

Εγχειρίδιο ΚΙΤ

artus[®] WNV LC RT-PCR



Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το όργανο *LightCycler*[®]

Δεκέμβριος 2014 — Έκδοση 1



4509063, 4509065



1046924EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R3

MAT

1046924EL



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. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες	6
6. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	7
7. Περιγραφή προϊόντος.....	7
8. Πρωτόκολλο	9
8.1 Απομόνωση RNA	9
8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	10
8.3 Ποσοτικοποίηση	11
8.4 Προετοιμασία της PCR.....	12
8.5 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler</i>	17
9. Ανάλυση δεδομένων.....	20
10. Αντιμετώπιση προβλημάτων	23
11. Ειδικά χαρακτηριστικά.....	25
11.1 Αναλυτική ευαισθησία.....	25
11.2 Ειδικότητα.....	26
11.3 Ακρίβεια.....	28
11.4 Ανθεκτικότητα	30
11.5 Επαναληψιμότητα	30
11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση	30
12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος.....	30

13. Πληροφορίες ασφάλειας	31
14. Ποιοτικός έλεγχος	31
15. Βιβλιογραφία	31
16. Επεξήγηση των συμβόλων	32

Κιτ *artus* WNV LC RT-PCR

Για χρήση με το όργανο *LightCycler*.

1. Περιεχόμενο

	Επισημάνση και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4509063 24 αντιδράσεις
Μπλε	<i>WNV LC Master</i>	2 x 12 αντιδράσεις
Κόκκινο	<i>WNV LC/TM QS 1^α</i> 4 x 10 ⁴ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>WNV LC/TM QS 2^α</i> 4 x 10 ³ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>WNV LC/TM QS 3^α</i> 4 x 10 ² αντίγραφα/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>WNV LC/TM QS 4^α</i> 4 x 10 ¹ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl
Πράσινο	<i>WNV LC IC^α</i>	1 x 1.000 μl
Λευκό	<i>Νερό (κατηγορίας PCR)</i>	1 x 1.000 μl

^α QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης
IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

2. Αποθήκευση

Τα υλικά του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR αποθηκεύονται στους -15°C έως -30°C και διατηρούνται σταθερά μέχρι την ημερομηνία 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 στους +4°C δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης RNA (βλέπε 8.1 Απομόνωση RNA)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- *Color Compensation Set* (Σετ αντιστάθμισης χρώματος) (αρ. καταλ. 2 158 850) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *CROSSTALK COLOR COMPENSATION* (Αντιστάθμιση χρώματος αλληλοπαρεμβολής)
- Τριχοειδή *LightCycler* (20 µl)
- Μονάδα ψύξης *LightCycler*
- Όργανο *LightCycler*
- Εργαλείο πωματισμού *LightCycler*

4. Γενικές προφυλάξεις

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

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη 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 φυγοκέντρωσης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή στη μονάδα ψύξης *LightCycler*.

5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι ένα μέλος της οικογένειας των φλαβιοβιριδίων (γένος *Flavivirus*). Μολυσμένα κουνούπια συνήθως τσιμπούν και μολύνουν άγρια πτηνά — τον κύριο ξενιστή του ιού — αλλά ο ιός WNV μπορεί επίσης να μολύνει άλογα και άλλα θηλαστικά. 80% όλων των μολυσμένων ανθρώπων δεν παρουσιάζουν συμπτώματα σχετιζόμενα με τον ιό WNV. Λοιμώξεις με τον ιό WNV σε ηλικωμένα άτομα, παιδιά και ανασοκατεσταλμένους ασθενείς μπορεί σε σπάνιες περιπτώσεις να οδηγήσουν σε θανατηφόρο εγκεφαλίτιδα ή μυοκαρδίτιδα.

6. 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).

7. Περιγραφή προϊόντος

Το κιτ *artus WNV LC RT-PCR* αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση RNA του ιού WNV με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στο όργανο *LightCycler*. Το *WNV LC Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την αντίστροφη μεταγραφή και την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 72 bp του γονιδιώματος του ιού WNV, καθώς και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμόμετρου F1 του οργάνου *LightCycler*. Πέραν αυτού, το κιτ *artus WNV LC RT-PCR* περιέχει ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμόμετρου F3. Δεν

μειώνεται το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής RT-PCR του WNV (βλέπε **11.1** Αναλυτική ευαισθησία). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*WNV LC/TM QS 1 – 4*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα **8.3** Ποσοτικοποίηση.

8. Πρωτόκολλο

8.1 Απομόνωση RNA

Κιτ απομόνωσης RNA διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Οι ποσότητες δείγματος για τη διαδικασία απομόνωσης RNA εξαρτώνται από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο. Παρακαλούμε εκτελείτε την απομόνωση RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνιστάται το ακόλουθο κιτ απομόνωσης.

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Ορός, πλάσμα, ΕΝΥ	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Κιτ QIAamp® Viral RNA Mini) (50)	52 904	QIAGEN	περιέχεται

- 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 κιτ QIAamp Viral RNA Mini, 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 AE ή του ρυθμιστικού διαλύματος AVE (ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, τελική συγκέντρωση 1 μg/ml, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Καταμερίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -20°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (> 2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.
 - b. Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, όπου εφαρμόζεται, βλέπε **8.2** Πρότυπο εσωτερικού **ελέγχου**) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα μεταφοράς με πιπέτα:

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα AVL	560 μl	6.720 μl
Φορέας RNA (1 μg/μl)	5,6 μl	67,2 μl
Συνολικός όγκος	565,6 μl	6.787,2 μl
Όγκος ανά εκχύλιση	560 μl	ανά 560 μl

- c. Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή!
- 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 kit *artus* WNV LC RT-PCR δεν επιτρέπεται μαζί με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη **φαινόλη**.

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του kit *artus* WNV LC RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**).

8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (WNV LC IC)*. Με αυτό ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να **ελέγξει τόσο την απομόνωση του RNA 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 kit QIAmp Viral RNA Mini, το RNA εκλύεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AVE). Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 6 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Εάν κάνετε έκλουση, π.χ. σε 50 μl, τότε χρησιμοποιήστε τον αντίστοιχο όγκο των 5 μl. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλουσης. Λάβετε υπόψη ότι το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* πρέπει να προστίθεται στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος. Εναλλακτικά, το

πρότυπο εσωτερικού ελέγχου μπορεί να προστεθεί απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Προαιρετικά, μπορείτε να προσθέσετε το φορέα RNA μαζί με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (βλέπε **8.1** Απομόνωση RNA). Ωστόσο, λάβετε υπόψη ότι το μείγμα *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου/φορέα* RNA και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης 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 *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* και μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης). **Μην** προσθέτετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* 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 0,5 μl του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* απευθείας σε 15 μl *WNV LC Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 15 μl του παρασκευασμένου όπως αναφέρεται παραπάνω *Master Mix*^{*} και στη συνέχεια προσθέστε 5 μl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *WNV LC Master* και του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **8.4** Προετοιμασία της PCR).

8.3 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (WNV LC/TM QS 1 – 4)* χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (5 μl). Για την παραγωγή μιας πρότυπης καμπύλης στο όργανο *LightCycler*, πρέπει να χρησιμοποιούνται και τα τέσσερα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* και να καθορίζονται στην οθόνη *SAMPLE LOADING* (Φόρτωση δείγματος) ως πρότυπα με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις [βλέπε εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler (LightCycler Operator's*

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

Manual), έκδοση 3.5, κεφάλαιο Β, 2.4. Εισαγωγή δεδομένων δειγμάτων]. 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 το σκοπό αυτό, απαιτείται να εισαχθεί η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε προηγουμένως [βλέπε εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*), έκδοση 3.5, κεφάλαιο Β, 4.2.5. Ποσοτικοποίηση με εξωτερική πρότυπη καμπύλη]. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις στα αποτελέσματα λόγω διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών εκτελέσεων PCR.

Προσοχή: Τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* ορίζονται ως αντίγραφα/μl. Η παρακάτω εξίσωση πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή των τιμών που προσδιορίζονται με χρήση της πρότυπης καμπύλης σε αντίγραφα/ml του υλικού δείγματος:

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

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 φυγοκέντρωσης ή αύξηση λόγω συμπληρώματος για τον απαιτούμενο όγκο προς απομόνωση).

Σημαντικό: Μια κατευθυντήρια οδηγία για την ποσοτική ανάλυση των συστημάτων *artus* στο όργανο *LightCycler* παρέχεται στο www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX [τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler* (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument**)].

8.4 Προετοιμασία της PCR

Διασφαλίστε ότι η μονάδα ψύξης καθώς και οι προσαρμογείς τριχοειδών (παρελκόμενα του οργάνου *LightCycler*) έχουν προψυχθεί στους +4°C. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό τριχοειδών *LightCycler* στους

προσαρμογείς της μονάδας 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 (WNV LC/TM QS 1 – 4)*. 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 αναστροφή του σωληναρίου αρκετές φορές) και να φυγοκεντρώνονται σύντομα.

Για την περίπτωση που με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* θέλετε να **ελέγξετε τόσο την απομόνωση του RNA όσο και μια ενδεχομένη αναστολή της PCR**, αυτό πρέπει ήδη να έχει προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε **8.2** 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	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Συνολικός όγκος	15 µl	180 µl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl	ανά 15 µl
	Δείγμα	5 µl	ανά 5 µl
	Συνολικός όγκος	20 µl	ανά 20 µl

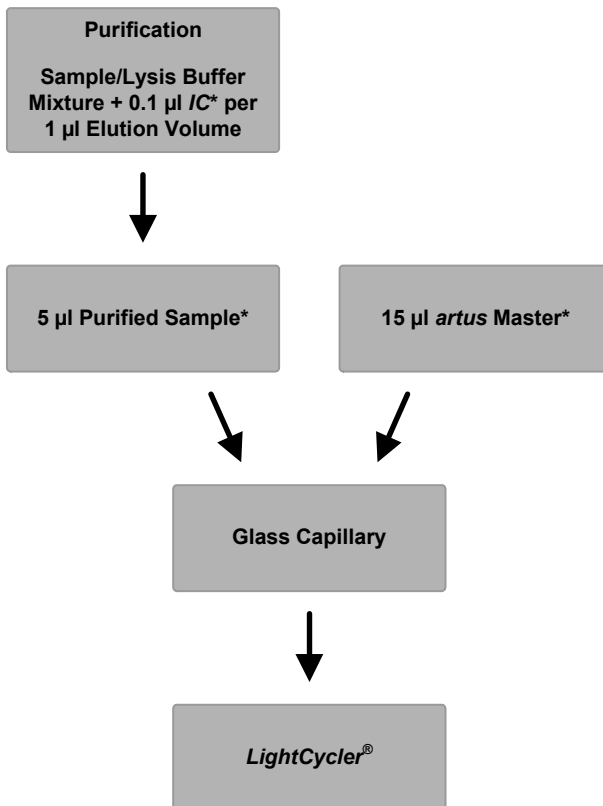
Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR*, θα πρέπει αυτό να προστεθεί απευθείας στο *WNV LC Master*. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 2):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>WNV LC Master</i>	15 μl	180 μl
	<i>WNV LC IC</i>	0,5 μl	6 μl
	Συνολικός όγκος	15,5 μl*	186 μl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 μl	ανά 15 μl
	Δείγμα	5 μl	ανά 5 μl
	Συνολικός όγκος	20 μl	ανά 20 μl

Μεταφέρετε με πιπέτα 15 μl του Master Mix στην πλαστική δεξαμενή κάθε τριχοειδούς. Στη συνέχεια, προσθέστε 5 μl του εκλουσμένου RNA δείγματος. Αντιστοίχως, 5 μl τουλάχιστον ενός από τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (WNV LC/TM QS 1–4)* πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικό πρότυπο ελέγχου και 5 μl νερού (*νερό, κατηγορίας PCR*) ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου. Κλείστε τα τριχοειδή. Για να μεταφέρετε το μείγμα από την πλαστική δεξαμενή στο τριχοειδές, φυγοκεντρήστε τους προσαρμογείς που περιέχουν τα τριχοειδή σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο για δέκα δευτερόλεπτα σε μέγιστο 400 x g (2.000 rpm).

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

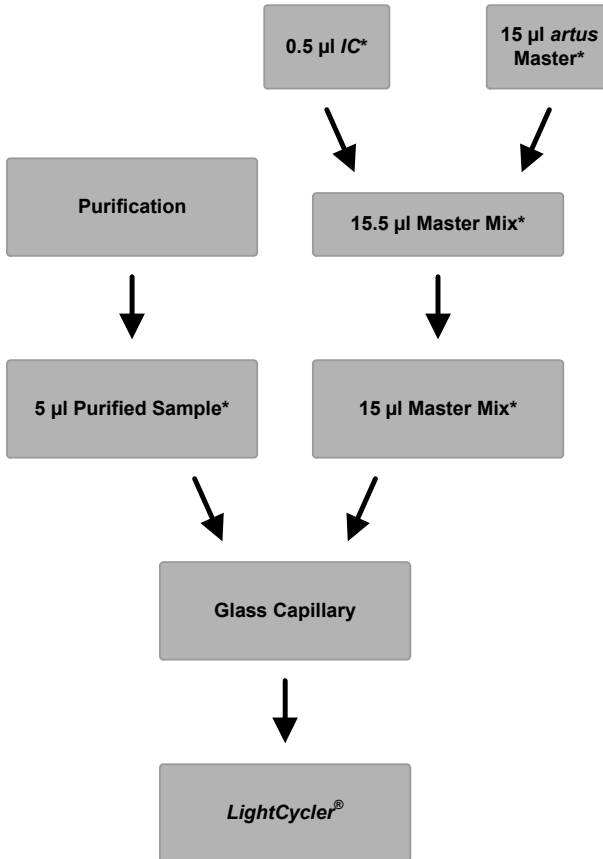
Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία καθαρισμού



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.

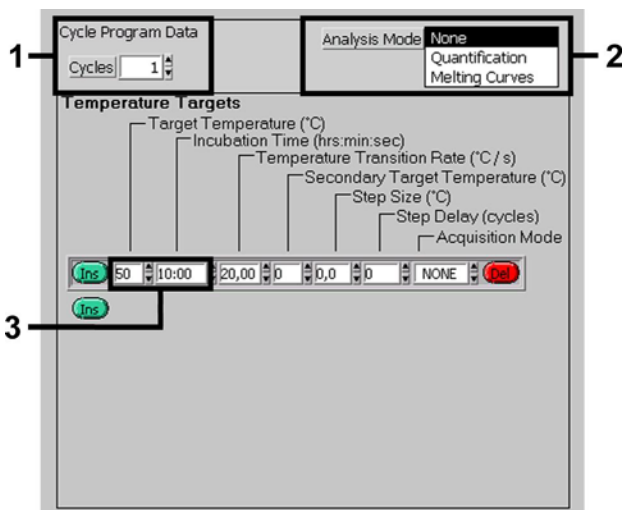
*Φροντίστε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμειξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

8.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*

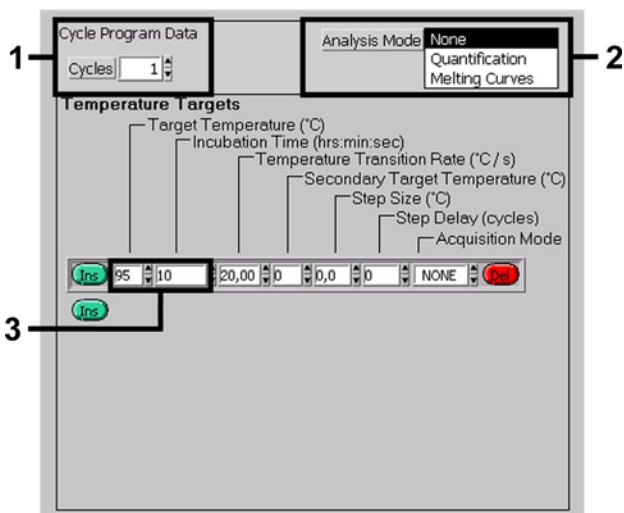
Για την ανίχνευση του RNA του WNV, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο *LightCycler* σύμφωνα με τα ακόλουθα τέσσερα βήματα (βλέπε Εικ. 3 – 6).

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Αντίστροφη μεταγραφή του RNA | Εικ. 3 |
| B. | Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης | Εικ. 4 |
| Γ. | Ενίσχυση του cDNA | Εικ. 5 |
| Δ. | Ψύξη | Εικ. 6 |

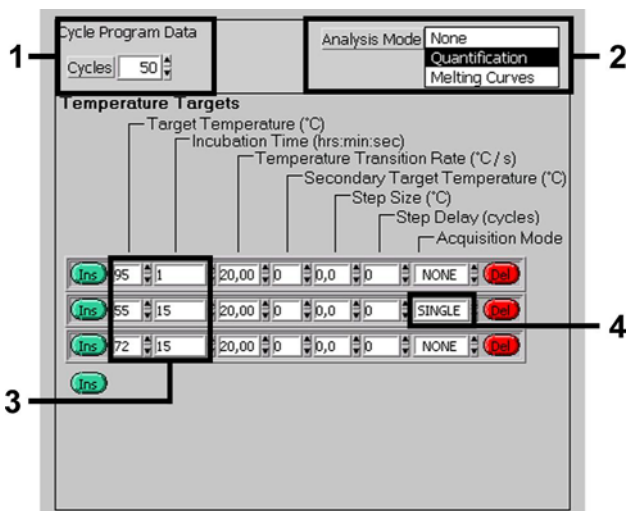
Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ρυθμίσεις για *ANALYSIS MODE* (λειτουργία ανάλυσης), *CYCLE PROGRAM DATA* (Δεδομένα προγράμματος κύκλου) και *TEMPERATURE TARGETS* (Στόχοι θερμοκρασίας). Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler*, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*).



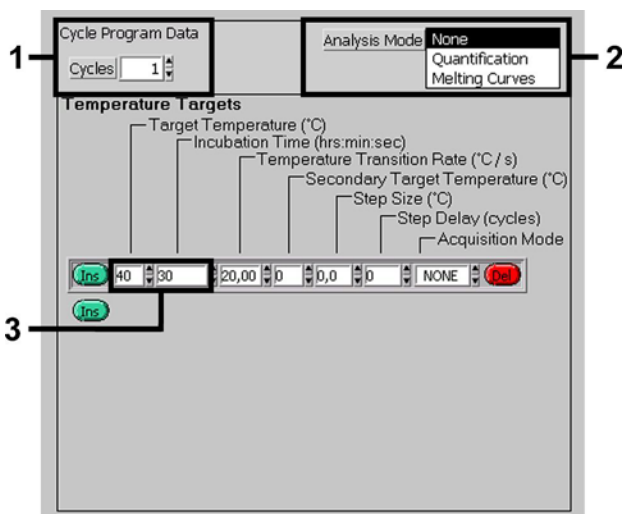
Εικ. 3: Αντίστροφη μεταγραφή του RNA.



Εικ. 4: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.



Εικ. 5: Ενίσχυση του cDNA.



Εικ. 6: Ψύξη.

9. Ανάλυση δεδομένων

Στις πολυχρωματικές αναλύσεις, εμφανίζονται παρεμβολές μεταξύ των καναλιών φθορισμόμετρου. Το λογισμικό του οργάνου *LightCycler* περιέχει ένα αρχείο που ονομάζεται *COLOR COMPENSATION FILE* (Αρχείο αντιστάθμισης χρώματος), το οποίο αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές. Ανοίξτε αυτό το αρχείο πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την εκτέλεση της PCR ενεργοποιώντας το κουμπί *CHOOSE CCC FILE* (Επιλογή αρχείου CCC) ή *SELECT CC DATA* (Επιλογή δεδομένων CC). Εάν δεν έχει εγκατασταθεί *COLOR COMPENSATION FILE*, δημιουργήστε το αρχείο σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*). Μετά την ενεργοποίηση του *COLOR COMPENSATION FILE*, εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα στα κανάλια φθορισμόμετρου F1, F2 και F3. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων PCR που ελήφθησαν με το κιτ *artus WNV LC RT-PCR*, επιλέξτε τις επιλογές εμφάνισης φθορισμού F1 για την αναλυτική RT-PCR του WNV και F3/Back-F1* για την RT-PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, αντίστοιχα. Για την ανάλυση των ποσοτικών εκτελέσεων, ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα **8.3 Ποσοτικοποίηση και στην τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler* (Technical Note for quantitation on the *LightCycler Instrument*) στο www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.**

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμόμετρου F1.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: Το δείγμα περιέχει RNA του WNV.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι F3/Back-F1 μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις RNA από WNV (θετικό σήμα στο κανάλι F1) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1 (ανταγωνισμός).

* Όταν χρησιμοποιούνται παλιότερες εκδόσεις του λογισμικού (έκδοση 3.3 και παλιότερη), η επιλογή εμφάνισης F3/Back-F1 δεν είναι διαθέσιμη. Σε αυτήν την περίπτωση, επιλέξτε F3/F1.

2. Στο κανάλι φθορισμόμετρου F1 δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1.

Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο RNA του WNV. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

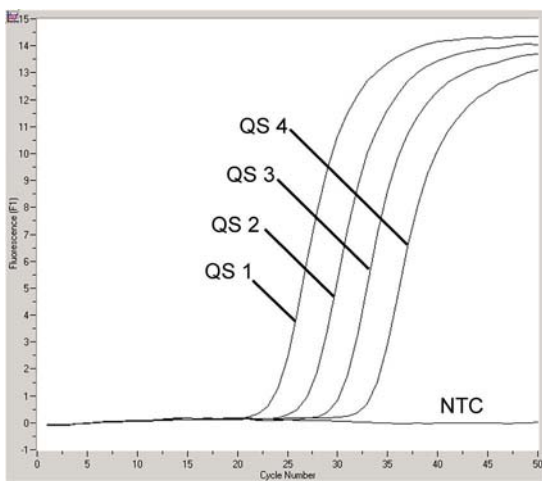
Όταν η RT-PCR του WNV είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι F1 ή στο κανάλι F3/Back-F1.

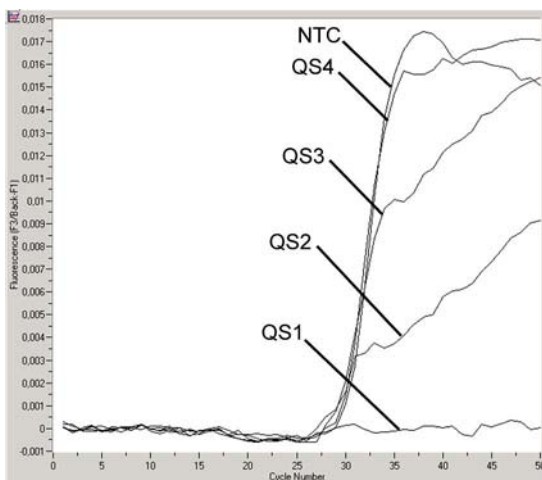
Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

Υποδείξεις σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους παρατίθενται στο κεφάλαιο 10. Αντιμετώπιση **προβλημάτων**.

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στην Εικ. 7 και Εικ. 8.



Εικ. 7: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης (WNV LC/TM QS 1 – 4)* στο κανάλι φθορισμού F1. NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 8: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμού F3/Back-F1 με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων ποσοτικοποίησης (WNV LC/TM QS 1 – 4)*. NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).

10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Απουσία σήματος με θετικά πρότυπα ελέγχου (WNV LC/TM QS 1 – 4) στο κανάλι φθορισμόμετρου F1:

- Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμόμετρου για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.
 - Για ανάλυση δεδομένων, επιλέξτε το κανάλι φθορισμόμετρου F1 για την αναλυτική RT-PCR του WNV και το κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back--F1 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Λανθασμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του οργάνου *LightCycler*.
 - Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο (βλέπε **8.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler***).
- Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης της PCR.
 - Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **8.4 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2**. Αποθήκευση ή το kit *artus WNV LC RT-PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο kit, εάν είναι απαραίτητο.

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back--F1 και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι -F1:

- 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 μία συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.1 Απομόνωση RNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

- Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του RNA έχει εκτελεστεί το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την έκλυση (βλέπε **8.1** Απομόνωση RNA).
- Χάθηκε RNA κατά την εκχύλιση.
 - Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην εκχύλιση, μπορεί η απουσία του σήματος του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* να σημαίνει απώλειες RNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.1** Απομόνωση RNA) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2**. Αποθήκευση ή το kit *artus WNV LC RT-PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο kit, εάν είναι απαραίτητο.

Σήματα με τα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο κανάλι φθορισμόμετρου F1 της ανάλυσης PCR.

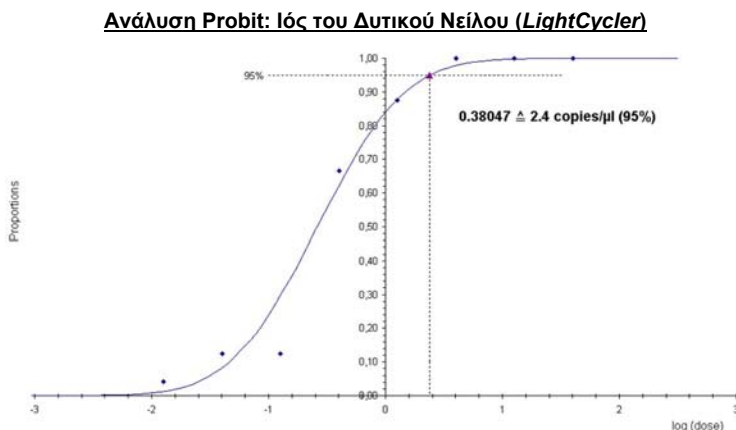
- Υφίσταται μία επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR.
 - Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια κατ' επανάληψη.
 - Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.
 - Εισάγετε με πιπέτα τα θετικά πρότυπα ελέγχου αυστηρά στο τέλος.
 - 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.

11. Ειδικά χαρακτηριστικά

11.1 Αναλυτική ευαισθησία

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αναλυτική ευαισθησία του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR, δημιουργήθηκε μια πρότυπη σειρά αραιώσεων από 40 μέχρι ονομαστικά 0,01265 των *in vitro* μεταγεγραμμένων αντιγράφων RNA ανά μικρολίτρο του αμπλικονίου WNV και αναλύθηκε με το τικ *artus* WNV LC RT-PCR. 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. 9. Το όριο ανίχνευσης του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR είναι 2,4 αντίγραφα/μλ ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 2,4 αντίγραφα/μλ ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικ. 9: Αναλυτική ευαισθησία του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR.

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus WNV LC RT-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 στελεχών του WNV διασφαλίστηκε συνεπώς με ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων.

Επιπλέον, έχε δοκιμαστεί η επίδραση του γονιδιωματικού DNA στην ανίχνευση των θετικών για WNV δειγμάτων. Έχει καταδειχθεί ότι μεγάλες ποσότητες γονιδιωματικού DNA σε μια εκτέλεση PCR μπορεί να αναχαιτίσει την αντίδραση PCR. Συνεπώς, το kit *artus WNV LC RT-PCR* πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με πτωχά σε κύτταρα υλικά δείγματος.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση 30 διαφορετικών δειγμάτων πλάσματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού, τα οποία ήταν αρνητικά στον WNV. Αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για WNV ενισχυτές και ανιχνευτές, που περιλαμβάνονται στο *WNV LC Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του kit *artus WNV LC RT-PCR*, 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 kit με δυνητικά διασταυρούμενους αντιδρώντες παθογόνους παράγοντες.

Ομάδα ελέγχου	WNV (F1)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (F3/Back-F1)
Ιός εγκεφαλίτιδας του St. Louis	-	+
Ιός Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας	-	+
Ιός κίτρινου πυρετού	-	+
Ιός δάγγειου πυρετού τύπου 1	-	+
Ιός δάγγειου πυρετού τύπου 2	-	+
Ιός δάγγειου πυρετού τύπου 3	-	+
Ιός δάγγειου πυρετού τύπου 4	-	+
Ιός λευκοεγκεφαλίτιδας μικρομυτιδας Montana	-	+
Ιός Modoc	-	+
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 ανοσοανεπάρκειας	-	+
Εντεροϊός 71	-	+
Ιός Coxsackie A7	-	+
Ιός Coxsackie A24	-	+
Ιός Coxsackie B3	-	+
Ηχοϊός 30	-	+
Ιός ηπατίτιδας Α	-	+
Ιός ηπατίτιδας Β	-	+
Ιός ηπατίτιδας C	-	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	-	+
<i>Listeria welshmerii</i>	-	+
<i>Listeria ivanovii</i>	-	+

11.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας, για το kit *artus* WNV LC RT-PCR 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 ακρίβειας εξετάστηκαν, για το kit *artus* WNV LC RT-PCR, βάσει του *προτύπου ποσοτικοποίησης* με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (QS 4, 40 αντίγραφα/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 αντίγραφα/μl προσδιορίστηκαν 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 0,79% (Ct) ή 10,12% (συγκέντρωση), για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* σε 4,28% (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: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,14	0,02	0,46
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,32	0,10	1,09
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	1,28	1,63	4,62
Συνολική διασπορά: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,26	0,07	0,79
Συνολική διασπορά: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	1,23	1,51	4,28

Πίνακας 3: Δεδομένα ακριβείας στη βάση ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε αντίγραφα/μl).

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,53	6,40	6,31
Συνολική διασπορά: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	4,07	16,56	10,12

11.4 Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του kit *artus WNV LC RT-PCR*. Εμβολιάσθηκαν 30 αρνητικά στον WNV δείγματα πλάσματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού με 7,2 αντίγραφα/μl όγκου έκλουσης RNA ιού του Δυτικού Νείλου πλήρους μήκους (περ. τριπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού ορίου ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του kit QIAamp Viral RNA Mini (βλέπε 8.1 Απομόνωση RNA), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το kit *artus WNV LC RT-PCR*. Το ποσοστό αποτυχίας για τον WNV 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 WNV δειγμάτων πλάσματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Έτσι, η ανθεκτικότητα του kit *artus WNV LC RT-PCR* ανέρχεται στο $\geq 99\%$.

11.5 Επαναληψιμότητα

Δεν υπάρχουν διαθέσιμες ενημερωμένες διεργαστηριακές δοκιμασίες για την ανίχνευση του RNA του ιού του Δυτικού Νείλου μέσω PCR πραγματικού χρόνου. Δεδομένα αναπαραγωγιμότητας θα συγκεντρωθούν σε εξωτερικές μελέτες επικύρωσης και πλευράς βήτα και σε σύγκριση με άλλα προϊόντα στις διαγνωστικές μελέτες (βλέπε 11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση).

11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση

Επί του παρόντος, το kit *artus WNV LC RT-PCR* υποβάλλεται σε μια σειρά μελετών αξιολόγησης.

12. 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 (EN375).

- 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.
- Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή 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.

13. Πληροφορίες ασφάλειας

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 κιτ και συστατικό των κιτ της QIAGEN®.

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

14. Ποιοτικός έλεγχος

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του κιτ *artus WNV LC RT-PCR* ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για την διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

15. Βιβλιογραφία

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

Επεξήγηση των συμβόλων

	Ημερομηνία λήξης
	Κωδικός παρτίδας
	Κατασκευαστής
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός υλικού
	Εγχειρίδιο
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Συστατικά
	Περιέχει
	Αριθμός
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
 <N>	Περιέχει ποσότητα που επαρκεί για <N> δοκιμασίες
	Περιορισμός θερμοκρασίας



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

QS

Πρότυπο ποσοτικοποίησης

IC

Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Κιτ *artus* WNV LC RT-PCR

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (Όμιλος QIAGEN) *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

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.

Η ΑΓΟΡΑ ΑΥΤΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΧΟΡΗΓΕΙ ΣΤΟΝ ΑΓΟΡΑΣΤΗ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ ΒΑΣΕΙ ΕΝΟΣ Ή ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΩΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΩΝ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ ΤΩΝ Η.Π.Α. ΜΕ ΑΡ. 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 ΚΑΙ 6,245,514 ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΓΙΑ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙ ΑΥΤΟ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΖΩΑ. ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΚΑΝΕΝΑ ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΚΑΙΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ Ή ΑΛΛΗ ΑΔΕΙΑ ΟΠΟΙΟΥΔΗΠΟΤΕ ΕΙΔΟΥΣ, ΕΚΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΔΙΚΑΙΩΜΑ ΧΡΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ.

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *artus* WNV LC RT-PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο* *kit artus WNV LC RT-PCR* 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* *kit artus WNV LC RT-PCR* 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 οποιοσδήποτε 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 οποιασδήποτε ενέργειας 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 κιτ και/ή τα συστατικά του.

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

Κιτ QIAamp Viral RNA Mini

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του κιτ QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των κιτ 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.

© 2007–2014 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)

1046924EL 148051765



Sample & Assay Technologies