του HSV-1 RG PC και του HSV-2 RG PC ως θετικοί μάρτυρες και 20 μl νερού (Νερό, βαθμού PCR) ως αρνητικός μάρτυρας.**

Πίνακας 7. Προετοιμασία του προσδιορισμού PCR

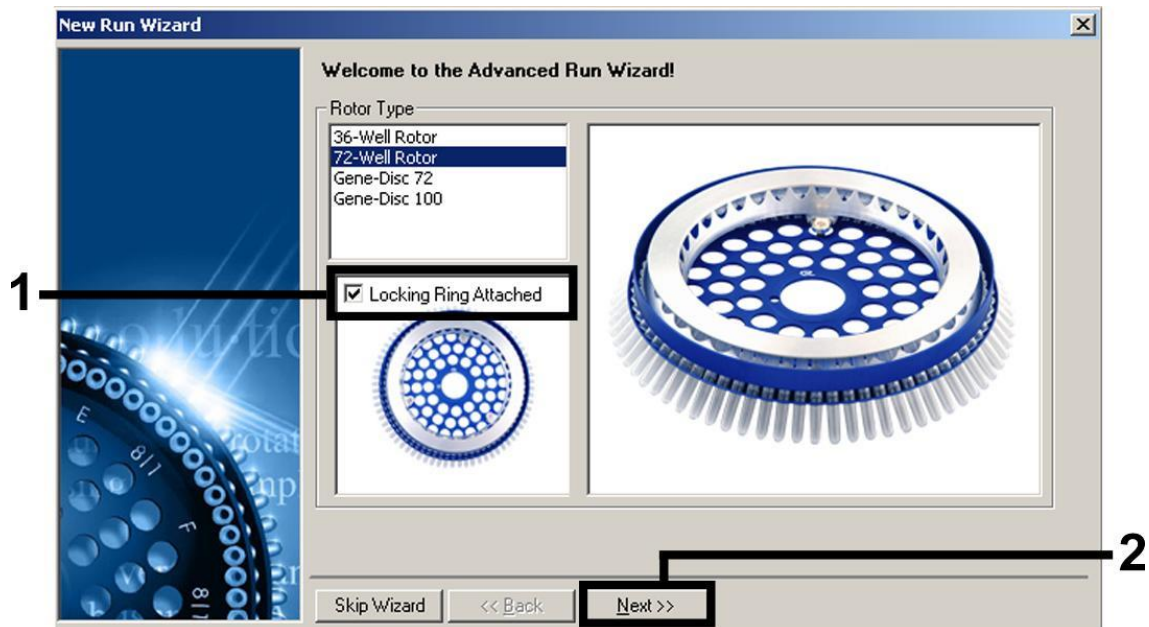
Αριθμός δειγμάτων	1	12
Κύριο (master) μείγμα	30 μl	30 μl καθένα
Δείγμα	20 μl	20 μl καθένα
Συνολικός όγκος	50 μl	50 μl καθένα

4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε πως 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 HSV-1 DNA ή HSV-2 DNA, δημιουργήστε ένα θερμοκρασιακό προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Εικόνες 3, 4, 5
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης (hot-start)	Εικόνα 6
Ενίσχυση του DNA	Εικόνα 7
Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Εικόνα 8
Έναρξη της εκτέλεσης	Εικόνα 9

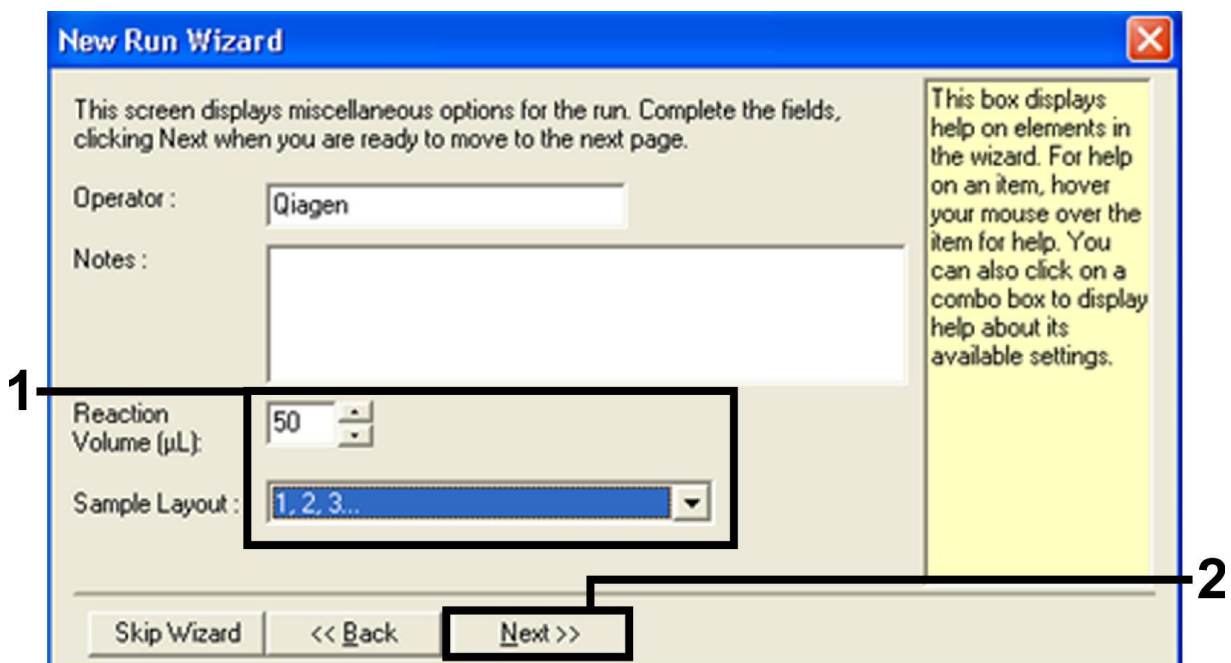
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στις εκδόσεις λογισμικού Rotor-Gene Q 1.7.94 ή μεταγενέστερες ή στις εκδόσεις λογισμικού Rotor-Gene 6000 1.7.65 ή μεταγενέστερες. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene παρακαλείστε να ανατρέξετε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q.

6. Ανοίξτε καταρχήν το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) με την έκδοση «Advanced» (εικόνα 3). Επιλέξτε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Προσαρτήθηκε δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο).



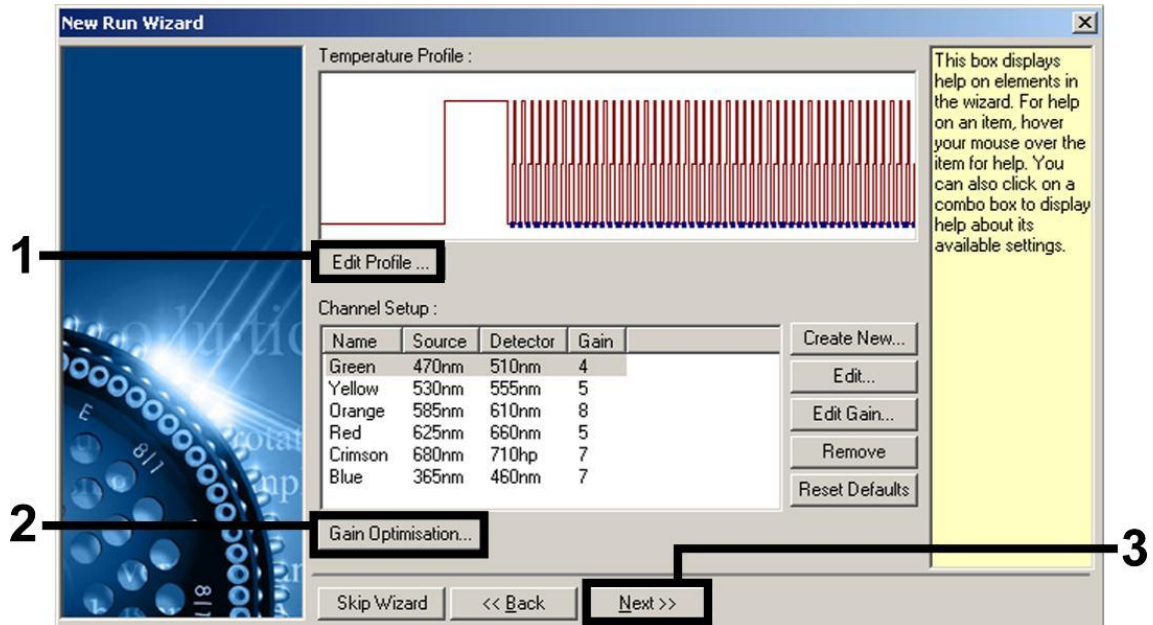
Εικόνα 3. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard».

7. Επιλέξτε 50 ως τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στο «Next» (Εικόνα 4).

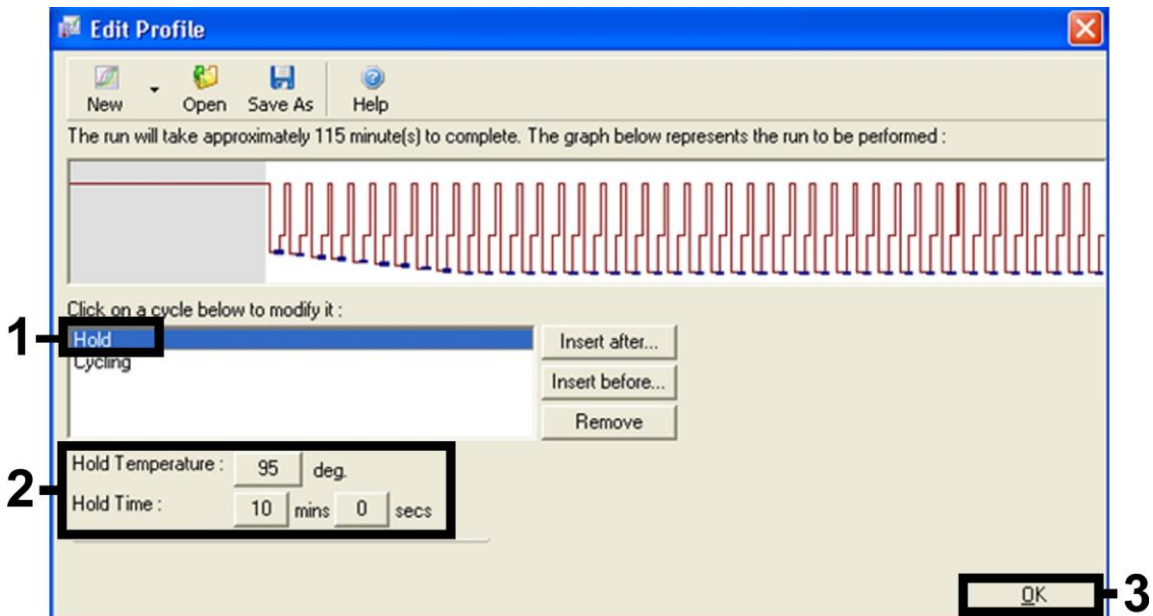


Εικόνα 4. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού

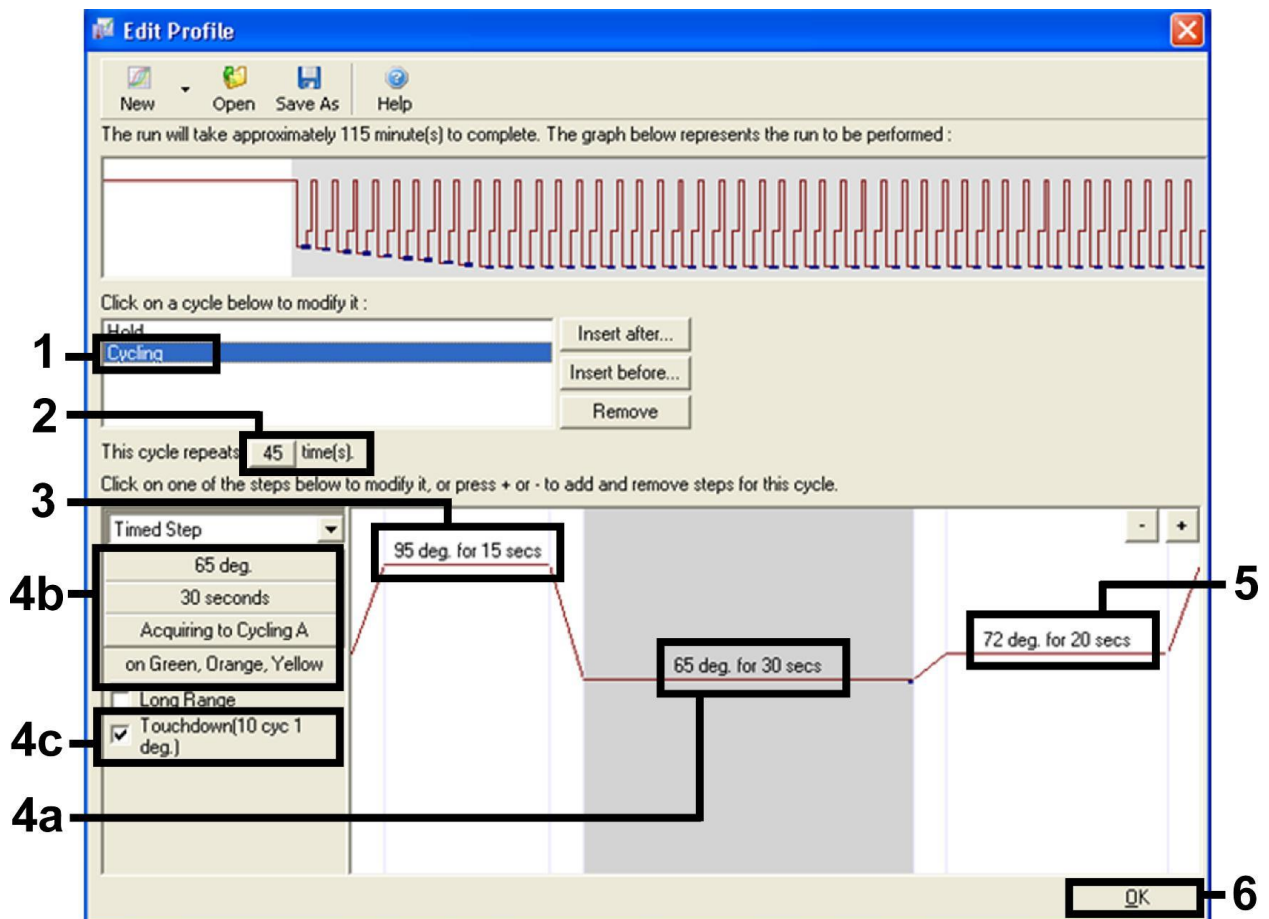
8. Κάντε κλικ στο κουμπί «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο ακόλουθο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (εικόνα 5) και προγραμματίστε το θερμοκρασιακό προφίλ με τον τρόπο που φαίνεται στις εικόνες 6–7.



Εικόνα 5. Επεξεργασία του προφίλ.

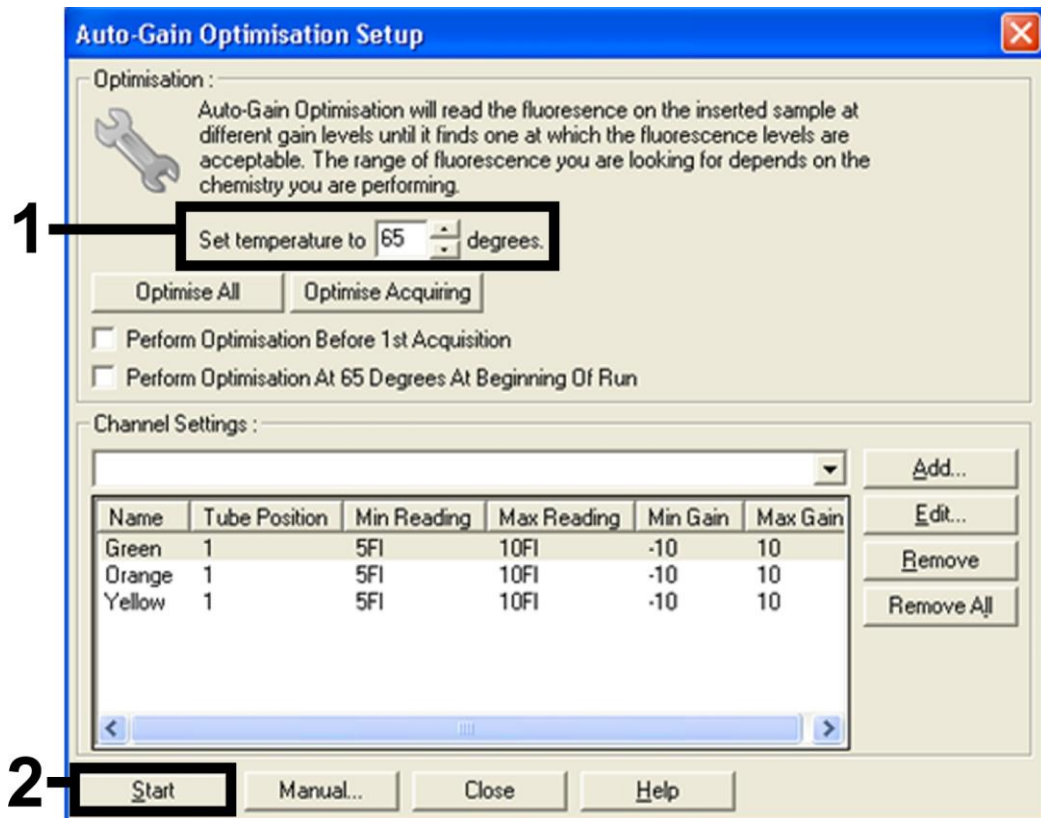


Εικόνα 6. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης



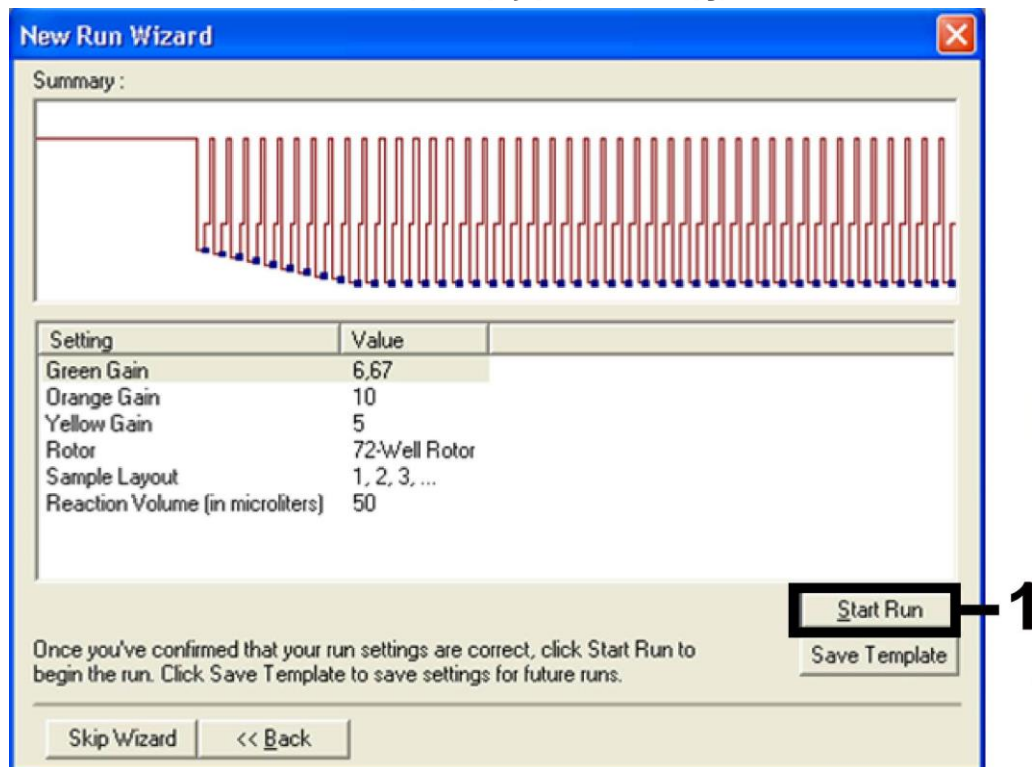
Εικόνα 7. Ενίσχυση του DNA. Βεβαιωθείτε πως έχετε ενεργοποιήσει τη λειτουργία touchdown για 10 κύκλους στο βήμα Annealing (Ανασύνδεση)

9. Τό εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Κάντε κλικ στο “Gain Optimisation” (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου “New Run Wizard” (βλ. βήμα 2) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου “Auto-Gain Optimisation Setup” (Ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής (εικόνα 8). Ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στο 65 για την αντιστοίχιση της θερμοκρασίας ανασύνδεσης στο πρόγραμμα ενίσχυσης (εικόνα 7, βήμα 4b). Βεβαιωθείτε πως και τα τρία κανάλια (Green, Orange, και Yellow) έχουν επιλεγεί για “Auto-Gain Optimisation”. (Θα βρείτε τα κανάλια στο αναπτυσσόμενου μενού κάτω από το “Channel Settings” (Ρυθμίσεις καναλιών) και κάντε κλικ στο “Add” (Προσθήκη).) Κάντε κλικ στο “Start” (Έναρξη) για να ξεκινήσετε τη βελτιστοποίηση της απολαβής. Κάντε κλικ στο “Close” (Κλείσιμο) του πλαισίου διαλόγου “Auto-Gain Optimisation Setup”. Η βαθμονόμηση απολαβής έχει ολοκληρωθεί.



Εικόνα 8. Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού.

10. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση του καναλιού αποθηκεύονται αυτομάτως και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (εικόνα 9). Κάντε κλικ στο «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης).



Εικόνα 9. Έναρξη της εκτέλεσης.

11. Μόλις ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων. Εφικτά είναι τα ακόλουθα αποτελέσματα (11α, 11β, 11γ, 11δ, 11ε και 11στ).

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στις Εικόνα 10, 11 και 12.

**11α.Ανιχνεύτηκε σήμα στο κανάλι φθορισμού Cycling Green.
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει DNA από HSV-1.**

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling Yellow μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από HSV-1 (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Green) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (ανταγωνισμός).

**11β.Στο κανάλι φθορισμού Cycling Green δεν ανιχνεύεται σήμα.
Ταυτόχρονα εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow.
Δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA από HSV-1 στο δείγμα. Μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.**

Στην περίπτωση αρνητικής PCR για HSV-1, το ανιχνευμένο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

**11γ.Ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι φθορισμού Cycling Orange.
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει DNA από HSV-2.**

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling Yellow μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από HSV-2 (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Orange) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (ανταγωνισμός).

**11δ.Στο κανάλι φθορισμού Cycling Orange δεν ανιχνεύεται σήμα.
Ταυτόχρονα εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow.
Δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA από HSV-2 στο δείγμα. Μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό ως προς τον HSV-2.**

Στην περίπτωση αρνητικής PCR για τον HSV-2, το ανιχνευμένο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

**11ε.Ανιχνεύτηκε σήμα στα κανάλια Cycling Green και Cycling Orange.
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει DNA τόσο από HSV-1 όσο και από HSV-2.**

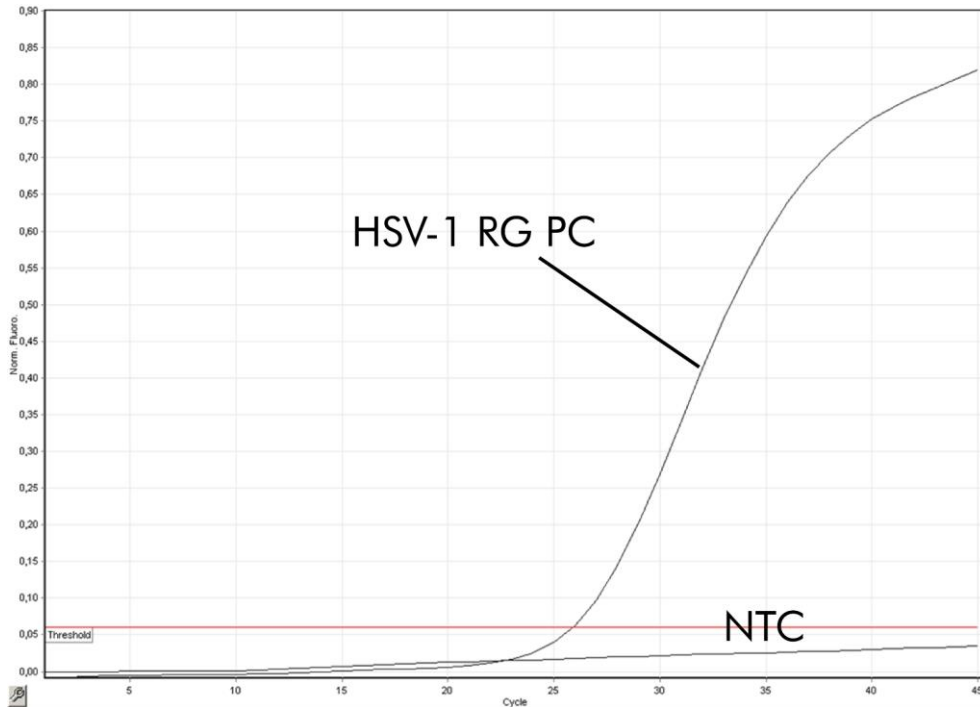
Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling Yellow μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA τόσο από HSV-1 όσο και από HSV-2 (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Green και Cycling Orange) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή

απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (ανταγωνισμός).

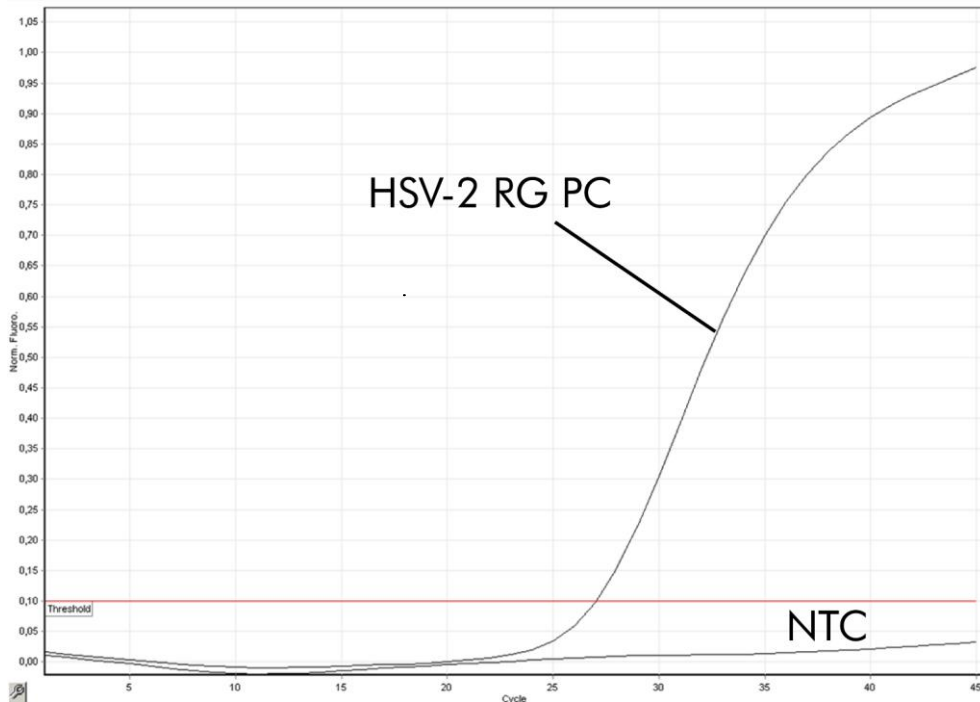
11στ. Δεν ανιχνεύτηκε σήμα στα κανάλια Cycling Green, Cycling Orange ή Cycling Yellow.

Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι εφικτή.

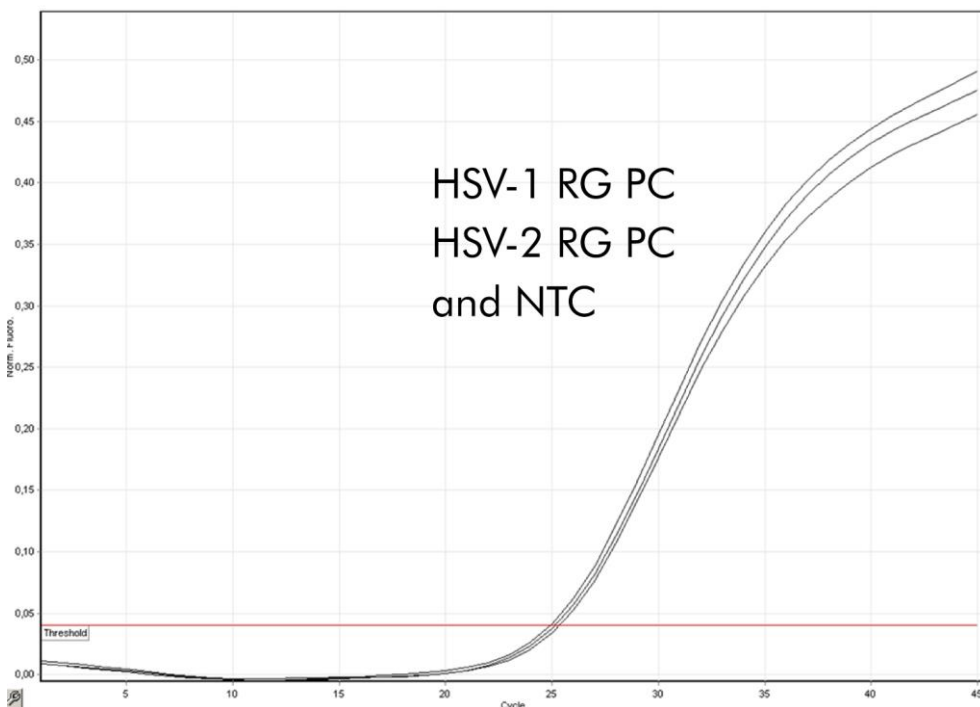
Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στο “Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων”, σελίδα 30.



Εικόνα 10. Ανίχνευση του θετικού μάρτυρα για τον HSV-1 (HSV-1 RG PC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 11. Ανίχνευση του θετικού μάρτυρα για τον HSV-2 (HSV-2 RG PC) στο κανάλι φθορισμού *Cycling Orange*. NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 12. Ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα (IC) στο κανάλι φθορισμού *Cycling Yellow* με ταυτόχρονη ενίσχυση των θετικών μαρτύρων (HSV-1 RG PC και HSV-2 RG PC). NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση τυχόν προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε ερωτήσεις σχετικά με 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 (HSV-1 RG PC και HSV-2 RG PC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling Orange

- 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 περιεχόμενα του κιτ δεν συμμορφώνονται με τις οδηγίες της ενότητας “Φύλαξη” (σελίδα 5)
- ε) Το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR έχει λήξει
- ⓘ Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green και Cycling Orange για την ανάλυση HSV-1/2 PCR και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow για την PCR εσωτερικού μάρτυρα.
- ⓘ Συγκρίνετε το θερμοκρασιακό προφίλ με το πρωτόκολλο. Βλ. “Πρωτόκολλο: PCR και Ανάλυση δεδομένων”, σελίδα 20.
- ⓘ Ελέγξτε τα βήματα του σχήματος διανομής με πιπέτα και επαναλάβετε την PCR εάν είναι απαραίτητο. Βλ. “Πρωτόκολλο: PCR και Ανάλυση δεδομένων”, σελίδα 20.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, αν χρειαστεί.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, αν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Αδύναμο σήμα ή απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα ενός αρνητικού δείγματος ENY που υποβλήθηκε σε διαδικασία καθαρισμού με χρήση του κιτ EZ1 DSP Virus στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι Cycling Green ή Cycling Orange

- α) Οι συνθήκες PCR δεν συμμορφώνονται με το πρωτόκολλο
- β) Συνέβη αναστολή της PCR
- γ) Χάθηκε DNA κατά την εκχύλιση
- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα περιεχόμενα του κιτ δεν συμμορφώνονται με τις οδηγίες της ενότητας “Φύλαξη” (σελίδα 5)
- ε) Το κιτ *artus* HSV-1/2 RG PCR έχει λήξει
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- ⓘ Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- ⓘ Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε στην εκχύλιση, η απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα μπορεί να υποδεικνύει απώλεια κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης (βλ. “Απομόνωση DNA”, σελίδα 18) και ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, αν χρειαστεί.
- ⓘ Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, αν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Σήματα με τους αρνητικούς μάρτυρες στο κανάλι φθορισμού Channel Cycling Green ή Cycling Orange της ανάλυσης PCR

α) Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR

ⓘ Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια και θυγατρικούς κλώνους.

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

ⓘ Βεβαιωθείτε πως οι θετικοί μάρτυρες διανέμονται με πιπέτα τελευταίοι.

ⓘ Βεβαιωθείτε πως 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 δοκιμασία χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.

ⓘ Βεβαιωθείτε πως 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 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 τις Τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Master, Διάλυμα Mg, 2 Θετικοί μάρτυρες, Εσωτερικός μάρτυρας, Νερό (βαθμού PCR)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: Master, Διάλυμα Mg, 2 Θετικοί μάρτυρες, Εσωτερικός μάρτυρας, Νερό (βαθμού PCR)	4500265
Κιτ EZ1 DSP Virus — για τον καθαρισμό ιικών νουκλεϊκών οξέων από ανθρώπινο ENY για in vitro διαγνωστικούς σκοπούς		
EZ1 DSP Virus Kit	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων: Προγεμισμένες Φύσιγγες αντιδραστηρίων, υποδοχές ρυγχών μίας χρήσης, αναλώσιμα ρύγχη με φίλτρο, σωληνάρια δείγματος, σωληνάρια έκλουσης, ρυθμιστικά διαλύματα, φορέας RNA	62724
Κιτ EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR — για αυτοματοποιημένο καθαρισμό δείγματος και ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε πλήρη συμμόρφωση με τις απαιτήσεις CE για IVD		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων και 24 προσδιορισμούς: 1 κιτ EZ1 DSP Virus, 1 κιτ <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	Για 48 προετοιμασίες ιικών νουκλεϊκών οξέων και 48 προσδιορισμούς: 1 κιτ EZ1 DSP Virus, 2 κιτ <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR (24)	EA10024
Rotor-Gene Q και παρελκόμενα		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	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	Ρωτήστε

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
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 (2500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 10.000 αντιδράσεις	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1000 αντιδράσεις	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 10000 αντιδράσεις	981008

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια ή η οδηγίες χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή.

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®, *artus*®, EZ1®, EASY*artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Το kit *artus* HSV-1/2 RG PCR και το kit EZ1 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* HSV-1/2 RG PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του kit *artus* HSV-1/2 RG PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit artus HSV-1/2 RG PCR (artus HSV-1/2 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 HSV-1/2 RG PCR (artus HSV-1/2 RG PCR Kit Handbook)* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν εγγυάται 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 μια 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 λάβει ή να μην επιτρέψει σε κανέναν να λάβει βήματα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες 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 οποιοδήποτε 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 τη διατήρηση 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 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ 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

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 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 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 +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

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

