

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *artus*[®] CMV LC PCR



24 (αρ. καταλόγου 4503063)



96 (αρ. καταλόγου 4503065)

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το όργανο

LightCycler[®] 1.1/1.2/1.5 και *LightCycler* 2.0

Δεκέμβριος 2014 — Έκδοση 1



4503063, 4503065



1046903EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R4

MAT

1046903EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιοδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Πίνακας περιεχομένων

1. Περιεχόμενο	5
2. Αποθήκευση	5
3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές	6
4. Γενικές προφυλάξεις	6
5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες	8
6. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	8
7. Περιγραφή προϊόντος	8
8. Πρωτόκολλο	10
8.1 Προαναλυτική διαδικασία: Λήψη, φύλαξη και μεταφορά των δειγμάτων	10
8.1.1 Δειγματοληψία	11
8.1.2 Φύλαξη δειγμάτων	11
8.1.3 Μεταφορά δειγμάτων	11
8.1.4 Παρεμβαλλόμενες ουσίες	12
8.2 Απομόνωση DNA	12
8.3 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	13
8.4 Ποσοτικοποίηση	15
8.5 Προετοιμασία της PCR	17
8.6 Προγραμματισμός των οργάνων <i>LightCycler</i>	22
8.6.1 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	22
8.6.2 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler 2.0</i>	26
9. Ανάλυση δεδομένων	30
9.1 Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	30

9.2	Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο <i>LightCycler 2.0</i>	34
10.	Αντιμετώπιση προβλημάτων	39
11.	Ειδικά χαρακτηριστικά.....	41
11.1	Αναλυτική ευαισθησία	41
11.2	Ειδικότητα.....	45
11.3	Ακρίβεια.....	46
11.4	Ανθεκτικότητα	49
11.5	Επαναληψιμότητα.....	49
11.6	Διαγνωστική αξιολόγηση.....	50
12.	Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος.....	51
13.	Πληροφορίες ασφάλειας	51
14.	Ποιοτικός έλεγχος	51
15.	Βιβλιογραφία	52
16.	Επεξήγηση των συμβόλων	53

Εγχειρίδιο κιτ *artus* CMV LC PCR

Για χρήση με το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0* για την ποσοτική ανίχνευση του DNA του CMV από πλάσμα EDTA.

1. Περιεχόμενο

	Επισημάνση και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4503063 24 αντιδράσεις	Αρ. είδους 4503065 96 αντιδράσεις
Μπλε	<i>CMV LC Master</i>	2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Κίτρινο	<i>CMV Mg-Sol^f</i>	1 x 600 μl	1 x 600 μl
Κόκκινο	<i>CMV QS 1^α</i> <i>1 x 10⁴ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV QS 2^α</i> <i>1 x 10³ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV QS 3^α</i> <i>1 x 10² αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	<i>CMV QS 4^α</i> <i>1 x 10¹ αντίγραφα/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Πράσινο	<i>CMV LC IC^α</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

- ^α QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης
IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου
Mg-Sol = Διάλυμα μαγνησίου

2. Αποθήκευση

Τα συστατικά του κιτ *artus* CMV LC PCR θα πρέπει να φυλάσσονται στους -15°C έως -30°C και είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επαναληπτική ψύξη/απόψυξη (> 2 x) θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί με αυτό τον τρόπο μειώνεται η ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους 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
- *Color Compensation Set* (σετ αντιστάθμισης χρώματος) (Roche Diagnostics, αρ. καταλ. 2 158 850) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *Crosstalk Color Compensation* (αντιστάθμιση χρώματος αλληλοπαρεμβολής) για το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (πολυχρωματικό σετ επίδειξης *LightCycler*) (αρ. καταλ. 03 624 854 001) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *Crosstalk Color Compensation* (αντιστάθμιση χρώματος αλληλοπαρεμβολής) για το όργανο *LightCycler 2.0*
- Τριχοειδή *LightCycler* (20 µl)
- Μονάδα ψύξης *LightCycler*
- Όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (έκδοση λογισμικού 3.5) ή *LightCycler 2.0* (έκδοση λογισμικού 4.0)
- Εργαλείο πωματισμού *LightCycler*

4. Γενικές προφυλάξεις

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

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου, προϊόντα πολλαπλασιασμού) πρέπει να εκχυλίζεται, να αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Πλήρη απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση τους.

- Στη συνέχεια, καλή ανάμειξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρησης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή στη μονάδα ψύξης *LightCycler*.

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 μονοπυρήνωσης 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 LC PCR αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του CMV με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στο όργανο *LightCycler*. Το *CMV LC Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 105 bp του γονιδιώματος CMV και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης

(αμπλικόνιο) με το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0*. Πέραν αυτού, το κιτ *artus CMV LC PCR* περιέχει ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR.

Προϊόν PCR	Επιλογή των καναλιών φθορισμού	
	Όργανο <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	Όργανο <i>LightCycler 2.0</i>
CMV	F1	530
CMV LC IC	F3/Back-F1	705/Back 530

Η ενίσχυση και η ανίχνευση αυτού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC)* δεν μειώνουν το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης PCR του CMV (βλέπε **11.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*CMV 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 LC PCR* αντιστοιχεί στα προφίλ του κιτ *artus EBV LC PCR*, του κιτ *artus HSV-1/2 LC PCR*, και του κιτ *artus VZV LC PCR*. Συνεπώς, οι προσδιορισμοί PCR αυτών των συστημάτων *artus* μπορούν να διενεργηθούν και να αναλυθούν σε μία μόνο εκτέλεση. Παρακαλούμε σημειώστε 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 το λόγο αυτό συνιστούμε τη χρήση αυτών των υλικών με το κιτ *artus CMV LC PCR*.

Η πιστοποίηση του κιτ *artus CMV LC PCR* διεξήχθη με χρήση δειγμάτων EDTA ανθρώπινου πλάσματος. Άλλα υλικά δείγματος δεν έχουν επαληθευτεί.

Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε μόνο τα συνιστώμενα κιτ 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: Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα ασθενών που υποβάλλονται σε αγωγή με ηπαρίνη (βλέπε **8.1.4 Παρεμβαλλόμενες ουσίες**).

8.1.2 Φύλαξη δειγμάτων

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), λιπιδίων (≤ 1.100 mg/dl), και τα αιμολυτικά δείγματα δεν επηρεάζουν το σύστημα ανάλυσης 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.

8.2 Απομόνωση DNA

Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης για την απομόνωση του DNA του CMV:

Υλικό δειγμάτων	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Καταλόγου Αριθμός	Κατασκευαστής	RNA-φορέας
Πλάσμα EDTA	QIAamp [®] DSP Virus Kit (50)	60704	QIAGEN	περιέχεται
Πλάσμα EDTA	Κιτ EZ1 [®] DSP Virus (48)*	62724	QIAGEN	περιέχεται

*Για χρήση σε συνδυασμό με το EZ1 Advanced (αρ. καταλ. 9001411) και την κάρτα EZ1 Advanced DSP Virus (αρ. καταλ. 9018306) ή το BioRobot[®] EZ1 DSP (αρ. καταλ. 9001360) και την κάρτα EZ1 DSP Virus (αρ. καταλ. 9017707). * Το κιτ EZ1 DSP Virus είναι επίσης διαθέσιμο με τη μορφή των κιτ

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

EASYartus® CMV LC PCR με σήμανση CE για IVD, σε συνδυασμό με το κιτ *artus* CMV LC PCR (αρ. καταλ. EA10303 και EA10304).

- Η χρήση του **RNA-φορέα** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Για την επίτευξη βελτιωμένης σταθερότητας του RNA-φορέα, που παρέχεται με το κιτ QIAamp DSP Virus και το κιτ EZ1 DSP Virus, παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες για το χειρισμό και τη φύλαξη του RNA-φορέα στο *Εγχειρίδιο QIAamp DSP Virus Spin Kit* ή στο εγχειρίδιο κιτ EZ1 DSP Virus (*EZ1 DSP Virus Kit Handbook*).

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του κιτ *artus* CMV LC PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης. Βεβαιωθείτε ότι ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος περιλαμβάνεται στη διαδικασία απομόνωσης. Το αντίστοιχο σήμα του *προτύπου 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 LC IC)*. Με αυτό ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να **ελέγξει τόσο τη διαδικασία απομόνωσης του DNA όσο και μια ενδεχόμενη αναστολή της PCR** (βλέπε Εικ. 1). Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Με τη χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus, το DNA εκλύεται για παράδειγμα σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος AVE. Επομένως, πρέπει να προστεθούν 6 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Με τη χρήση του κιτ EZ1 DSP Virus, πρέπει να προστεθεί το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* σύμφωνα με τις οδηγίες στο *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλουσης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και το RNA-φορέας (βλέπε **8.2 Απομόνωση DNA**) πρέπει να προστίθενται ακολουθώντας αυστηρά τις οδηγίες στο *Εγχειρίδιο QIAamp DSP Virus Spin Kit* ή στο *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

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/RNA-φορέα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του (αποθήκευση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο μπορεί να οδηγήσει, μετά από μόνο μερικές ώρες, σε αποτυχία του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* και μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης). **Μην** προσθέτετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και το RNA-φορέα απευθείας στο υλικό του δείγματος.

Για να θεωρηθεί επιτυχής ένας καθαρισμός, η τιμή Ct του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος το οποίο έχει υποβληθεί σε επεξεργασία μέσω καθαρισμού πρέπει να φθάσει την τιμή Ct που υποδεικνύεται στον Πίνακα 1. 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.

Πίνακας 1: Αποδεκτό εύρος των τιμών Ct του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος.

Κιτ καθαρισμού	Όργανο	Κανάλι φθορισμού	Μέθοδος ανάλυσης	Τιμή Ct
Κιτ QIAamp DSP Virus	<i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	F3/Back-F1	<i>Μέγιστο δεύτερης παραγώγου</i>	14 ± 3
Κιτ QIAamp DSP Virus	<i>LightCycler 2.0</i>	705/Back 530	<i>Αυτόματη</i>	14 ± 3
Κιτ EZ1 DSP Virus	<i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	F3/Back-F1	<i>Μέγιστο δεύτερης παραγώγου</i>	15 ± 3
Κιτ EZ1 DSP Virus	<i>LightCycler 2.0</i>	705/Back 530	<i>Αυτόματη</i>	15 ± 3

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 *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* και 2,5 μl *CMV Mg-Sol* απευθείας σε 12,5

μl *CMV LC Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 15 μl του παρασκευασμένου όπως αναφέρεται παραπάνω Master Mix* και στη συνέχεια προσθέστε 10 μl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *CMV LC Master*, του CMV Mg-Sol και του *πρότυπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**).

Τα κιτ *artus EBV LC PCR* και τα κιτ *artus CMV LC PCR* περιέχουν ένα πανομοιότυπο *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)*. Τα κιτ *artus HSV-1/2 LC PCR* και τα κιτ *artus VZV LC PCR* περιέχουν επίσης ένα πανομοιότυπο *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*.

8.4 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV QS 1 – 4)* χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (10 μl). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης στο όργανο *LightCycler*, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και τα τέσσερα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* ως εξής:

Όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Καθορίστε τα *CMV QS 1 – 4* στην οθόνη *SAMPLE LOADING* (Φόρτωση δείγματος) ως πρότυπα με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις [βλέπε εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*, έκδοση 3.5, κεφάλαιο B, 2.4. Εισαγωγή δεδομένων δειγμάτων].

Όργανο *LightCycler 2.0*

Για τον καθορισμό των προτύπων, ενεργοποιήστε τη λειτουργία *ANALYSIS TYPE* (Τύπος ανάλυσης) στο μενού του παραθύρου *SAMPLES* (δείγματα) και επιλέξτε *ABSOLUTE QUANTIFICATION* (Απόλυτη ποσοτικοποίηση). Μπορείτε τώρα να καθορίσετε τα *CMV QS 1 – 4* ως πρότυπα και να εισάγετε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις για κάθε πρότυπο (βλέπε *LightCycler*

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

Operator's Manual, έκδοση 4.0, κεφάλαιο 2.2 Εισαγωγή πληροφοριών δείγματος). Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία *ENABLE CONTROLS* (Ενεργοποίηση προτύπων ελέγχου) **δεν** είναι ενεργοποιημένη. Σε αντίθετη περίπτωση, η επιλογή των δυνατοτήτων ανάλυσης για την ανάλυση δεδομένων περιορίζεται (βλέπε **9.2 Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο *LightCycler 2.0***).

Εάν έχετε ενσωματώσει περισσότερα από ένα συστήματα *artus* έρπητα στην εκτέλεση PCR, παρακαλούμε 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 QS 1 – CMV QS 4*) 1 μl του προτύπου εσωτερικού ελέγχου και 2,5 μl *CMV Mg-Sol* απευθείας σε 12,5 μl *CMV LC Master* (για μια σχηματική επισκόπηση, βλέπε Εικ. 2). Αυτό το σχήμα μεταφοράς με πιπέτα εφαρμόζεται γενικά για τα πρότυπα ποσοτικοποίησης *CMV* και ανεξάρτητα από τον αριθμό των προτύπων ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιούνται.

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

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

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

Σημαντικό: Κατευθυντήριες οδηγίες για την ποσοτική ανάλυση των συστημάτων *artus* στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0* παρέχονται στο www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX [τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0* (**Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument**)].

8.5 Προετοιμασία της PCR

Διασφαλίστε ότι η μονάδα ψύξης καθώς και οι προσαρμογείς τριχοειδών (παρελκόμενα του οργάνου *LightCycler*) έχουν προψυχθεί στους +4°C. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό τριχοειδών *LightCycler* στους προσαρμογείς της μονάδας ψύξης. Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* καθώς και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*νερό, κατηγορίας PCR*) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*CMV QS 1 – 4*). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμειγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και στη συνέχεια να φυγοκεντρούνται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Για την περίπτωση που με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* θέλετε να **ελέγξετε τόσο την απομόνωση του DNA όσο και μια ενδεχομένη αναστολή της PCR**, αυτό 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 LC Master	12,5 µl	150 µl
	CMV Mg-Sol	2,5 µl	30 µl
	CMV LC IC	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 *CMV LC Master*. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 2):

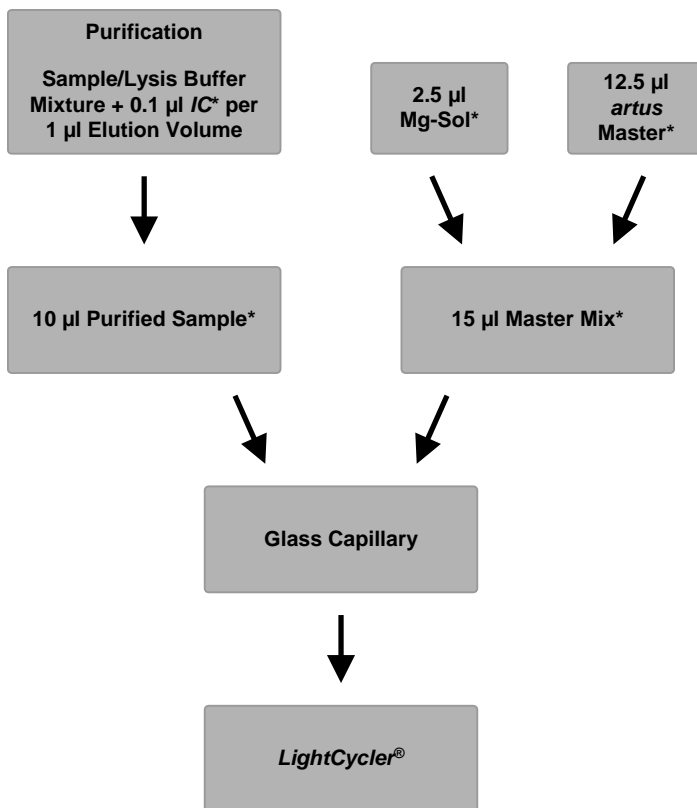
	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	CMV LC Master	12,5 µl	150 µl
	CMV Mg-Sol	2,5 µl	30 µl
	CMV LC IC	1 µl	12 µl
	Συνολικός όγκος	16 µl*	192 µl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl	ανά 15 µl
	Δείγμα/CMV QS 1 – 4	10 µl	ανά 10 µl
	Συνολικός όγκος	25 µl	ανά 25 µl

Μεταφέρετε με πιπέτα 15 µl του Master Mix στην πλαστική δεξαμενή κάθε τριχοειδούς. Στη συνέχεια, προσθέστε 10 µl του εκλουσμένου DNA δείγματος. Αντιστοίχως, 10 µl τουλάχιστον ενός από τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV QS 1 – 4)* πρέπει να χρησιμοποιείται ως θετικό πρότυπο ελέγχου και 10 µl νερού (*νερό, κατηγορίας PCR*) ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου. Κλείστε τα τριχοειδή. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, συνιστάται επισταμένως η συμπλήρωση του Master Mix που χρησιμοποιείται για τα

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

*πρότυπα ποσοτικοποίησης με την ανάλογη ποσότητα προτύπου εσωτερικού ελέγχου (βλέπε **8.4 Ποσοτικοποίηση**). Για να μεταφέρετε το μείγμα από την πλαστική δεξαμενή στο τριχοειδές, φυγοκεντρήστε τους προσαρμογείς που περιέχουν τα τριχοειδή σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο για δέκα δευτερόλεπτα σε μέγιστο 400 x g (2.000 rpm).*

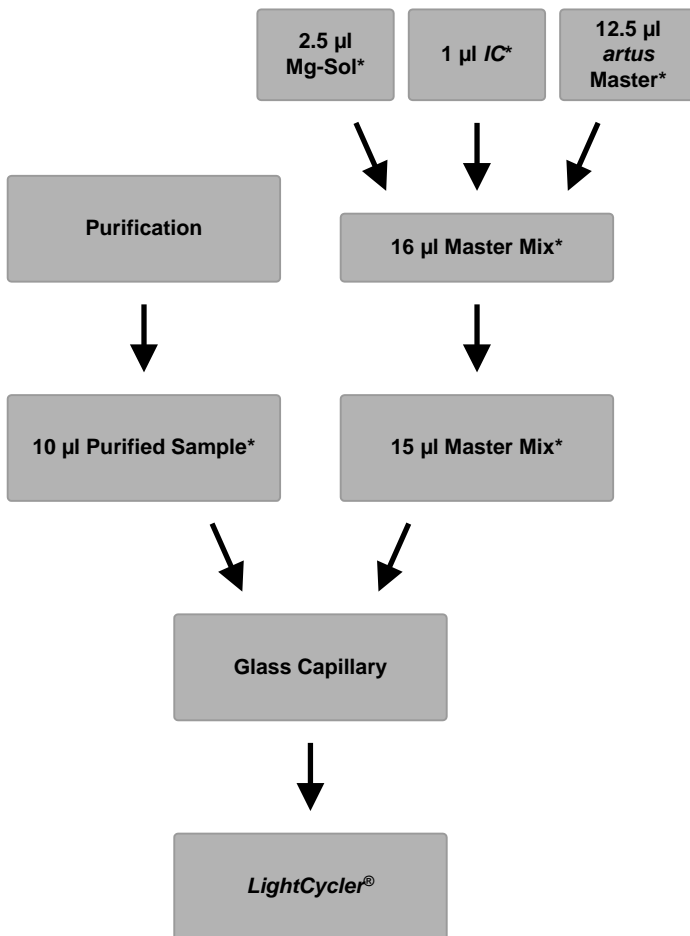
Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία καθαρισμού



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 ανάμιξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

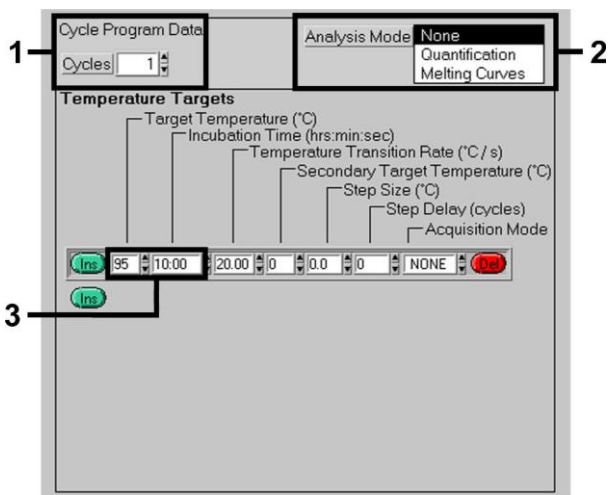
8.6 Προγραμματισμός των οργάνων *LightCycler*

8.6.1 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

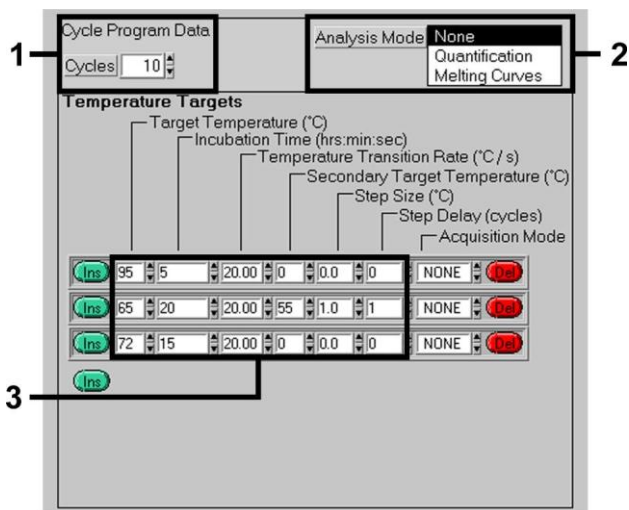
Για την ανίχνευση του DNA του CMV, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* σύμφωνα με τα ακόλουθα πέντε βήματα (βλέπε Εικ. 3 – 7).

- | | |
|---|--------|
| A. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης | Εικ. 3 |
| B. Βήμα touchdown | Εικ. 4 |
| Γ. Ενίσχυση του DNA | Εικ. 5 |
| Δ. Καμπύλη τήξης (προαιρετικά) | Εικ. 6 |
| E. Ψύξη | Εικ. 7 |

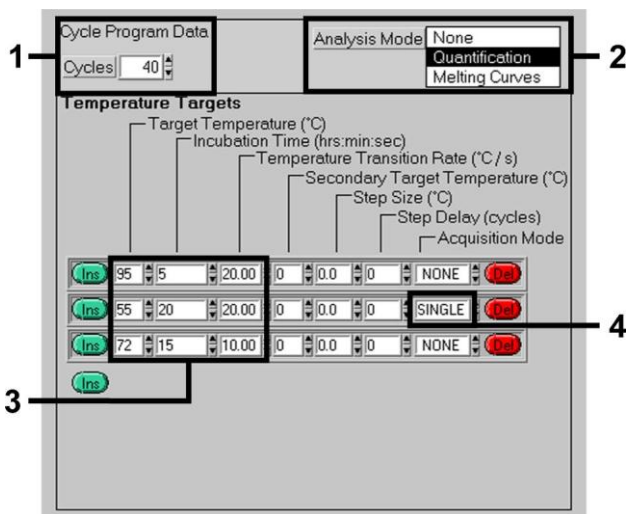
Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ρυθμίσεις για *ANALYSIS MODE* (Λειτουργία ανάλυσης), *CYCLE PROGRAM DATA* (Δεδομένα προγράμματος κύκλου) και *TEMPERATURE TARGETS* (Στόχοι θερμοκρασίας). Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5*, ανατρέξτε στο *LightCycler Operator's Manual*. Το βήμα Δ. (Καμπύλη τήξης) στο πρόγραμμα PCR είναι **προαιρετικό** και απαιτείται μόνο για τη διαφοροποίηση του HSV1 και HSV2 όταν χρησιμοποιείται το kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.



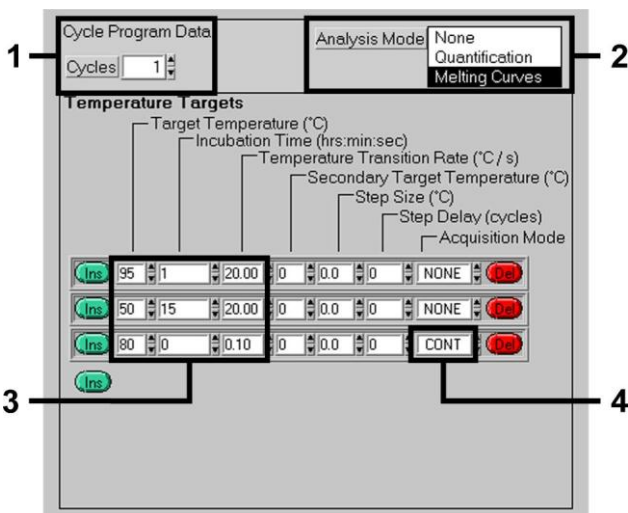
Εικ. 3: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.



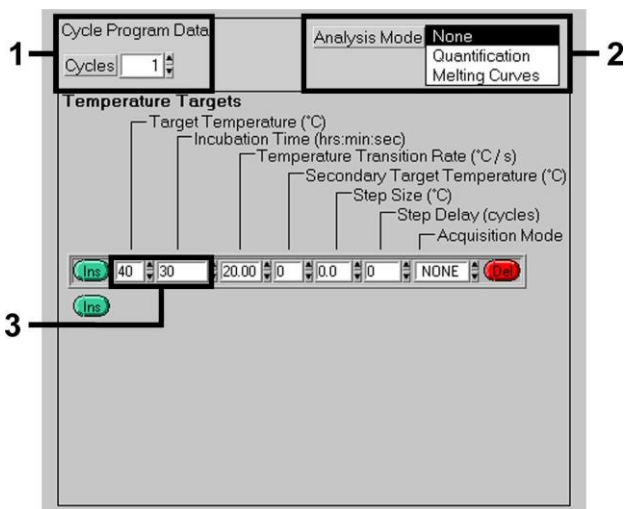
Εικ. 4: Βήμα touchdown.



Εικ. 5: Ενίσχυση του DNA.



Εικ. 6: Καμπύλη τήξης (εφαρμόζεται μόνο, εάν εκτελείται παράλληλα το κιτ *artus* HSV-1/2 LC PCR).



Εικ. 7: Ψύξη.

8.6.2 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler 2.0*

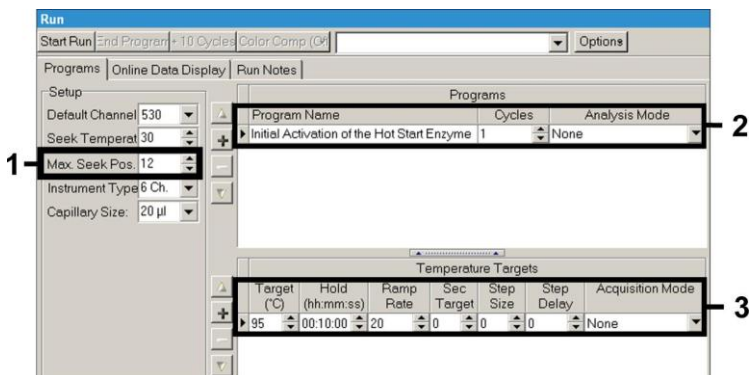
Για να προγραμματίσετε μια εκτέλεση PCR με το όργανο *LightCycler 2.0*, ενεργοποιήστε την επιλογή *NEW* (Νέο) στο κύριο μενού και επιλέξτε *LightCycler EXPERIMENT* (Πείραμα *LightCycler*).

Στη συνέχεια, για την ανίχνευση του DNA του CMV, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο *LightCycler 2.0* σύμφωνα με τα ακόλουθα πέντε βήματα (βλέπε Εικ. 8 – 12).

- A. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης Εικ. 8
- B. Βήμα touchdown Εικ. 9
- Γ. Ενίσχυση του DNA Εικ. 10
- Δ. Καμπύλη τήξης (**προαιρετικά**) Εικ. 11
- E. Ψύξη Εικ. 12

Το βήμα Δ. στο πρόγραμμα PCR είναι **προαιρετικό** και απαιτείται μόνο για τη διαφοροποίηση του HSV1 και HSV2 όταν χρησιμοποιείται το κιτ *artus HSV-1/2 LC PCR*.

Βεβαιωθείτε ότι έχετε πρώτα εισάγει τον αριθμό των τριχοειδών που προετοιμάζονται για αυτήν την εκτέλεση PCR [*MAX. SEEK POS.* (Μέγ. αρ. θέσεων αναζήτησης)], βλέπε Εικ. 8).



Εικ. 8: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.

The screenshot shows the 'Run' software interface. On the left, there are setup parameters: Default Channel (530), Seek Temperature (30), Max. Seek Pos. (12), Instrument Type (6 Ch.), and Capillary Size (20 µl). The main area is divided into 'Programs' and 'Program Temperature Targets'.

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Activation of the Hot Start Enzyme	1	None
Touch Down Step	10	None

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate	Sec Target	Step Size	Step Delay	Acquisition Mode
95	00:00:05	20	0	0	0	None
65	00:00:20	20	55	1	1	None
72	00:00:15	20	0	0	0	None

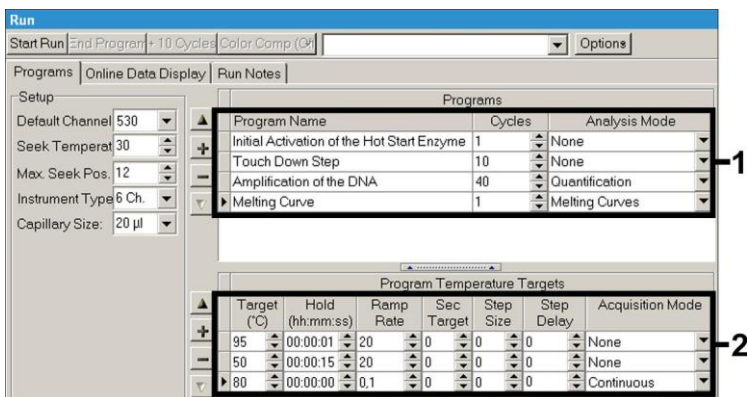
Εικ. 9: Βήμα touchdown.

The screenshot shows the 'Run' software interface after adding a new step. The 'Programs' table now includes 'Amplification of the DNA' with 40 cycles and 'Quantification' analysis mode.

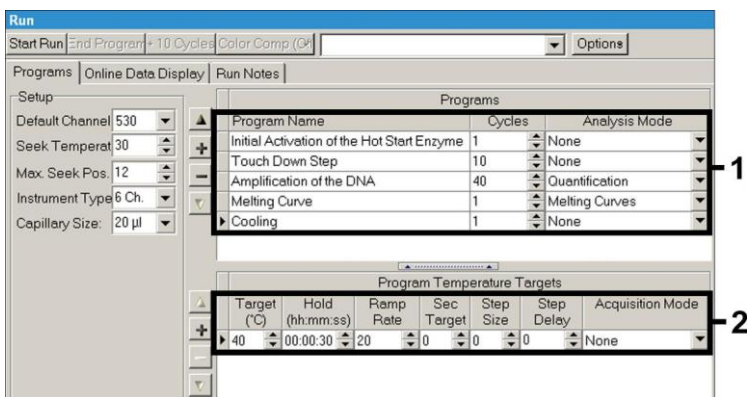
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Initial Activation of the Hot Start Enzyme	1	None
Touch Down Step	10	None
Amplification of the DNA	40	Quantification

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate	Sec Target	Step Size	Step Delay	Acquisition Mode
95	00:00:05	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	Single
72	00:00:15	10	0	0	0	None

Εικ. 10: Ενίσχυση του DNA.



Εικ. 11: Καμπύλη τήξης (εφαρμόζεται μόνο, εάν εκτελείται παράλληλα το κιτ *artus* HSV-1/2 LC PCR).



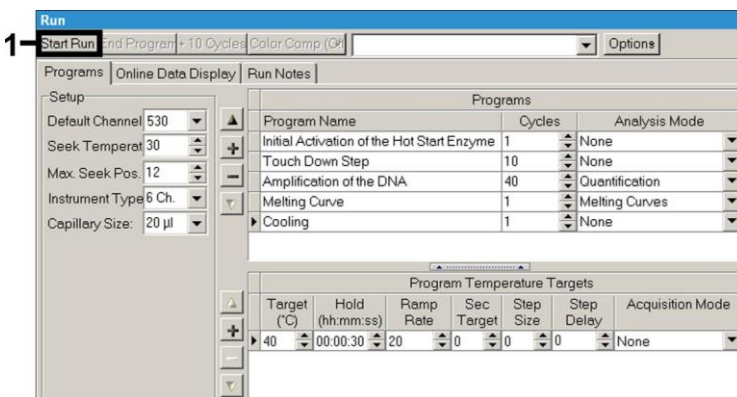
Εικ. 12: Ψύξη.

Για να εισάγετε τις προδιαγραφές δείγματος, ενεργοποιήστε το κουμπί **SAMPLES**.

- Στο παράθυρο **CAPILLARY VIEW** (Προβολή τριχοειδών) εισάγετε πρώτα το συνολικό αριθμό των προγραμματισμένων προετοιμασιών PCR για την εκτέλεση PCR [**SAMPLE COUNT** (Αριθμός δειγμάτων)].

- Στη συνέχεια, μπορείτε να αντιστοιχίσετε ονόματα στα δείγματα κάτω από το *SAMPLE NAME* (Όνομα δείγματος).
- Επίσης, κάτω από το *SELECTED CHANNELS* (Επιλεγμένα κανάλια) επιλέξτε τα κανάλια φθορισμού 530 για την ανίχνευση της ανάλυσης PCR του CMV και 705 για την ανίχνευση PCR του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Για να καθορίσετε τα πρότυπα και για να αντιστοιχίσετε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, επιλέξτε την επιλογή *ABSOLUTE QUANTIFICATION* κάτω από το *ANALYSIS TYPE* (Βλέπε **8.4 Ποσοτικοποίηση**).
- Βεβαιωθείτε ότι η λειτουργία *ENABLE CONTROLS* **δεν** είναι ενεργοποιημένη. Σε αντίθετη περίπτωση, η επιλογή των δυνατοτήτων ανάλυσης για την ανάλυση δεδομένων περιορίζεται [η λειτουργία *FIT POINTS* (Σημεία προσαρμογής) δεν είναι διαθέσιμη, βλέπε **9.2 Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο LightCycler 2.0**]. Κάτω από το *TARGET NAME* (Όνομα-στόχος) μπορείτε να αντιστοιχίσετε τις αλληλουχίες-στόχους προς ανίχνευση (CMV ή *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*) στα επιλεγμένα κανάλια φθορισμού 530 και 705. Η συμπλήρωση της στήλης *TARGET NAME* μπορεί να διευκολυνθεί με τη λειτουργία *AUTO COPY* (Αυτόματη αντιγραφή). Ο καθορισμός του *TARGET NAME* βοηθά στην επίτευξη μιας καλύτερης επισκόπησης, αλλά δεν απαιτείται αυστηρά για την ανάλυση δεδομένων.
- Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης για την ανάλυση δεδομένων, τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* πρέπει να καθορίζονται με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους. Ως εκ τούτου, επιλέξτε *STANDARD* (Πρότυπο) κάτω από το *SAMPLE TYPE* (Τύπος δείγματος) και εισάγετε την αντίστοιχη συγκέντρωση για κάθε πρότυπο κάτω από το *CONCENTRATION* (Συγκέντρωση).
- Το προγραμματισμένο προφίλ θερμοκρασίας μπορεί να αποθηκευτεί στο σκληρό δίσκο του υπολογιστή, για να χρησιμοποιηθεί ξανά για περαιτέρω εκτελέσεις. Για το σκοπό αυτό, ενεργοποιήστε τη λειτουργία *SAVE AS* (Αποθήκευση ως) κάτω από το μενού *FILE* (Αρχείο), οπότε ανοίγει ένα νέο παράθυρο. Κάτω από το *TEMPLATES AND MACROS* (Πρότυπα και

- μακροεντολές) επιλέξτε το υπομενού *RUN TEMPLATES* (Πρότυπα εκτέλεσης) και αποθηκεύστε τα δεδομένα κάτω από ένα κατάλληλο όνομα.
- Για να εκκινήσετε μια εκτέλεση PCR, μεταβείτε στο πεδίο *RUN* (Εκτέλεση) και ενεργοποιήστε τη λειτουργία *START RUN* (Εκκίνηση εκτέλεσης) (βλέπε Εικ. 13). Το πρόγραμμα PCR θα εκκινηθεί μετά την εισαγωγή της τοποθεσίας όπου θα πρέπει να αποθηκευτούν τα δεδομένα.



Εικ. 13: Εκκίνηση της εκτέλεσης PCR.

9. Ανάλυση δεδομένων

9.1 Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Για την ανάλυση των δεδομένων PCR που συλλέγονται με το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5*, συνιστούμε τη χρήση του λογισμικού *LightCycler* έκδοση 3.5.

Στις πολυχρωματικές αναλύσεις, εμφανίζονται παρεμβολές μεταξύ των καναλιών φθορισμόμετρου. Το λογισμικό του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5* περιέχει ένα αρχείο που ονομάζεται *COLOR COMPENSATION FILE* (Αρχείο αντιστάθμισης χρώματος), το οποίο αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές. Ανοίξτε αυτό το αρχείο πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την εκτέλεση της PCR

ενεργοποιώντας το κουμπί *CHOOSE CCC FILE* (Επιλογή αρχείου CCC) ή *SELECT CC DATA* (Επιλογή δεδομένων CC). Εάν δεν έχει εγκατασταθεί *COLOR COMPENSATION FILE*, δημιουργήστε το αρχείο σύμφωνα με τις οδηγίες στο *LightCycler Operator's Manual*. Μετά την ενεργοποίηση του *COLOR COMPENSATION FILE*, εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα στα κανάλια φθορισμόμετρου F1, F2 και F3. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων PCR που ελήφθησαν με το κιτ *artus CMV LC PCR*, επιλέξτε τις επιλογές εμφάνισης φθορισμού F1 για την ανάλυση PCR του CMV και F3/Back-F1 για την -PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, αντίστοιχα. **Για την ανάλυση των ποσοτικών εκτελέσεων, ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα 8.4 Ποσοτικοποίηση και στην τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0* (*Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument*) 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. Επιλέξτε ανάλογα τις θέσεις καρουσέλ για την ανάλυση.

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμόμετρου F1.

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

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

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

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

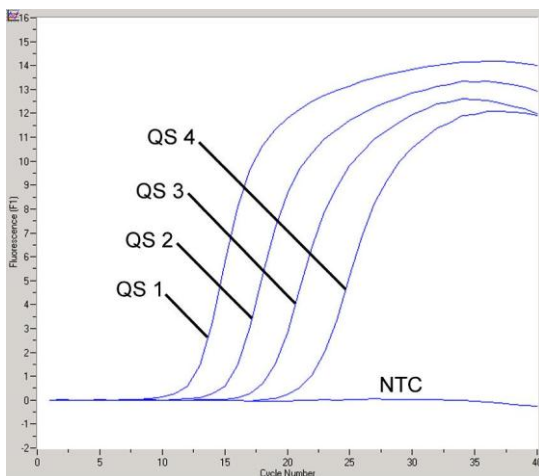
Στην περίπτωση αρνητικής PCR για CMV, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

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

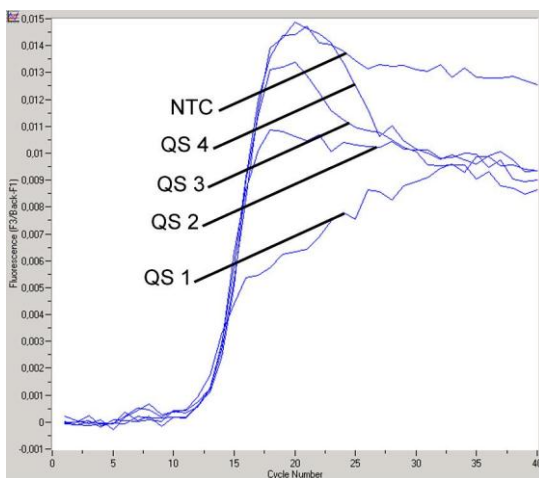
Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

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

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στην Εικ. 14 και Εικ. 15.



Εικ. 14: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (CMV QS 1 – 4) στο κανάλι φθορισμού F1 του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5*. NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 15: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμού F3/Back-F1 του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5* με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων*

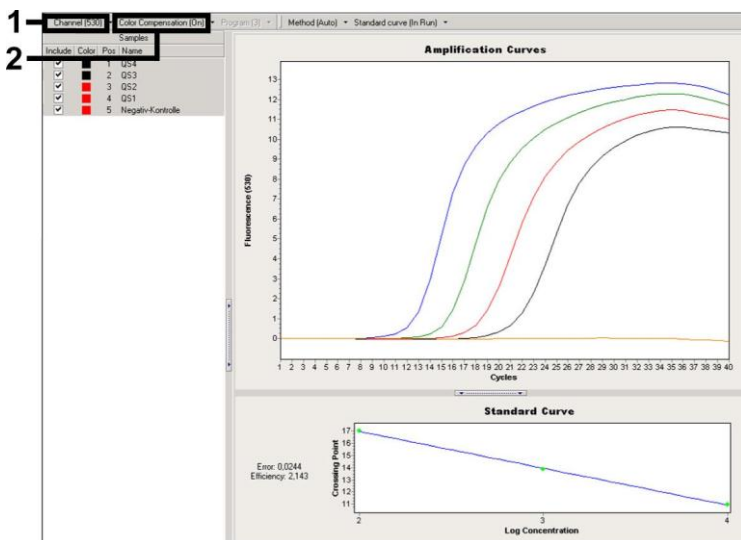
ποσοτικοποίησης (CMV QS 1 – 4). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).

9.2 Ανάλυση δεδομένων των δεδομένων PCR στο όργανο *LightCycler 2.0*

Για την ανάλυση των δεδομένων PCR που συλλέγονται με το όργανο *LightCycler 2.0*, συνιστούμε τη χρήση του λογισμικού *LightCycler* έκδοση 4.0. Παρακαλούμε λάβετε υπόψη τις οδηγίες που δίνονται στο εγχειρίδιο χειριστή του οργάνου *LightCycler 2.0* έκδοση 4.0 (*LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual Version 4.0*).

Για την ανάλυση των δεδομένων PCR προχωρήστε ως εξής (βλέπε Εικ. 16):

- Ενεργοποιήστε τη λειτουργία *ANALYSIS* (Ανάλυση) στην ταινία μενού και επιλέξτε το στοιχείο *ABSOLUTE QUANTIFICATION*. Κατ' αρχήν, όλα τα δεδομένα ενίσχυσης που παράγονται με το κιτ *artus LC PCR* πρέπει να αναλύονται με αυτή τη λειτουργία.
- Το λογισμικό του *LightCycler* έκδοση 4.0 περιέχει ένα αρχείο που ονομάζεται *COLOR COMPENSATION FILE*, το οποίο αντισταθμίζει παρεμβολές πολυχρωματικών αναλύσεων μεταξύ των καναλιών φθορισμού. Ανοίξτε αυτό το αρχείο κατά τη διάρκεια ή μετά από μια εκτέλεση PCR ενεργοποιώντας το *COLOR COMP (ON/OFF)* [Αντιστάθμιση χρώματος (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση)] και στη συνέχεια το κουμπί *SELECT COLOR COMPENSATION* (Επιλογή αντιστάθμισης χρώματος) (βλέπε Εικ. 16). Εάν δεν έχει εγκατασταθεί *COLOR COMPENSATION FILE*, δημιουργήστε το αρχείο σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο *LightCycler Operator's Manual*.
- Μετά την ενεργοποίηση του *COLOR COMPENSATION FILE*, εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα στα κανάλια φθορισμού. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων PCR που ελήφθησαν με το κιτ *artus CMV LC PCR*, επιλέξτε τις επιλογές εμφάνισης φθορισμού 530 για την ανάλυση PCR του CMV και 705/Back 530 για την -PCR του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*, αντίστοιχα.



Εικ. 16: Ενεργοποίηση του *COLOR COMPENSATION FILE* και επιλογή του καναλιού φθορισμού.

Για την ανάλυση των ποσοτικών εκτελέσεων, ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα **8.4 Ποσοτικοποίηση** και στην τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0* (***Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument***) στο www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Αφού ολοκληρωθεί η ρύθμιση των επιλογών ανάλυσης, είναι δυνατά τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμού 530.

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

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι 705/Back 530 μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA του CMV (θετικό σήμα στο κανάλι 530) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος

φθορισμού του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο κανάλι 705/Back 530 (ανταγωνισμός).

2. Στο κανάλι φθορισμού 530 δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι 705/Back 530.

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

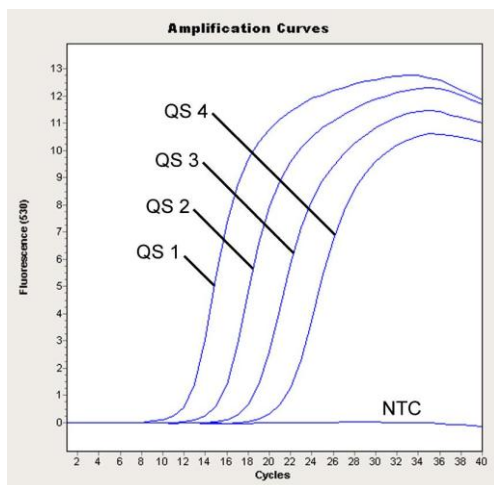
Στην περίπτωση αρνητικής PCR για CMV, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι 530 ή στο κανάλι 705/Back 530.

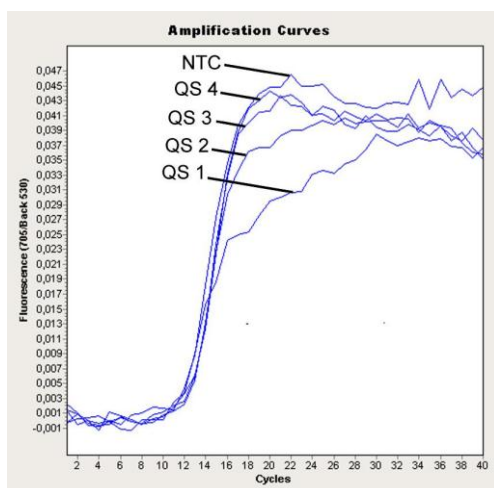
Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

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

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στην Εικ. 17 και Εικ. 18.



Εικ. 17: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV QS 1 – 4) στο κανάλι φθορισμού 530 του οργάνου *LightCycler 2.0*. NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Εικ. 18: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) στο κανάλι φθορισμού 705/Back 530 του οργάνου *LightCycler 2.0* με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης

(*CMV QS 1 – 4*). NTC: No template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).

10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Απουσία σήματος με θετικά πρότυπα ελέγχου (*CMV QS 1 – 4*) στο κανάλι φθορισμού F1 ή 530:

- Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.
 - Για ανάλυση δεδομένων, επιλέξτε το κανάλι φθορισμού F1 ή 530 για την ανάλυση PCR του *CMV* και το κανάλι φθορισμού F3/Back-F1 ή 705/Back 530 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ή *LightCycler 2.0*.
 - Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο (βλέπε **8.6 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler***).
- Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης της PCR.
 - Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **8.5 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2. Αποθήκευση** ή το κιτ *artus CMV LC PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

Ασθενές ή ανύπαρκτο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος το οποίο έχει υποβληθεί σε επεξεργασία μέσω καθαρισμού (απόκλιση υψηλότερη από $Ct = 14 \pm 3$ όταν χρησιμοποιείται το κιτ *QIAamp DSP Virus*, απόκλιση υψηλότερη από $Ct = 15 \pm 3$ όταν χρησιμοποιείται το κιτ *EZ1 DSP Virus*, βλέπε Πίνακα 1) και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι F1 ή 530:

- 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 διαδικασία απομόνωσης που συνιστούμε (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 *πρωτύπου 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 κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2. Αποθήκευση** ή το κιτ *artus CMV LC PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

Σήματα με τα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο κανάλι φθορισμού F1 ή 530 της ανάλυσης PCR.

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

- Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση.
 - Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR των εξεταζόμενων δειγμάτων με τη χρησιμοποίηση νέων αντιδραστηρίων.
 - Βεβαιωθείτε πως ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

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

11. Ειδικά χαρακτηριστικά

11.1 Αναλυτική ευαισθησία

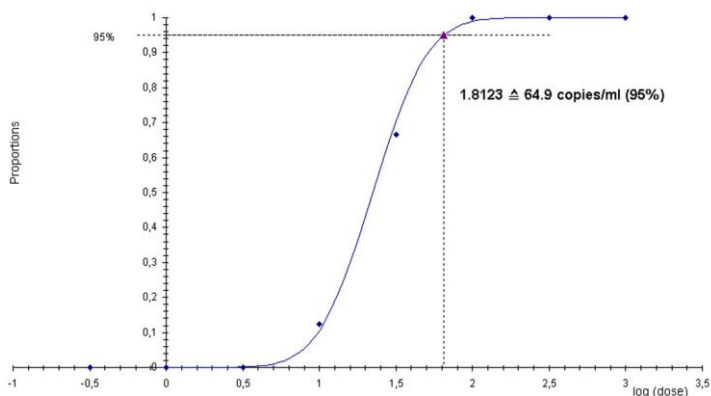
Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης καθώς και το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης όσον αφορά στον καθαρισμό (όριο ευαισθησίας) αξιολογήθηκαν για το kit *artus* CMV LC PCR. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον CMV δειγμάτων και λαμβάνοντας 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 LC PCR, προετοιμάστηκε σειρά αραιώσεων γονιδιωματικού DNA του CMV από 10 έως ονομαστικά 0,00316 αντίγραφα CMV/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο **όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5*** σε συνδυασμό με το kit *artus* CMV LC PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του kit *artus* CMV LC PCR σε συνδυασμό με το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5* είναι 0,49 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 0,49 αντίγραφα/μl ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.

Η **αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (kit *QIAamp DSP Virus*)** του kit *artus* CMV LC PCR στο **όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5*** προσδιορίστηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσεων από υλικό του ιού CMV από 1.000 έως

ονομαστικά 0,316 αντίγραφα CMV/ml με εμβολιασμό σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA με το κιτ QIAamp DSP Virus (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 60 μl). Καθεμιά από τις οκτώ αραιώσεις αναλύθηκε με το κιτ *artus* CMV LC PCR σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης Probit παρουσιάζεται στην Εικ. 19. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό του κιτ *artus* CMV LC PCR σε συνδυασμό με το όργανο *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 είναι 64,9 αντίγραφα/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95% πιθανότητα ανίχνευσης 64,9 αντιγράφων/ml.

Ανάλυση Probit: Κυτταρομεγαλοϊός (*LightCycler* 1.1/1.2/1.5)



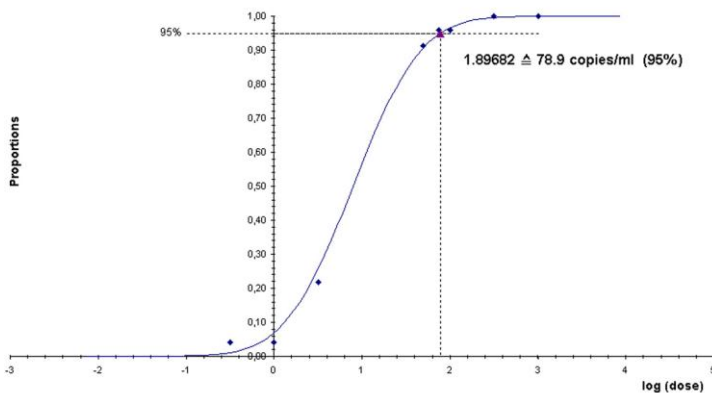
Εικ. 19: Αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus) του κιτ *artus* CMV LC PCR στο όργανο *LightCycler* 1.1/1.2/1.5.

Για να προσδιοριστεί η **αναλυτική ευαισθησία** του κιτ *artus* CMV LC PCR, προετοιμάστηκε σειρά αραιώσεων γονιδιωματικού DNA του CMV από 10 έως ονομαστικά 0,00316 αντίγραφα CMV/ml και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο **όργανο *LightCycler* 2.0** σε συνδυασμό με το κιτ *artus* CMV LC PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς

κλώνους. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του kit *artus* CMV LC PCR σε συνδυασμό με το όργανο *LightCycler 2.0* είναι 0,65 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 0,65 αντίγραφα/μl ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.

Η αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus) του κιτ *artus* CMV LC PCR στο όργανο *LightCycler 2.0* προσδιορίστηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσεων από υλικό του ιού CMV από 1.000 έως ονομαστικά 0,316 αντίγραφα CMV/ml με εμβολιασμό σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA με το κιτ QIAamp DSP Virus (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 60 μl). Καθεμιά από τις οκτώ αραιώσεις αναλύθηκε με το κιτ *artus* CMV LC PCR σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης Probit παρουσιάζεται στην Εικ. 20. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό του κιτ *artus* CMV LC PCR σε συνδυασμό με το όργανο *LightCycler 2.0* είναι 78,9 αντίγραφα/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95% πιθανότητα ανίχνευσης 78,9 αντιγράφων/ml.

Ανάλυση Probit: Κυτταρομεγαλοϊός (*LightCycler 2.0*)



Εικ. 20: Αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus) του κιτ *artus* CMV LC PCR στο όργανο *LightCycler 2.0*.

Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό του κιτ *artus* CMV LC PCR σε συνδυασμό με το όργανο *LightCycler 1.1/1.2/1.5/2.0*

και το kit EZ1 DSP Virus (όγκος εκχύλισης 0,4 ml, όγκος έκλουσης: 60 μl) στο EZ1 Advanced ή BioRobot EZ1 DSP είναι 67,2 αντίγραφα/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95 % πιθανότητα ανίχνευσης 67,2 αντιγράφων/ml.

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus* CMV LC PCR διασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και από την τήρηση αυστηρών συνθηκών για την αντίδραση. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές ελέγχθηκαν ως προς πιθανές ομολογίες με όλες τις δημοσιευμένες ακολουθίες σε τράπεζες γονιδίων μέσω ανάλυσης σύγκρισης ακολουθιών. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών στελεχών συνεπώς διασφαλίστηκε.

Εκτός αυτού, η ειδικότητα επαληθεύτηκε με 100 διαφορετικά CMV αρνητικά δείγματα πλάσματος. Αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για CMV ενισχυτές και ανιχνευτές, που περιλαμβάνονται στο *CMV LC Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του kit *artus* CMV LC PCR, η ομάδα προτύπων ελέγχου που παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα (βλέπε Πίνακας 2) ελέγχθηκε για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση. Δεν παρουσιάστηκαν διασταυρούμενες αντιδραστικότητες σε μεικτές λοιμώξεις.

Πίνακας 2: Ειδικός έλεγχος του kit με δυνητικά διασταυρούμενους αντιδρώντες παθογόνους παράγοντες.

Ομάδα ελέγχου	CMV (F1)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (F3/Back-F1)
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 ερπητιοίος 8 (ερπητιοίος 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 LC PCR συλλέχθηκαν με τη βοήθεια του οργάνου *LightCycler 1.1/1.2/1.5* 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 *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Τα δεδομένα ακρίβειας εξετάστηκαν, για το κιτ *artus CMV LC PCR*, βάσει του *προτύπου 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 κατωφλίου*, βλέπε Πίνακας 3). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε αντίγραφα/μl προσδιορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών Ct (βλέπε Πίνακας 4). Συνεπώς, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος της αναφερομένης συγκέντρωσης ανέρχεται σε 2,47% (Ct) ή 14,06% (συγκέντρωση), για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο 5,31% (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ακρίβειας βάσει των τιμών Ct.

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>CMV QS 4</i>	0,14	0,02	0,68
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,04	0,00	0,32
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>CMV QS 4</i>	0,21	0,04	1,00
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,14	0,02	1,18
Μεταβλητότητα μεταξύ	0,54	0,30	2,50

παρτίδων: CMV QS 4			
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,72	0,52	5,73
Συνολική διασπορά: CMV QS 4	0,53	0,28	2,47
Συνολική διασπορά: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,64	0,41	5,31

Πίνακας 4: Δεδομένα ακρίβειας στη βάση ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε αντίγραφα/μl).

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: CMV QS 4	1,02	1,05	10,18
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: CMV QS 4	1,35	1,81	13,35
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: CMV QS 4	1,64	2,69	16,19
Συνολική διασπορά: CMV QS 4	1,42	2,02	14,06

11.4 Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του kit *artus* CMV LC 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 LC PCR. Το ποσοστό αποτυχίας για τον CMV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Η ανθεκτικότητα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω του καθαρισμού και της ανάλυσης 100 αρνητικών στον CMV δειγμάτων πλάσματος. Για το λόγο αυτό, η ανθεκτικότητα του kit *artus* CMV LC PCR είναι ≥ 99 %.

11.5 Επαναληψιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του kit *artus* CMV LC 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 κιτ *artus* CMV LC PCR αξιολογήθηκε σε μια μελέτη. Συγκρίνοντας το κιτ *artus* CMV LC PCR με τη δοκιμασία COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR®, 177 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 κιτ *artus* CMV LC PCR απομονώθηκαν προσθέτοντας το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του κιτ *artus* CMV LC PCR με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus και στη συνέχεια αναλύθηκαν από το όργανο *LightCycler*. 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 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR έδωσαν επίσης θετικό αποτέλεσμα με το κιτ *artus* CMV LC PCR. Και τα 144 δείγματα που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα με τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR καθώς επίσης και με το κιτ *artus* CMV LC PCR. Ελήφθησαν 22 ασύμφωνα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης επικύρωσης.

Δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR				
		+	-	Σύνολο
Κιτ <i>artus</i> CMV LC PCR	+	11	22	33
	-	0	144	144

Εάν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας COBAS AMPLICOR CMV MONITOR ληφθούν ως αναφορά, η διαγνωστική ευαισθησία όλων των δειγμάτων του κιτ *artus* CMV LC PCR είναι 100%, και η διαγνωστική ειδικότητα είναι 86,7%.

Περαιτέρω εξέταση των 22 ασύμφωνων αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των κιτ *artus* PCR. Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι η ασυμφωνία βασίζεται στην υψηλότερη ευαισθησία του κιτ *artus* CMV LC PCR.

12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

- Η χρήση πρέπει να γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro* (EN375).
- Η ακριβής τήρηση του πρωτοκόλλου είναι απολύτως απαραίτητη, για την επίτευξη άριστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή τον ανιχνευτή του κιτ, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

13. Πληροφορίες ασφάλειας

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείσθε 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 LC 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

Πρότυπο ποσοτικοποίησης

IC

Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Mg-Sol

Διάλυμα μαγνησίου

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Kit *artus* CMV LC PCR

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EASY*artus*®, EZ1® (QIAGEN Group)· *LightCycler*®,
AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH).

Η αγορά αυτού του προϊόντος παρέχει στον αγοραστή τη δυνατότητα της χρήσης του για την εκτέλεση διαγνωστικών υπηρεσιών για in vitro διάγνωση σε ανθρώπους. Με τον παρόν δεν παρέχεται κανένα γενικό δικαίωμα ευρεσιτεχνίας ή άλλη άδεια οποιουδήποτε είδους, εκτός από το παρόν, συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης από την αγορά.

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

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

Άδεια περιορισμένης χρήσης

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

1. Η χρήση του kit *artus* CMV LC PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit artus CMV LC PCR* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο kit artus CMV LC 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 kit και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit 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)

1046903EL 148051746



Sample & Assay Technologies