

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *artus*[®] CMV TM PCR



24 (αρ. καταλόγου 4503163)



96 (αρ. καταλόγου 4503165)

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το *ABI PRISM*[®] 7000, 7700 και 7900HT *Sequence Detection System*

Δεκέμβριος 2014 — Έκδοση 1



4503163, 4503165



1046905EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R3

MAT

1046905EL



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	4
2. Φύλαξη	4
3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές	4
4. Γενικές προφυλάξεις	5
5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες	5
6. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	5
7. Περιγραφή προϊόντος	5
8. Πρωτόκολλο	6
8.1 Προαναλυτική διαδικασία: Λήψη, φύλαξη και μεταφορά των δειγμάτων	6
8.1.1 Δειγματοληψία	6
8.1.2 Φύλαξη	6
8.1.3 Μεταφορά δειγμάτων	6
8.1.4 Παρεμβαλλόμενες ουσίες	6
8.2 Απομόνωση DNA	7
8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	7
8.4 Ποσοτικοποίηση	8
8.5 Προετοιμασία της PCR	8
8.6 Προγραμματισμός των <i>ABI PRISM SDS</i>	13
8.6.1 Προγραμματισμός του <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	13
8.6.2 Προγραμματισμός του <i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	15
8.6.3 Προγραμματισμός του <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	19
9. Ανάλυση δεδομένων	23
10. Αντιμετώπιση προβλημάτων	26
11. Ειδικά χαρακτηριστικά	27
11.1 Αναλυτική ευαισθησία	27
11.2 Ειδικότητα	28
11.3 Ακρίβεια	29
11.4 Ανθεκτικότητα	30
11.5 Αναπαραγωγιμότητα	30
11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση	30
12. Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος	30
13. Πληροφορίες ασφάλειας	31
14. Ποιοτικός έλεγχος	31
15. Βιβλιογραφία	31
16. Επεξήγηση των συμβόλων	32

Κιτ *artus* CMV TM PCR

Για τη χρήση σε συνδυασμό με το *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT Sequence Detection System* για την ποσοτική ανίχνευση του DNA του CMV από πλάσμα-EDTA.

Προσοχή: Το κιτ *artus* CMV TM PCR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό τόσο με το *GeneAmp® 5700 SDS* όσο και με την πλάκα 384 βοθρίων του *ABI PRISM 7900HT SDS*.

1. Περιεχόμενο

	Επισημάνση και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4503163 24 αντιδράσεις	Αρ. είδους 4503165 96 αντιδράσεις
Μπλε	<i>CMV TM Master</i>	2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Κίτρινο	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol[†]</i>	1 x 600 μl	1 x 600 μl
Κόκκινο	<i>CMV LC/RG/TM QS 1[‡]</i> <i>1 x 10⁴ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV LC/RG/TM QS 2[‡]</i> <i>1 x 10³ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV LC/RG/TM QS 3[‡]</i> <i>1 x 10² αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV LC/RG/TM QS 4[‡]</i> <i>1 x 10¹ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Πράσινο	<i>CMV TM IC[‡]</i>	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	<i>Νερό (κατηγορίας PCR)</i>	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

[‡] QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης
IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου
Mg-Sol = Διάλυμα μαγνησίου

2. Φύλαξη

Τα υλικά του κιτ *artus* CMV TM 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 +4°C δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- Φυγόκεντρος με κεφαλή για μικροπλακίδια (προαιρετικά)
- Πλάκα αντίδρασης 96 βοθρίων/σωληνάρια αντίδρασης για οπτικές μετρήσεις με αντίστοιχα οπτικά υλικά σφράγισης* (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**)
- Πλαίσιο υποστήριξης δύο μερών 96- βοθρίων για χρήση με σωληνάρια αντίδρασης για οπτικές μετρήσεις [96-Well Tray/Retainer Set (Δίσκος/σετ συγκράτησης 96 βοθρίων), αρ. καταλ. 403 081, Applied Biosystems], βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**
- Επιφάνεια συμπίεσης για χρήση με οπτικά αυτοκόλλητα φύλλα [Optical Cover Compression Pads (Επιφάνειες συμπίεσης οπτικών φύλλων), αρ. καταλ. 4 312 639, Applied Biosystems], βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**

* Η χρήση σωληναρίων αντίδρασης για οπτικές μετρήσεις με θολωτά καλύμματα είναι επιτρεπτή μόνο για το όργανο *ABI PRISM 7700 SDS* και προϋποθέτει τροποποίηση του χρόνου έκθεσης (βλέπε **8.6.2 Προγραμματισμός του ABI PRISM 7700 SDS**, 8.6.2.5 Σημαντικές πρόσθετες ρυθμίσεις).

- Εξάρτημα για τη σφράγιση των πλακών αντίδρασης με χρήση οπτικών αυτοκόλλητων φύλλων [*Adhesive Seal Applicator Kit* (Κιτ εφαρμογέα αυτοκόλλητης σφράγισης), αρ. καταλ. 4 333 183, Applied Biosystems]
- *ABI PRISM 7000* (έκδοση λογισμικού 1.0.1), *7700* (έκδοση λογισμικού 1.9.1) ή *7900HT SDS* (έκδοση λογισμικού 2.1)

Προσοχή: Κατά την έναρξη λειτουργίας των συσκευών, απαιτείται οπωσδήποτε μία υπάρχουσα έγκυρη βαθμονόμηση των χρωστικών ουσιών (*PURE SPECTRA COMPONENT FILE*) (Αρχείο στοιχείων καθαρού φάσματος) και του υποβάθρου (*BACKGROUND COMPONENT FILE*) (Αρχείο στοιχείων υποβάθρου).

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, 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 ανάμιξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρησης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή μονάδα ψύξης.

5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (CMV) ανευρίσκεται στο αίμα, στους ιστούς και σχεδόν σε όλες τις εκκρίσεις των προσβεβλημένων ατόμων. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί στοματικά, με τη σεξουαλική επαφή, με μετάγγιση αίματος ή μεταμόσχευση οργάνων, ενδομήτρια ή περιγεννητικά. Η λοίμωξη με τον ιό CMV είναι συνήθως ασυμπτωματική, ακολουθούμενη από εφ' όρου ζωής παραμονή του ιού στον οργανισμό. Εάν εκδηλωθούν συμπτώματα, σε εφήβους ή ενήλικες, μοιάζουν με εκείνα της μονοκυρήνωσης με πυρετό, ασθενή ηπατίτιδα και γενικευμένη αδιαθεσία. Έχουν παρατηρηθεί βαριές λοιμώξεις από CMV, ιδιαίτερα σε ασθενείς που προσβλήθηκαν ενδομήτρια και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

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 CMV TM PCR* είναι ένα σύστημα έτοιμο προς χρήση για την ανίχνευση του DNA του CMV μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στο *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT Sequence Detection System*. Το *CMV TM Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμο για την ειδική ενίσχυση μιας περιοχής 105 bp του γονιδιώματος του CMV. Το προϊόν πολλαπλασιασμού ανιχνεύεται μέσω της μέτρησης φθορισμού FAM™ στο *ABI PRISM SDS*. Πέραν αυτού, το κιτ *artus CMV TM PCR* περιέχει ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR. Αυτό ανιχνεύεται ως πρότυπο *εσωτερικού ελέγχου (IC)* με τη μέτρηση φθορισμού VIC®/JOE™. Δεν μειώνεται το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής PCR του CMV (βλέπε **11.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα **8.4 Ποσοτικοποίηση**.

Προσοχή: Το προφίλ θερμοκρασίας για την ανίχνευση του κυτταρομεγαλοϊού με χρήση του κιτ *artus CMV TM PCR* αντιστοιχεί στα προφίλ του κιτ *artus EBV TM PCR* και του κιτ *artus HSV-1/2 TM PCR*. Συνεπώς, οι προσδιορισμοί PCR αυτών των συστημάτων *artus* μπορούν να διενεργηθούν και να αναλυθούν σε μία μόνο εκτέλεση. Λάβετε υπόψη τις συστάσεις σχετικά με την ανάλυση PCR που δίνονται στα κεφάλαια **8.4 Ποσοτικοποίηση** και **9. Ανάλυση δεδομένων**.

8. Πρωτόκολλο

8.1 Προαναλυτική διαδικασία: Λήψη, φύλαξη και μεταφορά των δειγμάτων

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

Προσοχή: Τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα καταδεικνύουν το μείγμα πλάσμα-EDTA ή πλάσμα-κιτρικό ως το καταλληλότερο υλικό δείγματος για την ανίχνευση του CMV. Για αυτό το λόγο, συνιστούμε τη χρήση των υλικών αυτών με το kit *artus CMV TM PCR*.

Η τεκμηρίωση της εγκυρότητας του kit *artus CMV TM PCR* έγινε με ανθρώπινα δείγματα πλάσματος-EDTA. Άλλα υλικά δείγματος δεν έχουν επαληθευτεί. Χρησιμοποιήστε μόνο τα προτεινόμενα kit απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**) για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Κατά τη λήψη, τη φύλαξη και τη μεταφορά των δειγμάτων πρέπει να λαμβάνονται οπωσδήποτε υπόψη οι ακόλουθες προδιαγραφές.

8.1.1 Δειγματοληψία

Κάθε αιματοληψία έχει σαν αποτέλεσμα τον τραυματισμό αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες, τριχοειδή αγγεία). Επιτρέπεται μόνο η χρήση αβλαβούς και αποστειρωμένου υλικού. Για τη λήψη αίματος διατίθενται υλικά μίας χρήσης. Κατά την παρακέντηση της φλέβας δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται πολύ λεπτές τριχοειδείς βελόνες. Η φλεβική αιματοληψία πρέπει να γίνεται σε κατάλληλα σημεία της περιοχής του εσωτερικού του αγκώνα, του αντιβραχίου ή του μετακαρπίου. Το αίμα παραλαμβάνεται με τυποποιημένα σωληνάρια (κόκκινο κάλυμμα, Sarstedt ή ομοιότυπα σωληνάρια άλλου κατασκευαστή). Πρέπει να παραλαμβάνονται 5 – 10 ml μείγματος αίματος-EDTA. Τα σωληνάρια πρέπει να αναδεύονται με ανατροπή αμέσως μετά τη δειγματοληψία (8 x, χωρίς ανατάραξη).

Προσοχή: Δείγματα από ασθενείς που λαμβάνουν ηπαρίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται (βλέπε **8.1.4 Παρεμβαλλόμενες ουσίες**).

8.1.2 Φύλαξη

Το ολικό αίμα θα πρέπει να διαχωρισθεί στο πλάσμα και τα κυτταρικά του στοιχεία μέσα σε διάστημα έξι ωρών, με φυγοκέντρηση σε 800 – 1.600 x g για 20 λεπτά. Το διαχωρισμένο πλάσμα πρέπει να μεταφερθεί σε αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου. Η ευαισθησία της εξέτασης μπορεί να μειωθεί μέσω κατάψυξης ρουτίνας ή μακροχρόνιας φύλαξης των δειγμάτων.

8.1.3 Μεταφορά δειγμάτων

Το υλικό των δειγμάτων θα πρέπει κατ' αρχήν να μεταφέρεται σε άθραυστο δοχείο μεταφοράς. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποτραπεί ο εν δυνάμει κίνδυνος μόλυνσης λόγω διαφυγής του δείγματος. Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται σύμφωνα με τις ισχύουσες τοπικές και κρατικές προδιαγραφές, σχετικά με τη μεταφορά παθογόνου υλικού.*

Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται εντός έξι ωρών. Δεν συνιστάται αποθήκευση των δειγμάτων στον τόπο λήψης τους. Ταχυδρομική αποστολή είναι δυνατή, σύμφωνα με τις νομικές υποδείξεις για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Συνιστούμε τη μεταφορά των δειγμάτων με υπηρεσία ταχυμεταφορών (courier). Τα δείγματα αίματος πρέπει να αποστέλλονται υπό ψύξη (+2°C μέχρι +8°C) και του πλάσματος υπό κατάψυξη (-20°C).

8.1.4 Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Τα αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης ($\leq 4,5$ mg/dl) και λιπιδίων (≤ 1.100 mg/dl) και τα αιμολυτικά δείγματα δεν επηρεάζουν το αναλυτικό σύστημα CMV. Η ηπαρίνη επηρεάζει την PCR. Δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. Επίσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα ασθενών που υποβάλλονται σε αγωγή με ηπαρίνη.

* International Air Transport Association (Διεθνής Ένωση Αεροπορικών Μεταφορών). Dangerous Goods Regulations (Κανονισμός για τα επικίνδυνα εμπορεύματα), 41η έκδοση, 2000.704.

8.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA του CMV, συνιστάται το ακόλουθο κιτ απομόνωσης:

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Πλάσμα-EDTA	QIAamp [®] DSP Virus Kit (Κιτ QIAamp [®] DSP Virus) (50)	60704	QIAGEN	περιέχεται

- Η χρήση του **φορέα RNA** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Για την επίτευξη βελτιωμένης σταθερότητας του φορέα RNA, ο οποίος παρέχεται με το κιτ QIAamp DSP Virus, ακολουθήστε τις οδηγίες για το χειρισμό και τη φύλαξη του φορέα RNA (βλέπε «Προετοιμασία αντιδραστικών και ρυθμιστικών διαλυμάτων» στο εγχειρίδιο κιτ QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*)).
- Το κιτ απομόνωσης περιλαμβάνει ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης που περιέχουν **αιθανόλη**. Βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την έκλυση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (τρία λεπτά, 13.000 rpm) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει πιθανή αναστολή της PCR.

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του κιτ *artus CMV TM PCR* μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν στη διαδικασία απομόνωσης. Βεβαιωθείτε ότι ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος περιλαμβάνεται στη διαδικασία απομόνωσης. Το αντίστοιχο σήμα του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποτελεί τη βάση για την αξιολόγηση της απομόνωσης (βλέπε **8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**).

8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (CMV TM IC)*. Με αυτό έχετε τη δυνατότητα να **ελέγξετε τόσο την απομόνωση του DNA όσο και μια ενδεχόμενη αναστολή της PCR** (βλέπε Εικ. 1). Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλυσης. Για παράδειγμα, με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus, το DNA εκλύεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ. Επομένως, πρέπει να προστεθούν 6 μl του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Η ποσότητα του προστιθέμενου *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλυσης.

Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και ο φορέας RNA (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

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

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

Για να θεωρηθεί μια απομόνωση ως επιτυχής, πρέπει η τιμή Ct του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος που περιλαμβάνεται στη διαδικασία του καθαρισμού (κιτ QIAamp DSP Virus) στο *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT SDS* να φθάσει σε $Ct = 27 \pm 3$ (*κατώφλι ABI PRISM 7000*: 0,1, *ABI PRISM 7700* και *7900HT SDS*: 0,2). Η αναφερόμενη διασπορά οφείλεται σε διακύμανση μεταξύ μηχανημάτων και διαδικασιών καθαρισμού. Μία υψηλότερη απόκλιση υποδεικνύει την παρουσία προβλημάτων κατά τη διαδικασία καθαρισμού. Σε αυτή την περίπτωση, η διαδικασία καθαρισμού πρέπει να ελεγχθεί και, εάν είναι απαραίτητο, να επικυρωθεί εκ νέου. Στην περίπτωση που προκύψουν άλλα ερωτήματα ή προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τεχνική μας εξυπηρέτηση.

Προαιρετικά, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* μπορεί να χρησιμοποιηθεί **αποκλειστικά για τον έλεγχο μιας ενδεχομένης αναστολής της PCR** (βλέπε Εικ. 2). Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε 2 μl του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* και 5 μl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* ανά αντίδραση απευθείας σε 25 μl *CMV TM Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 30 μl

του παρασκευασμένου όπως αναφέρεται παραπάνω Master Mix^{*} και στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *CMV TM Master*, του *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**).

8.4 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (20 μl). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης σε ένα *ABI PRISM Sequence Detection System*, τοποθετήστε και τα τέσσερα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* και ορίστε τα ως πρότυπα σύμφωνα με την προδιαγραφή των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (βλέπε **8.6 Προγραμματισμός των ABI PRISM SDS**). Δεν είναι εφικτή η εισαγωγή πρότυπων καμπυλών με βάση προηγούμενες διαδικασίες από το λογισμικό *ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS*.

Εάν έχετε ενσωματώσει περισσότερα από ένα συστήματα *artus* έρπητα στην εκτέλεση PCR, αναλύστε αυτά τα διαφορετικά συστήματα με τα αντίστοιχα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* ξεχωριστά.

Προσοχή: Για να διασφαλιστεί η ακριβής ποσοτικοποίηση, συνιστάται έντονα η συμπλήρωση του Master Mix που χρησιμοποιείται για τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* με την αντίστοιχη ποσότητα *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Για το σκοπό αυτό, προσθέστε για κάθε *πρότυπο ποσοτικοποίησης* (*CMV LC/RG/TM QS 1 – CMV LC/RG/TM QS 4*) 2 μl *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και 5 μl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* απευθείας σε 25 μl *CMV TM Master* (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 2). Αυτό το σχήμα μεταφοράς με πιπέτα εφαρμόζεται γενικά για τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* CMV και ανεξάρτητα από τον αριθμό των χρησιμοποιούμενων *προτύπων ποσοτικοποίησης*.

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/μl του υλικού δείγματος:

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

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

Σημαντικό: Για την απλούστευση της ποσοτικής αξιολόγησης συστημάτων *artus* στο όργανο *ABI PRISM 7000 SDS* θα βρείτε σχετικές οδηγίες στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX [τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο *ABI PRISM 7000 SDS* (**Technical Note for quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS**)].

8.5 Προετοιμασία της PCR

Προετοιμάστε, για τις προγραμματισμένες αντιδράσεις, τον απαιτούμενο αριθμό σωληναρίων αντίδρασης ή μία πλάκα αντίδρασης 96 βοθρίων. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα συνιστώμενα υλικά:

Είδος	Περιγραφή	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	Πλαίσιο υποστήριξης [†]	Επιφάνεια συμπίεσης
Οπτική πλάκα αντίδρασης 96 βοθρίων	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	όχι	–
Οπτικά αυτοκόλλητα φύλλα	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	–	ναι

^{*} 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.

[†] Κατά τη χρήση του πλαισίου υποστήριξης δύο τεμαχίων πρέπει να ανοίγετε τα σωληνάρια κατά την εισαγωγή και την εξαγωγή. Για την αποφυγή μολύνσεων λόγω αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιείτε αποκλειστικά το κάτω μέρος του πλαισίου υποστήριξης.

Οπτικά σωληνάκια αντίδρασης	ABI PRISM Optical Tubes, 8 σωληνάκια/ταίνια	4 316 567	Applied Biosystems	ναι	–
Οπτικά σωληνάκια αντίδρασης	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ναι	–
Οπτικά καλύμματα (επίπεδα)	ABI PRISM Optical Caps, 8 καλύμματα/ταίνια	4 323 032	Applied Biosystems	–	όχι

Προσοχή: Η χρήση σωληναρίων αντίδρασης για οπτικές μετρήσεις με θολωτά καλύμματα είναι επιτρεπτή μόνο για το όργανο ABI PRISM 7700 SDS και προϋποθέτει τροποποίηση του χρόνου έκθεσης (βλέπε **8.6.2 Προγραμματισμός του ABI PRISM 7700 SDS**, **8.6.2.5 Σημαντικές πρόσθετες ρυθμίσεις**).

Κατά την προετοιμασία της PCR, φροντίστε ώστε σε κάθε διαδικασία PCR να υπάρχει τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*νερό, κατηγορίας PCR*). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4)*.

Προσοχή: Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, συνιστάται έντονα η συμπλήρωση του Master Mix που χρησιμοποιείται για τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* με την αντίστοιχη ποσότητα *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* (βλέπε **8.4 Ποσοτικοποίηση**). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμειγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και στη συνέχεια να φυγοκεντρώνται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Για την περίπτωση που με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* θέλετε να **ελέγξετε τόσο την απομόνωση του DNA όσο και μία ενδοχόμενη αναστολή της PCR**, το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου πρέπει ήδη να έχει προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε **8.3 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	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	0 µl	0 µl
	Συνολικός όγκος	30 µl	360 µl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	30 µl	ανά 30 µl
	Δείγμα	20 µl	ανά 20 µl
	Συνολικός όγκος	50 µl	ανά 50 µl

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

		Αριθμός δειγμάτων	
		1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	2 µl	24 µl
	Συνολικός όγκος	32 µl*	384 µl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	30 µl	ανά 30 µl
	Δείγμα/CMV LC/RG/TM QS 1 – 4	20 µl	ανά 20 µl
	Συνολικός όγκος	50 µl	ανά 50 µl

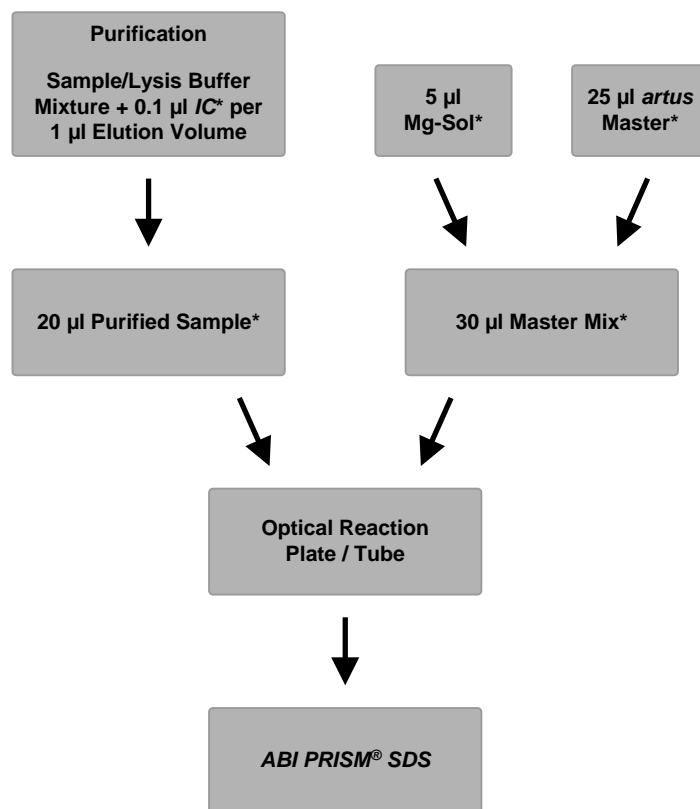
* Η αύξηση όγκου μέσω της προσθήκης του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*, κατά την προετοιμασία της αντίδρασης PCR, είναι αμελητέα. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

Εισάγετε με πιπέτα, σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης ή σε κάθε απαιτούμενη κοιλότητα της πλάκας αντίδρασης 96 βοθρίων, 30 μl του Master Mix. Στη συνέχεια προσθέστε 20 μl εκλούσματος από την απομόνωση DNA. Φροντίστε για την καλή ανάμειξη του διαλύματος με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα. Σφραγίστε τα σωληνάκια με τα αντίστοιχα καλύμματα, ή εναλλακτικά, κατά τη χρήση μιας πλάκας αντίδρασης 96 βοθρίων, με οπτικά αυτοκόλλητα φύλλα (*Optical Adhesive*). Για τη συλλογή του όγκου αντίδρασης στον πυθμένα των σωληναρίων ή πλακών, φυγοκεντρήστε τα σωληνάκια (στον υποδοχέα φύλαξης που προβλέπεται για τα σωληνάκια της PCR) ή την πλάκα αντίδρασης 96 βοθρίων σε συσκευή φυγοκέντρησης με κεφαλή για μικροπλακίδια, για 30 δευτερόλεπτα σε 1.780 x g (4.000 rpm). Σε περίπτωση που δεν διαθέτετε μία τέτοια συσκευή φυγοκέντρησης, τότε φροντίστε κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων της PCR να εισάγετε με πιπέτα τόσο το Master Mix, όσο και τον όγκο δειγμάτων στον πυθμένα των σωληναρίων ή των βοθρίων. Αποθηκεύστε τα μείγματα αντίδρασης στους +4°C μέχρι να προγραμματιστεί το όργανο *ABI PRISM SDS* (βλέπε **8.6 Προγραμματισμός των *ABI PRISM SDS***) και μεταφέρετέ τα στη συνέχεια στη συσκευή.

Προσοχή:

- Κατά τη χρήση οπτικών σωληναρίων αντίδρασης σε συνδυασμό με οπτικά καλύμματα, να τοποθετείτε πάντα ένα πλαίσιο υποστήριξης (*δίσκος/σετ συγκράτησης 96 βοθρίων*) στο όργανο (*ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS*). Κατά τη χρήση του πλαισίου υποστήριξης δύο τεμαχίων πρέπει να ανοίγετε τα σωληνάκια κατά την εισαγωγή και την εξαγωγή. Για την αποφυγή μολύνσεων λόγω αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιείτε αποκλειστικά το κάτω μέρος του πλαισίου υποστήριξης.
- Η χρήση οπτικών πλακών αντίδρασης 96 βοθρίων σε συνδυασμό με οπτικά αυτοκόλλητα φύλλα, απαιτεί την τοποθέτηση μιας επιφάνειας συμπίεσης (*Optical Cover Compression Pads*).

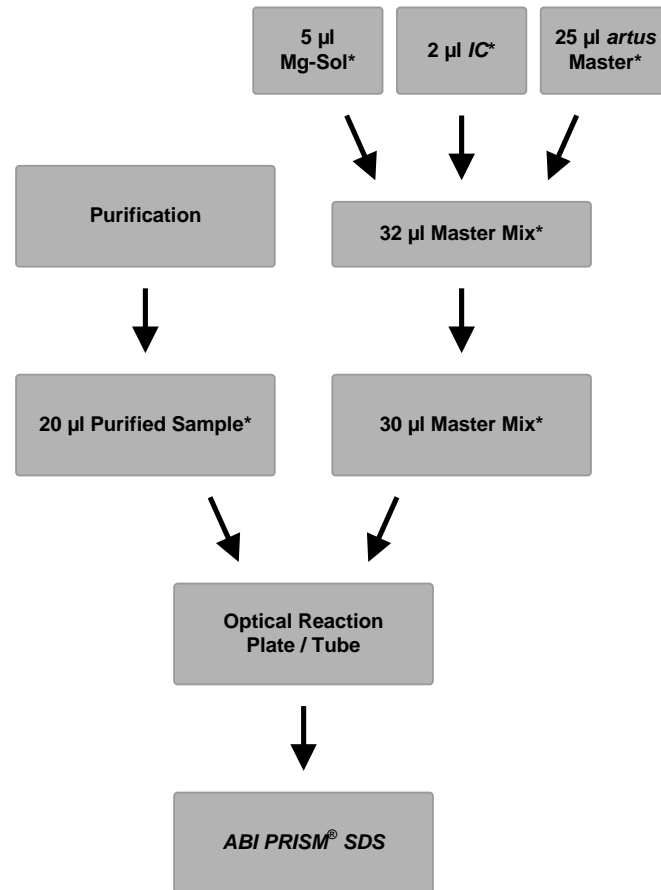
Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία καθαρισμού



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.

8.6 Προγραμματισμός των *ABI PRISM SDS*

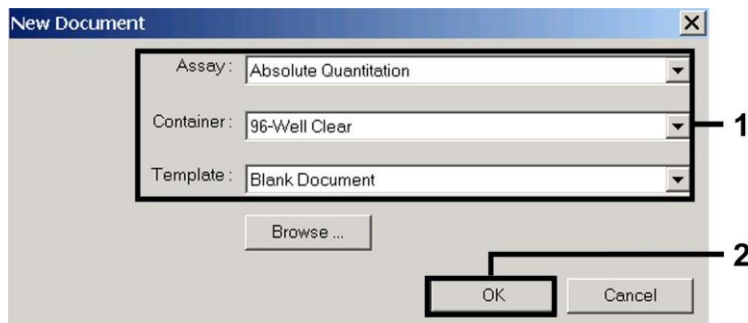
Το λογισμικό του *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT Sequence Detection System (SDS)* απαιτεί, πριν από την έναρξη της διαδικασίας PCR, ορισμένες πρόσθετες πληροφορίες. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στους τρόπους διαδικασίας κατά τον προγραμματισμό των συσκευών, για τους οποίους ακολουθεί περιγραφή σε ξεχωριστά κεφάλαια.

8.6.1 Προγραμματισμός του *ABI PRISM 7000 SDS*

Για την ανίχνευση του DNA του CMV δημιουργήστε στο *ABI PRISM 7000 SDS* ένα προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα έξι στάδια εργασίας (8.6.1.1 – 8.6.1.6). Όλα τα στοιχεία αναφέρονται στο *ABI PRISM 7000 SDS* έκδοση λογισμικού 1.0.1. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό του *ABI PRISM 7000 SDS* μπορείτε να βρείτε στον οδηγό χρήστη *ABI PRISM 7000 SDS (ABI PRISM 7000 SDS User Guide)*. Για καλύτερη επισκόπηση, οι απαραίτητες ρυθμίσεις επισημαίνονται στις απεικονίσεις με μαύρα πλαίσια.

8.6.1.1 Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR

Επιλέξτε στο *ABI PRISM 7000 SDS* από το μενού *FILE* (Αρχείο) την επιλογή μενού *NEW* (Νέο) και προγραμματίστε τις ακόλουθες αρχικές ρυθμίσεις για το νέο έγγραφο (βλέπε Εικ. 3). Στη διάθεσή σας υπάρχει ένα ήδη αποθηκευμένο πρότυπο (*SDS Template (*.sdf)*) το οποίο θα βρείτε στη λίστα *TEMPLATE* (Πρότυπο) ή επιλέγοντάς το με τη λειτουργία *BROWSE* (Περιήγηση) (βλέπε **8.6.1.5 Αποθήκευση της διαδικασίας PCR**). Επιβεβαιώστε τις προκαταρκτικές ρυθμίσεις σας (*OK*).



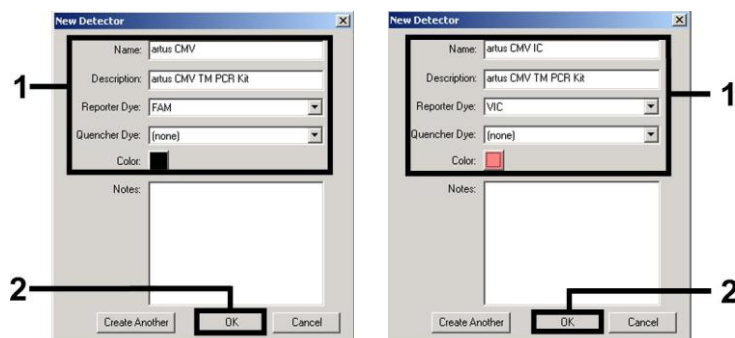
Εικ. 3: Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR [*NEW DOCUMENT* (Νέο έγγραφο)].

8.6.1.2 Δημιουργία/επιλογή των ανιχνευτών

Με τη βοήθεια του υπομενού *DETECTOR MANAGER* (Διαχειριστής ανιχνευτών) που βρίσκεται στην επιλογή *TOOLS* (Εργαλεία) αντιστοιχίστε στο έγγραφο τις κατάλληλες χρωστικές ουσίες ανιχνευτών. Για την ανίχνευση του DNA του CMV καθώς και του προτύπου εσωτερικού ελέγχου, μέσω του κιτ *artus CMV TM PCR*, πρέπει να προσδιορίζονται οι reporters (ανιχνευτές φθορισμού)/quenchers (αναστολείς φθορισμού) που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Ανίχνευση	Reporter	Quencher
CMV DNA	FAM	NONE
Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (CMV TM IC)	VIC	NONE

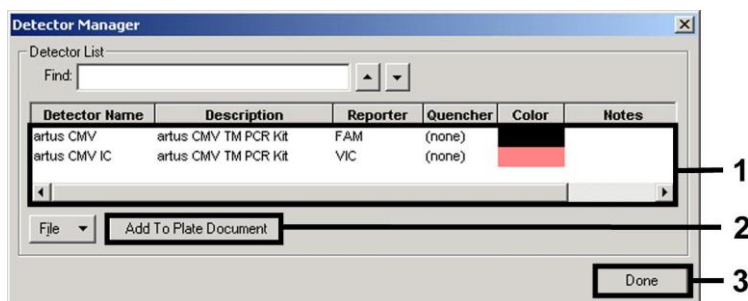
Για τη δημιουργία αυτών των ανιχνευτών, επιλέξτε την επιλογή *FILE* (Κάτω αριστερά του *DETECTOR MANAGER*) και στη συνέχεια την επιλογή *NEW*.



Εικ. 4: Δημιουργία του ειδικού ανιχνευτή CMV (DETECTOR MANAGER).

Εικ. 5: Δημιουργία του ειδικού ανιχνευτή IC (DETECTOR MANAGER).

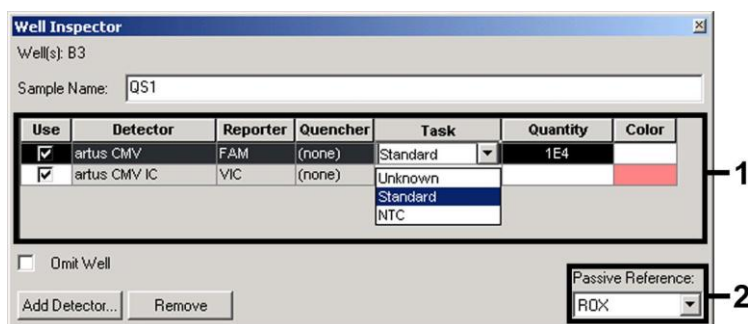
Για την ανίχνευση του DNA του CMV, καθορίστε το συνδυασμό ανιχνευτή/αναστολέα φθορισμού **FAM/NONE** (κανένα) στο νέο παράθυρο. Για την ανίχνευση του *πρότυπου εσωτερικού ελέγχου*, επιλέξτε το συνδυασμό **VIC/NONE** (όπως φαίνεται στην Εικ. 4 και Εικ. 5). Με την επιβεβαίωση της ενέργειας (OK) επιστρέψετε στο *DETECTOR MANAGER*. Επισημάνετε τους ανιχνευτές που δημιουργήθηκαν και μεταφέρετε κάθε επιλογή στο *WELL INSPECTOR* (Ελεγκτής βοθρίου) κάνοντας κλικ στην επιλογή *ADD TO PLATE DOCUMENT* (Προσθήκη στο έγγραφο πλάκας) (βλέπε Εικ. 6). Κλείστε το παράθυρο [*DONE* (Ολοκληρώθηκε)].



Εικ. 6: Επιλογή των ανιχνευτών (DETECTOR MANAGER).

8.6.1.3 Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών

Από το μενού *VIEW* (Προβολή), ανοίξτε τώρα την επιλογή *WELL INSPECTOR*, για να βρείτε τους ανιχνευτές που έχετε επιλέξει από το 8.6.1.2 (βλέπε Εικ. 7).



Εικ. 7: Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών (WELL INSPECTOR).

Επιλέξτε τις κρατημένες θέσεις πλάκας για την ανίχνευση του DNA του CMV. Αντιστοιχίστε στις θέσεις αυτές τους επιλεγμένους ανιχνευτές, ενεργοποιώντας την επιλογή *USE* (Χρήση) και των δύο ανιχνευτών, οπότε εμφανίζεται ένα σύμβολο επιλογής. Για την ονομασία των επιμέρους μειγμάτων αντίδρασης, επιλέξτε την αντίστοιχη θέση στην πλάκα και καταχωρήστε το όνομα [*SAMPLE NAME* (Όνομα δείγματος)]. Λάβετε υπόψη σας ότι τα μείγματα με ίδιο *SAMPLE NAME* και ίδια αντιστοίχιση ανιχνευτών αναγνωρίζονται από το λογισμικό ως επαναλήψεις και προσδιορίζονται αναφορικά με το ποσοτικοποιημένο φορτίο του παθογόνου παράγοντά τους. Επιλέξτε τότε για κάθε τύπο δείγματος την ανάλογη λειτουργία [*TASK* (Εργασία)], σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

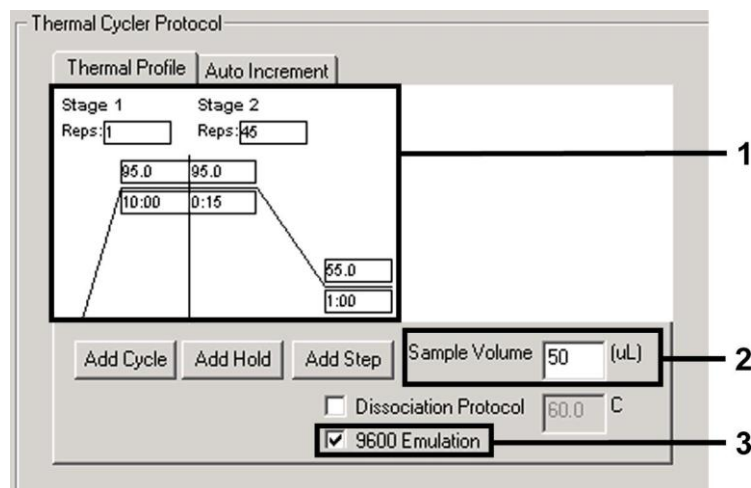
Τύπος δείγματος	Λειτουργία (TASK)	Συγκέντρωση (QUANTITY)	Reporter	Quencher
Δείγμα	UNKNOW N	–	FAM	NONE
Μάρτυρας χωρίς μήτρα	NTC	–	FAM	NONE
Πρότυπο	STANDAR D	βλέπε 1. . Περιεχόμενο	FAM	NONE

Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήστε, σε κάθε διαδικασία PCR, όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) και καταχωρήστε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (βλέπε 1. . Περιεχόμενο) για κάθε επιμέρους πρότυπο (QUANTITY). Λάβετε υπόψη σας ότι για μία διαδικασία PCR με το κιτ *artus CMV TM PCR*, η

ένδειξη **ROX™** πρέπει να ρυθμίζεται ως αναφορά παθητικού [*PASSIVE REFERENCE* (Αναφορά παθητικού)]. Η ομοιόμορφη κατανομή της χρωστικής ουσίας ROX σε όλα τα μείγματα PCR μιας παρτίδας, μέσω της ανάμιξης του *CMV TM Master*, διασφαλίζει την αναγνώριση και τον υπολογισμό των αποκλίσεων tube-to-tube (διαφορές φθορισμού μεταξύ διαφόρων μειγμάτων PCR) με βάση το *Sequence Detection Software* (Κανονικοποίηση).

8.6.1.4 Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας

Για τη δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας, μεταβείτε από το επίπεδο *SETUP* στο επίπεδο *INSTRUMENT* του λογισμικού. Καταχωρήστε το ειδικό προφίλ θερμοκρασίας για την ανίχνευση του DNA του CMV, σύμφωνα με την Εικ. 8. Για την απομάκρυνση του σταδίου 50°C που αποθηκεύτηκε στις προκαταρκτικές ρυθμίσεις, επισημάνετε το με το αριστερό κουμπί του ποντικιού κρατώντας παράλληλα πατημένο το πλήκτρο Shift και στη συνέχεια διαγράψτε το, χρησιμοποιώντας το πλήκτρο Backspace. Ελέγξτε αν ο όγκος αντίδρασης είναι ρυθμισμένος σε 50 μl. Η επιλογή *9600 Emulation* (Προσομοίωση 9600) πρέπει να είναι ενεργοποιημένη και οι προκαταρκτικές ρυθμίσεις του *AUTO INCREMENT* (Αυτόματη επαύξηση) να παραμένουν αμετάβλητες (*AUTO INCREMENT: 0.0°C, 0.0 SECONDS*) (0,0°C, 0,0 δευτερόλεπτα).



Εικ. 8: Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας.

8.6.1.5 Αποθήκευση της διαδικασίας PCR

Στη θέση αυτή μπορείτε να αποθηκεύσετε τις ήδη καταχωρημένες ρυθμίσεις (*SETUP*) ως πρότυπο, για να τις χρησιμοποιήσετε εκ νέου σε επόμενες εφαρμογές σε τροποποιημένη ή μη τροποποιημένη μορφή. Με την αποθήκευση των ρυθμίσεων ως *SDS Template (*.sdt)* στον κατάλογο *TEMPLATE DIRECTORY* (Κατάλογος προτύπου) (*Local Disk [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates*, του λογισμικού Applied Biosystems), το αρχείο αυτό μπορεί να επιλεγεί απευθείας από την αναπτυσσόμενη λίστα *TEMPLATE* στο παράθυρο *NEW DOCUMENT*. Τα πρότυπα που είναι αποθηκευμένα σε άλλους καταλόγους πρέπει να επιλέγονται μέσω της επιλογής *BROWSE*. Πριν από την έναρξη της διαδικασίας PCR, φροντίστε να την αποθηκεύσετε εκ νέου ως *SDS Document (*.sds)* προκειμένου να διασφαλίσετε την αποθήκευση των δεδομένων που συλλέγονται κατά την εξέλιξη της PCR.

8.6.1.6 Έναρξη της διαδικασίας PCR

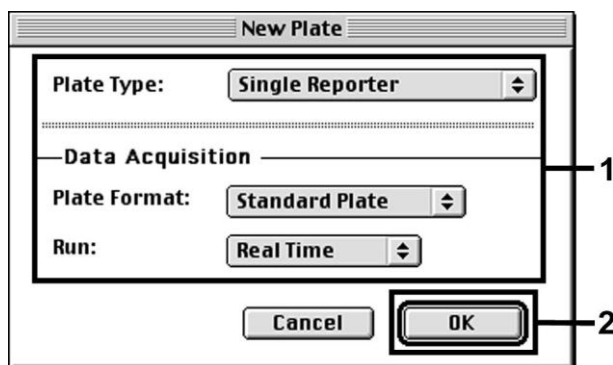
Ξεκινήστε τη διαδικασία PCR επιλέγοντας την επιλογή *START* (Εναρξη) από το στοιχείο μενού *INSTRUMENT* ή το πεδίο *START* στο επίπεδο *INSTRUMENT*.

8.6.2 Προγραμματισμός του ABI PRISM 7700 SDS

Για την ανίχνευση του DNA του CMV δημιουργήστε στο *ABI PRISM 7700 SDS* ένα προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα επτά στάδια εργασίας (8.6.2.1 - 8.6.2.7). Όλα τα στοιχεία αναφέρονται στο *ABI PRISM 7700 SDS* έκδοση λογισμικού 1.9.1. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό του *ABI PRISM 7700 SDS* μπορείτε να βρείτε στο εγχειρίδιο χρήστη *ABI PRISM 7700 SDS* (*ABI PRISM 7700 SDS User's Manual*). Για καλύτερη επισκόπηση, οι απαραίτητες ρυθμίσεις επισημαίνονται στις απεικονίσεις με μαύρα πλαίσια.

8.6.2.1 Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR

Επιλέξτε στο *ABI PRISM 7700 SDS* από το μενού *FILE* την επιλογή μενού *NEW PLATE* (Νέα πλάκα) και προγραμματίστε τις ακόλουθες αρχικές ρυθμίσεις για το νέο έγγραφο (βλέπε Εικ. 9). Επιβεβαιώστε τις προκαταρκτικές ρυθμίσεις (*OK*).



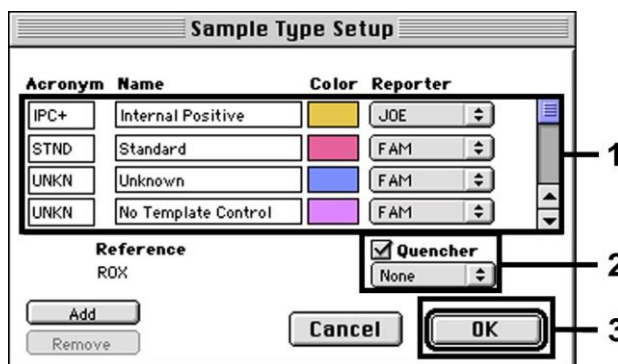
Εικ. 9: Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR (*NEW PLATE*).

8.6.2.2 Επιλογή των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών και αντιστοίχιση του τύπου δείγματος

Με τη βοήθεια του *SAMPLE TYPE SETUP* (Ρύθμιση τύπου δείγματος) [επίπεδο *SETUP: SAMPLE TYPE* (Τύπος δείγματος)/*SAMPLE TYPE SETUP*], αντιστοιχίστε τις αντίστοιχες χρωστικές ανιχνευτών και τον αντίστοιχο τύπο δείγματος στο αρχείο. Για την ανίχνευση του DNA του CMV καθώς και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, μέσω του kit *artus CMV TM PCR*, πρέπει να προσδιορίζονται οι reporters (ανιχνευτές φθορισμού)/quencher (αναστολείς φθορισμού) που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Ανίχνευση	Reporter	Quencher
CMV DNA	FAM	NONE
Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (CMV TM IC)	JOE	NONE

Για τη μέτρηση του DNA του CMV μέσω του kit *artus CMV TM PCR*, επιλέξτε σύμφωνα με τον πίνακα τη χρωστική ουσία reporter **FAM**. Αυτό ισχύει τόσο για τα πρότυπα [STND (Πρότυπο)], τα δείγματα [UNKN (Αγνωστο)] όσο και για τα αρνητικά πρότυπα ελέγχου (UNKN). Για την ανάλυση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* (IPC+) καθορίστε ως reporter το **JOE**. Ως quencher ορίστε το **NONE**. Η αντιστοίχιση των χρωστικών ουσιών και των τύπων δειγμάτων στο παράθυρο *SAMPLE TYPE SETUP* εμφανίζεται στην Εικ. 10.



Εικ. 10: Επιλογή των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών και αντιστοίχιση του τύπου δείγματος (*SAMPLE TYPE SETUP*).

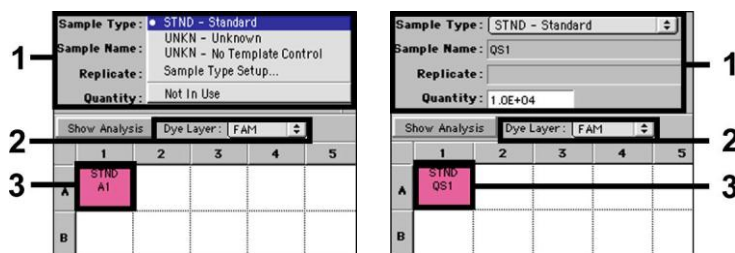
Η αντιστοίχιση του τύπου δείγματος σε μία κατάλληλη λειτουργία (*ACRONYM*) (Ακρονύμιο) επιτυγχάνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Τύπος δείγματος	Λειτουργία (<i>ACRONYM</i>)	Συγκέντρωση (<i>QUANTITY</i>)	Reporter	Quencher
Δείγμα	UNKN	–	FAM	NONE
Μάρτυρας χωρίς μήτρα	UNKN	–	FAM	NONE

Πρότυπο	STND	βλέπε 1. . Περιεχόμενο	FAM	NONE
---------	------	---------------------------	-----	------

8.6.2.3 Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών

Για την αντιστοίχιση των ανιχνευτών και των τύπων δειγμάτων στις επιμέρους θέσεις πλακών επιλέξτε τα αντίστοιχα πεδία. Στη συνέχεια ανοίξτε στο επίπεδο *SETUP* το παράθυρο διαλόγου *DYE LAYER* (Στρώμα χρωστικής) και αντιστοιχίστε τον κατάλληλο reporter. Ενεργοποιώντας το αναδυόμενο μενού *SAMPLE TYPE*, βρίσκετε στην εμφανιζόμενη λίστα τους τύπους δείγματος που έχουν αντιστοιχιστεί στον reporter στην επιλογή *SAMPLE TYPE SETUP* (βλέπε Εικ. 11). Επιλέξτε τον κατάλληλο τύπο δείγματος (βλέπε πίνακα στην ενότητα 8.6.2.2) και καθορίστε τώρα μέσω της επιλογής *DYE LAYER* και του μενού *SAMPLE TYPE* την αντιστοίχιση για τις υπόλοιπες θέσεις πλακών. Στο πεδίο *SAMPLE NAME* είναι δυνατή η αντιστοίχιση κάθε δείγματος σε ένα όνομα. Τα πεδία που καθορίζονται ως *REPLICATE* (Επανάληψη) (καταχώρηση του ονόματος του δείγματος αναφοράς στη στήλη *REPLICATE*) μεσοτιμώνται από το λογισμικό αναφορικά με το ποσοτικοποιημένο φορτίο παθογόνου παράγοντά τους και υπολογίζεται η τυπική απόκλισή τους.

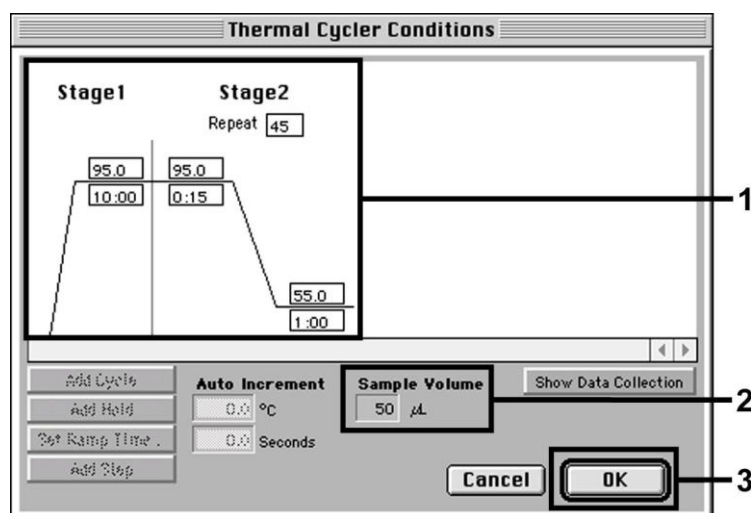


Εικ. 11/12: Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών.

Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήστε, σε κάθε διαδικασία PCR, όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) και καταχωρήστε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (βλέπε 1. **Περιεχόμενο**) για κάθε επιμέρους πρότυπο στο πεδίο *QUANTITY* (βλ. Εικ. 12). Ωστόσο, αυτό είναι εφικτό μόνο όταν οι θέσεις που καταλαμβάνονται με πρότυπα έχουν καθοριστεί προηγουμένως ως τέτοιες, μέσω του μενού *SAMPLE TYPE*.

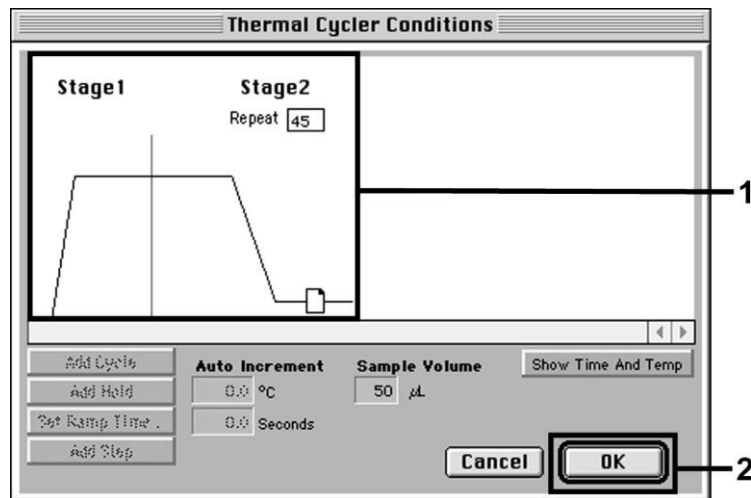
8.6.2.4 Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας

Για τη δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας, κάντε εναλλαγή από το μενού *THERMAL CYCLER CONDITIONS* (συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή) στο επίπεδο *SETUP*. Καταχωρήστε το ειδικό προφίλ θερμοκρασίας για την ανίχνευση του DNA του CMV, σύμφωνα με την Εικ. 13. Ελέγξτε αν ο όγκος αντίδρασης είναι ρυθμισμένος σε 50 μl. Οι προκαταρκτικές ρυθμίσεις των χρονικών διαστημάτων του *RAMP* (Διαβάθμιση) και της επιλογής *AUTO INCREMENT* (Αυτόματη επαύξηση) παραμένουν αμετάβλητες (*RAMP TIME*: 0:00, *AUTO INCREMENT*: 0.0°C, 0.0 SECONDS).



Εικ. 13: Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας.

Επιπλέον, στο μενού *THERMAL CYCLER CONDITIONS* βρίσκεται η επιλογή *SHOW DATA COLLECTION* (Εμφάνιση συλλογής δεδομένων). Αν προβείτε σε αυτή την επιλογή μεταβαίνετε στο παράθυρο που εμφανίζεται στην Εικ. 14. Κάθε θερμοκρασία διαβάθμισης και σταθεροποιημένης κατάστασης διαθέτει ένα *εικονίδιο συλλογής δεδομένων*, που απεικονίζει τη συλλογή των δεδομένων στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της διαδικασίας. Απομακρύνετε όλα τα σύμβολα εκτός από το σύμβολο για το βήμα *ANNEALING* (Αποδιάταξη) [*STAGE2/STEP2* (επίπεδο 2/βήμα 2)], προκειμένου να αποκλείσετε περιττές μετρήσεις φθορισμού. Έτσι ο συνολικός χρόνος διαδικασίας και ο όγκος δεδομένων είναι ο ελάχιστος δυνατός.

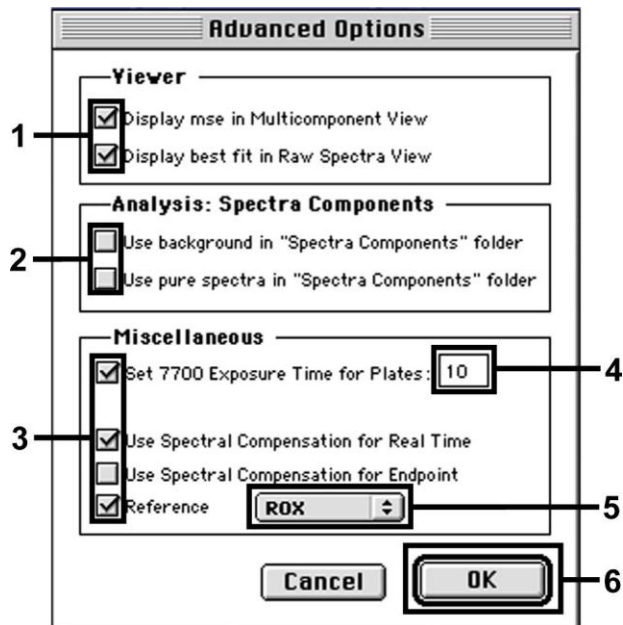


Εικ. 14: Συλλογή δεδομένων.

8.6.2.5 Σημαντικές πρόσθετες ρυθμίσεις

Για τη ρύθμιση του χρόνου έκθεσης (διέγερση των φθορίζουσών χρωστικών ουσιών), καθώς και για την επιλογή των αρχείων *PURE SPECTRA/BACKGROUND* (Καθαρό φάσμα/υπόβαθρο), μεταβείτε από το επίπεδο *SETUP* στο επίπεδο *ANALYSIS* (Ανάλυση). Επιλέξτε το ήδη ενεργοποιημένο δευτερεύον στοιχείο *ADVANCED OPTIONS* (Εξελιγμένες επιλογές) που βρίσκεται στο στοιχείο *DIAGNOSTICS* (Διαγνωστικός έλεγχος) στο μενού *INSTRUMENT*. Πραγματοποιήστε τις ρυθμίσεις σύμφωνα με την Εικ. 15. Με την αδρανοποίηση της λειτουργίας επιλογής *SPECTRA COMPONENTS* (Στοιχεία φάσματος) (*ANALYSIS*), τα τρέχοντα αρχεία βαθμονόμησης που είναι αποθηκευμένα στον κατάλογο *SPECTRA COMPONENTS* κατά τη στιγμή της δημιουργίας των δεδομένων χρησιμοποιούνται αυτόματα κατά την εκ νέου αξιολόγηση ήδη αναλυμένων διαδικασιών. Για την ανάλυση προηγούμενων διαδικασιών με τη χρήση των νεοεισαγμένων *SPECTRA COMPONENTS*, ενεργοποιήστε και τα δύο αυτά πεδία. Λάβετε υπόψη σας ότι για μια διαδικασία PCR με το κιτ *artus CMV TM PCR*, η ένδειξη **ROX** πρέπει να ρυθμίζεται ως αναφορά παθητικού (*REFERENCE*). Η ομοιόμορφη κατανομή της χρωστικής ουσίας ROX σε όλα τα μείγματα PCR μιας παρτίδας μέσω της ανάμειξης του *CMV TM Master* διασφαλίζει την αναγνώριση και τον υπολογισμό των αποκλίσεων tube-to-tube (διαφορές φθορισμού μεταξύ διαφόρων μειγμάτων PCR) με βάση το *Sequence Detection Software* (κανονικοποίηση).

Προσοχή: Ο χρόνος έκθεσης κατά τη χρήση των πλακών αντίδρασης 96 βοθρίων για οπτικές μετρήσεις σε συνδυασμό με οπτικά αυτοκόλλητα φύλλα ή οπτικά σωληνάρια αντίδρασης με επίπεδα καλύμματα ανέρχεται σε δέκα χιλιοστά του δευτερολέπτου. Σε περίπτωση που χρησιμοποιήσετε **οπτικά σωληνάρια αντίδρασης με θολωτά καλύμματα**, τότε ρυθμίστε αυτόν το χρόνο έκθεσης σε **25 χιλιοστά του δευτερολέπτου**.



Εικ. 15: Σημαντικές πρόσθετες ρυθμίσεις (ADVANCED OPTIONS).

8.6.2.6 Αποθήκευση της διαδικασίας PCR

Στη θέση αυτή μπορείτε να αποθηκεύσετε τις ήδη καταχωρημένες ρυθμίσεις (SETUP) ως πρότυπο, για να τις χρησιμοποιήσετε εκ νέου σε επόμενες εφαρμογές σε τροποποιημένη ή μη τροποποιημένη μορφή. Για το λόγο αυτό αποθηκεύστε το αρχείο αυτό σε *STATIONARY FILE FORMAT* (Μορφή στατικού αρχείου). Πριν από την έναρξη της τρέχουσας προγραμματισμένης διαδικασίας PCR, φροντίστε να την αποθηκεύσετε εκ νέου σε μορφή *NORMAL FILE FORMAT* (Μορφή κανονικού αρχείου) προκειμένου να διασφαλίσετε την αποθήκευση των δεδομένων που συλλέγονται κατά την εξέλιξη της PCR.

8.6.2.7 Έναρξη της διαδικασίας PCR

Ξεκινήστε τη διαδικασία κύκλου PCR επιλέγοντας την επιλογή *RUN* (Εκτέλεση) από το στοιχείο μενού *INSTRUMENT* ή το πεδίο *RUN* στο επίπεδο *ANALYSIS*.

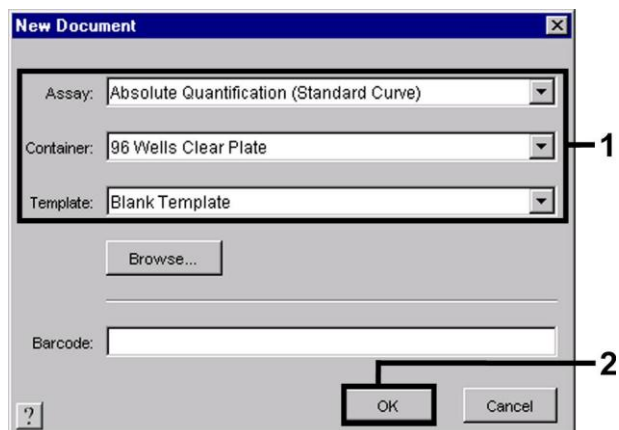
8.6.3 Προγραμματισμός του *ABI PRISM 7900HT SDS*

Για την ανίχνευση του DNA του CMV, δημιουργήστε στο *ABI PRISM 7900HT SDS* ένα προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα έξι στάδια εργασίας (8.6.3.1 – 8.6.3.6). Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο *ABI PRISM 7900HT SDS* έκδοση λογισμικού 2.1. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό του *ABI PRISM 7900HT SDS* μπορείτε να βρείτε στον οδηγό χρήστη *ABI PRISM 7900HT SDS* (*ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*). Για καλύτερη επισκόπηση, οι απαραίτητες ρυθμίσεις επισημαίνονται στις απεικονίσεις με μαύρα πλαίσια.

8.6.3.1 Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR

Επιλέξτε στο *ABI PRISM 7900HT SDS* από το μενού *FILE* την επιλογή μενού *NEW* και προγραμματίστε τις ακόλουθες αρχικές ρυθμίσεις για το νέο έγγραφο (βλέπε Εικ. 16). Στη διάθεσή σας υπάρχει ένα ήδη αποθηκευμένο πρότυπο (*ABI PRISM SDS Template Document* [*.sd \bar{t}]) το οποίο θα βρείτε στη λίστα *TEMPLATE* ή επιλέγοντάς το με τη λειτουργία *BROWSE* (βλέπε 8.6.3.5 Αποθήκευση της διαδικασίας PCR). Επιβεβαιώστε τις προκαταρκτικές ρυθμίσεις (OK).

Προσοχή: Το kit *artus* CMV TM PCR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την πλάκα 384 βοθρίων του *ABI PRISM 7900HT SDS*.



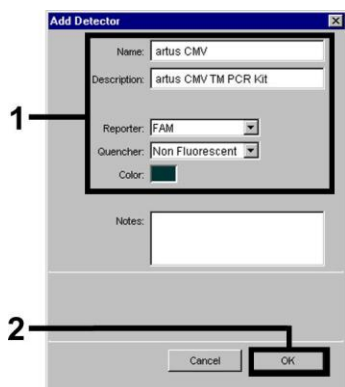
Εικ. 16: Προκαταρκτικές ρυθμίσεις για τη δημιουργία μιας νέας διαδικασίας PCR (NEW DOCUMENT).

8.6.3.2 Δημιουργία/επιλογή των ανιχνευτών

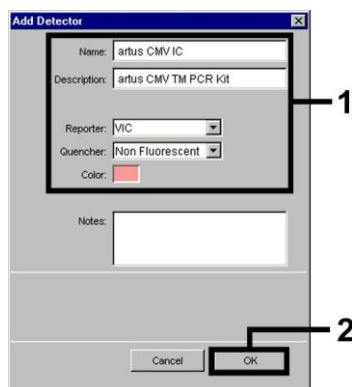
Με τη βοήθεια του υπομενού *DETECTOR MANAGER* από το μενού *TOOLS* [επιλέξτε εναλλακτικά: επίπεδο *SETUP*/λειτουργία *ADD DETECTOR* (Προσθήκη ανιχνευτή)], αντιστοιχίστε στο αρχείο τις κατάλληλες χρωστικές ουσίες ανιχνευτών. Για την ανίχνευση του DNA του CMV καθώς και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, μέσω του κιτ *artus CMV TM PCR*, πρέπει να προσδιορίζονται οι reporters (ανιχνευτές φθορισμού)/quenchers (αναστολείς φθορισμού) που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Ανίχνευση	Reporter	Quencher
CMV DNA	FAM	NON FLUORESCENT
Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (CMV TM IC)	VIC	NON FLUORESCENT

Για τη δημιουργία αυτών των ανιχνευτών, επιλέξτε την επιλογή *NEW* (κάτω αριστερά από το *DETECTOR MANAGER*).

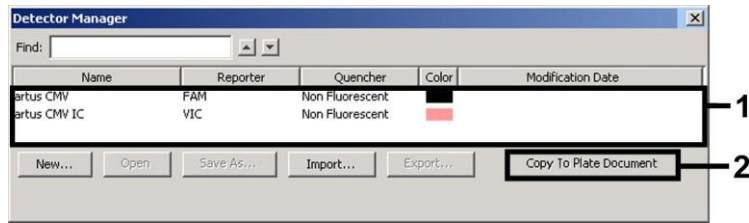


Εικ. 17: Δημιουργία του ειδικού ανιχνευτή IC (*DETECTOR MANAGER*).



Εικ. 18: Δημιουργία του ειδικού ανιχνευτή IC (*DETECTOR MANAGER*).

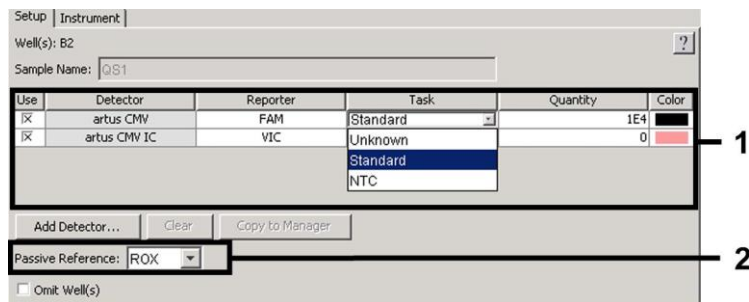
Για την ανίχνευση του DNA του CMV, καθορίστε το συνδυασμό ανιχνευτή/αναστολέα φθορισμού **FAM/NON FLUORESCENT** (μη φθορίζον) στο νέο παράθυρο. Για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, επιλέξτε το συνδυασμό **VIC/NON FLUORESCENT** (όπως φαίνεται στην Εικ. 17 και Εικ. 18). Με την επιβεβαίωση της ενέργειας (*OK*) επιστρέφετε στο *DETECTOR MANAGER*. Επισημάνετε τους ανιχνευτές που δημιουργήθηκαν και μεταφέρετε αυτό που επιλέξατε με την επιλογή *COPY TO PLATE DOCUMENT* (Αντίγραφο στο έγγραφο πλάκας) στην επιλογή επιπέδου *SETUP* (βλέπε Εικ. 19). Κλείστε το παράθυρο (*DONE*).



Εικ. 19: Επιλογή των ανιχνευτών (DETECTOR MANAGER).

8.6.3.3 Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών

Μετά από το κλείσιμο του *DETECTOR MANAGER* (DONE) μπορείτε να βρείτε ξανά τους ανιχνευτές που έχετε επιλέξει στα πλαίσια της ενότητας 8.6.3.2 στο επίπεδο *SETUP*, όπου παρατίθενται σε πίνακα (βλέπε Εικ. 20).



Εικ. 20: Αντιστοίχιση των απαραίτητων πληροφοριών στις θέσεις πλακών.

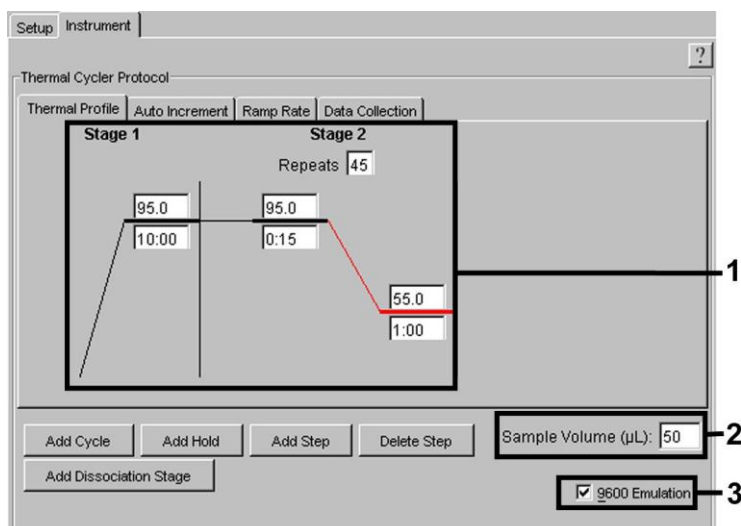
Επιλέξτε τις κρατημένες θέσεις πλάκας για την ανίχνευση του DNA του CMV. Αντιστοιχίστε στις θέσεις αυτές τους επιλεγμένους ανιχνευτές, ενεργοποιώντας την επιλογή *USE* και των δύο ανιχνευτών, οπότε εμφανίζεται ένας σταυρός. Για την ονομασία των επιμέρους μειγμάτων αντίδρασης, επιλέξτε την αντίστοιχη θέση στην πλάκα και καταχωρήστε το όνομα [*SAMPLE NAME* (Όνομα δείγματος)]. Λάβετε υπόψη σας ότι τα μείγματα με ίδιο *SAMPLE NAME* και ίδια αντιστοίχιση ανιχνευτών αναγνωρίζονται από το λογισμικό ως επαναλήψεις και προσδιορίζονται αναφορικά με το ποσοτικοποιημένο φορτίο του παθογόνου παράγοντά τους. Επιλέξτε τότε για κάθε τύπο δείγματος την ανάλογη λειτουργία (*TASK*), σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Τύπος δείγματος	Λειτουργία (<i>TASK</i>)	Συγκέντρωση (<i>QUANTITY</i>)	Reporter	Quencher
Δείγμα	UNKNOW N	–	FAM	NON FLUORESCENT
Μάρτυρας χωρίς μήτρα	NTC	–	FAM	NON FLUORESCENT
Πρότυπο	STANDAR D	βλέπε 1. .Περ ιεχόμενο	FAM	NON FLUORESCENT

Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήστε, σε κάθε διαδικασία PCR, όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) και καταχωρήστε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (βλέπε 1. . **Περιεχόμενο**) για κάθε επιμέρους πρότυπο (*QUANTITY*). Λάβετε υπόψη σας ότι για μία διαδικασία PCR με το kit *artus CMV TM PCR*, η ένδειξη **ROX** πρέπει να ρυθμίζεται ως αναφορά παθητικού (*PASSIVE REFERENCE*). Η ομοιόμορφη κατανομή της χρωστικής ουσίας ROX σε όλα τα μείγματα PCR μιας παρτίδας, μέσω της ανάμειξης του *CMV TM Master*, διασφαλίζει την αναγνώριση και τον υπολογισμό των αποκλίσεων tube-to-tube (διαφορές φθορισμού μεταξύ διαφόρων μειγμάτων PCR) με βάση το *Sequence Detection Software* (κανονικοποίηση).

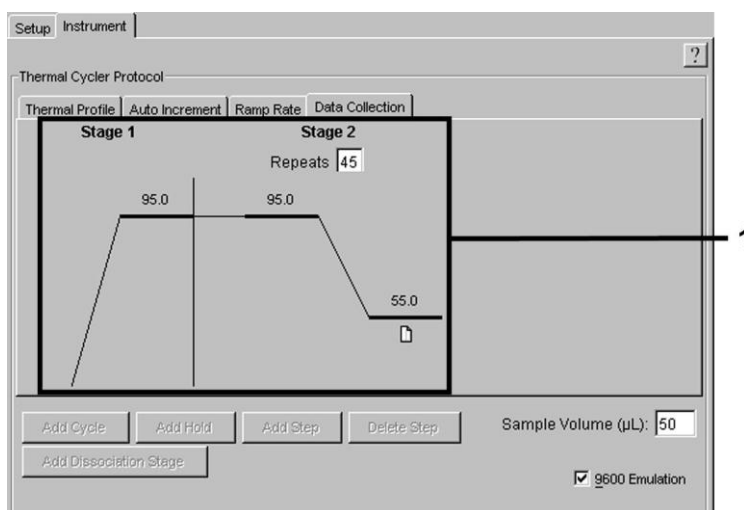
8.6.3.4 Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας

Για τη δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας, μεταβείτε από το επίπεδο *SETUP* στο επίπεδο *INSTRUMENT* του λογισμικού. Καταχωρήστε το ειδικό προφίλ θερμοκρασίας για την ανίχνευση του DNA του CMV, σύμφωνα με την Εικ. 21. Ελέγξτε αν ο όγκος αντίδρασης είναι ρυθμισμένος σε 50 μl. Η επιλογή *9600 Emulation* πρέπει να είναι ενεργοποιημένη και οι προκαταρκτικές ρυθμίσεις των χρονικών διαστημάτων του *RAMP* και της επιλογής *AUTO INCREMENT* να παραμένουν αμετάβλητες (*RAMP TIME: 0:00, AUTO INCREMENT: 0.0°C, 0.0 SECONDS*).



Εικ. 21: Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας.

Επιπλέον στο επίπεδο *INSTRUMENT* βρίσκεται η επιλογή *DATA COLLECTION* (Συλλογή δεδομένων). Αν προβείτε σε αυτή την επιλογή μεταβαίνετε στο παράθυρο που εμφανίζεται στην Εικ. 22. Κάθε θερμοκρασία διαβάθμισης και σταθεροποιημένης κατάστασης διαθέτει ένα *εικονίδιο συλλογής δεδομένων*, που απεικονίζει τη συλλογή των δεδομένων στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της διαδικασίας. Απομακρύνετε όλα τα σύμβολα εκτός από το σύμβολο για το βήμα *ANNEALING (STAGE2/STEP2)*, κάνοντας κλικ σε αυτά, προκειμένου να αποκλείσετε περιττές μετρήσεις φθορισμού. Έτσι ο συνολικός χρόνος διαδικασίας και ο όγκος δεδομένων είναι ο ελάχιστος δυνατός.



Εικ. 22: Συλλογή δεδομένων.

8.6.3.5 Αποθήκευση της διαδικασίας PCR

Στη θέση αυτή μπορείτε να αποθηκεύσετε τις ήδη καταχωρημένες ρυθμίσεις (*SETUP*) ως πρότυπο, για να τις χρησιμοποιήσετε εκ νέου σε επόμενες εφαρμογές σε τροποποιημένη ή μη τροποποιημένη μορφή. Με την αποθήκευση των ρυθμίσεων ως *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* στον κατάλογο *TEMPLATE DIRECTORY* ([D:]\\Program Files\\Applied Biosystems\\SDS 2.1\\Templates, του λογισμικού Applied Biosystems), το αρχείο αυτό μπορεί να επιλεγεί απευθείας από τη λίστα *TEMPLATE* στο παράθυρο *NEW DOCUMENT*. Τα πρότυπα που είναι αποθηκευμένα σε άλλους καταλόγους πρέπει να επιλέγονται μέσω της επιλογής *BROWSE*. Πριν από την έναρξη της τρέχουσας διαδικασίας PCR, φροντίστε να την αποθηκεύσετε εκ νέου ως *ABI PRISM SDS Document (*.sds)* προκειμένου να διασφαλίσετε την αποθήκευση των δεδομένων που συλλέγονται κατά την εξέλιξη της PCR.

8.6.3.6 Έναρξη της διαδικασίας PCR

Ξεκινήστε τη διαδικασία PCR επιλέγοντας την επιλογή *START* (Εναρξη) από την επιλογή μενού *INSTRUMENT*.

9. Ανάλυση δεδομένων

Μία υπάρχουσα έγκυρη βαθμονόμηση των χρωστικών ουσιών (*PURE SPECTRA COMPONENT FILE*) και του υποβάθρου (*BACKGROUND COMPONENT FILE*) απαιτείται οπωσδήποτε κατά την έναρξη λειτουργίας των συσκευών. Αυτά τα αρχεία βαθμονόμησης χρειάζονται, όπως αναφέρεται παρακάτω, στον ακριβή υπολογισμό των αποτελεσμάτων:

Οι παρεμβολές που εκπέμπονται από τη συσκευή και επηρεάζουν τη συνολική μέτρηση εξαλείφονται από το *Sequence Detection Software* των *ABI PRISM Sequence Detection Systems*, μέσω του *BACKGROUND COMPONENT FILE*.

Επιπλέον, κατά τις αναλύσεις πολλαπλών χρωμάτων εκδηλώνονται παρεμβολές μεταξύ των φασμάτων εκπομπών των επιμέρους φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Το λογισμικό των *ABI PRISM SDS* αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές μέσω του υπολογισμού με τα δεδομένα φάσματος των μεμονωμένων χρωστικών ουσιών που είναι αποθηκευμένα στο *PURE SPECTRA COMPONENT FILE*. Το λογισμικό πραγματοποιεί επίσης την αντιστοίχιση των δεδομένων φθορισμού που συλλέγονται μέσω του συνολικού μετρήσιμου φάσματος κατά την εξέλιξη της PCR προς τους προγραμματισμένους ανιχνευτές, μέσω της επιλογής *Pure Spectra Component*. Στη συνέχεια τα μεταδιδόμενα δεδομένα φθορισμού των επιμέρους χρωστικών ουσιών διαχωρίζονται, για τον υπολογισμό των αποκλίσεων tube-to-tube (διαφορές φθορισμού μεταξύ των διαφόρων μειγμάτων της PCR), μέσω του σήματος παθητικής αναφοράς (ROX). Τα σήματα που κανονικοποιούνται κατά αυτό τον τρόπο μπορούν να αξιολογηθούν μέσω της επιλογής *Amplification Plot*.

Τα αρχεία βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αξιολόγηση μιας διαδικασίας PCR ασφαρίζονται αυτόματα κατά την αποθήκευση. Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν εγκατεστημένα **αρχεία βαθμονόμησης**, δημιουργήστε τα αρχεία αυτά λαμβάνοντας υπόψη τις οδηγίες στον οδηγό/εγχειρίδιο χρήστη *ABI PRISM SDS* (*ABI PRISM SDS User Guide/Manual*).

Σε περίπτωση που έχετε ενσωματωμένα περισσότερα από ένα συστήματα *artus*™ PCR στη διαδικασία PCR (**λάβετε υπόψη το προφίλ θερμοκρασίας**), τότε παρακαλούμε να διεξάγετε τις αναλύσεις των συστημάτων εξέτασης ξεχωριστά. Τα δείγματα με ίδιο *SAMPLE NAME* και ίδια αντιστοίχιση ανιχνευτών αναγνωρίζονται αυτόματα από το λογισμικό *ABI PRISM 7000* και *7900HT SDS* ως επαναλήψεις και προσδιορίζονται αναφορικά με το ποσοτικοποιημένο φορτίο του παθογόνου παράγοντά τους.

Για την ανάλυση των ποσοτικών εκτελέσεων, ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα **8.4 Ποσοτικοποίηση** και στην τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο *ABI PRISM 7000 SDS* (***Technical Note for quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS***) στο www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Εάν έχετε ενσωματώσει περισσότερα από ένα συστήματα *artus* έρπητα στην εκτέλεση PCR, αναλύστε αυτά τα διαφορετικά συστήματα με τα αντίστοιχα πρότυπα ποσοτικοποίησης ξεχωριστά. Παρακαλούμε επιλέξτε τις θέσεις των δειγμάτων για την ανάλυση αναλόγως.

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ανιχνεύεται ένα σήμα φθορισμού FAM.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: Το δείγμα περιέχει DNA του CMV.

Στην περίπτωση αυτή, η ανίχνευση ενός σήματος φθορισμού VIC/JOE (*πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*) είναι άνευ σημασίας, δεδομένου ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις εκκίνησης του DNA του CMV (θετικό σήμα φθορισμού FAM) ενδέχεται να οδηγήσουν σε μειωμένο ως ανύπαρκτο σήμα φθορισμού του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* (ανταγωνισμός).

2. Δεν ανιχνεύεται σήμα φθορισμού FAM. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται ένα σήμα φθορισμού VIC/JOE από το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*.

Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA του CMV. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

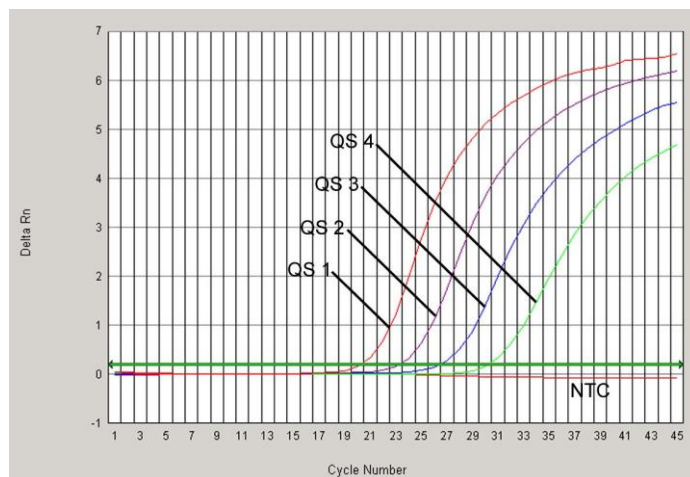
Όταν η PCR του CMV είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα φθορισμού FAM ούτε σήμα φθορισμού VIC/JOE.

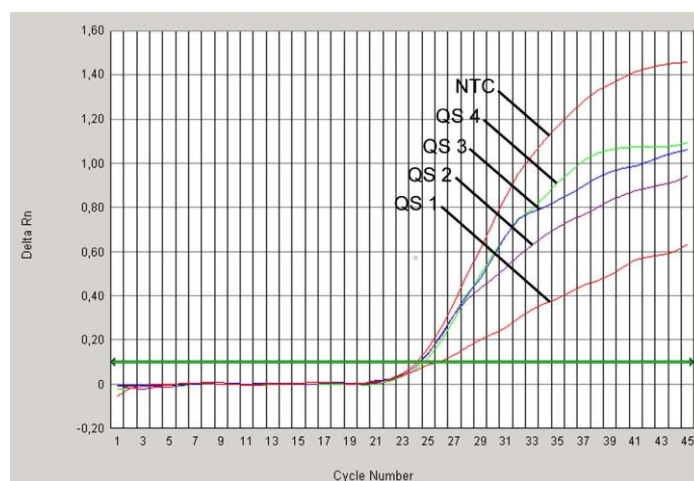
Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

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

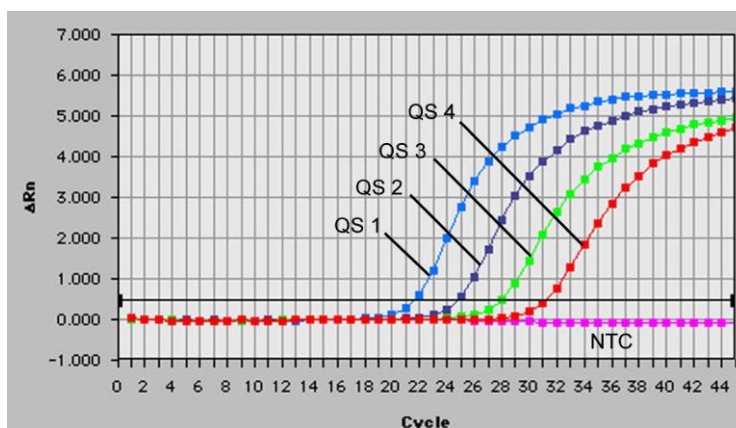
Παραδείγματα για θετικές και αρνητικές αντιδράσεις της PCR παρατίθενται επίσης στις εικόνες 23 / 24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25 / 26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) και 27 / 28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).



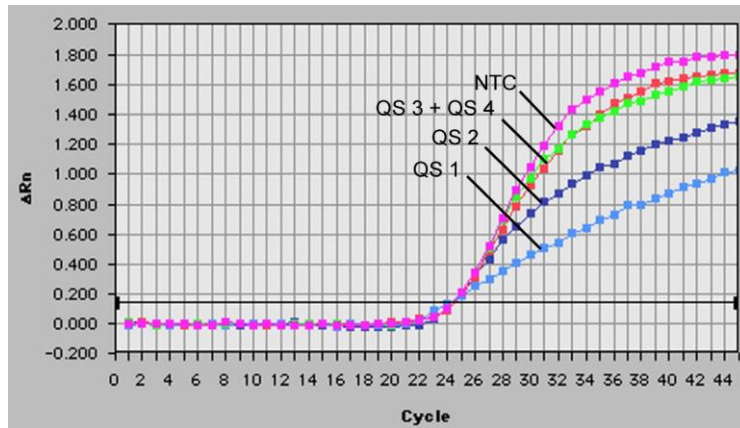
Εικ. 23: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1–4) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



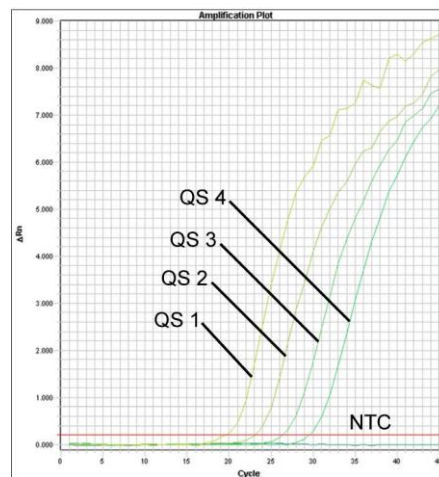
Εικ. 24: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού VIC (ABI PRISM 7000 SDS) με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1–4). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



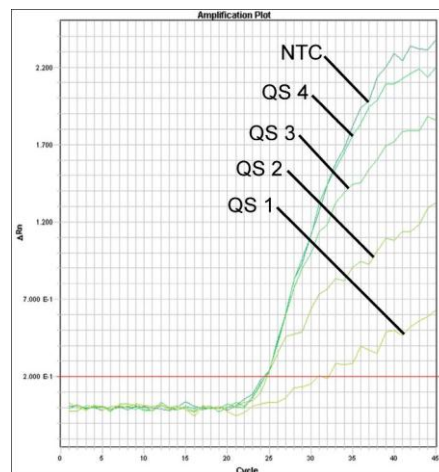
Εικ. 25: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1–4) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού FAM (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 26: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού JOE (**ABI PRISM 7700 SDS**) με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 27: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού FAM (**ABI PRISM 7900HT SDS**). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 28: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) μέσω της ανίχνευσης ενός σήματος φθορισμού VIC (**ABI PRISM 7900HT SDS**) με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).

10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Κανένα σήμα φθορισμού FAM στα θετικά πρότυπα ελέγχου (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- Η εκλογή του ανιχνευτή χρωστικών ουσιών, κατά την ανάλυση των δεδομένων της PCR, δεν ανταποκρίνεται στα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου.
 - Για την ανάλυση των δεδομένων, επιλέξτε τον ανιχνευτή χρωστικών ουσιών FAM για την αναλυτική PCR του CMV και τον ανιχνευτή χρωστικών ουσιών VIC/JOE για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Η ρύθμιση των εξαχθέντων δεδομένων (*EXTENSION PHASE DATA EXTRACTION*) (Εξαγωγή δεδομένων φάσης επέκτασης) προς αξιολόγηση που βρίσκεται στην επιλογή *OPTIONS* δεν συμφωνεί με τις ρυθμίσεις της επιλογής *DATA COLLECTION* (για το *ABI PRISM 7700 SDS* βλέπε **8.6.2.4 Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας**, για το *ABI PRISM 7900HT SDS* βλέπε **8.6.3.4 Δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας**).
 - Αναλύστε την διαδικασία της PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις και επαναλάβετε την αξιολόγηση (*ANALYSIS*).
- Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του *ABI PRISM Sequence Detection System* είναι εσφαλμένος.
 - Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με τα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου (βλέπε **8.6 Προγραμματισμός των ABI PRISM SDS**).
- Εσφαλμένη διαμόρφωση 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 φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2. . ύλαξη** ή το kit *artus CMV TM 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 ή ανύπαρκτο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ενός περιλαμβανόμενου στη διαδικασία καθαρισμού (kit *QIAamp DSP Virus*) αρνητικού δείγματος πλάσματος (σήμα φθορισμού VIC/JOE, απόκλιση μεγαλύτερη από $Ct = 27 \pm 3$, *κατώφλι ABI PRISM 7000: 0,1, ABI PRISM 7700 και 7900HT SDS: 0,2*) με ταυτόχρονη απουσία ενός σήματος φθορισμού FAM της ειδικής PCR του CMV:

- 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 τη συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
 - Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA έχει εκτελεστεί το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την έκλυση (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**).
- Υφίστανται απώλειες DNA κατά την εκχύλιση.
 - Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην εκχύλιση, μπορεί η απουσία του σήματος του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* να σημαίνει απώλειες DNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**) 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. . ύλαξη** ή το kit *artus CMV TM 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.

Ένα σήμα φθορισμού FAM στα αρνητικά πρότυπα ελέγχου της αναλυτικής 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

Για την εγκυρότητα του kit *artus* CMV TM PCR καθορίστηκαν τόσο το αναλυτικό όριο ανίχνευσης όσο και το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (όρια ευαισθησίας). Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον CMV δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης. Απεναντίας, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε χωρίς κλινικά δείγματα και ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης με τη βοήθεια DNA του CMV γνωστής συγκέντρωσης.

Για να προσδιοριστεί η **αναλυτική ευαισθησία** του kit *artus* CMV TM PCR, προετοιμάστηκε σειρά αραιώσης γονιδιωματικού DNA του CMV από 10 έως ονομαστικά 0,00316 αντίγραφα CMV/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT Sequence Detection System* σε συνδυασμό με το kit *artus* CMV TM PCR. Οι έλεγχοι εκτελέστηκαν, για κάθε συσκευή, σε τρεις διαφορετικές ημέρες με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit.

Όριο ανίχνευσης (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,20 αντίγραφα/μl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,20 αντίγραφα/μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,17 αντίγραφα/μl

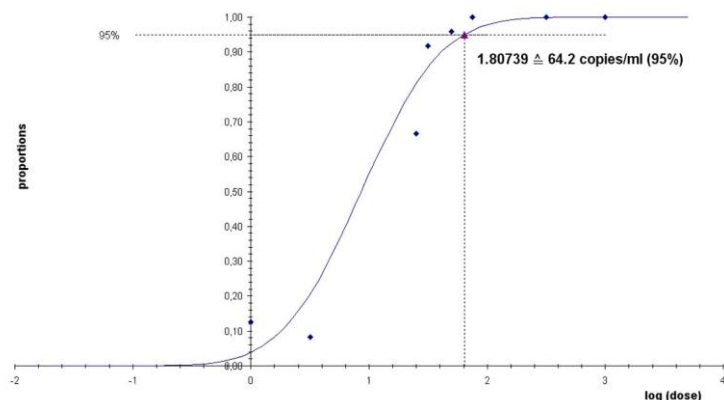
Αυτό σημαίνει ότι με πιθανότητα 95% ανιχνεύονται 0,20 αντίγραφα/μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,20 αντίγραφα/μl (*ABI PRISM 7700 SDS*) και 0,17 αντίγραφα/μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*).

Η **αναλυτική ευαισθησία σχετικά με τον καθαρισμό (kit QIAamp DSP Virus)** του kit *artus* CMV TM PCR καθορίστηκε με χρήση μίας σειράς αραιώσεων από υλικό του ιού CMV από 1.000 σε ονομαστικά 0,316 αντίγραφα CMV/ml, εμβολιασμένων σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA με το kit QIAamp DSP Virus (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 70 μl). Κάθε ένα από τα οκτώ συνολικά στάδια αραιώσης αναλύθηκαν με το *ABI PRISM 7000*, *7700* και *7900HT SDS* σε τρεις διαφορετικές ημέρες, με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών, με τη βοήθεια του kit *artus* CMV TM PCR. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια ανάλυσης probit και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Όριο ανίχνευσης (p = 0,05) λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	64,2 αντίγραφα/ml
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	100,5 αντίγραφα/ml
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	53,5 αντίγραφα/ml

Η γραφική αναπαράσταση παρουσιάζεται στην Εικ. 29 για το *ABI PRISM 7000 SDS*. Επομένως, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό, του kit *artus* CMV TM PCR βρίσκεται κατά συνέπεια στα 64,2 αντίγραφα/ml (p = 0,05). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95 % πιθανότητα ανίχνευσης 64,2 αντιγράφων/ml.

Ανάλυση Probit: Κυτταρομεγαλοϊός (ABI PRISM 7000 SDS)



Εικ. 29: Αναλυτική ευαισθησία του kit *artus* CMV TM PCR λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (kit QIAamp DSP Virus) (ABI PRISM 7000 SDS).

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus* CMV TM PCR 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 ελέγχθηκαν ως προς πιθανές ομολογίες με όλες τις δημοσιευμένες ακολουθίες σε τράπεζες γονιδίων μέσω ανάλυσης σύγκρισης ακολουθιών. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών στελεχών συνεπώς διασφαλίστηκε.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση 100 διαφορετικών δειγμάτων πλάσματος, τα οποία ήταν αρνητικά στον CMV. Αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για CMV ενισχυτές και ανιχνευτές, που περιλαμβάνονται στο *CMV TM Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του kit *artus* CMV TM 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. Δεν παρουσιάστηκαν διασταυρούμενες αντιδραστικότητες σε μεικτές λοιμώξεις.

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

Ομάδα ελέγχου	CMV (FAM)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (VIC)
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 4 (Ιός Epstein-Barr)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6A	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6B	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 7	-	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 8 (ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi)	-	+
Ιός ηπατίτιδας A	-	+
Ιός ηπατίτιδας B	-	+
Ιός ηπατίτιδας C	-	+
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV) 1	-	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 1	-	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 2	-	+
Ιός του Δυτικού Νείλου	-	+
Εντεροϊός	-	+
Παρβοϊός B19	-	+

11.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του kit *artus* CMV TM PCR συλλέχθηκαν με τη βοήθεια του *ABI PRISM 7000 SDS* και παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού της ολικής διακύμανσης του προσδιορισμού. Η ολική διασπορά αποτελείται από τη **μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού** (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης, στα πλαίσια ενός πειράματος), τη **μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών** (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού που παρήχθησαν σε διαφορετικά όργανα του ίδιου τύπου από διαφορετικούς χειριστές εντός του ίδιου εργαστηρίου) και τη **μεταβλητότητα μεταξύ των παρτίδων** (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού με χρήση περισσότερων παρτίδων). 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 *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Τα δεδομένα αυτά εξετάστηκαν, για το kit *artus* CMV TM PCR, βάσει του πρωτύπου ποσοτικοποίησης με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (QS 4, 10 αντίγραφα/μl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές Ct των καμπυλών ενίσχυσης (Ct: *κύκλος καταφύλιου*, βλέπε Πίνακας 2). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε αντίγραφα/μl προσδιορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών Ct (βλέπε Πίνακας 3). Συνεπώς, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος της αναφερομένης συγκέντρωσης ανέρχεται σε 1,06% (Ct) ή 12,93% (συγκέντρωση), για την ανίχνευση του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο 1,14% (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ακρίβειας βάσει των τιμών Ct.

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,10	0,01	0,33
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,12	0,01	0,50
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,67
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,30	0,09	1,23
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,32	0,10	1,01
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,26	0,07	1,05
Συνολική διασπορά: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,33	0,11	1,06
Συνολική διασπορά: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,28	0,08	1,14

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

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,72	0,52	7,20
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,25	1,57	12,45
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,53	2,33	15,10
Συνολική διασπορά:	1,30	1,70	12,93

11.4 Ανθεκτικότητα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας συμβάλλει στην εξέταση του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του kit *artus* CMV TM PCR. Εμβολιάσθηκαν 100 CMV αρνητικά δείγματα πλάσματος με DNA του CMV σε τελική συγκέντρωση 170 αντίγραφα/ml (περ. τριπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού ορίου ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του kit QIAamp DSP Virus (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το kit *artus* CMV TM PCR. Το ποσοστό αποτυχίας για τον CMV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Η ανθεκτικότητα του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω του καθαρισμού και της ανάλυσης 100 αρνητικών στον CMV δειγμάτων πλάσματος. Έτσι, η ανθεκτικότητα του kit *artus* CMV TM PCR ανέρχεται στο $\geq 99\%$.

11.5 Αναπαραγωγιμότητα

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

11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση

Το kit *artus* CMV TM PCR αξιολογήθηκε σε μια μελέτη. Συγκρίνοντας το kit *artus* CMV TM PCR με τη δοκιμασία COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR®, 154 κλινικά δείγματα πλάσματος-EDTA αναλύθηκαν αναδρομικά και προοπτικά. Όλα τα δείγματα προ-αναλύθηκαν σε θετικά ή αρνητικά με χρήση του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR για διάγνωση ρουτίνας.

Τα δείγματα για τον έλεγχο του kit *artus* CMV TM PCR απομονώθηκαν προσθέτοντας το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του kit *artus* CMV TM PCR με χρήση του kit QIAamp DSP Virus και στη συνέχεια αναλύθηκαν από το *ABI PRISM 7000 SDS*. Τα δείγματα για τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR απομονώθηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που παρέχονται στο ένθετο της συσκευασίας.

Και τα 11 δείγματα που ήταν θετικά με τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR ήταν επίσης θετικά με το kit *artus* CMV TM PCR. Ένα σύνολο 125 δειγμάτων ήταν αρνητικά τόσο με τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR όσο και με το kit *artus* CMV TM PCR. Ελήφθησαν 18 ασύμφωνα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης επικύρωσης.

Δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR				
		+	-	Σύνολο
Kit <i>artus</i> CMV TM PCR	+	11	18	29
	-	0	125	125

Εάν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας COBAS AMPLICOR CMV MONITOR λαμβάνονται ως αναφορά, η διαγνωστική ευαισθησία όλων των δειγμάτων του kit *artus* CMV TM PCR είναι 100%, και η διαγνωστική ειδικότητα είναι 87,4%.

Περαιτέρω εξέταση των 18 ασύμφωνων αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των kit *artus* PCR. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ασυμφωνία βασίζεται σε μια υψηλότερη ευαισθησία του kit *artus* CMV TM PCR.

12. Περιορισμοί χρήσης 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 kit, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή

αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

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* CMV TM 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.

16. 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	<i>Πρότυπο ποσοτικοποίησης</i>
IC	<i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>
Mg-Sol	<i>Διάλυμα μαγνησίου</i>

Κιτ *artus* CMV TM PCR

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (Όμιλος QIAGEN): *ABI PRISM*® (Applied Biosystems), AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH): FAM™, *GeneAmp*®, JOE™, MicroAmp®, ROX™, VIC® (Life Technologies).

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.

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.

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *artus* CMV TM PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *artus* CMV TM PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο κιτ artus CMV TM 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 κιτ artus CMV TM 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 οποιασδήποτε άλλης άδειας, 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 ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιασδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιουδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

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

© 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)

1046905 148051759