

Μάρτιος 2021

Οδηγίες χρήσης (Εγχειρίδιο) για το *artus*[®] CMV RG PCR Kit



24 (αρ. καταλόγου 4503263)



96 (αρ. καταλόγου 4503265)

Έκδοση 1

Ποσοτικό in vitro διαγνωστικό προϊόν

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE 0197

REF

4503263, 4503265



QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R6 **MAT**

1123965EL

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....	5
Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.....	6
Αρχή της διαδικασίας	6
Υλικά που παρέχονται	7
Περιεχόμενα του κιτ.....	7
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	8
Αντιδραστήρια	8
Αναλώσιμα	8
Εξοπλισμός	8
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	9
Πληροφορίες ασφάλειας.....	9
Προφυλάξεις.....	9
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	10
Χειρισμός και φύλαξη δειγμάτων	10
Δειγματοληψία.....	11
Φύλαξη δειγμάτων.....	11
Μεταφορά δειγμάτων	12
Διαδικασία	13
Απομόνωση DNA.....	13
Εσωτερικός μάρτυρας.....	14
Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων.....	15

Ερμηνεία αποτελεσμάτων	25
Ποσοτικοποίηση	25
Αποτελέσματα	26
Έλεγχος ποιότητας	29
Περιορισμοί	29
Χαρακτηριστικά απόδοσης	30
Αναλυτική ευαισθησία	30
Γραμμικό εύρος	32
Ειδικότητα	33
Ακρίβεια	35
Παρεμβαλλόμενες ουσίες	37
Αξιοπιστία	39
Αναπαραγωγικότητα	39
Διαγνωστική αξιολόγηση	41
Βιβλιογραφία	43
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	44
Σύμβολα	46
Πληροφορίες παραγγελιών	47
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου	50

Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ *artus* CMV RG PCR Kit είναι ένας in vitro έλεγχος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ποσοτικοποίηση DNA του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) στο ανθρώπινο πλάσμα. Αυτό το κιτ διαγνωστικής δοκιμασίας χρησιμοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και είναι διαμορφωμένο για χρήση με όργανα Rotor-Gene Q.

Το *artus* CMV RG PCR Kit προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με την κλινική εμφάνιση και άλλους εργαστηριακούς δείκτες για τη διαχείριση λοίμωξης από CMV σε ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο νόσου CMV.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων του *artus* CMV RG PCR Kit πρέπει να πραγματοποιείται στο πλαίσιο όλων των σχετικών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων.

Το *artus* CMV RG PCR Kit δεν προορίζεται για χρήση ως εξέταση διαλογής για την παρουσία CMV στο αίμα ή σε παράγωγα αίματος ούτε ως διαγνωστική δοκιμασία για την επιβεβαίωση της παρουσίας λοίμωξης με CMV.

Περιγραφή και αρχή λειτουργίας

Το *artus* CMV RG PCR Kit είναι ένα έτοιμο προς χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του ιού CMV με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) σε όργανα Rotor-Gene Q MDx. Το CMV RG Master περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση περιοχής 105 bp του κύριου άμεσου πρώιμου (Major Immediate Early Gene, *MIE*) γονιδίου εντός του γονιδιώματος CMV (ο προσδιορισμός μπορεί να ανιχνεύει τους γονότυπους gB1 – gB4 του CMV) και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green του Rotor-Gene Q MDx.

Επιπλέον, το *artus* CMV RG PCR Kit περιλαμβάνει ακόμη ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για τη διαπίστωση τυχόν αναστολής της PCR. Το σύστημα αυτό ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow του οργάνου Rotor-Gene Q MDx. Παρέχονται εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες (CMV QS 1–4) οι οποίοι καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της ποσότητας του ιικού DNA. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. «Ποσοτικοποίηση», σελίδα 25.

Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (CMV) ανευρίσκεται στο αίμα, στους ιστούς και σχεδόν σε όλες τις εκκρίσεις των προσβεβλημένων ατόμων. Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί δια στόματος, με τη σεξουαλική επαφή, με μετάγγιση αίματος ή μεταμόσχευση οργάνων, ενδομήτρια ή περιγεννητικά (1-4). Η εξέταση ιικού φορτίου του CMV αποτελεί σημαντικό βοήθημα για την αξιολόγηση του κινδύνου της νόσου, για τη διάγνωση της νόσου και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (5).


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 (6). Έχουν παρατηρηθεί βαριές λοιμώξεις από CMV, ιδιαίτερα σε ασθενείς που προσβλήθηκαν ενδομήτρια και σε ασθενείς με ανοσολογική ανεπάρκεια (4,7).

Αρχή της διαδικασίας

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου μικροοργανισμού. Στη μέθοδο real-time PCR, το ενισχυμένο προϊόν ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές. Αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων που προσδένονται ειδικά στο ενισχυμένο προϊόν. Η παρακολούθηση των εντάσεων φθορισμού κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της PCR (δηλ. σε πραγματικό χρόνο) επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συσσωρευόμενου προϊόντος χωρίς να χρειάζεται να ανοιχτούν ξανά τα σωληνάρια αντίδρασης μετά το πέρας της εκτέλεσης PCR (8).

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του κιτ

artus CMV RG PCR Kit		(24)	(96)
Αρ. καταλόγου		4503263	4503265
Αριθμός αντιδράσεων		24	96
Μπλε	CMV RG Master (Ταq 0,1 U/μl)		2 x 12 αντιδράσεις
Κίτρινο	CMV Mg-Sol*	Mg-Sol	600 μl
Κόκκινο	CMV QS 1 [†] (1 x 104 αντίγραφα/μl)	QS	200 μl
Κόκκινο	CMV QS 2 [†] (1 x 103 αντίγραφα/μl)	QS	200 μl
Κόκκινο	CMV QS 3 [†] (1 x 102 αντίγραφα/μl)	QS	200 μl
Κόκκινο	CMV QS 4 [†] (1 x 101 αντίγραφα/μl)	QS	200 μl
Πράσινο	CMV RG IC [‡]	IC	1.000 μl
Λευκό	Water (PCR grade) (Νερό (βαθμού PCR))		1.000 μl
	Οδηγίες χρήσης		1

* Διάλυμα μαγνησίου

[†] Πρότυπο ποσοτικοποίησης

[‡] Εσωτερικός μάρτυρας

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Αντιδραστήρια

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 13)

Αναλώσιμα

- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, για χρήση με 72-Well Rotor (αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- **Εναλλακτικά:** PCR Tubes, 0.2 ml, για χρήση με 36-Well Rotor (αρ. κατ. 981005 ή 981008)

Εξοπλισμός

- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Αναδευτήρας Vortex*
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Όργανα Rotor-Gene Q MDx* με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Yellow
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή νεότερη
- Τεμάχιο ψύξης (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, αρ. κατ. 9018901 ή Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, αρ. κατ. 9018905)

* Πριν από τη χρήση, βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα **www.qiagen.com/safety**, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε κιτ της QIAGEN, καθώς και για τα εξαρτήματά του.

Απορρίπτετε τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφάλειας.

Προφυλάξεις

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

- Πρέπει να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Τα θετικά υλικά (δοκίμια, θετικοί μάρτυρες και αμπλικόνια) πρέπει να φυλάσσονται και να εκχυλίζονται ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και να προστίθενται στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Όλα τα συστατικά πρέπει να αποψύχονται πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.
- Αφού αποψυχθούν, τα συστατικά πρέπει να αναμειχθούν (με αναρρόφηση και επανειλημμένη διανομή με πιπέτα ή με παλμικό στροβιλισμό) και να φυγοκεντριστούν για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Η εργασία πρέπει να εκτελεστεί γρήγορα και τα συστατικά να διατηρηθούν σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (μπλοκ φόρτωσης 72/96 βυθισμάτων).

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα συστατικά του *artus* CMV RG PCR Kit θα πρέπει να φυλάσσονται στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ και είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη (>2 φορές), καθώς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού. Για τον λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ώρες.

Χειρισμός και φύλαξη δειγμάτων

Σημείωση: Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

Σημείωση: Αναλυτικές μελέτες που έχουν διενεργηθεί για την επαλήθευση της απόδοσης του kit, αναφέρονται στο πλάσμα EDTA ως το πλέον κατάλληλο υλικό δειγμάτων για την ανίχνευση του ιού CMV. Για τον λόγο αυτό συνιστάται να χρησιμοποιείτε αυτό το υλικό σε συνδυασμό με το *artus* CMV RG PCR Kit.

Η επικύρωση του *artus* CMV RG PCR Kit έγινε με δείγματα ανθρώπινου πλάσματος-EDTA. Άλλα υλικά δείγματος δεν έχουν επικυρωθεί. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά το συνιστώμενο kit απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 13) για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Κατά τη χρήση ορισμένων υλικών δειγμάτων πρέπει να τηρούνται αυστηρά συγκεκριμένες οδηγίες σχετικές με τη συλλογή, τη μεταφορά και τη φύλαξη.

Δειγματοληψία

Κάθε αιμοληψία έχει σαν αποτέλεσμα τον τραυματισμό αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες ή τριχοειδή αγγεία). Επιτρέπεται μόνο η χρήση αβλαβούς και αποστειρωμένου υλικού. Για την αιμοληψία πρέπει να διατίθενται κατάλληλα υλικά μίας χρήσης. Για τη φλεβοκέντηση δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται υπερβολικά λεπτές τριχοειδικές βελόνες. Η λήψη φλεβικού αίματος θα πρέπει να πραγματοποιείται σε κατάλληλα σημεία της καμπής του αγκώνα, του αντιβραχίου ή της ράχης της παλάμης. Το αίμα πρέπει να λαμβάνεται με τυπικά σωληνάρια δειγματοληψίας (κόκκινου πώματος, Sarstedt® ή αντίστοιχο σωληνάριο άλλου κατασκευαστή). Πρέπει να λαμβάνεται όγκος 5–10 ml αίματος σε σωληνάριο EDTA. Τα σωληνάρια πρέπει, αμέσως μετά την συλλογή του δείγματος, να αναμειγνύονται με αναστροφή (8x, όχι ανατάραξη).

Σημείωση: Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ηπαρινισμένα δείγματα.

Φύλαξη δειγμάτων

Το ολικό αίμα πρέπει να διαχωρίζεται σε πλάσμα και κυτταρικά συστατικά με φυγοκέντριση για 20 λεπτά στα 800–1.600 x g εντός 6 ωρών (9,10). Το απομονωμένο πλάσμα μεταφέρεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια από πολυπροπυλένιο. Η ευαισθησία του προσδιορισμού μπορεί να περιορισθεί εάν η συνήθης διαδικασία είναι να καταψύχονται τα δείγματα ή να αποθηκεύονται για μεγαλύτερη χρονική περίοδο.

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 λοίμωξης λόγω διαφυγής του δείγματος. Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται σύμφωνα με τις τοπικές και εθνικές οδηγίες για τη μεταφορά παθογόνων υλικών.*

Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται εντός 6 ωρών. Δεν συνιστάται αποθήκευση των δειγμάτων στον τόπο λήψης τους. Ταχυδρομική αποστολή των δειγμάτων είναι δυνατή, σύμφωνα με τις νομικές υποδείξεις για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Συνιστούμε μεταφορά δειγμάτων μέσω ιδιωτικής υπηρεσίας ταχυμεταφορών. Τα δείγματα αίματος πρέπει να αποστέλλονται υπό ψύξη (2–8 °C) και του διαχωρισμένου πλάσματος υπό κατάψυξη (–30 έως –15 °C).

* International Air Transport Association (IATA) (Διεθνής Ένωση Αεροπορικών Μεταφορών). Κανονισμοί περί Επικίνδυνων Εμπορευμάτων.

Διαδικασία

Απομόνωση DNA

Τα κιτ της QIAGEN που περιλαμβάνει ο Πίνακας 1 έχουν επικυρωθεί για τον καθαρισμό ιικού DNA από τους τύπους ανθρώπινων δειγμάτων που ενδείκνυνται για χρήση με το *artus* CMV RG PCR Kit. Εκτελέστε τον καθαρισμό του ιικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στα εγχειρίδια των αντίστοιχων κιτ.

Πίνακας 1. Κιτ καθαρισμού επικυρωμένα για χρήση με το *artus* CMV RG PCR Kit

Υλικό δείγματος	Όγκος δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου	Φορέας RNA
Πλάσμα με EDTA	500 µl	QIAamp® DSP Virus Kit	60704	Περιέχεται
Πλάσμα με EDTA	400 µl	EZ1® DSP Virus Kit (48)	62724	Περιέχεται

Σημείωση: Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Για την αύξηση της σταθερότητας του φορέα RNA που παρέχεται με το QIAamp DSP Virus Kit, συνιστούμε να ακολουθείτε τις πληροφορίες σχετικά με την ανασύσταση και τη φύλαξη του φορέα RNA που δίνονται στην ενότητα «Προετοιμασία αντιδραστηρίων και ρυθμιστικών διαλυμάτων» στο *Εγχειρίδιο του QIAamp DSP Virus Kit*.

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας του *artus* CMV RG PCR Kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης. Βεβαιωθείτε ότι ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος περιλαμβάνεται στη διαδικασία απομόνωσης. Το αντίστοιχο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποτελεί τη βάση για την αξιολόγηση της απομόνωσης (βλ. την ενότητα «Εσωτερικός μάρτυρας» παρακάτω).

Εσωτερικός μάρτυρας

Με το kit παρέχεται εσωτερικός μάρτυρας (CMV RG IC). Με αυτόν, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ελέγξει τόσο τη διαδικασία απομόνωσης του DNA όσο και μια ενδεχόμενη αναστολή της PCR. Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα στην απομόνωση σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, με χρήση του QIAamp DSP Virus Kit, το DNA εκλύεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AVE). Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 6 μl του εσωτερικού μάρτυρα. Η ποσότητα του εσωτερικού μάρτυρα που χρησιμοποιείται εξαρτάται μόνο από τον όγκο έκλουσης.

Σημείωση: Ο εσωτερικός μάρτυρας και ο φορέας RNA (βλ. «Απομόνωση DNA», σελίδα 13) θα πρέπει να προστίθενται μόνο στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Ο εσωτερικός μάρτυρας δεν πρέπει να προστίθεται στο υλικό δείγματος απευθείας. Εάν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, λάβετε υπόψη ότι το μείγμα εσωτερικού μάρτυρα και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης–φορέα RNA πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο και να χρησιμοποιείται αμέσως (η φύλαξη του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο για μόνο μερικές ώρες μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία του εσωτερικού μάρτυρα και μειωμένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης).

Σημείωση: Μην προσθέτετε απευθείας τον εσωτερικό μάρτυρα και τον φορέα RNA στο υλικό του δείγματος.

Για να θεωρηθεί επιτυχής ένας καθαρισμός, η τιμή C_T του εσωτερικού μάρτυρα ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος το οποίο υποβλήθηκε σε επεξεργασία κατά τη διάρκεια του καθαρισμού (QIAamp DSP Virus Kit) πρέπει να ανέλθει σε C_T = 27 ± 3 (όριο: 0,03) με χρήση οργάνων Rotor-Gene Q (βλ. σελίδα 28 για περισσότερες πληροφορίες). Η αναφερόμενη διασπορά οφείλεται σε διακύμανση μεταξύ οργάνων 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. Αν έχετε περαιτέρω ερωτήσεις ή αν συναντήσετε προβλήματα, επικοινωνήστε με το τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN.

Προαιρετικά, ο εσωτερικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για τον έλεγχο τυχόν αναστολής της PCR. Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol, όπως περιγράφεται στο βήμα 2b του πρωτοκόλλου (σελίδα 17).

Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου για περισσότερες πληροφορίες.
- Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό, βαθμού PCR) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε και τα 4 παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4) για κάθε εκτέλεση PCR.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (παρεκκόμενο του οργάνου Rotor-Gene Q) έχει προψυχθεί στους 2–8 °C.

- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται πλήρως, να αναμειγνύονται (με επανειλημμένη αναρρόφηση και διανομή με πιπέτα ή με γρήγορο στροβιλισμό) και να φυγοκεντρίζονται σύντομα.

Διαδικασία

1. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων PCR στους προσαρμογείς του τεμαχίου ψύξης.
2. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας απομόνωσης DNA και τον έλεγχο για τυχόν αναστολή της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2a. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2b.

Σημείωση: Συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη του εσωτερικού μάρτυρα στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol που χρησιμοποιείται για τα πρότυπα ποσοτικοποίησης. Για τα πρότυπα ποσοτικοποίησης, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol, όπως περιγράφεται στο βήμα 2b του πρωτοκόλλου, και χρησιμοποιήστε αυτό το κύριο μείγμα για κάθε πρότυπο ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4).

- 2a. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλ. *Εσωτερικός μάρτυρας*, σελίδα 14). Στην περίπτωση αυτή, προετοιμάστε ένα κύριο μείγμα σύμφωνα με τον Πίνακα 2 (επόμενη σελίδα).

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

Πίνακας 2. Προετοιμασία του κύριου μείγματος (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της απομόνωσης DNA και τον έλεγχο της αναστολής PCR)

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

2b. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστεθεί απευθείας στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol. Στην περίπτωση αυτή, προετοιμάστε ένα κύριο μείγμα σύμφωνα με τον Πίνακα 3.

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

Πίνακας 3. Προετοιμασία του κύριου μείγματος (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
CMV RG Master	25 μl	300 μl
CMV Mg-Sol	5 μl	60 μl
CMV RG IC	2 μl	24 μl
Συνολικός όγκος	32 μl*	384 μl*

* Η αύξηση του όγκου λόγω της προσθήκης του εσωτερικού μάρτυρα δεν λαμβάνεται υπόψη κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού PCR. Η ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης δεν επηρεάζεται.

3. Διανείμετε με πιπέτα 30 μl του κύριου μείγματος σε κάθε σωληνάριο PCR και στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του εκλουσμένου δείγματος DNA (βλ. Πίνακα 4). Αντίστοιχα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν 20 μl τουλάχιστον ενός από τα πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4) ως θετικός μάρτυρας και 20 μl νερού (νερό, βαθμού PCR) ως αρνητικός μάρτυρας.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του προσδιορισμού PCR

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

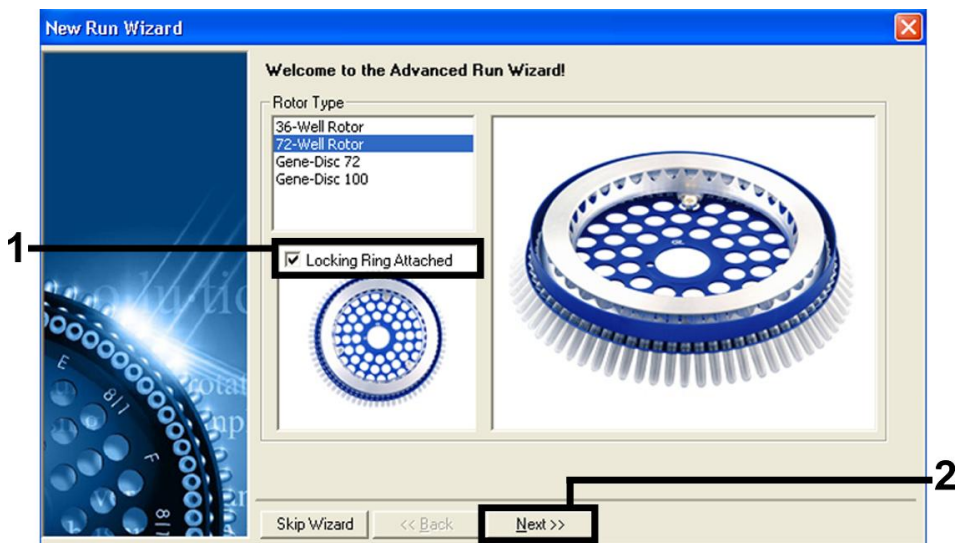
4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (παρελκόμενο του οργάνου Rotor-Gene) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του στροφέα για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.

5. Για την ανίχνευση DNA από CMV, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Εικόνα 1, Εικόνα 2 και Εικόνα 3
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start	Εικόνα 4
Ενίσχυση του DNA (touchdown PCR)	Εικόνα 5
Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Εικόνα 6
Έναρξη της εκτέλεσης	Εικόνα 7

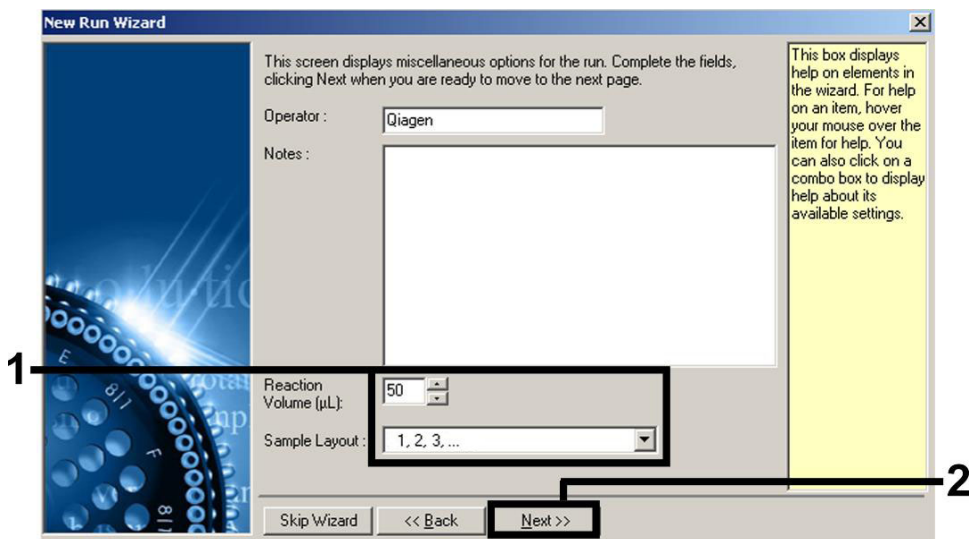
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοσης 2.3.5 ή νεότερης. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του αντίστοιχου οργάνου. Στις απεικονίσεις οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με ένα έντονο μαύρο πλαίσιο. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q.

6. Ανοίξτε το πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 1, επόμενη σελίδα). Επιλέξτε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Προσαρτημένος δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στην επιλογή **Next** (Επόμενο).



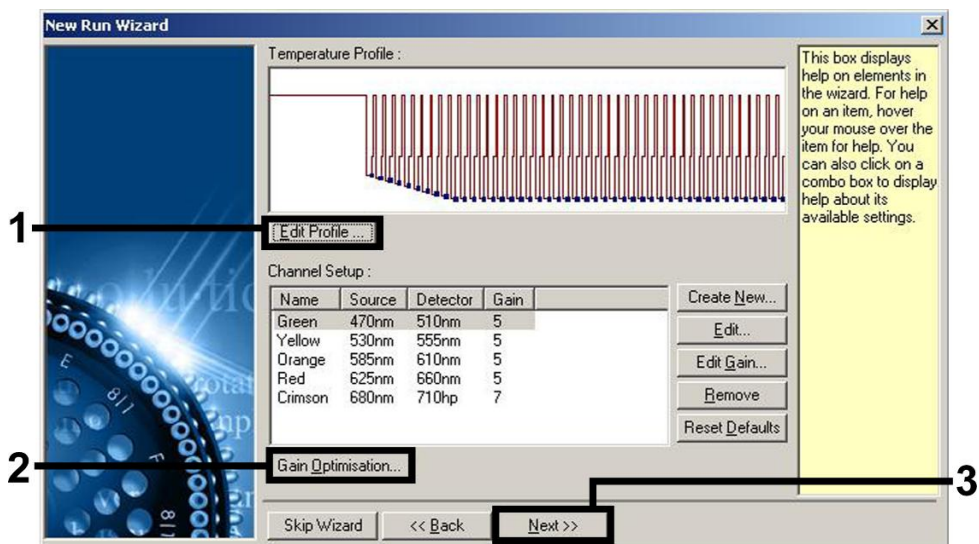
Εικόνα 1. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).

- Επιλέξτε 50 για τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στην επιλογή **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 2).

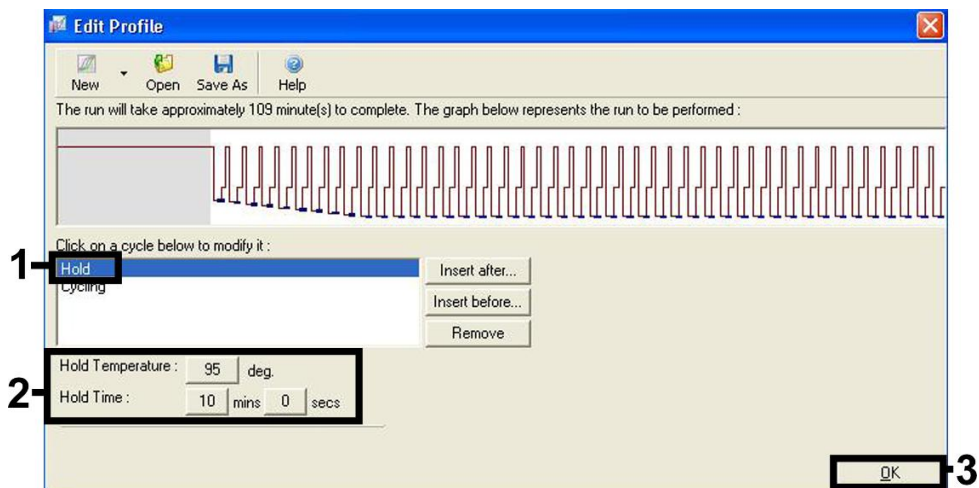


Εικόνα 2. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

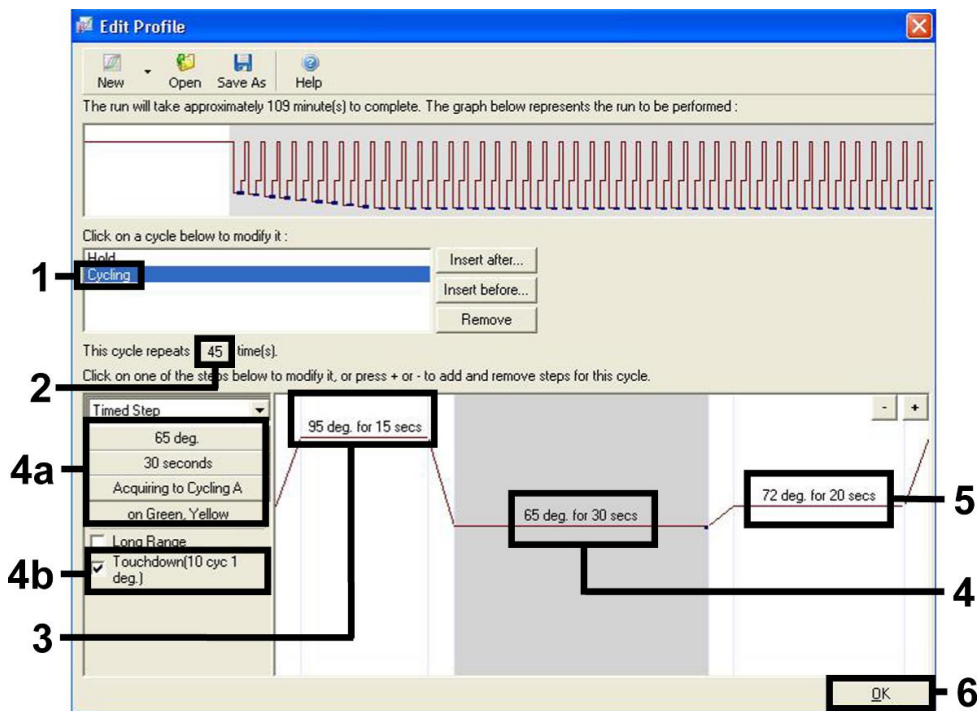
8. Κάντε κλικ στο κουμπί **Edit Profile** (Επεξεργασία προφίλ) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 3) και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας με τον τρόπο που εμφανίζεται από την Εικόνα 3 έως την Εικόνα 5.



Εικόνα 3. Επεξεργασία του προφίλ.

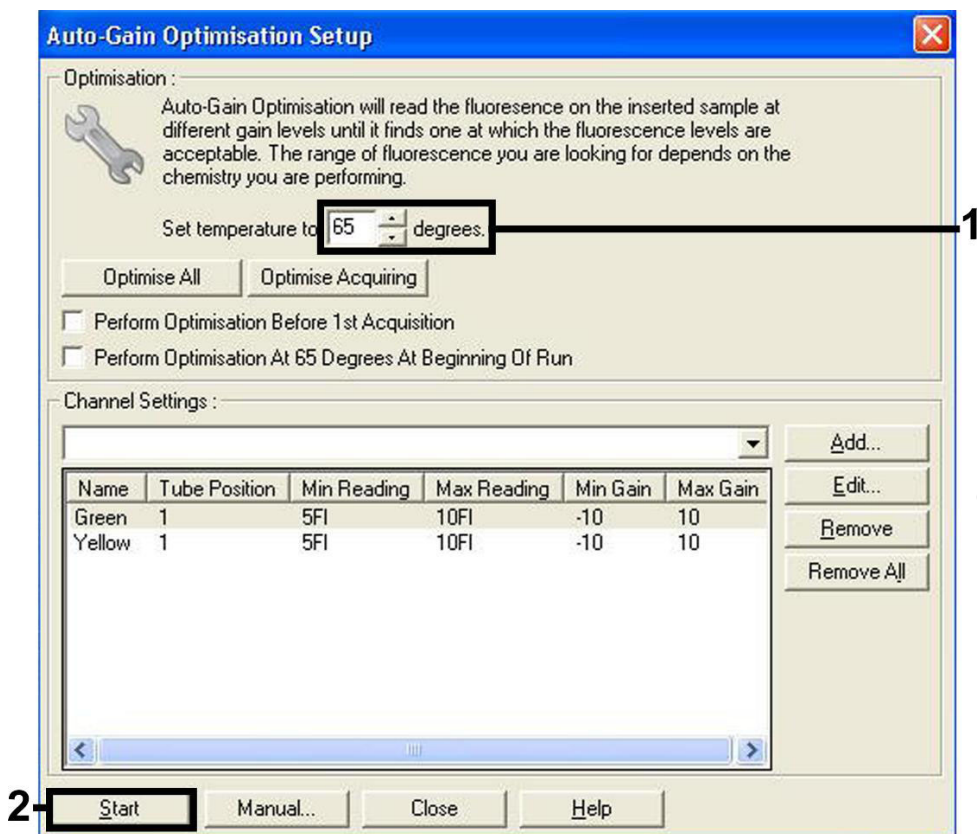


Εικόνα 4. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start.



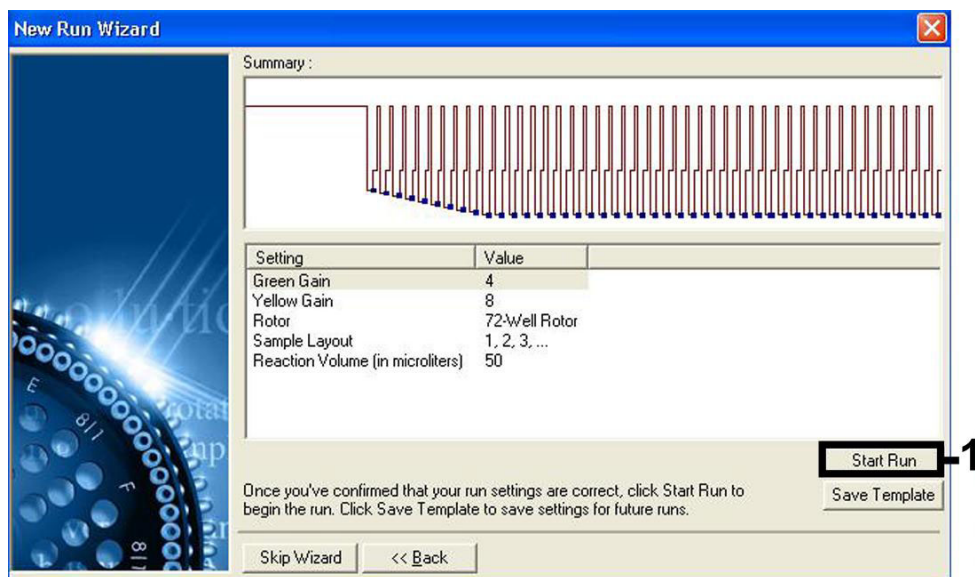
Εικόνα 5. Ενίσχυση του DNA. Βεβαιωθείτε πως έχετε ενεργοποιήσει τη λειτουργία touchdown για 10 κύκλους στο βήμα ανασύνδεσης.

9. Το εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Κάντε κλικ στο **Gain Optimisation** (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (βλ. Εικόνα 3, προηγούμενη σελίδα) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου **Auto-Gain Optimisation Setup** (Ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής). Ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στην τιμή 65 °C για να αντιστοιχεί στη θερμοκρασία ανασύνδεσης του προγράμματος ενίσχυσης (Εικόνα 6, επόμενη σελίδα).



Εικόνα 6. Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού.

10. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση των καναλιών αποθηκεύονται αυτόματα και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (Εικόνα 7, επόμενη σελίδα). Κάντε κλικ στο **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης).



Εικόνα 7. Έναρξη της εκτέλεσης.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4) αντιμετωπίζονται ως προηγουμένως καθαρισμένα δείγματα και χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος των 20 μl απευθείας στην PCR (χωρίς να απαιτείται περαιτέρω εκχύλιση). Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης σε όργανα Rotor-Gene Q, θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε και τα 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης και να τα ορίσετε στο πλαίσιο διαλόγου **Edit Samples** (Επεξεργασία δειγμάτων) ως πρότυπα με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις (ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήση του οργάνου).

Σημείωση: Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια της ποσοτικοποίησης, συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη του εσωτερικού μάρτυρα στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol που χρησιμοποιείται για τα πρότυπα ποσοτικοποίησης. Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο μείγμα CMV RG Master και CMV Mg-Sol, όπως περιγράφεται στο βήμα 2b του πρωτοκόλλου (σελίδα 17), και χρησιμοποιήστε αυτό το κύριο μείγμα για κάθε πρότυπο ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4).

Σημείωση: 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:

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

Κατ' αρχήν, ο αρχικός όγκος δείγματος πρέπει να καταχωρηθεί στην παραπάνω εξίσωση. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περίπτωση τροποποίησης του όγκου δείγματος πριν από την εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέως (π.χ., μείωση του όγκου με φυγοκέντριση ή αύξηση του όγκου με προσθήκη του απαιτούμενου για την απομόνωση όγκου).

Σημείωση: Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης έχουν βαθμονομηθεί με βάση το 1ο Διεθνές Πρότυπο για τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό (κωδικός NIBSC: 09/162) όπως αυτό έχει προσδιοριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ).

Για τη μετατροπή αντιγράφων/ml σε IU/ml αναφορικά με το QIAamp DSP Virus Kit:

$$\text{ΠΟΥ (IU/ml)} = 2,933 \times \text{artus CMV (αντίγραφα/ml)}$$

Σημείωση: Για τη ροή εργασίας QIAamp, τα ποσοτικοποιημένα δείγματα πρέπει να βρίσκονται εντός του γραμμικού εύρους $QS 1 \times 10^1$ έως 1×10^4 αντίγραφα/μl. Η ποσοτικοποίηση δεν μπορεί να διασφαλιστεί εκτός αυτού του εύρους.

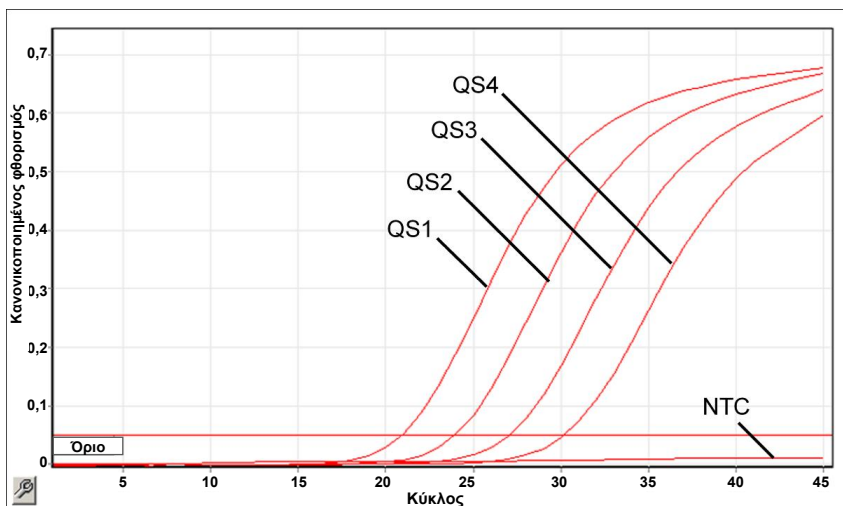
Για τη μετατροπή αντιγράφων/ml σε IU/ml αναφορικά με το EZ1 DSP Virus Kit στο όργανο EZ1 Advanced XL:

$$\text{ΠΟΥ (IU/ml)} = 0,794 \times \text{artus CMV (αντίγραφα/ml)}$$

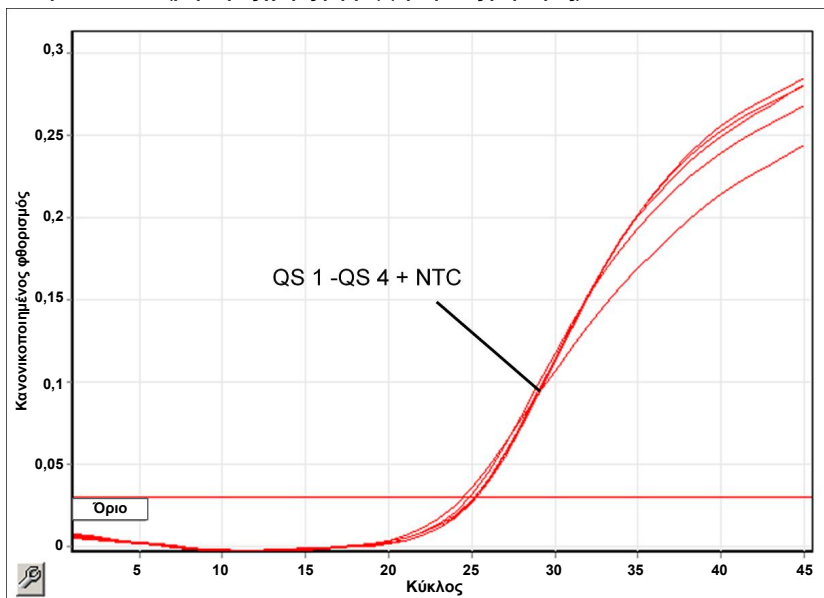
Σημείωση: Για τη ροή εργασίας EZ1, τα ποσοτικοποιημένα δείγματα πρέπει να βρίσκονται εντός του γραμμικού εύρους $3,16E+02$ έως $1,00E+08$ αντίγραφα/ml. Η ποσοτικοποίηση δεν μπορεί να διασφαλιστεί εκτός αυτού του εύρους.

Αποτελέσματα

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR παρέχονται στην Εικόνα 8 και την Εικόνα 9, (επόμενη σελίδα).



Εικόνα 8. Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. NTC: No template control (μάρτυρας χωρίς μήτρα) (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 9. Ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα (Internal Control, IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (CMV QS 1–4). NTC: No template control (μάρτυρας χωρίς μήτρα) (αρνητικός μάρτυρας).

Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμού Cycling Green.

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

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

Στο κανάλι φθορισμού Cycling Green δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow (Κυκλοποίηση Κίτρινο).

Δεν είναι ανιχνεύσιμο DNA από CMV στο δείγμα. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

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

Κανένα σήμα δεν ανιχνεύεται στο κανάλι Cycling Green ή στο κανάλι Cycling Yellow.

Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι δυνατή.

Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στην ενότητα «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», σελίδα 44.

Έλεγχος ποιότητας

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *artus* CMV RG PCR Kit ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

Περιορισμοί

Όλα τα αντιδραστήρια προορίζονται αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Η χρήση πρέπει να γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro*.

Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη του αντίστοιχου οργάνου είναι απολύτως απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων από την PCR.

Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

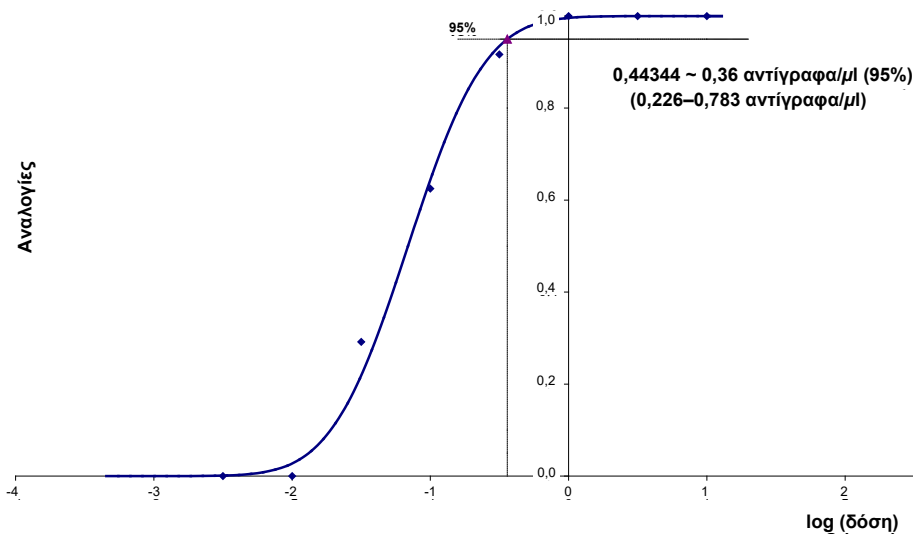
Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές ή/και τον ανιχνευτή του kit μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ευαισθησία

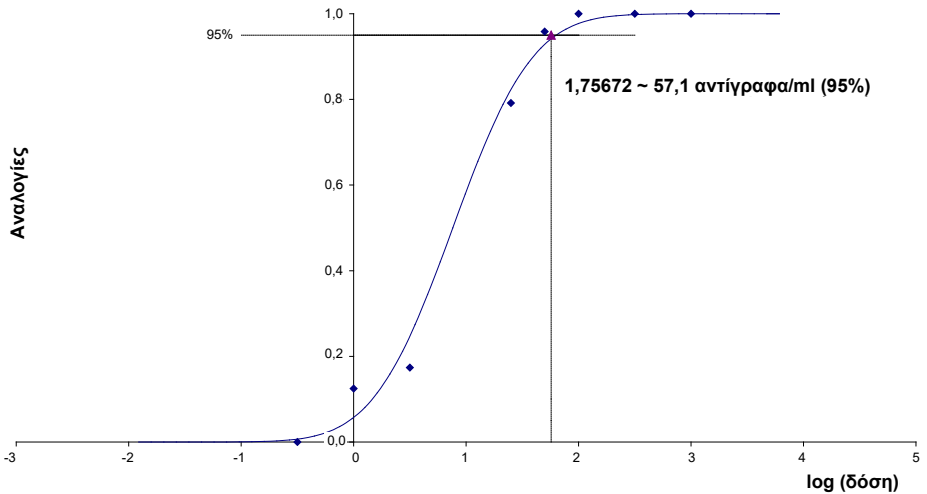
Για την εγκυρότητα του *artus* CMV RG PCR Kit καθορίστηκαν τόσο το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης όσο και το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό (όρια ευαισθησίας). Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον CMV δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης. Αντίθετα, το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης προσδιορίστηκε ανεξάρτητα από την επιλεγμένη μέθοδο εκχύλισης, με τη βοήθεια DNA του CMV γνωστής συγκέντρωσης.

Για τον καθορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του *artus* CMV RG PCR Kit, προετοιμάστηκε σειρά αραιώσεων γονιδιωματικού DNA του CMV από 10 σε ονομαστικά 0,00316 αντίγραφα/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση σε όργανα Rotor-Gene σε συνδυασμό με το *artus* CMV RG PCR Kit. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit στο Rotor-Gene 6000 παρουσιάζεται στην Εικόνα 10 (επόμενη σελίδα). Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του *artus* CMV RG PCR Kit σε συνδυασμό με το Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 και το Rotor-Gene 3000 είναι 0,36 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$) και 0,24 αντίγραφα/μl ($p = 0,05$), αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι 0,36 αντίγραφα/μl ή 0,24 αντίγραφα/μl ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικόνα 10. Πιθανοτική ανάλυση (probit): CMV (Rotor-Gene 6000). Αναλυτική ευαισθησία του *artus* CMV RG PCR Kit στο Rotor-Gene 6000.

Η αναλυτική ευαισθησία σχετικά με τον καθαρισμό (QIAamp DSP Virus Kit) του *artus* CMV RG PCR Kit σε όργανα Rotor-Gene καθορίστηκε με χρήση μιας 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 QIAamp DSP Virus Kit (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 60 μl). Καθεμιά από τις 8 αραιώσεις αναλύθηκε με το *artus* CMV RG PCR Kit σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit παρουσιάζεται στην Εικόνα 11 (επόμενη σελίδα). Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης για τον καθαρισμό του kit *artus* CMV RG PCR Kit σε συνδυασμό με το Rotor-Gene 3000 είναι 57,1 αντίγραφα/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95% πιθανότητα ανίχνευσης 57,1 αντιγράφων/ml.



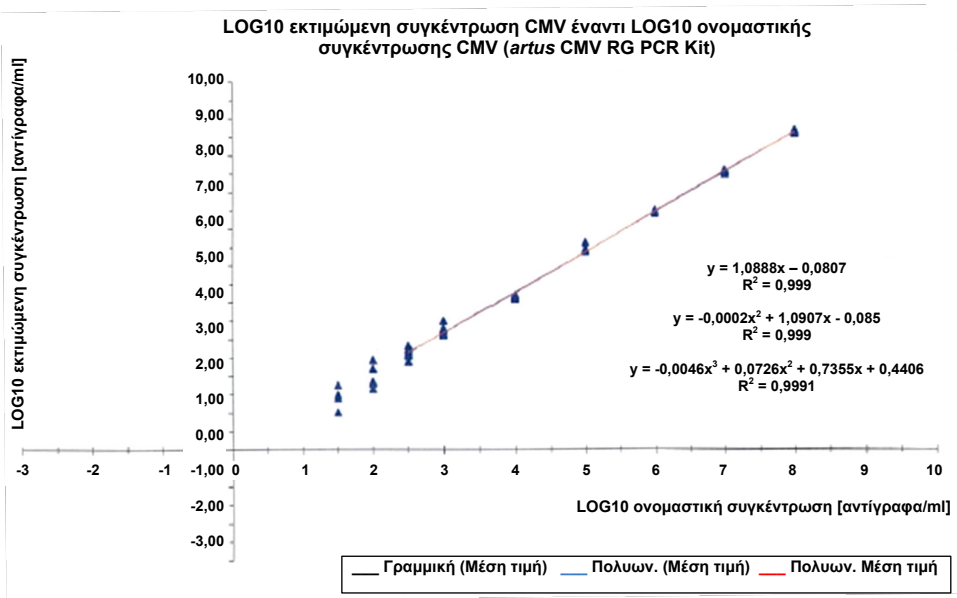
Εικόνα 11. Πιθανοτική ανάλυση (probit): CMV (Rotor-Gene 3000). Αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό (QIAamp DSP Virus Kit, QIAGEN) του *artus* CMV RG PCR Kit στο Rotor-Gene 3000.

Η αναλυτική ευαισθησία για τον καθαρισμό με το EZ1 DSP Virus Kit (όγκος εκχύλισης: 0,4 ml, όγκος έκλουσης: 60 µl) με χρήση του οργάνου EZ1 Advanced XL του *artus* CMV RG PCR Kit στο Rotor-Gene 6000 είναι 68,75 αντίγραφα/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει πως υπάρχει 95% πιθανότητα ανίχνευσης 68,75 αντιγράφων/ml.

Γραμμικό εύρος

Το γραμμικό εύρος για τον καθαρισμό με το EZ1 DSP Virus Kit (όγκος εκχύλισης: 0,4ml, όγκος έκλουσης: 60 µl) με χρήση του οργάνου EZ1 Advanced XL προσδιορίστηκε με εξέταση 4 έως 6 θυγατρικών κλώνων από υλικό του ιού CMV σε σειρά αραιώσεων από $3,16E+01$ έως $1,00E+08$ αντίγραφα/ml.

Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit παρουσιάζεται στην Εικόνα 12 (επόμενη σελίδα).



Εικόνα 12. Πολυωνυμική παλινδρόμηση ομάδας δεδομένων του *artus CMV RG PCR Kit* για τον καθαρισμό (EZ1 DSP Virus Kit) στο όργανο EZ1 Advanced XL. Περιλαμβάνονται μοντέλα γραμμικής, τετραγωνικής και κυβικής παλινδρόμησης.

Το γραμμικό εύρος του *artus CMV RG PCR Kit* για τον καθαρισμό με το EZ1 DSP Virus Kit (όγκος εκχύλισης: 0,4ml, όγκος έκλουσης: 60μl) με χρήση του οργάνου EZ1 Advanced XL είναι 3,16E+02 έως 1,00E+08 αντίγραφα/ml.

Σημείωση: Το γραμμικό εύρος του *artus CMV RG PCR Kit* για τον καθαρισμό με το QIAamp DSP Virus Kit (όγκος εκχύλισης: 0,4 ml, όγκος έκλουσης: 60 μl), είναι 1,00E+01 έως 1,00E+04 αντίγραφα/μl.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα του *artus CMV RG PCR Kit* εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο με την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές 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. 99 από τα δείγματα δεν παράγγααν κανένα σήμα με τους ειδικούς για CMV εκκινητές και ανιχνευτές, οι οποίοι περιλαμβάνονται στο CMV RG Master.

Σημείωση: 1 δείγμα που παράγγαε σήμα με τους ειδικούς για CMV εκκινητές και ανιχνευτές που ήταν επίσης ήταν θετικό για CMV στα κιτ *artus* CMV LC και TM RG PCR Kits, είναι πιθανώς θετικό. Η τελική ειδικότητα που βασίστηκε στην εξέταση 100 δειγμάτων από ξεχωριστούς δότες, επαληθεύτηκε ότι ήταν 99,00% (99/100).

Ελέγχθηκε μια πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του *artus* CMV RG PCR Kit με χρήση της ομάδας μαρτύρων που παρατίθεται στον Πίνακα 5. Κανένα από τα παθογόνα που ελέγχθηκαν δεν ήταν αντιδραστικό. Δεν παρουσιάστηκαν διασταυρούμενες αντιδραστικότητες σε μεικτές λοιμώξεις.

Πίνακας 5. Έλεγχος της ειδικότητας του κιτ με δυνητικά διασταυρούμενα αντιδρώντα παθογόνα

Ομάδα μαρτύρων	CMV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow ή Cycling A.JOE)
Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (Ιός απλού έρπητα 1)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (Ιός απλού έρπητα 2)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (Ιός ανεμοβλογιάς-ζωστήρα)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 4 (Ιός Epstein-Barr)	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6A	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 6B	–	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 7	–	+
Ανθρώπινος ερπητιοϊός 8 (ερπητιοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi)	–	+
Ιός ηπατίτιδας A	–	+
Ιός ηπατίτιδας B	–	+
Ιός ηπατίτιδας C	–	+

(συνέχεια στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 5 (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Ομάδα μαρτύρων	CMV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Yellow ή Cycling A.JOE)
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV) 1	–	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 1	–	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας T κυττάρων 2	–	+
Ιός του Δυτικού Νείλου	–	+
Εντεροϊός	–	+
Παρβοϊός B19	–	+

Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του *artus* CMV RG PCR Kit συλλέχθηκαν με τη βοήθεια οργάνων Rotor-Gene και παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού της συνολικής διασποράς του προσδιορισμού. Η συνολική 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 διαφόρων παρτίδων). Τα ληφθέντα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της τυπικής απόκλισης, της διασποράς και του συντελεστή διακύμανσης για το ειδικό παθογόνο και την PCR εσωτερικού μάρτυρα.

Τα δεδομένα ακρίβειας του *artus* CMV RG PCR συλλέχθηκαν με χρήση του προτύπου ποσοτικοποίησης της χαμηλότερης συγκέντρωσης (QS 4, 10 αντίγραφα/μl). Η δοκιμασία εκτελέστηκε με 8 θυγατρικούς κλώνους. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές C_T των καμπυλών ενίσχυσης (C_T : κύκλος ορίου, βλ. Πίνακα 6, επόμενη σελίδα). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε αντίγραφα/μl προσδιορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών C_T (βλ. Πίνακα 7, επόμενη σελίδα). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η γενική στατιστική διασπορά οποιουδήποτε δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση είναι 1,21% (C_T) ή 14,38% (συγκέντρωση), και 1,93% (C_T) για την ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα. Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των καθορισμένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 6. Δεδομένα ακρίβειας με βάση τις τιμές C_T

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: CMV QS 4	0,17	0,03	0,57
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: Εσωτερικός μάρτυρας	0,31	0,10	1,16
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: CMV QS 4	0,38	0,14	1,27
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	0,47	0,22	1,77
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: CMV QS 4	0,33	0,11	1,10
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: Εσωτερικός μάρτυρας	0,53	0,28	2,02
Συνολική διασπορά: CMV QS 4	0,36	0,13	1,21
Συνολική διασπορά: Εσωτερικός μάρτυρας	0,51	0,26	1,93

Πίνακας 7. Δεδομένα ακρίβειας στη βάση ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε αντίγραφα/μl)

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: CMV QS 4	1,34	1,80	13,30
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: CMV QS 4	1,54	2,38	15,25
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: CMV QS 4	1,46	2,12	14,41
Συνολική διασπορά: CMV QS 4	1,45	2,11	14,38

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

DNA του CMV εμβολιάστηκε σε αρνητικό πλάσμα σε διαφορετικά συστήματα συλλογής αίματος που διατίθενται στο εμπόριο με διαφορετικά αντιπηκτικά. Η υπολογισμένη συγκέντρωση (αντίγραφα/ml), η μέση τιμή C_T, η τυπική απόκλιση, η διασπορά και το ποσοστό του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) αναφέρονται στον Πίνακα 8. Η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας βρίσκονται εντός του πεδίου του 5% και συνεπώς εντός του εύρους ανοχής. Δεν προσδιορίστηκε κάποια σημαντική επίδραση στην PCR εξαιτίας των διαφόρων ουσιών.

Πίνακας 8. Δεδομένα για συστήματα συλλογής αίματος και αντιπηκτικά που διατίθενται στο εμπόριο

Ουσία	Συγκέντρωση (αντίγραφα/ml)	Μέση τιμή C _T	Τυπική απόκλιση C _T	Διασπορά C _T	CV (%) C _T
Καλιούχο EDTA, Becton Dickinson®	399,60	31,06	0,11	0,01	0,36
Καλιούχο EDTA, Sarstedt	350,10	31,26	0,30	0,09	0,97
Καλιούχο EDTA, Greiner Bio-One®	285,00	31,58	0,50	0,25	1,58
Καλιούχο EDTA, Springe (αναφοράς)	310,40	31,40	0,16	0,03	0,52
Καλιούχο EDTA, Sarstedt (αναφοράς)	487,20	30,80	0,14	0,02	0,47
Καλιούχο EDTA (κύησης)	423,30	33,2	0,26	0,07	0,79

Οι ενδογενείς ουσίες (Πίνακας 9, επόμενη σελίδα) εμβολιάστηκαν σε δείγματα πλάσματος-EDTA θετικά για CMV σε 3 x LOD και 10 x LOD. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία σε όλα τα δείγματα και δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στα δείγματα που περιείχαν αυξημένα επίπεδα ενδογενών αναστολέων (χολερυθρίνη, αιμοσφαιρίνη, τριγλυκερίδια και λευκωματίνη).

Πίνακας 9. Ενδογενείς ουσίες που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία

Παρεμβαλλόμενες ουσίες	Συγκέντρωση παρεμβαλλόμενων ουσιών
Χολερυθρίνη	30 mg/dl
Αιμοσφαιρίνη	2 g/dl
Τριγλυκερίδια	1 g/dl
Λευκωματίνη	6 g/dl

Ελέγχθηκαν συνήθη φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων σε συγκέντρωση επί 3 της οξείας ανώτατης συγκέντρωσης ύστερα από φαρμακευτική θεραπευτική αγωγή, όπως συνιστούν οι κατευθυντήριες οδηγίες CLSI® Guideline EP07-A2 (11) (βλ. Πίνακα 10). Καθεμία ουσία εμβολιάστηκε σε δείγματα αρνητικά για CMV και δείγματα θετικά για CMV τα οποία εξετάστηκαν σε 4 θυγατρικούς κλώνους.

Καμία από τις εξωγενείς ουσίες που εξετάστηκαν δεν κατέδειξε σημαντική επίδραση στην απόδοση του *artus* CMV RG PCR kit.

Πίνακας 10. Κατάλογος φαρμάκων που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ως εξωγενείς ουσίες

Παρεμβαλλόμενες ουσίες	Συγκέντρωση δοκιμασίας
Αντιβιοτικά	
Σουλφαμεθοξαζόλη	200 mg/l
Τριμεθοπρίμη	5,2 mg/l
Claforan® (κεφοταξίμη)	1 g/l
Tazobac® (πιπερακιλλίνη+ταζοβακτάμη)	Πιπερακιλλίνη: 1 g/l Ταζοβακτάμη: 125 mg/l
Τικαρκιλλίνη	1 g/l
Augmentin® (αμοξικιλίνη + κλαβουλανικό οξύ)	Αμοξικιλίνη: 125 mg/l Κλαβουλανικό οξύ: 25 mg/l
Βανκομυκίνη	125 mg/l
Αντιμυκητιασικά	
Φλουκοναζόλη	1 mg/l
Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα	
Ραπαμυκίνη	100 mg/l
Μυκοφαινολικό οξύ	80 mg/l

Αξιοπιστία

Η επαλήθευση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του *artus* CMV RG PCR Kit. 100 αρνητικά ως προς τον CMV δείγματα πλάσματος εμβολιάστηκαν με υλικό CMV σε τελική συγκέντρωση 170 αντίγραφα/ml (περίπου τριπλάσια συγκέντρωση από το όριο αναλυτικής ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του QIAamp DSP Virus Kit, τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το *artus* CMV RG PCR Kit. Το ποσοστό αποτυχίας για τον CMV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Επιπλέον, η αξιοπιστία του εσωτερικού μάρτυρα αξιολογήθηκε με καθαρισμό και ανάλυση 100 αρνητικών ως προς τον CMV δειγμάτων πλάσματος. Συνεπώς, η αξιοπιστία του *artus* CMV RG PCR Kit ανέρχεται σε $\geq 99\%$.

Αναπαραγωγιμότητα

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

Εκτός από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας, υποβλήθηκε σε δοκιμασία ένα σετ CMV 10 μονάδων (Πίνακας 11) σε 3 εξωτερικά εργαστήρια με χρήση του EZ1 DSP Virus Kit στο όργανο EZ1 Advanced XL για τον καθαρισμό νουκλεϊκού οξέος και του *artus* RG PCR Kit για την εξέταση του εκλούσματος DNA.

Πίνακας 11. Σύνοψη των μονάδων του σετ CMV

Αριθμός σετ (τύπος μονάδων σετ)	Μονάδα σετ	Αραιωτική επίδραση
1001 (1)	Αρνητική	Αρνητική δεξαμενή 1
1002 (1)	Αρνητική	Αρνητική δεξαμενή 2
1003 (2)	Υψηλή αρνητική	50% θετική
1004 (2)	Υψηλή αρνητική	50% θετική
1005 (3)	Χαμηλή θετική	200 αντίγραφα/ml
1006 (3)	Χαμηλή θετική	200 αντίγραφα/ml
1007 (4)	Μέτρια θετική	2.000 αντίγραφα/ml
1008 (4)	Μέτρια θετική	2.000 αντίγραφα/ml
1009 (5)	Υψηλή θετική	200.000 αντίγραφα/ml
1010 (5)	Υψηλή θετική	200.000 αντίγραφα/ml

Το σετ 10 μονάδων υποβλήθηκε σε δοκιμασία εις διπλούν από 2 διαφορετικούς χειριστές για 6 ημέρες σε κάθε κέντρο με 3 παρτίδες kit αντιδραστηρίων. Επομένως, 20 δείγματα επί 2 χειριστές για 6 ημέρες σε 3 κέντρα ισούνται με 720 σημεία δεδομένων.

Η συνολική αναπαραγωγιμότητα της εξέτασης *artus CMV RGQ MDx* βρέθηκε ότι ήταν $\leq 12\%$ CV για δείγματα με συγκέντρωση μεταξύ 200 αντιγράφων/ml και 200.000 αντιγράφων/ml (Πίνακας 12)

Πίνακας 12. Γενική σύνοψη (ανά τύπο μονάδων σετ) – παρατηρούμενοι μέσοι όροι

τύπος_μονάδα_σετ	Αρ. παρατ.	Μέση τιμή	Διάμεση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ποσοστό CV	Ελάχιστη τιμή
1	144	0,02	0,00	0,158	849,84	0,00
2	144	0,68	0,83	0,630	92,19	-0,10
3	144	1,91	1,95	0,226	11,83	0,98
4	144	2,96	2,96	0,168	5,68	2,16
5	144	5,03	5,03	0,091	1,80	4,75

Η γενική σύνοψη της ποσοστιαίας μεταβλητότητας και της τυπικής απόκλισης για τις τιμές \log_{10} IU/ml καθενός από τα 5 σετ ανά παρτίδα, κέντρο, χειριστή, ημέρα, μεταξύ εκτελέσεων και εντός εκτέλεσης περιλαμβάνονται στον Πίνακα 13 (επόμενη σελίδα).

Πίνακας 13. Γενική σύνοψη της μεταβλητότητας και της τυπικής απόκλισης

Δείγμα	1	2	3	4	5	
Τύπος δείγματος	αρνητικό	υψηλό αρνητικό	χαμηλό θετικό	μέτριο θετικό	υψηλό θετικό	
Παρατηρούμενη μέση τιμή log ₁₀ IU/ml	0,02	0,68	1,91	2,96	5,03	
Αρ. εξετάσεων	144	144	144	144	144	
Κριτήριο	%μεταβλητότητας ΤΑ					
Διασπορά δειγμάτων	Παρτίδα	0 0	3,10 0,113	0 0	0 0	3,00 0,016
	Κέντρο	0 0	0 0	0 0	0,90 0,016	0 0
	Χειριστής	4,3 0,033	4,6 0,136	0 0	18,8 0,074	15,4 0,037
	Ημέρα	0 0	0 0	8,60 0,067	6,00 0,042	48,10 0,065
	Μεταξύ εκτελέσεων	0 0	0 0	4,40 0,048	10,90 0,057	7,90 0,026
	Εντός εκτέλεσης	95,7 0,155	92,3 0,611	87 0,212	63,40 0,136	25,60 0,048
	Σύνολο	100 0,158	100 0,635	100 0,227	100 0,171	100 0,094

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *artus* CMV RG PCR Kit αξιολογήθηκε σε μελέτη που συγκρίνει το kit *artus* CMV RG PCR Kit με την εξέταση COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test. Στην προοπτική-αναδρομική μελέτη αναλύθηκαν 156 κλινικά δείγματα πλάσματος-EDTA. Όλα τα δείγματα δοκιμίου είχαν προηγουμένως αναλυθεί ως θετικά ή αρνητικά με χρήση του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR για διαγνωστικό έλεγχο ρουτίνας.

DNA από CMV για τον έλεγχο του *artus* CMV RG PCR Kit απομονώθηκε με χρήση του QIAamp DSP Virus Kit, με προσθήκη του εσωτερικού μάρτυρα του *artus* CMV RG PCR Kit στην απομόνωση, και διενεργήθηκε ανάλυση στο Rotor-Gene 3000. Τα δείγματα για τη δοκιμασία COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test υποβλήθηκαν σε επεξεργασία 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 Test ήταν επίσης θετικά με το *artus* CMV RG PCR Kit. 123 από τα 145 δείγματα που ήταν αρνητικά με την εξέταση COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test ήταν επίσης αρνητικά με το κιτ *artus* CMV RG PCR Kit. Ελήφθησαν 22 αποτελέσματα για τα οποία υπήρχε ασυμφωνία (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης επικύρωσης

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		Σύνολο
		+	-	
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit	+	11	22	33
	-	0	123	123

Εάν ληφθούν ως αναφορά τα αποτελέσματα της εξέτασης COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test, η διαγνωστική ευαισθησία όλων των δειγμάτων του *artus* CMV RG PCR Kit είναι 100%, ενώ η διαγνωστική ειδικότητα είναι 84,8%.

Περαιτέρω εξέταση των 22 ασύμφωνων δειγμάτων επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των κιτ *artus* PCR. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ασυμφωνία βασίζεται στην υψηλότερη ευαισθησία του *artus* CMV RG PCR Kit.

Βιβλιογραφία

1. Plosa E.J., Esbenshade J.C., Fuller M.P., and Weitkamp J.H. (2012). Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Rev.* **33**, 156-163.
2. Furui Y., Satake M., Hoshi Y., Uchida S., Suzuki K., and Tadokoro K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalance in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* **53**, 2190-2197.
3. Atabani, S.F., et al. (2012). Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am. J. Transplant.* **12**, 2457-2464.
4. Enders G., Daiminger A., Bäder U., Exler S., and Enders M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol.* **52**, 244-246.
5. Kotton, C.N., et al. (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* **102**, 900-931.
6. Lancini D, Faddy H.M., Flower R., and Hogan C. (2014). Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med. J. Aust.* **201**, 578-580.
7. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, and Warrell DA. (1997). Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 52-56.
8. Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190-212.
9. Nesbitt S.E., Cook L., Jerome K.R. (2004). Cytomegalovirus quantitation by real-time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. **42**, 1296-1297.
10. Abdul-Ali D., Kraft C.S., Ingersoll J., Frempong M., Caliendo A.M. (2011). Cytomegalovirus DNA stability in EDTA Anti-Coagulated Whole Blood and Plasma Samples. *J. Clin. Virol.* **52**, 222-224
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline – Second Edition. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα «Frequently Asked Questions» (Συχνές ερωτήσεις) του κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Απουσία σήματος με θετικούς μάρτυρες (CMV QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green

- | | |
|---|---|
| α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για την ανάλυση των δεδομένων της PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο | Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green για την ανάλυση PCR του CMV και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow για την PCR εσωτερικού μάρτυρα. |
| β) Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο Rotor-Gene | Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 15. |
| γ) Εσφαλμένη διαμόρφωση της PCR | Ελέγξτε τα βήματα εργασίας σας μέσω του πλάνου διανομής με πιπέτα και, εάν χρειάζεται, επαναλάβετε την PCR. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 15. |
| δ) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», (σελίδα 10) | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο κιτ, εάν χρειαστεί. |
| ε) Το κιτ <i>artus</i> CMV RG PCR Kit έχει λήξει | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο κιτ, εάν χρειαστεί. |

Αδύναμο σήμα ή απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα ενός αρνητικού δείγματος πλάσματος που υποβλήθηκε σε διαδικασία καθαρισμού με χρήση του QIAamp DSP Virus Kit ($C_T = 27 \pm 3$, όριο, 0,03) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι Cycling Green

- | | |
|--|--|
| α) Οι συνθήκες της PCR δεν συμμορφώνονται με το πρωτόκολλο | Ελέγξτε τις συνθήκες της PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο. |
| β) Παρουσιάστηκε αναστολή της PCR | Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες του κατασκευαστή. |

Παρατηρήσεις και προτάσεις

- | | |
|---|--|
| γ) Χάθηκε DNA κατά την εκχύλιση | Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε στην εκχύλιση, η απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα μπορεί να υποδεικνύει απώλεια DNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης (βλέπε «Απομόνωση DNA», σελίδα 13) και ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή. |
| δ) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», (σελίδα 10) | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο kit, εάν χρειαστεί. |
| ε) Το kit artus CMV RG PCR Kit έχει λήξει | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο kit, εάν χρειαστεί. |

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

- | | |
|--|--|
| α) Προέκυψε επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR | Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε θυγατρικούς κλώνους.
Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.
Βεβαιωθείτε πως οι θετικοί μάρτυρες διανέμονται με πιπέτα τελευταίοι.
Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. |
| β) Προέκυψε επιμόλυνση κατά την εκχύλιση | Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR του εξεταζόμενου δείγματος χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.
Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. |

Σύμβολα



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιεχόμενα



Αριθμός



Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Master, διάλυμα μαγνησίου, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4503263
<i>artus</i> CMV RG PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: Master, διάλυμα μαγνησίου, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4503265
EZ1 DSP Virus Kit — για αυτοματοποιημένο, ταυτόχρονο καθαρισμό ιικού DNA και RNA από 1–14 δείγματα ορού, πλάσματος ή ENY		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Για 48 παρασκευές ιικών νουκλεϊκών οξέων: Προγεμισμένες φύσιγγες αντιδραστηρίων, υποδοχές ρυγχών μίας χρήσης, αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, σωληνάρια δείγματος, σωληνάρια έκλουσης, ρυθμιστικά διαλύματα, φορέας RNA	62724
QIAamp DSP Virus Kit — για τον καθαρισμό ιικών νουκλεϊκών οξέων από ανθρώπινο πλάσμα για in vitro διαγνωστικούς σκοπούς		
QIAamp DSP Virus Kit	Για 50 παρασκευές: QIAamp MinElute® Spin Columns, ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, επεκτάσεις στήλης και VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx και παρελκόμενα		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Κυκλοποιητής real-time PCR με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002023

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Όργανο real-time PCR με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση δεν συμπεριλαμβάνονται	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Όργανο real-time PCR με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Κυκλοποιητής real-time PCR με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002003

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 2 κανάλια (πράσινο, κίτρινο) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με μία πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης σε τυπική διάταξη 8 x 12 με χρήση 96 σωληναρίων των 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1.000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 ταινίες 4 σωληναρίων και πωμάτων για 10.000 αντιδράσεις	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 10.000 αντιδράσεις	981008

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο ή στο εγχειρίδιο χρήστη του αντίστοιχου kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση	Αλλαγές
R6, Μάρτιος 2021	<p>Προσθήκη των ενοτήτων «Γραμμικό εύρος», «Παρεμβαλλόμενες ουσίες» και «Αναπαραγωγιμότητα».</p> <p>Ενημέρωση των ενοτήτων «Προβλεπόμενη χρήση» και «Ποσοτικοποίηση».</p> <p>Αφαίρεση των αναφορών σε όργανα της QIAGEN που δεν υποστηρίζονται πλέον.</p>

Συμφωνία άδειας περιορισμένης χρήσης για το *artus CMV RG PCR Kit*

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο παρόν εγχειρίδιο και μόνο με τα εξαρτήματα που περιλαμβάνονται στο 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, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα επιπλέον πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το κιτ ή/και η χρήση/οι χρήσεις του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του παρέχονται με άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του κιτ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιασδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το κιτ ή/και τα συστατικά του.

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

Η αγορά αυτού του προϊόντος επιτρέπει στον αγοραστή να το χρησιμοποιήσει για την παροχή διαγνωστικών υπηρεσιών στο πλαίσιο της *in vitro* διαγνωστικής χρήσης σε δείγματα ανθρώπινης προέλευσης. Κανένα γενικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ή άλλη άδεια οποιοδήποτε είδους, πέρα από αυτό το συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης που απορρέει από την αγορά, δεν παρέχεται δια του παρόντος.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, EZ1®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group), CLSI®, (Clinical Laboratory and Standards, Inc.), Augmentin® (Glaxo Group Limited), Tazobac® (Pfizer Inc.), AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Group), Claforan (Sanofi-Aventis Group), FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific).

HB-0046-008 1123965 R6 03/2021© 2021 QIAGEN. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Παραγγείλες www.qiagen.com/shop | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com | Ιστότοπος www.qiagen.com