

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Εγχειρίδιο



24 (Αρ.Καταλόγου 4511263)

Διαγνωστικό προϊόν in-vitro ποσοτικού προσδιορισμού

Για τη χρήση με το

artus[™] 3000 και το *Rotor-Gene[®] 3000*

Έκδοση 1η



4511263



1046936EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2

MAT

1046936EL



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	Γενικά μέτρα ασφαλείας	6
5	Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες	7
6	Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR	8
7	Περιγραφή προϊόντος.....	8
8	Πρωτόκολλο	9
8.1	Προαναλυτική διαδικασία: λήψη, φύλαξη και μεταφορά των δειγμάτων	9
8.1.1	Δειγματοληψία.....	10
8.1.2	Φύλαξη δείγματος.....	10
8.1.3	Μεταφορά δειγμάτων.....	10
8.2	Απομόνωση RNA	11
8.3	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	13
8.4	Ποσοτικοποίηση	14
8.5	Προετοιμασία της PCR.....	15
8.6	Προγραμματισμός του <i>artus 3000</i> ή του <i>Rotor-Gene 3000</i>	20
9	Αξιολόγηση.....	25
10	Αντιμετώπιση προβλημάτων	27
11	Ειδικά χαρακτηριστικά.....	29
11.1	Αναλυτική ευαισθησία.....	29
11.2	Ειδικότητα.....	30
11.3	Ακρίβεια.....	31

11.4	Ανθεκτικότητα.....	32
11.5	Επαναληψιμότητα.....	33
11.6	Διαγνωστική αξιολόγηση	33
12	Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος.....	33
13	Πληροφορίες ασφάλειας	33
14	Ποιοτικός έλεγχος	34
15	Βιβλιογραφία.....	34
16	Ερμηνεία των συμβόλων.....	35

artus SARS RG RT-PCR Kit

Για τη χρήση με το *artus 3000* ή με το *Rotor-Gene 3000*^{*}.

1 Περιεχόμενο

	Ονομασία και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4511263 24 αντιδράσεις
Μπλε	SAR-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Κόκκινο	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 ^α 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 ^α 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 ^α 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 ^α 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Πράσινο	SARS-CoV LC/RG/TM IC ^α	1 x 1.000 μl
Λευκό	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

^α QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης
IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

2 Αποθήκευση

Τα υλικά του *artus SARS RG RT-PCR Kit* αποθηκεύονται στους -30°C έως -15°C και διατηρούνται μέχρι την ημερομηνία που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επαναληπτική ψύξη/απόψυξη (> 2 x) θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, θα πρέπει να γίνεται επιμερισμός των αντιδραστηρίων. Εάν παραστεί ανάγκη αποθήκευσης των υλικών στους $+4^{\circ}\text{C}$, το χρονικό διάστημα αποθήκευσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

^{*} Το *artus SARS RG RT-PCR Kit* μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης με το *Rotor-Gene™ 2000*.

3 Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης RNA (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- *artus 3000* ή *Rotor-Gene 3000*
- Σωληνάρια PCR 0,1 ml για τη χρησιμοποίηση της κεφαλής 72 υποδοχών (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, Αρ. κατ.: 4699982; 0.1 ml tubes, Corbett Research, Αρ. κατ.: ST-1001)
- Εναλλακτικά: σωληνάρια PCR 0,2 ml για τη χρησιμοποίηση της κεφαλής 36 υποδοχών (π.χ. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Αρ. κατ.: 4699983; 0,2 ml tubes, Corbett Research, Αρ. κατ.: SE-1003F)
- Μονάδα ψύξης (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, Αρ. κατ.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, Αρ. κατ.: 3001-008/3001-009)

4 Γενικά μέτρα ασφαλείας

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

- Χρησιμοποίηση στείρων ρυγχών πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου, προϊόντα πολλαπλασιασμού) πρέπει να καθαρίζεται, 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 ανάμιξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρωσης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή μονάδα ψύξης (72/96 well loading block).

5 Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες

Οι κορωναϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Coronaviridae* και είναι μεγάλοι επικαλυμμένοι ιοί RNA θετικού κλώνου, οι οποίοι προκαλούν υψηλά λοιμογόνες ασθένειες στον άνθρωπο και τα κατοικίδια ζώα. Δύο μέχρι σήμερα γνωστοί κορωναϊοί του ανθρώπου ευθύνονται για το ένα τρίτο των διαδεδομένων ασθενειών κρυολογήματος και των νοσοκομειακών μολύνσεων των ανώτερων αναπνευστικών οδών στα πρόωρα νεογνά.

Ένα μέλος της οικογένειας των κορωναϊών θεωρείται ως αιτιολογικός παράγοντας του βαρέως οξέος αναπνευστικού συνδρόμου („Severe Acute Respiratory Syndrome“, SARS). Ένα τμήμα του γονιδίου πολυμεράσης του SARS κορωναϊού (SARS-CoV) ταυτοποιήθηκε σε έναν ασθενή από το Ινστιτούτο Τροπικής Ιατρικής Bernhard Nocht του Αμβούργου και τα συνεργαζόμενα εργαστήρια, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Με βάση την ανωτέρω εξέταση αναπτύχθηκε ένα εμπορικό σύστημα Real-Time RT-PCR για τον άμεσο εντοπισμό του SARS-CoV. Η PCR έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης γενετικού υλικού του ιού SARS-CoV σε διάφορα δείγματα (αίμα, εκκρίματα αναπνευστικών οδών ή ιστοί).

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της εξέτασης

Σημαντικό: Λαμβάνετε υπόψη τις επίσημες υποδείξεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) που μπορούν να διαβαστούν στην ακόλουθη σελίδα διαδικτύου: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Θετικά αποτελέσματα: Μία εξέταση SARS-CoV με θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι προϋπάρχει μία SARS-CoV μόλυνση, ακόμα και αν ο ασθενής δεν παρουσιάζει τα συμπτώματα του SARS.

Αρνητικά αποτελέσματα: Μία εξέταση SARS-CoV με αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει ότι ο ασθενής δεν έχει προσβληθεί από το SARS. Τα αίτια ενός αρνητικού αποτελέσματος, παρά την εμφάνιση συμπτωμάτων SARS, μπορούν να είναι:

- κατ το χρόνο της λήψης δείγματος, ο ιός δεν υπήρχε μέσα στο δείγμα (προς το παρόν δεν είναι γνωστό σε ποιό στάδιο της παθογένειας του SARS-CoV είναι δυνατή η απόδειξη παρουσίας του ιού σε ένα ειδικό δείγμα υλικού).
- ο ασθενής παρουσιάζει όμοια συμπτώματα της νόσου SARS, τα οποία έχουν προκληθεί από έναν άλλο παθογόνο παράγοντα.

6 Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR

Η διάγνωση παθογόνων οργανισμών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου παράγοντα. Στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου η ανίχνευση γίνεται με τη βοήθεια φθορίζουσων χρωστικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσκολλώνται ειδικά στο προϊόν του πολλαπλασιασμού της PCR. Η μέτρηση των εντάσεων φθορισμού, κατά την εξέλιξη της PCR πραγματικού χρόνου, 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 *artus* SARS RG RT-PCR Kit είναι ένα σύστημα έτοιμο προς χρήση για την ανίχνευση του RNA του SARS-CoV, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στο *artus 3000* ή στο *Rotor-Gene 3000*. Το *SARS-CoV RG/TM Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την αντίστροφη μεταγραφή και τον ειδικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος μεγέθους 92 bp, του γονιδιώματος του SARS-CoV καθώς και για την άμεση ανίχνευση του προϊόντος

πολλαπλασιασμού στο κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM του *artus 3000™* ή του *Rotor-Gene 3000*. Πέραν αυτού, το *artus SARS RG RT-PCR Kit* περιέχει, για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR, ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα πολλαπλασιασμού. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμού Cycling A.JOE. Επιπλέον δεν επηρεάζεται αρνητικά το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής RT-PCR του SARS-CoV (βλέπε **11.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Ανατρέξτε σχετικά στην ενότητα **8.4 Ποσοτικοποίηση**.

8 Πρωτόκολλο

8.1 Προαναλυτική διαδικασία: λήψη, φύλαξη και μεταφορά των δειγμάτων

Λάβετε υπόψη: Όλα τα δείγματα να χειρίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Σημαντικό: Τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα καταδεικνύουν το πτύελο ως το καταλληλότερο υλικό δείγματος για την ανίχνευση του SARS-CoV. Για αυτό το λόγο συνιστούμε τη χρήση αυτού του υλικού με το *artus SARS RG RT-PCR Kit*.

Η εσωτερική επαλήθευση του *artus SARS RG RT-PCR Kit* έγινε με δείγματα ορού. Άλλα υλικά δείγματος όπως, το βρογχιακό κυψελιδικό έκπλυμα (BKE), το ρινοφαρυγγικό έκπλυμα, επιχρίσματα, πνευμονικός ιστός και το πτύελο δεν έχουν επαληθευτεί πλήρως. Χρησιμοποιήστε μόνο τα προτεινόμενα κιτ απομόνωσης RNA (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**) για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Για συγκεκριμένα υλικά δείγματος πρέπει να λαμβάνονται οπωσδήποτε υπ' όψη ιδιαίτερες προδιαγραφές για τη λήψη, τη φύλαξη και τη μεταφορά τους.

Λάβετε υπόψη: Προσέξτε τις επίσημες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), τις οποίες θα βρείτε στην διεύθυνση διαδικτύου: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Δειγματοληψία

Για τη λήψη δειγμάτων επιχρίσματος χρησιμοποιήστε τα ακόλουθα υλικά:

Χρησιμοποιήστε μόνο στειλεούς επιχρίσματος με κεφαλή από Dacron[®] ή rayon και λαβή από συνθετική ύλη. **Μην χρησιμοποιείτε στειλεούς επιχρίσματος με λαβή από ξύλο ή αλουμίνιο.**

8.1.2 Φύλαξη δείγματος

Το αποτέλεσμα της εξέτασης μπορεί να επηρεαστεί μέσω μέτριας κατάψυξης ή φύλαξης των δειγμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η φύλαξη των δειγμάτων γίνεται στους 2 - 8°C. (Όταν τα δείγματα επιχρίσματος πρέπει να σταλούν σε ερευνητικό εργαστήριο, η αποστολή τους πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν συντομότερα μετά τη λήψη, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του εργαστηρίου για μεταφορά του SARS-CoV).

Δείγματα επιχρίσματος, τα οποία δεν εξετάζονται αμέσως μετά την άφιξη στο εργαστήριο, να φυλάγονται στους 2 - 8°C και να επεξεργάζονται σε διάστημα μιας ημέρας. Δείγματα επιχρίσματος, τα οποία δεν επεξεργάζονται σε διάστημα μιας ημέρας, από την παραλαβή τους, πρέπει να φυλάγονται στους -20°C ή χαμηλότερη θερμοκρασία και να εξετάζονται σε διάστημα 30 ημερών από την ημερομηνία παραλαβής.

8.1.3 Μεταφορά δειγμάτων

Δείγματα επιχρίσματος πρέπει να μεταφέρονται υπό ψύξη.

Εάν τα δείγματα επιχρίσματος πρέπει να σταλούν σε ερευνητικό εργαστήριο, η αποστολή τους πρέπει να γίνει υπό ψύξη όσο το δυνατόν συντομότερα μετά τη λήψη, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του εργαστηρίου για μεταφορά. Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται σύμφωνα με τις τοπικές και κρατικές

προδιαγραφές, σχετικά με τη μεταφορά παθογόνου υλικού*.

8.2 Απομόνωση RNA

Κιτ απομόνωσης RNA διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Ανάλογα με το πρωτόκολλο του επιλεγμένου κατασκευαστή, χρησιμοποιήστε την καθορισμένη ποσότητα δείγματος για απομόνωση και εκτελέστε την απομόνωση RNA σύμφωνα με τις οδηγίες. Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης:

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης	Αρ. καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Πτύελο, ορός, ΒΚΕ, ρινοφαρυγγικό έκπλυμα	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	περιέχεται
Πνευμονικός ιστός	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	δεν περιέχεται

Κατά τη χρησιμοποίηση πτυέλου ως υλικό δείγματος, παρακαλούμε να λάβετε υπόψη την ακόλουθη υπόδειξη: Για την προετοιμασία του δείγματος, αναμείξτε το δείγμα σε ίσες ποσότητες με ένα διάλυμα 0,9 % NaCl, το οποίο περιέχει 1 % Ν-ακετυλο-κυστεΐνης (Sigma Αρ. κατ. Α8199), (π.χ. 300 μl πτύελο + 300 μl μίγματος NaCl). Μετά την επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, προσθέστε 140 μl του προϊόντος της λύσης για την ακόλουθη απομόνωση RNA με το QIAamp Viral RNA Mini Kit και ακολουθείστε τις περαιτέρω ενδείξεις του πρωτοκόλλου του παρασκευαστή.

- Η προσθήκη του **φορέα RNA** έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και επομένως για την παραλαβή του DNA/RNA. Για να επιτύχουμε μία υψηλότερη σταθερότητα του φορέα RNA, ο οποίος παρέχεται μαζί με το QIAamp Viral RNA Mini Kit, προτείνουμε την ακόλουθη παραλλακτική διαδικασία σύμφωνα με τα δεδομένα του εγχειριδίου του κιτ απομόνωσης:

* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

- a. Αναμίξτε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA πριν από την πρώτη χρήση του κιτ απομόνωσης με 310 μl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης που περιέχεται στο κιτ (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Διαμοιράστε το διάλυμα αυτό του φορέα RNA στον ανάλογο αριθμό ποσοτήτων που αντιστοιχεί στις ανάγκες σας και φυλάξτε αυτές στους -20°C. Αποφύγετε την επαναληπτική απόψυξη (> 2 x) των ποσοτήτων του φορέα RNA.
- b. Πριν από την έναρξη κάθε απομόνωσης πρέπει να παρασκευασθεί ένα πρόσφατο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εάν είναι απαραίτητο *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, βλέπε **8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**) σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα.

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 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 για την απομόνωση	560 μl	ανά 560 μl

- c. Για την απομόνωση χρησιμοποιήστε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως. Αποθήκευση του μίγματος δεν είναι δυνατή.
- Σε διαδικασίες απομόνωσης, στις οποίες χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που περιέχει **αιθανόλη**, βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την εκχύλιση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (3 λεπτά, 13.000 στρ./λεπτό) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει τις πιθανές αναστολές της PCR.
 - Το *artus* SARS RG RT-PCR Kit δεν είναι κατάλληλο για διαδικασίες απομόνωσης που λειτουργούν με βάση τη **φαινόλη**.

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του *artus* SARS RG RT-PCR Kit μπορεί να εισαχθεί κατευθείαν στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**).

8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (SARS-CoV LC/RG/TM IC)*. Με αυτό έχετε τη δυνατότητα να ελέγξετε **τόσο την απομόνωση του RNA, όσο και μία ενδεχομένη 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 εκχύλισης. Χρησιμοποιήστε, για παράδειγμα, το QIAamp Viral RNA Mini Kit και εκτελέστε την εκχύλιση του RNA σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος AVE και στη συνέχεια προσθέστε 6 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Εάν π.χ. η εκχύλιση γίνεται σε 50 μl, τότε προσθέστε αντίστοιχα 5 μl. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο εκχύλισης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και εάν είναι απαραίτητο ο φορέας RNA (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

- στο μίγμα 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 μίγμα *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης/φορέα RNA πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του (αποθήκευση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο μπορεί να οδηγήσει, μετά από μερικές ώρες, σε απώλεια του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και μείωση της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης). **Μην** εισάγετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και το φορέα RNA με την πιπέτα 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 1 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* απευθείας σε 15 μl *SARS-CoV RG/TM Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 15 μl του όπως αναφέρεται παρασκευαζόμενου *Master Mix** και στη συνέχεια προσθέστε 10 μl του καθαρισμένου δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μία διαδικασία για πολλά δείγματα, αυξήστε τις απαραίτητες ποσότητες του *SARS-CoV RG/TM Master* και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**).

8.4 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* ρυθμίστηκαν έναντι προτύπων του ινστιτούτου Robert-Koch, Βερολίνο. Χρησιμοποιούνται όπως ένα δείγμα που έχει ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (10 μl). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης στο *artus 3000* ή στο *Rotor-Gene 3000*, τοποθετήστε και τα τέσσερα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης, ορίστε τα ως πρότυπα στο παράθυρο μενού *Edit Samples* και προσθέστε τις καθορισμένες συγκεντρώσεις (βλέπε *artus 3000 Software Manual* ή *Rotor-Gene Manual*, έκδοση 4.6). Αυτή η πρότυπη καμπύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τις επόμενες ποσοτικοποιήσεις, όταν στην τρέχουσα ανάλυση περιλαμβάνεται τουλάχιστον ένα πρότυπο **μιας** συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η εισαγωγή της ρυθμισμένης πρότυπης καμπύλης (βλέπε *artus 3000™ Software Manual* ή *Rotor-Gene Manual*, έκδοση 4.6). Ωστόσο, σε αυτήν τη μορφή ποσοτικοποίησης πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα απόκλισης στο αποτέλεσμα λόγω της μεταβλητότητας μεταξύ των διαδικασιών PCR.

* 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.

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

Αποτέλεσμα (αντίγραμl)	=	$\frac{\text{Αποτέλεσμα (αντίγραμl)} \times \text{Όγκος εκχύλισης (μl)}}{\text{Όγκος δείγματος (ml)}}$
------------------------	---	--

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: Για την απλούστευση της ποσοτικής αξιολόγησης συστημάτων *artus* στο *artus 3000* ή στο *Rotor-Gene 3000* θα βρείτε σχετικές οδηγίες στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Technical Note for quantitation on the *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000***).

8.5 Προετοιμασία της PCR

Βεβαιωθείτε ότι η μονάδα ψύξης (εξάρτημα του *artus 3000* ή του *Rotor-Gene 3000*) έχει προψυχθεί περίπου στους +4°C. Τοποθετήστε τον απαραίτητο για τις προγραμματισμένες αντιδράσεις αριθμό σωληναρίων PCR. Φροντίστε για κάθε διαδικασία PCR να υπάρχει τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*Water, PCR grade*). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*SARS CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμιγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με επαναληπτική αναστροφή του σωληναρίου αντίδρασης) και τελικά να φυγοκεντρούνται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Για την περίπτωση που με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* θέλετε να ελέγξετε τόσο την απομόνωση του RNA, όσο και μία ενδεχομένη αναστολή της

PCR, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* πρέπει ήδη να έχει προστεθεί για την απομόνωση (βλέπε **8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 1):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>SARS-CoV RG/TM Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>SARS-CoV LC/RG/TM 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	10 µl	ανά 10 µl
	Συνολικός όγκος	25 µl	ανά 25 µl

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

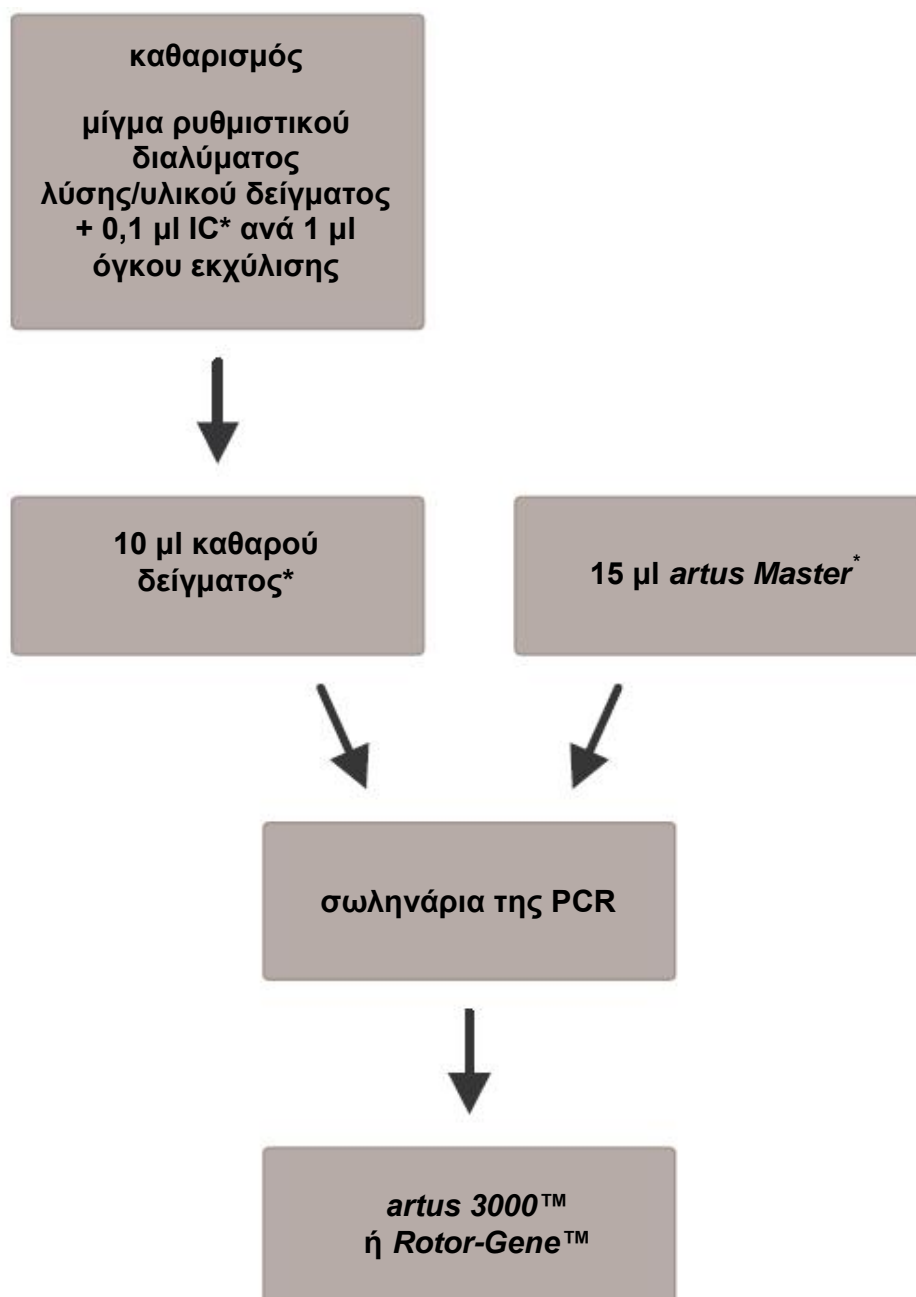
	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>SARS-CoV RG/TM Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>SARS-CoV LC/RG/TM IC</i>	1 µl	12 µl
	Συνολικός όγκος	16 µl*	192 µl*
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl*	ανά 15 µl*
	Δείγμα	10 µl	ανά 10 µl
	Συνολικός όγκος	25 µl	ανά 25 µl

Εισάγετε με πιπέτα σε κάθε σωληνάριο PCR 15 µl του Master Mix. Στη συνέχεια εισάγετε 10 µl από το εκχύλισμα του απομονωμένου RNA και αναμίξτε καλά με πολλαπλή αναρρόφηση και έγχυση με την πιπέτα. Αντίστοιχα πρέπει να προστεθούν ως θετικό πρότυπο ελέγχου 10 µl από ένα τουλάχιστον *πρότυπο ποσοτικοποίησης (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* και ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου 10 µl νερό (*Water, PCR grade*). Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Λάβετε

* 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.

υπόψη ότι στην κεφαλή θα πρέπει να τοποθετείται ένας *Locking Ring* (εξάρτημα του *artus 3000™* ή του *Rotor-Gene™ 3000*), για να εμποδίζεται το τυχαίο άνοιγμα των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

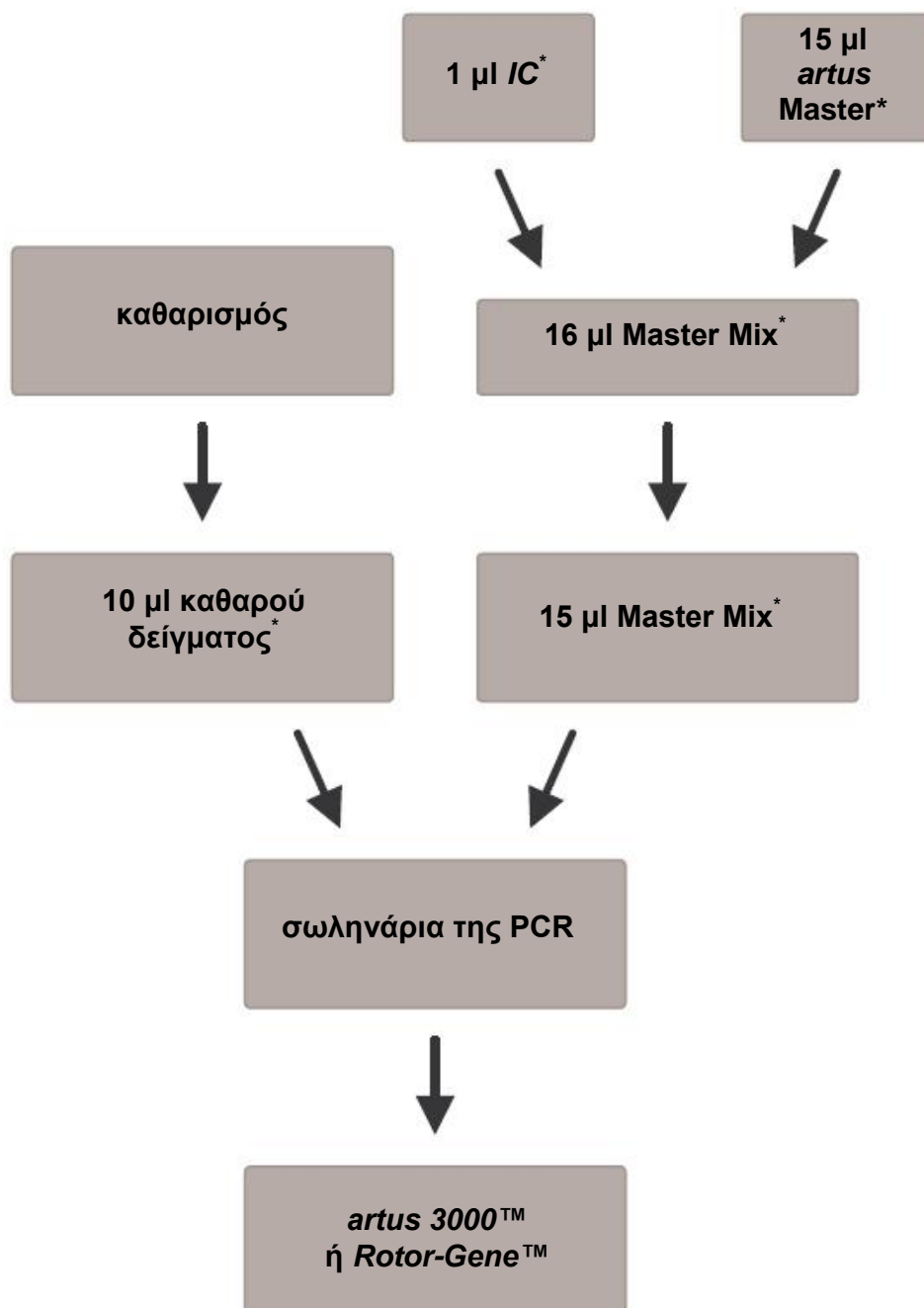
Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στην απομόνωση



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

*Σε κάθε βήμα επεξεργασίας με πιπέτα πρέπει οπωσδήποτε να φροντίσετε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμιξη 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.

*Σε κάθε βήμα επεξεργασίας με πιπέτα πρέπει οπωσδήποτε να φροντίσετε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμιξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

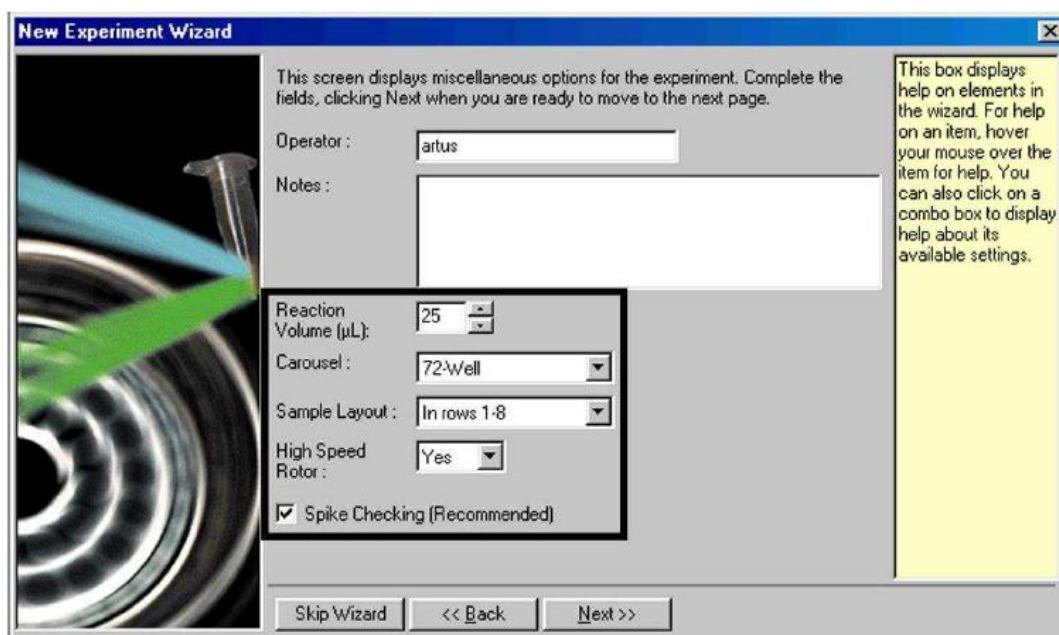
8.6 Προγραμματισμός του *artus 3000* ή του *Rotor-Gene 3000*

Για την ανίχνευση του RNA του SARS-CoV ρυθμίστε στο *artus 3000* ή στο *Rotor-Gene 3000* σας ένα προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τα ακόλουθα έξι στάδια εργασίας (βλέπε Εικ. 3 - 8).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Ρύθμιση γενικών παραμέτρων PCR | Εικ. 3 |
| B. | Αντίστροφη μεταγραφή του RNA | Εικ. 4 |
| C. | Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start | Εικ. 5 |
| D. | Πολλαπλασιασμός του cDNA | Εικ. 6 |
| E. | Ρύθμιση της ευαισθησίας των καναλιών φθορισμού | Εικ. 7 |
| F. | Εκκίνηση της διαδικασίας <i>artus 3000</i> ή <i>Rotor-Gene 3000</i> | Εικ. 8 |

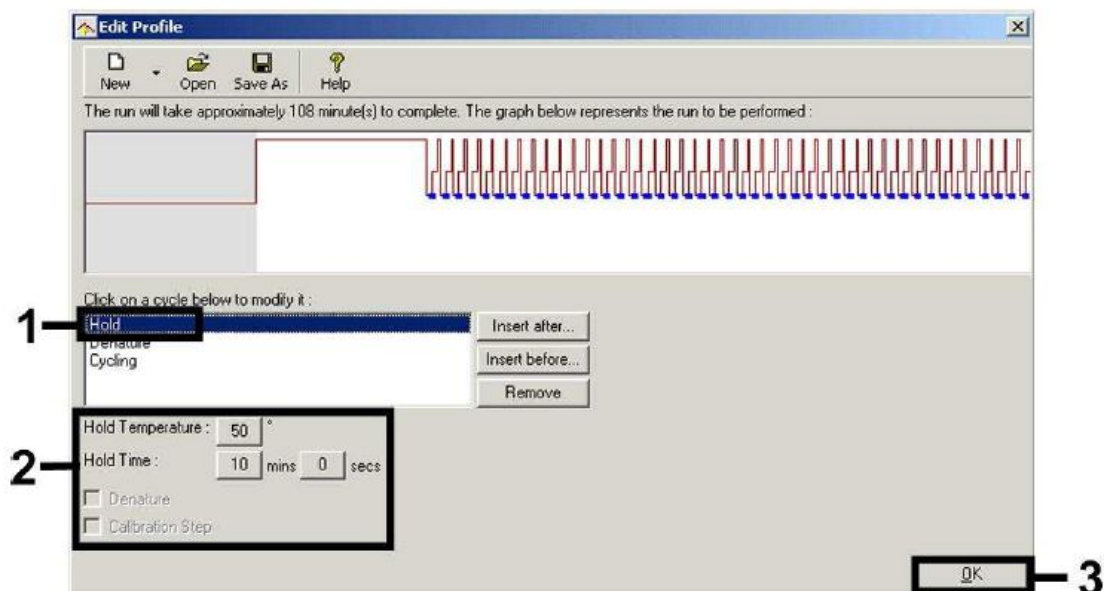
Όλες οι οδηγίες αφορούν το λογισμικό *artus 3000*, έκδοση 5.0.69 ή το λογισμικό *Rotor-Gene*, έκδοση 4.6.94. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό του *artus 3000* ή του *Rotor-Gene 3000* θα βρείτε στο *artus 3000 Software Manual* ή στο *Rotor-Gene Manual*, έκδοση 4.6. Στις εικόνες οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με μαύρο πλαίσιο.

Εισάγετε πρώτα τον όγκο αντίδρασης PCR στο παράθυρο μενού *New Experiment Wizard* (Οδηγός νέου περάματος, βλέπε Εικ. 3).

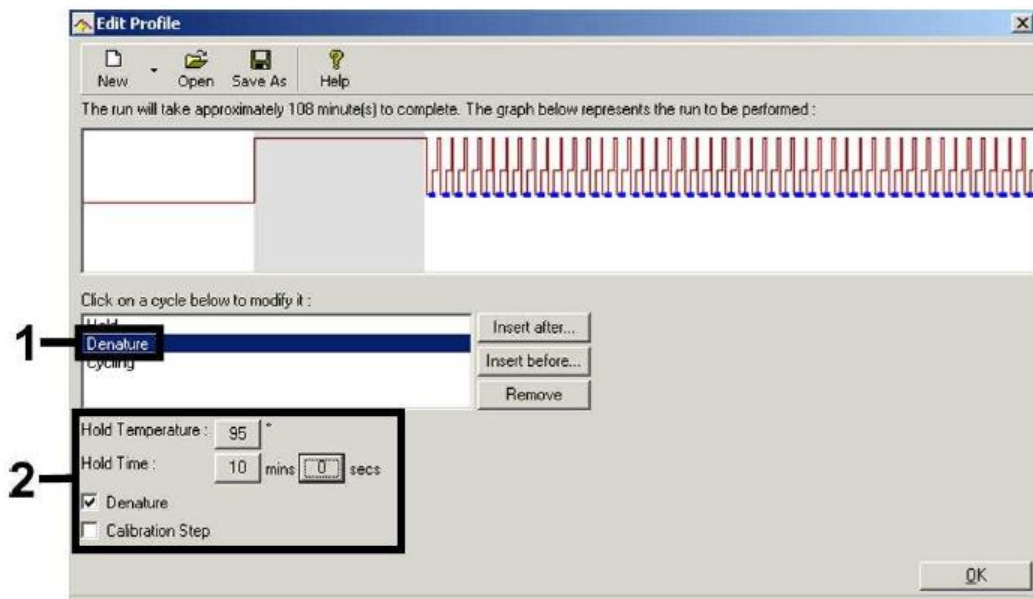


Εικ. 3: Ρύθμιση γενικών παραμέτρων PCR.

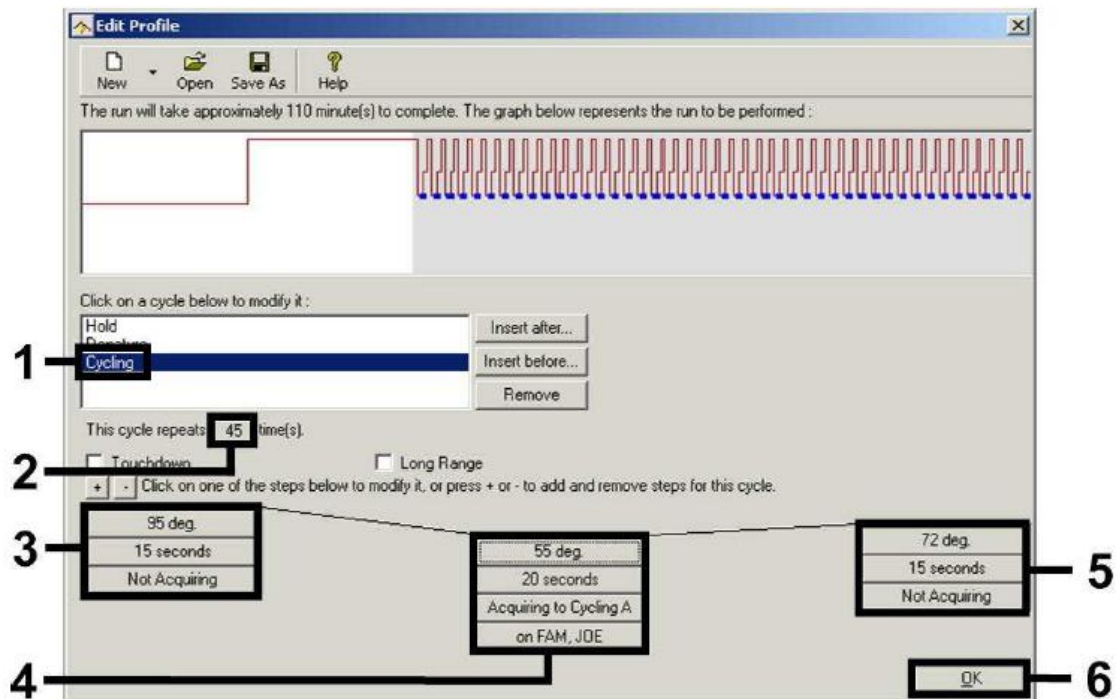
Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας εκτελείται με την ενεργοποίηση της λειτουργίας *Edit* στο επόμενο παράθυρο μενού *New Experiment Wizard* (βλέπε Εικ. 4, 5 και 6).



Εικ. 4: Αντίστροφη μεταγραφή του RNA.

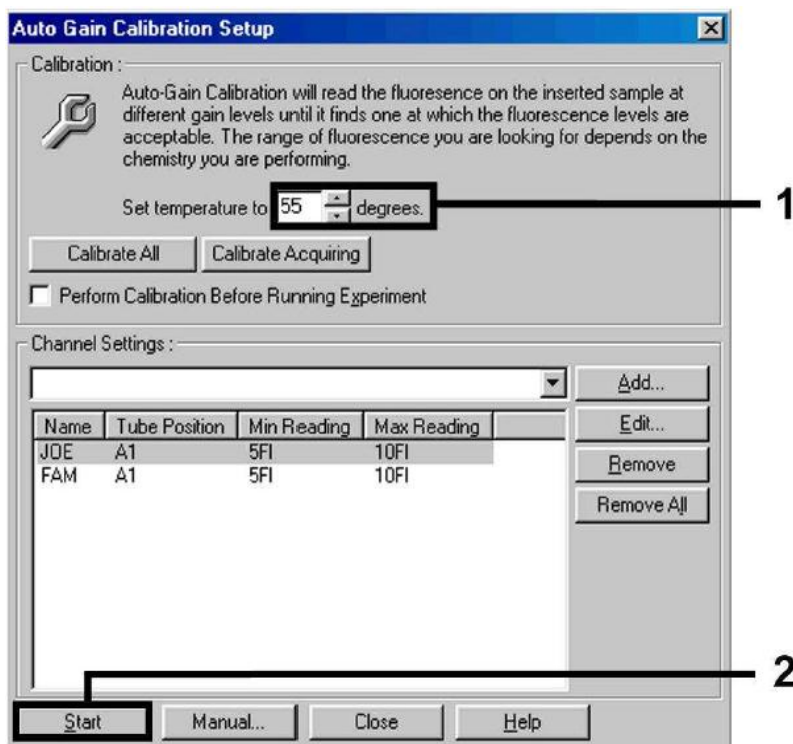


Εικ. 5: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start



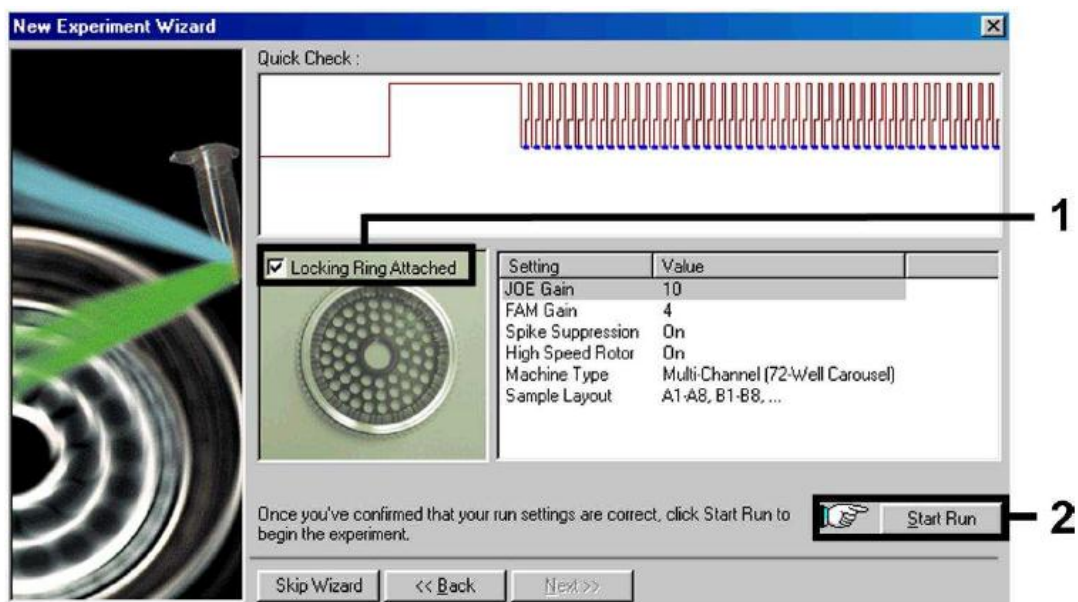
Εικ. 6: Πολλαπλασιασμός του cDNA.

Η περιοχή μέτρησης των καναλιών φθορισμού θα πρέπει να καθορίζεται σε αντιστοιχία με τις εντάσεις φθορισμού στα μίγματα PCR. Η ρύθμιση αυτή γίνεται στο παράθυρο μενού *Auto Gain Calibration Setup* (Ρύθμιση βαθμονόμησης αυτόματης απολαβής) (Ενεργοποίηση στο παράθυρο μενού *New Experiment Wizard*, ενότητα *Calibrate*). Προσαρμόστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στη θερμοκρασία υβριδισμού του προγράμματος πολλαπλασιασμού (βλέπε Εικ. 7).



Εικ. 7: Ρύθμιση της ευαισθησίας των καναλιών φθορισμού.

Οι τιμές *Gain* που εξάγονται από τη βαθμονόμηση του καναλιού αποθηκεύονται αυτόματα και εμφανίζονται στο τελευταίο παράθυρο μενού του προγραμματισμού (βλέπε Εικ. 8).



Εικ. 8: Εκκίνηση της διαδικασίας *artus 3000* ή *Rotor-Gene 3000*.

9 Αξιολόγηση

Η αξιολόγηση γίνεται με το λογισμικό *artus 3000* ή *Rotor-Gene* σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (*artus 3000 Software Manual* ή *Rotor-Gene Manual*, έκδοση 4.6).

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Στο κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM ανιχνεύεται ένα σήμα.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: Το δείγμα περιέχει RNA του SARS-CoV.

Στην περίπτωση αυτή η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling A.JOE είναι άνευ σημασίας, δεδομένου ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις εκκίνησης του RNA του SARS-CoV (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling A.FAM) ενδέχεται να οδηγούν σε μειωμένο έως ανύπαρκτο σήμα φθορισμού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι Cycling A.JOE (Ανταγωνισμός).

2. Στο κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα, παρά μόνο στο κανάλι Cycling A.JOE (σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*).

Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο RNA του SARS-CoV. Συνεπώς, το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

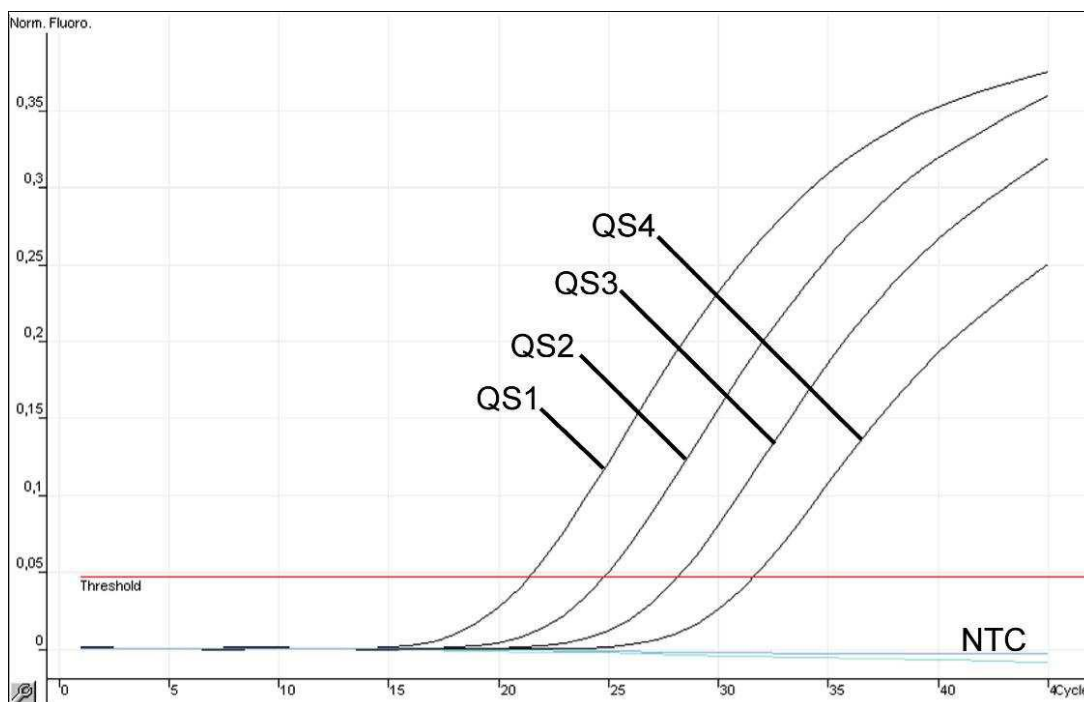
Όταν η RT-PCR του SARS-CoV είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της RT-PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα σε κανένα από τα κανάλια Cycling A.FAM ή Cycling A.JOE.

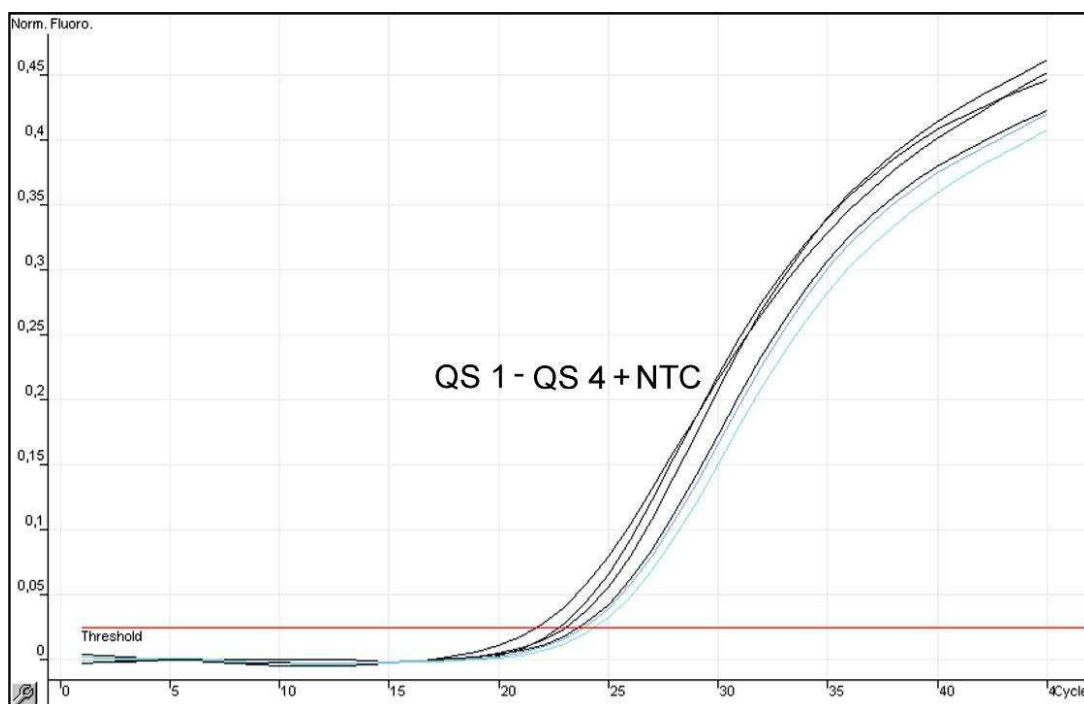
Δεν υπάρχει δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

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

Παραδείγματα για θετικές και αρνητικές αντιδράσεις PCR εμφανίζονται στις εικόνες 9 και 10.



Εικ. 9: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).



Εικ. 10: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling A.JOE με ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό των προτύπων ποσοτικοποίησης (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).

10 Αντιμετώπιση προβλημάτων

Κανένα σήμα στα θετικά πρότυπα ελέγχου (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) στο κανάλι φθορισμού Cycling.A.FAM:

- Το κανάλι φθορισμού που επιλέξατε, κατά την ανάλυση των δεδομένων της PCR, δεν ανταποκρίνεται στα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου.
 - Διαλέξτε, για την ανάλυση των δεδομένων, το κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM για την αναλυτική RT-PCR του SARS-CoV και το κανάλι φθορισμού Cycling A.JOE για την RT-PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του *artus 3000* ή του *Rotor-Gene 3000* είναι εσφαλμένος.
 - Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με τα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου (βλέπε **8.6 Προγραμματισμός του *artus 3000* ή του *Rotor-Gene 3000***).
- Εσφαλμένη διάταξη της αντίδρασης της PCR.
 - Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης, για ένα ή περισσότερα υλικά του κιτ, δεν αντιστοιχούν στις αναφερόμενες προδιαγραφές του κεφαλαίου **2. Αποθήκευση** ή η ημερομηνία λήξης του *artus SARS RG RT-PCR Kit* έχει περάσει.
 - 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 ή ανύπαρκτο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι φθορισμού Cycling A.JOE με ταυτόχρονη απουσία ενός σήματος στο κανάλι Cycling A.FAM:

- 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 διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του RNA το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την εκχύλιση, έχει εκτελεστεί (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**).
- Υφίστανται απώλειες RNA κατά τον καθαρισμό.
 - Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην απομόνωση, μπορεί η απουσία του σήματος του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* να σημαίνει απώλειες RNA κατά τον καθαρισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα υλικά του kit δεν αντιστοιχούν στις αναφερόμενες προδιαγραφές του κεφαλαίου **2. Αποθήκευση** ή η ημερομηνία λήξης του *artus SARS RG RT-PCR Kit* έχει περάσει.
 - 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 στα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο κανάλι φθορισμού Cycling A.FAM της αναλυτικής RT-PCR.

- Υφίσταται μία επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR.
 - Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια κατ' επανάληψη.
 - Εά είναι δυνατόν, κλείστε τα σωληνάρια της PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που είναι προς εξέταση.
 - Εισάγετε με πιπέτα τα θετικά πρότυπα ελέγχου κατά κανόνα στο τέλος.
 - Βεβαιωθείτε ότι οι χώροι εργασίας και τα μηχανήματα απολυμαίνονται συχνά.
- Υφίσταται μία επιμόλυνση κατά τον καθαρισμό.
 - Επαναλάβετε την απομόνωση και την PCR των εξεταζόμενων δειγμάτων με τη χρησιμοποίηση νέων αντιδραστηρίων.

- Βεβαιωθείτε ότι οι χώροι εργασίας και τα μηχανήματα απολυμαίνονται συχνά.

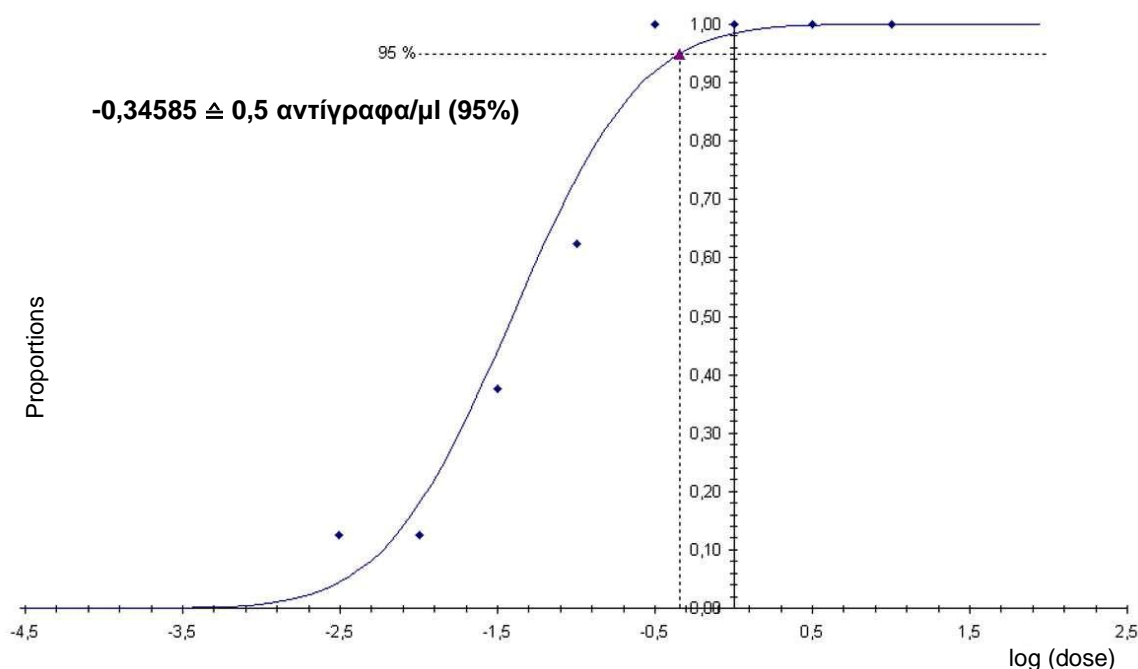
Στην περίπτωση που προκύψουν άλλα ερωτήματα ή προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τεχνική μας εξυπηρέτηση.

11 Ειδικά χαρακτηριστικά

11.1 Αναλυτική ευαισθησία

Για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του *artus* SARS RG RT-PCR Kit δημιουργήθηκε μία πρότυπη σειρά αραιώσεων από 10 ως την ονομαστική τιμή 0,003 των *in vitro* μεταγραφημένων αντιγράφων RNA ανά μl του υποτύπου του SARS-CoV και αναλύθηκε με το *artus* SARS LC RG-PCR Kit. Οι έλεγχοι εκτελέσθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Η γραφική της αξιολόγηση εμφανίζεται στην εικόνα 11. Κατά συνέπεια, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του *artus* SARS LC RG-PCR Kit βρίσκεται στα 0,5 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 0,5 αντίγραφα/μl μπορούν να ανιχνευθούν με πιθανότητα 95 %.

Ανάλυση Probit: SARS-Κορωναϊός (artus 3000/Rotor-Gene 3000)



Εικ. 11: Αναλυτική ευαισθησία του *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του *artus* SARS RG RT-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. Με αυτόν τον τρόπο έχει ελεγχθεί και η ανιχνευσιμότητα όλων των σημαντικών υπο-/γονοτύπων.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση 30 διαφορετικών δειγμάτων ορού, τα οποία ήταν αρνητικά στον SARS-CoV. Αυτά δεν εμφάνισαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για SARS-CoV εκκινητές και ανιχνευτές που περιέχονται στο *SARS-CoV RG/TM Master*.

Για τον καθορισμό της ειδικότητας του *artus* SARS RG RT-PCR Kit, εξετάστηκε η ομάδα ελέγχου που αναφέρεται στον πίνακα 1, για διασταυρωμένη αντίδραση. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση.

Πίνακας 1: Ειδικός έλεγχος του kit με δυνητικά διασταυρωμένης αντίδρασης παθογόνους παράγοντες.

Ομάδα ελέγχου	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV 212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

11.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακριβείας, για το *artus* SARS RG RT-PCR Kit, επιτρέπουν την εξακρίβωση της ολικής διακύμανσης (ολική διασπορά) του συστήματος ανάλυσης. Αυτή η ολική διακύμανση προέρχεται από την **μεταβλητότητα Intra-assay** (διασπορά δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης μέσα σε ένα πείραμα), την **μεταβλητότητα Inter-assay** (διασπορά λόγω της χρήσης διαφόρων συσκευών του ίδιου τύπου από διάφορα άτομα εντός ενός εργαστηρίου) και την **μεταβλητότητα Inter-batch** (διασπορά μέσω της χρήσης διαφορετικών 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* SARS RG RT-PCR Kit, βάσει του προτύπου ποσοτικοποίησης με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (QS 4:10 αντίγραφα/μl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει των τιμών Ct των καμπύλων πολλαπλασιασμού. (Ct: *threshold cycle*, Πίνακας 2). Συνεπώς, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος της αναφερομένης συγκέντρωσης ανέρχεται στο 1,66 % (Ct), για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο 1,28 % (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των

εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των τιμών Ct.

	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Intra-assay μεταβλητότητα: SARS-CoV LC/RG/TM QS 4	0,15	0,02	0,48
Intra-assay μεταβλητότητα: Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	0,40	0,15	1,67
Inter-assay μεταβλητότητα: SARS-CoV LC/RG/TM QS 4	0,23	0,05	0,75
Inter-assay μεταβλητότητα: Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	1,13	1,28	4,53
Inter-batch μεταβλητότητα: SARS-CoV LC/RG/TM QS 4	0,52	0,25	1,69
Inter-batch μεταβλητότητα: Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	0,94	0,63	3,62
Ολική διακύμανση: SARS-CoV LC/RG/TM QS 4	0,51	0,26	1,66
Ολική διακύμανση: Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	1,13	1,28	1,28

11.4 Ανθεκτικότητα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας συμβάλλει στην εξέταση του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Για αυτό το σκοπό αναμίχθηκαν 30 αρνητικά στον SARS-CoV δείγματα ορού το καθένα με 1,5 αντίγραφα/μl όγκου εκχύλισης του προτύπου RNA του SARS-COV (τριπλή συγκέντρωση των αναλυτικών ορίων ευαισθησίας), υπέστησαν απομόνωση με το QIAamp Viral RNA Mini Kit (βλέπε **8.2 Απομόνωση RNA**) και αναλύθηκαν με το *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Το ποσοστό αποτυχίας για τον SARS-CoV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0 %. Η ανθεκτικότητα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω της απομόνωσης και της ανάλυσης 30 αρνητικών στον SARS-CoV δειγμάτων ορού. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0 %. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Έτσι η ανθεκτικότητα του *artus* SARS RG RT-PCR Kit ανέρχεται στο ≥ 99 %.

11.5 Επαναληψιμότητα

Τα δεδομένα της επαναληψιμότητας, με σκοπό την τακτική αξιολόγηση της απόδοσης του *artus* SARS RG RT-PCR Kit καθώς και τη σύγκριση της απόδοσής του με άλλα προϊόντα, αποκτώνται με τη συμμετοχή σε πολυκεντρικές μελέτες.

11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *artus* SARS RG RT-PCR Kit αξιολογείται αυτή τη στιγμή σε αρκετές μελέτες.

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*.
- Η ακριβής τήρηση του πρωτοκόλλου είναι απολύτως απαραίτητη, για την επίτευξη άριστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες των επιμέρους στοιχείων. Τα αντιδραστήρια των οποίων έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

13 Πληροφορίες ασφάλειας

Πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με το *artus* SARS RG RT-PCR Kit μπορείτε να βρείτε στο φυλλάδιο δεδομένων ασφάλειας (safety data sheet, SDS). Αυτό μπορείτε να το βρείτε ως σύντομο και ευκολόχρηστο αρχείο PDF στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety.

14 Ποιοτικός έλεγχος

Σε ταυτοποίηση με το σύστημα αποδεδειγμένης ποιοτικής διαχείρισης ISO 9001 και ISO 13485 της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *artus* SARS RG RT-PCR Kit ελέγχθηκε έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών για την εγγύηση της σταθερής ποιότητας του προϊόντος.

15 Βιβλιογραφία

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

16 Ερμηνεία των συμβόλων



Ημερομηνία λήξης



Αριθμός παρτίδας



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός υλικού



Εγχειρίδιο



Διαγνωστικό ιατρικό προϊόν in-vitro



Ethanol



Global Trade Item Number



Το περιεχόμενο επαρκεί για <N> τεστ



Περιορισμοί θερμοκρασίας

QS

Πρότυπο ποσοτικοποίησης

IC

Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

artus SARS RG RT - PCR Kit

Μάρκες και αποποιήσεις
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® *Rotor-Gene*® (QIAGEN Group; Dacron® (Invista, Inc.).

Εμπορικά ονόματα, σήματα κ.τ.λ. που αναφέρονται στο εγχειρίδιο αυτό είναι κατοχυρωμένα ακόμα και αν αυτά δεν έχουν χαρακτηρισθεί.

Το *artus* SARS RG RT-PCR Kit είναι σημασμένο CE διαγνωστικό kit σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό 98/79/EC σχετικό με τη διαγνωστική in vitro. Δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες.

Τα kit QIAamp προορίζονται γενικά για εργαστηριακή χρήση. Τα δεδομένα ή η περιγραφή του προϊόντος δεν προβλέπονται για τη παροχή πληροφοριών όσο αφορά την διάγνωση, προφύλαξη και τη θεραπεία μιας ασθένειας.

Η αγορά των kit *artus* PCR περιλαμβάνει περιορισμένη άδεια χρήσης αυτών στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στη διαγνωστική in vitro για ανθρώπους και ζώα, σε συνδυασμό με θερμικό κυκλοποιητή του οποίου η χρήση στην αυτόματη εκτέλεση της διαδικασίας της PCR καλύπτεται με προπληρωμένο τέλος αδείας το οποίο καταβάλλεται είτε στην Applied Biosystems ή μέσω της αγοράς εξουσιοδοτημένου θερμικού κυκλοποιητή. Η διαδικασία της PCR είναι κατοχυρωμένη μέσω αντίστοιχων διεθνών προστατευομένων δικαιωμάτων των U.S. πατεντών με τα νούμερα 5,219,727 και 5,322,770 και 5,210,015 και 5,176,995 και 6,040,166 και 6,197,563 και 5,994,056 και 6,171,785 και 5,487,972 και 5,804,375 και 5,407,800 και 5,310,652 και 5,994,056 ιδιοκτησία της F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, όλα τα δικαιώματα είναι κατοχυρωμένα.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

