

Νοέμβριος 2019

Εγχειρίδιο *artus*[®] HHV-6 RG PCR Kit



96

Έκδοση 1

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF



R5 MAT

4521265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

1117341-EL

Διανέμεται από την QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Σύνοψη και επεξήγηση	4
Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.....	4
Αρχή της διαδικασίας.....	5
Περιεχόμενα του kit	6
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	7
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	8
Προειδοποιήσεις	8
Προφυλάξεις.....	8
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	10
Συστατικά του kit	10
Διαδικασία	12
Εκχύλιση DNA.....	12
Πρωτόκολλο: Ανίχνευση ειδικού για HHV-6A και HHV-6B DNA.....	14
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	25
Επικύρωση εκτελέσεων	25
Ποιοτική ανάλυση.....	26
Ποσοτική ανάλυση	28
Περιορισμοί	30
Ποιοτικός έλεγχος.....	31
Χαρακτηριστικά απόδοσης.....	31

Αναλυτική ευαισθησία	31
Ειδικότητα ανάλυσης.....	32
Γραμμικό εύρος.....	33
Ακρίβεια	35
Διαγνωστική αξιολόγηση	36
Επαναληψιμότητα	37
Σύμβολα	38
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	40
Αναφορά.....	40
Πληροφορίες παραγγελιών.....	41

Προβλεπόμενη χρήση

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96) είναι μια *in vitro* διαγνωστική δοκιμασία βασισμένη σε τεχνολογία real-time PCR για την ανίχνευση, διαφοροποίηση και ποσοτικοποίηση DNA που απαντάται συγκεκριμένα στον ανθρώπινο ιό έρπητα 6A (HHV-6A) και τον ανθρώπινο ιό έρπητα 6B (HHV-6B).

Σύνοψη και επεξήγηση

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση ειδικού για HHV-6A και HHV-6B DNA με χρήση real-time PCR σε όργανα Rotor-Gene Q. Ο προσδιορισμός περιλαμβάνει ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης (εσωτερικός μάρτυρας) για τη διαπίστωση τυχόν αναστολής της PCR και την επιβεβαίωση της ακεραιότητας των αντιδραστηρίων του kit.

Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς

HHV-6 είναι το γενικό όνομα που περιλαμβάνει δύο στενά σχετιζόμενους ιούς, τον HHV-6A και τον HHV-6B. Πρόκειται για δύο από τους εννέα ιούς έρπητα που είναι γνωστό ότι προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους. Ανήκουν στο γένος *Roseolovirus* της υποοικογένειας *Betaherpesvirinae*. Η πρωτογενής λοίμωξη από HHV-6 εμφανίζεται κατά κανόνα στην παιδική ηλικία και συγκεκριμένα πριν από την ηλικία των δύο ετών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, διάρροια και αιφνίδιο εξάνθημα το οποίο είναι πιο γνωστό ως βρεφική ροδάνθη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αρχική λοίμωξη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε εμπύρετες κρίσεις, εγκεφαλίτιδα ή δυσεπίλυτες κρίσεις. Μετά την πρωτογενή λοίμωξη, ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στο σώμα.

Ο λανθάνων HHV-6 μπορεί να καταστεί αδρανής αργότερα. Οι κλινικές εκδηλώσεις επανενεργοποίησης μπορεί να επηρεάσουν ορισμένες περιοχές στο σώμα, όπως τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, την καρδιά, τους πνεύμονες και τη γαστρεντερική οδό. Η επανενεργοποίηση του HHV-6 στον εγκεφαλικό ιστό σχετίζεται με νευρολογικές διαταραχές και σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να οδηγήσει σε νοητική βλάβη, μόνιμη αναπηρία και θάνατο.

Εάν και ο HHV-6B προκαλεί κλινικές εκδηλώσεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και παιδιά στις Η.Π.Α., στην Ιαπωνία και στην Ευρώπη, ο HHV-6A απαντάται κυρίως σε παιδιά στην Αφρική. Ο HHV-6A απαντάται συχνά σε ασθενείς με χρόνιες νευρολογικές ασθένειες, ιδίως νευροφλεγμονώδεις νόσους, όπως πολλαπλή σκλήρυνση (Multiple Sclerosis, MS) και ρομβοεγκεφαλίτιδα.

Αρχή της διαδικασίας

Τα HHV-6 RG Master A και HHV-6 RG Master B περιέχουν αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση περιοχών-στόχων στα γονιδιώματα των HHV-6A και HHV-6B και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού αμπλικονίου στα κανάλια φθορισμού Cycling Green και Cycling Red των οργάνων Rotor-Gene Q.

Πέραν αυτού, το *artus* HHV-6 RG PCR Kit περιέχει ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση πιθανών αποτυχιών κατά τη διαδικασία προσδιορισμού. Το σύστημα αυτό ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Yellow των οργάνων Rotor-Gene Q.

Οι ειδικοί ανιχνευτές για το DNA του HHV-6A επισημαίνονται με το φθορισμοφόρο FAM™, ενώ οι ειδικοί ανιχνευτές για το DNA του HHV-6B επισημαίνονται με ένα φθορισμοφόρο που εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το Cy[®]5. Ο ειδικός ανιχνευτής για τον εσωτερικό μάρτυρα επισημαίνεται με το φθορισμοφόρο JOE™. Η χρήση ανιχνευτών επισημασμένων με φασματικά διακριτά φθορισμοφόρα επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ειδικού για HHV-6A και HHV-6B DNA, καθώς και την ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα στα αντίστοιχα κανάλια του οργάνου Rotor-Gene Q.

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

artus HHV-6 RG PCR Kit		(96)
Αριθμός καταλόγου		4521265
Αριθμός αντιδράσεων		96
Μπλε	HHV-6 RG Master A	8 x 60 μl
Πορφυρό	HHV-6 RG Master B	8 x 180 μl
Πράσινο	HHV-6 RG IC	1 x 1000 μl
Κόκκινο	HHV-6 RG QS*	4 x 250 μl
Λευκό	H ₂ O	1 x 500 μl
	Εγχειρίδιο	1

*Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit περιέχει 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης (QS1–QS4).

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

Αντιδραστήρια

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, αρ. κατ. 51304 ή 51306, Βλ. «Εκχύλιση DNA», σελίδα 12)

Αναλώσιμα

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, για χρήση σε 72-well rotor (QIAGEN, αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου χαμηλής δέσμευσης DNA χωρίς νουκλεάση, για την προετοιμασία κύριων μειγμάτων
- Ρύγχη πιπέτας χωρίς νουκλεάση με φραγμό αερολυμάτων

Εξοπλισμός

- Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex or Rotor-Gene Q 6plex
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.1 ή νεότερη
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes, μονάδα αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία αντίδρασης (QIAGEN, αρ. κατ. 9018901)
- Ειδικές ρυθμιζόμενες πιπέτες για προετοιμασία δειγμάτων
- Ειδικές ρυθμιζόμενες πιπέτες για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR
- Ειδικές ρυθμιζόμενες πιπέτες για τη διοχέτευση της μήτρας DNA
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Διαβάστε όλες τις οδηγίες προσεκτικά προτού χρησιμοποιήσετε τη δοκιμασία.

Προειδοποιήσεις

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

Προφυλάξεις

- Η χρήση αυτού του προϊόντος περιορίζεται σε προσωπικό που έχει λάβει ειδικές οδηγίες και εκπαίδευση στις τεχνικές real-time PCR και σε in vitro διαγνωστικές διαδικασίες.
- Τα δείγματα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα ως μολυσματικά ή/και υλικά βιολογικής επικινδυνότητας σύμφωνα με ασφαλείς εργαστηριακές διαδικασίες.
- Φοράτε προστατευτικά γάντια μίας χρήσης χωρίς επικάλυψη πούδρας, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά κατά τον χειρισμό των δοκιμίων.
- Αποφύγετε τη μικροβιακή επιμόλυνση και την επιμόλυνση από νουκλεάσες (DNase/RNase) του δείγματος και των συστατικών του kit.
- Χρησιμοποιείτε πάντοτε άκρα πιπέτας χωρίς DNase/RNase μίας χρήσης με φραγμό αερολυμάτων.
- Φοράτε πάντα προστατευτικά γάντια μίας χρήσης χωρίς επικάλυψη πούδρας κατά τον χειρισμό των συστατικών του kit.
- Χρησιμοποιείτε ξεχωριστούς και απομονωμένους χώρους εργασίας για τις δραστηριότητες της προετοιμασίας δειγμάτων, προετοιμασίας αντίδρασης και ενίσχυσης/ανίχνευσης. Η ροή εργασίας στο εργαστήριο πρέπει να γίνεται προς μία κατεύθυνση. Σε κάθε χώρο φοράτε πάντοτε γάντια μίας χρήσης και αλλάζετε τα κάθε φορά που πηγαίνετε από τον έναν χώρο στον άλλον.

-
- Χρησιμοποιείτε αποκλειστικές προμήθειες και εξοπλισμό σε κάθε χώρο εργασίας και μην τα μετακινείτε από τον έναν χώρο στον άλλον.
 - Αποθηκεύετε το θετικό ή/και δυνητικά θετικό υλικό ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα συστατικά του kit.
 - Μην ανοίγετε τα σωληνάρια/τις πλάκες αντίδρασης μετά την ενίσχυση για να αποφύγετε την επιμόλυνση με αμπλικόνια.
 - Πρόσθετοι μάρτυρες μπορούν να εξεταστούν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ή απαιτήσεις των τοπικών, εθνικών ή/και ομοσπονδιακών κανονισμών ή των πιστοποιημένων οργανισμών.
 - Μη χρησιμοποιείτε συστατικά του kit μετά την ημερομηνία λήξης τους.
 - Απορρίπτετε τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφάλειας.

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Συστατικά του KIT

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit αποστέλλεται σε ξηρό πάγο. Κατά την παραλαβή τους, τα συστατικά του kit πρέπει να είναι κατεψυγμένα. Εάν ένα ή περισσότερα συστατικά δεν είναι κατεψυγμένα κατά την παραλαβή τους ή εάν τα σωληνάρια έχουν υποστεί φθορά κατά τη μεταφορά, επικοινωνήστε με το τμήμα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN για βοήθεια. Κατά την παραλαβή, αποθηκεύστε όλα τα συστατικά του kit σε θερμοκρασία από -30°C έως -15°C .

Αποφύγετε την απόψυξη και κατάψυξη κύριων αντιδραστηρίων περισσότερες από δύο φορές, καθώς ενδέχεται να μειωθεί η απόδοση του προσδιορισμού. Καταψύξτε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα εάν η χρήση τους δεν πρόκειται να είναι τακτική. Μην αποθηκεύετε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία 4°C για περισσότερο από 2 ώρες. Τα HHV-6 RG Master A και HHV-6 RG Master B πρέπει να προστατεύονται από το φως.

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit περιλαμβάνει τα εξής:

- Δύο κύρια αντιδραστήρια (HHV-6 RG Master A και HHV-6 RG Master B)
- Εσωτερικός μάρτυρας με μήτρα (HHV-6 RG IC)
- Τέσσερα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HHV-6 RG QS1–QS4)
- Νερό κατηγορίας PCR (H_2O)

Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης περιέχουν τυποποιημένες συγκεντρώσεις ειδικού για HHV-6 DNA. Αυτά τα πρότυπα ποσοτικοποίησης βαθμονομήθηκαν με βάση το 1ο Διεθνές Πρότυπο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για το DNA του Ανθρώπινου Ιού Έρπητα 6B (HHV-6B) (κωδικός NIBSC: 15/266) για προσδιορισμούς βασισμένους στην τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (NAT) (1).

Για τη βαθμονόμηση του ειδικού για τον HHV-6A θετικού υλικού του *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96), χρησιμοποιήθηκε ένας προσδιορισμός ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων χωρίς διαφοροποίηση των HHV-6A και HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). Πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση μέσω προσδιορισμού παράλληλης γραμμής με ειδικό για HHV-6A θετικό υλικό και με βάση το 1ο Διεθνές Πρότυπο του ΠΟΥ για το DNA του Ανθρώπινου Ιού Έρπητα 6B (HHV-6B). Η βαθμονόμηση επιβεβαιώθηκε με το *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96).

Αυτά τα πρότυπα ποσοτικοποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ως θετικοί μάρτυρες ή συνδυαστικά με στόχο τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της συγκέντρωσης ειδικού για HHV-6A και/ή HHV-6B DNA στο δείγμα. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων ποσοτικοποίησης παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συγκέντρωση προτύπων ποσοτικοποίησης

Πρότυπο ποσοτικοποίησης	Συγκέντρωση (IU/μl)	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	10.000	10.000
QS2	1000	1000
QS3	100	100
QS4	10	10

Διαδικασία

Εκχύλιση DNA

Οι ειδικές αλληλουχίες-στόχοι των HHV-6A και HHV-6B ενισχύονται από το DNA. Δεδομένου ότι η απόδοση του προσδιορισμού εξαρτάται από την ποιότητα της μήτρας DNA, βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε ένα κιτ προετοιμασίας δειγμάτων που αποδίδει DNA κατάλληλο προς χρήση σε καθοδική PCR.

Το κιτ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, αρ. κατ. 51304 ή 51306) συνιστάται για τον καθαρισμό DNA για χρήση μαζί με το *artus* HHV-6 RG PCR Kit. Εκτελέστε τον καθαρισμό DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στο *Εγχειρίδιο* του *QIAamp DSP Mini*.

Δεδομένου ότι τα ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης στο QIAamp DNA Mini Kit περιέχουν αιθανόλη, εκτελέστε ένα πρόσθετο βήμα φυγοκέντρησης πριν από την έκλουση. Τοποθετήστε τη στήλη διαχωρισμού QIAamp Mini σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής των 2 ml και απορρίψτε το παλιό σωληνάριο συλλογής με το διήθημα. Εκτελέστε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε ταχύτητα περίπου 17.000 x g (~13.000 σ.α.λ.) σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο.

Σημαντικό: Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και της σταθερότητας του εκχυλισμένου νουκλεϊκού οξέος.

Σημαντικό: Η αιθανόλη είναι ισχυρός αναστολέας σε real-time PCR. Εάν το κιτ προετοιμασίας δειγμάτων σας χρησιμοποιεί ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης που περιέχουν αιθανόλη, βεβαιωθείτε ότι έχετε απομακρύνει κάθε ίχνος αιθανόλης πριν από την έκλουση του νουκλεϊκού οξέος.

Εσωτερικός μάρτυρας

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit περιέχει έναν ετερόλογο εσωτερικό μάρτυρα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας αναστολής της PCR ή ως μάρτυρας της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων (εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος) και ως μάρτυρας αναστολής της PCR (βήμα 2α, σελίδα 15).

Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ως μάρτυρας αναστολής της PCR αλλά όχι ως μάρτυρας για τη διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο μείγμα των HHV-6 RG Master A και HHV-6 RG Master B, όπως περιγράφεται στο βήμα 2β του πρωτοκόλλου (σελίδα 15).

Ανεξάρτητα από το ποια μέθοδος/ποιο σύστημα χρησιμοποιείται για την εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος, ο εσωτερικός μάρτυρας δεν πρέπει να προστεθεί απευθείας στο δοκίμιο. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει πάντα να προστίθεται στο μείγμα δοκιμίου/ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Ο όγκος εσωτερικού μάρτυρα που πρέπει να προστεθεί στο μείγμα δοκιμίου/ρυθμιστικού διαλύματος λύσης εξαρτάται μόνο από τον όγκο έκλουσης και αντιπροσωπεύει το 10% του όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιείται το QIAamp DNA Mini Kit, το DNA εκλύεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE. Συνεπώς, προσθέστε 6 μl εσωτερικού μάρτυρα στο μείγμα δοκιμίου/ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κάθε δείγματος.

Σημαντικό: Μην προσθέτετε τον εσωτερικό μάρτυρα και τον φορέα RNA απευθείας στο δοκίμιο.

Πρωτόκολλο: Ανίχνευση ειδικού για HHV-6A και HHV-6B DNA

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε την ενότητα «Προφυλάξεις», στη σελίδα 8.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
- Βεβαιωθείτε πως κάθε εκτέλεση PCR περιλαμβάνει τουλάχιστον έναν θετικό μάρτυρα και έναν αρνητικό μάρτυρα (νερό κατηγορίας PCR).

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση

- Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (παρελκόμενο 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 ενδεχόμενης αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2α. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2β.

Σημαντικό: Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων, ο αρνητικός μάρτυρας —που δεν είναι αρνητικό δοκίμιο— θα πρέπει να περιλαμβάνει τον εσωτερικό μάρτυρα κατ' ελάχιστον.

- 2a. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλ. «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 13). Στην περίπτωση αυτή, προετοιμάστε ένα κύριο μείγμα σύμφωνα με τον Πίνακα 2. 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)

Συστατικό	1 αντίδραση	12 αντιδράσεις
HHV-6 RG Master A	5 μl	60 μl
HHV-6 RG Master B	15 μl	180 μl
Συνολικός όγκος	20 μl	240 μl

- 2b. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστεθεί απευθείας στο μείγμα των HHV-6 RG Master A και HHV-6 Master B. Σε αυτήν την περίπτωση, 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)

Συστατικό	1 αντίδραση	12 αντιδράσεις
HHV-6 RG Master A	5 μl	60 μl
HHV-6 RG Master B	15 μl	180 μl
HHV-6 RG IC	1 μl	12 μl
Συνολικός όγκος	21 μl	252 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 20 μl του κύριου μείγματος σε κάθε σωληνάριο PCR. Προσθέστε κατόπιν 10 μl του εκλουσμένου δείγματος DNA και αναμείξτε καλά με αναρρόφηση και επανειλημμένη διανομή με πιπέτα. Αντιστοίχως, προσθέστε 10 μl θετικού μάρτυρα ή προτύπου ποσοτικοποίησης ή 10 μl νερού (κατηγορίας PCR) ως αρνητικό μάρτυρα.

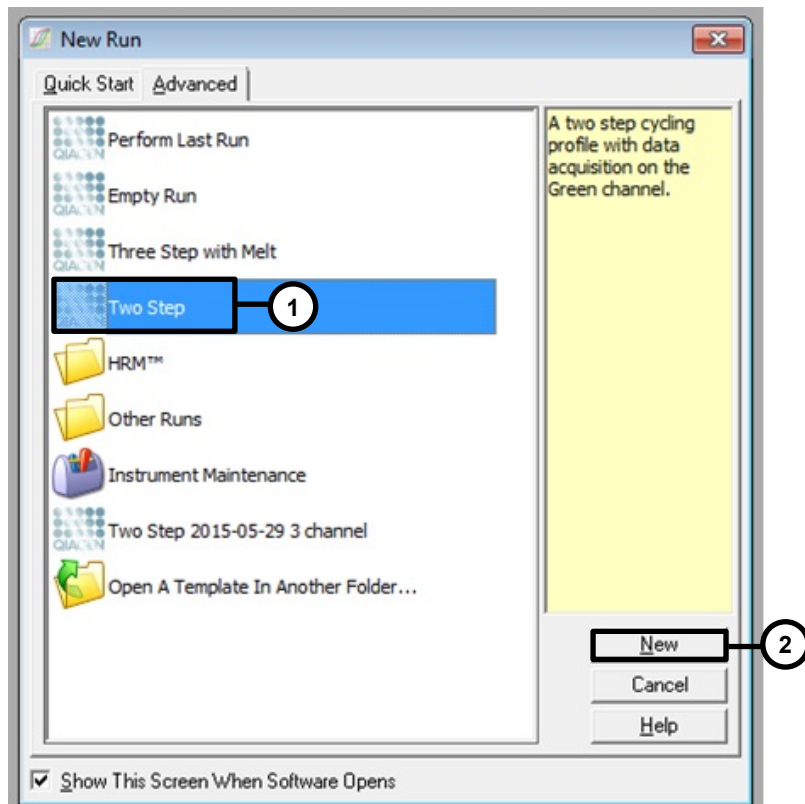
Βεβαιωθείτε ότι έχετε τουλάχιστον έναν θετικό μάρτυρα και έναν αρνητικό μάρτυρα για κάθε εκτέλεση. Για την ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιήστε και τα 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης (QS1–QS4).

4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (παρελκόμενο του οργάνου Rotor-Gene) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του ρότορα.
5. Για την ανίχνευση ειδικού για HHV-6A και HHV-6B DNA, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Εικόνες 1, 2, 3, 4
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start	Εικόνα 5
Ενίσχυση του DNA	Εικόνα 6
Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Εικόνα 7
Έναρξη της εκτέλεσης	Εικόνα 8

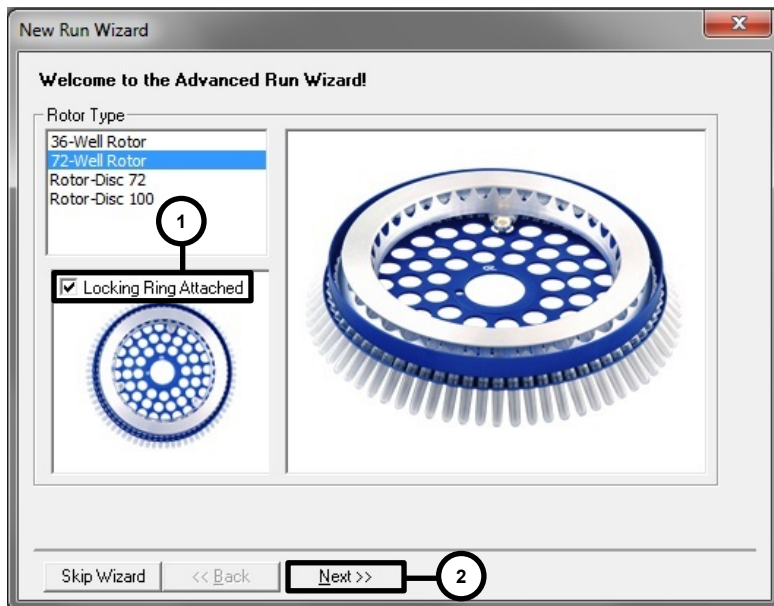
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοσης 2.3.1 ή μεταγενέστερης. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με ένα έντονο μαύρο πλαίσιο.

6. Πρώτα, ανοίξτε το πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) με την έκδοση **Advanced** (Για προχωρημένους) και επιλέξτε το στοιχείο **Two Step** (Δύο βημάτων) (Εικόνα 1). Κάντε κλικ στο **New** (Νέο) για να συνεχίσετε.



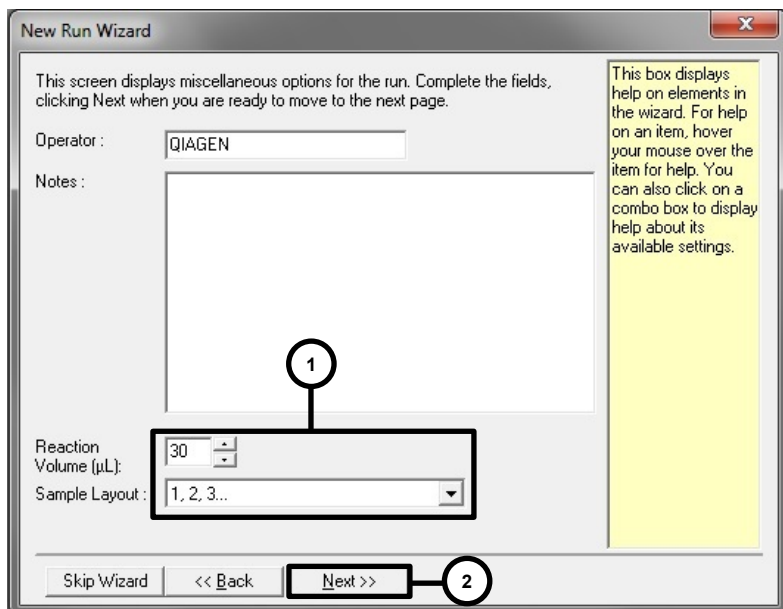
Εικόνα 1. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα εκτέλεση).

7. Στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 2), επισημάνετε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος) και κάντε κλικ στην επιλογή **Next** (Επόμενο).



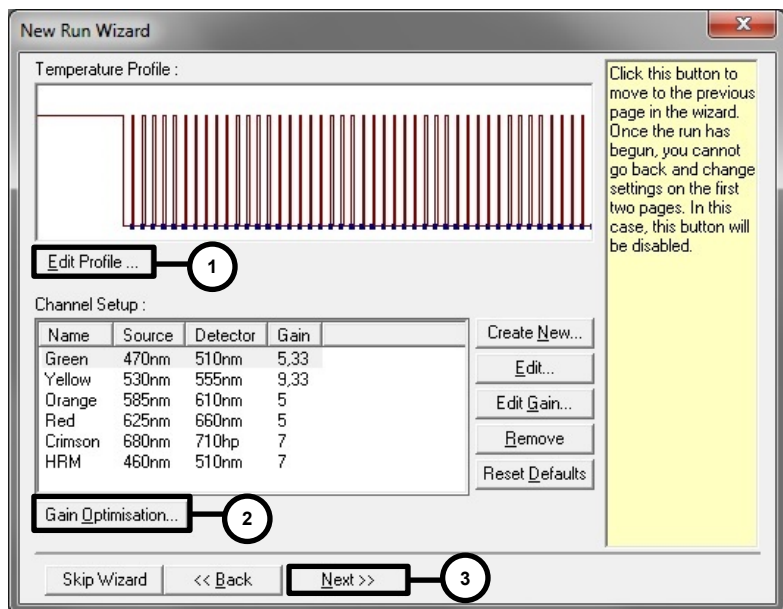
Εικόνα 2. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).

8. Επιλέξτε **30** για τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 3).

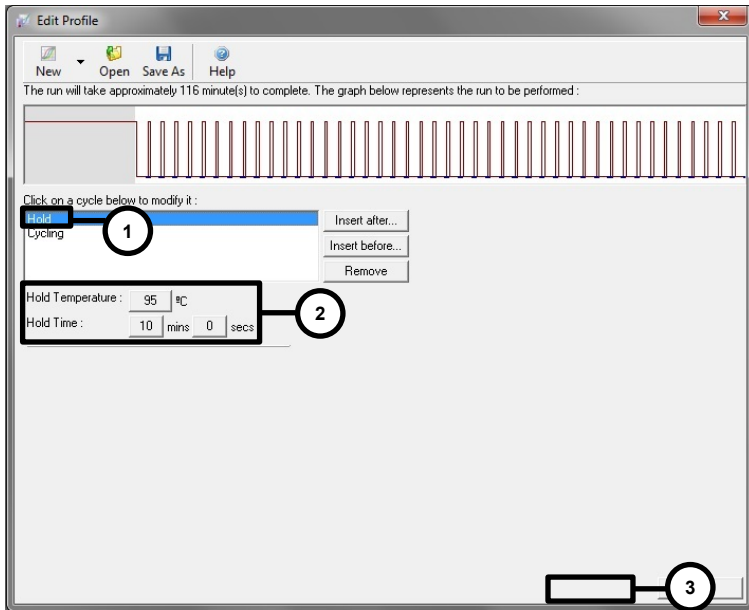


Εικόνα 3. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

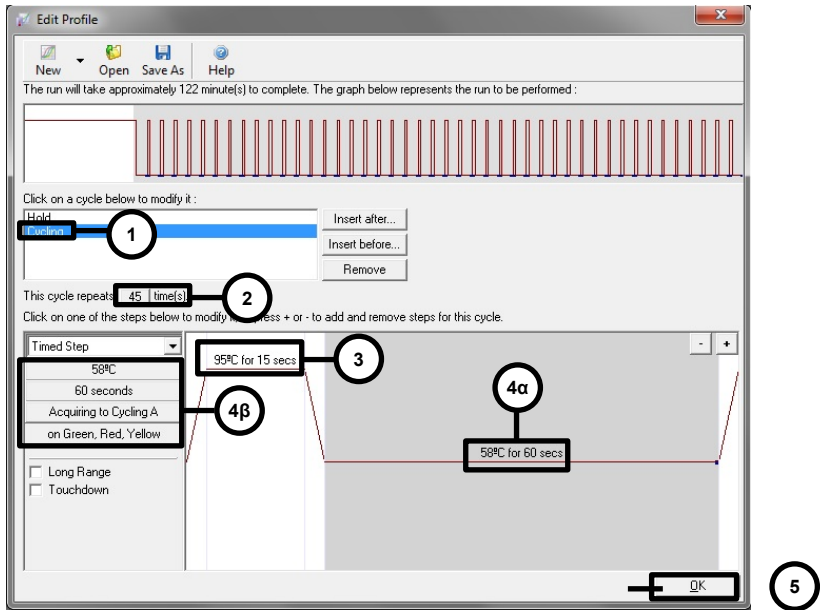
9. Κάντε κλικ στο **Edit Profile** (Επεξεργασία προφίλ) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου **New Run Wizard** (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 4) και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας με τον τρόπο που εμφανίζεται στις Εικόνες 5–6.



Εικόνα 4. Επεξεργασία του προφίλ.

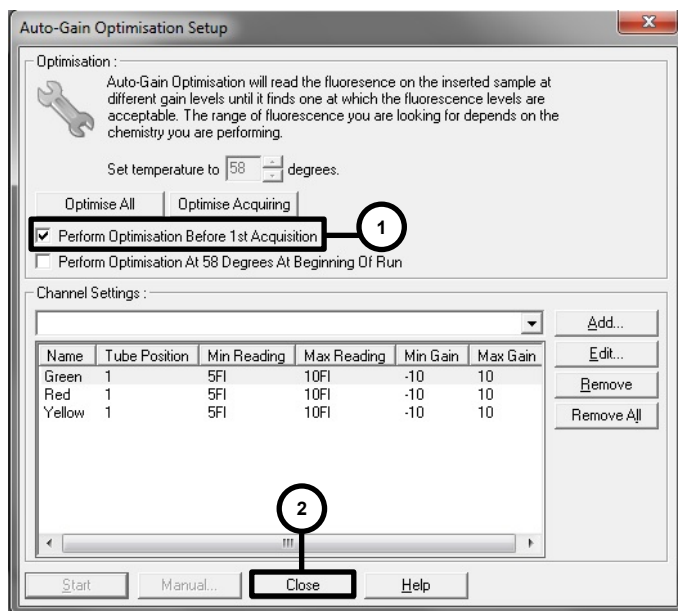


Εικόνα 5. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start.



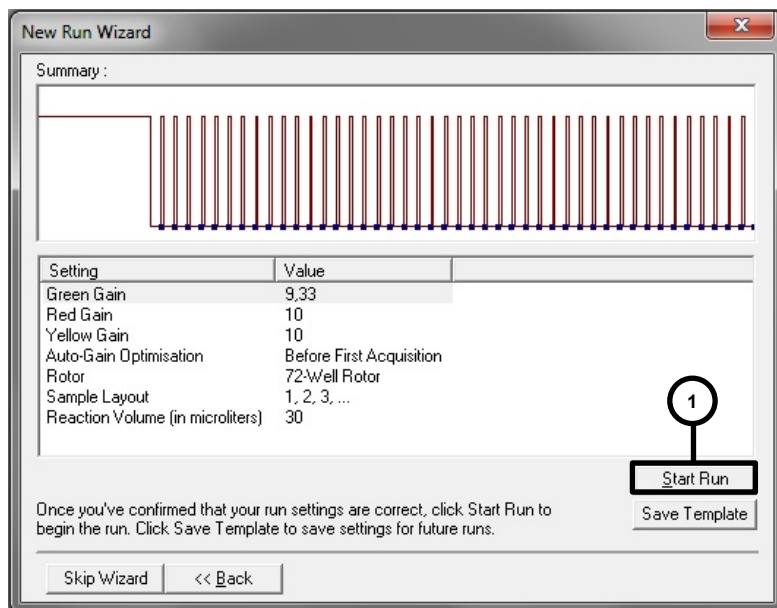
Εικόνα 6. Ενίσχυση του DNA.

10. 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) (Εικόνα 4, Βήμα 2) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου **Auto-Gain Optimisation Setup** (Ρύθμιση αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής) (Εικόνα 7). Επισημάνετε το πλαίσιο **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη) (Εικόνα 7). Βεβαιωθείτε ότι έχουν επιλεγεί όλα τα κανάλια (πράσινο, κόκκινο και κίτρινο) για το **Auto-Gain Optimisation** (Αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής) (Εικόνα 7). (Επιλέξτε το αναπτυσσόμενο μενού στο **Channel Settings** (Ρυθμίσεις καναλιών) για να βρείτε τα κανάλια και κάντε κλικ στο **Add** (Προσθήκη)). Κάντε κλικ στο **Close** (Κλείσιμο) του πλαισίου διαλόγου **Auto-Gain Optimisation Setup** (Ρύθμιση αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής) όταν ολοκληρωθεί η βαθμονόμηση απολαβής.



Εικόνα 7. Ρύθμιση της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού.

11. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση των καναλιών αποθηκεύονται αυτόματα και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (Εικόνα 8). Κάντε κλικ στο **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης).



Εικόνα 8. Έναρξη της εκτέλεσης.

12. Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, αναλύστε τα δεδομένα (βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων», στη σελίδα 25).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Επικύρωση εκτελέσεων

Έγκυρη ποιοτική εκτέλεση

Για να θεωρηθεί έγκυρη μια ποιοτική εκτέλεση, πρέπει να εκπληρώνονται οι ακόλουθες συνθήκες μάρτυρα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συνθήκες μάρτυρα για έγκυρη ποιοτική εκτέλεση

Αναγνωριστικό μάρτυρα	Κανάλι ανίχνευσης		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Θετικός μάρτυρας (QS)	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
Αρνητικός μάρτυρας	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ

Μη έγκυρη ποιοτική εκτέλεση

Μια ποιοτική εκτέλεση είναι μη έγκυρη εάν η εκτέλεση δεν έχει ολοκληρωθεί ή κάποια από τις συνθήκες μάρτυρα για έγκυρη ποιοτική εκτέλεση δεν έχει εκπληρωθεί.

Σε περίπτωση μη έγκυρης ποιοτικής εκτέλεσης, επαναλάβετε την PCR ή εκχυλίστε ξανά DNA από τα αρχικά δείγματα εάν δεν έχει απομείνει DNA.

Έγκυρη ποσοτική εκτέλεση

Μια ποσοτική εκτέλεση είναι έγκυρη εάν εκπληρώνονται όλες οι συνθήκες μάρτυρα για έγκυρη ποιοτική εκτέλεση (βλ. Πίνακα 4, παραπάνω). Επιπλέον, για ακριβή αποτελέσματα ποσοτικοποίησης, πρέπει να δημιουργηθεί μια έγκυρη πρότυπη καμπύλη. Για μια έγκυρη ποσοτική εκτέλεση, η πρότυπη καμπύλη πρέπει να έχει τις ακόλουθες τιμές παραμέτρων (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Παράμετροι μάρτυρα για έγκυρη πρότυπη καμπύλη

Παράμετρος μάρτυρα	Έγκυρη τιμή
Κλίση	-3,743/-2,765
Απόδοση PCR	85%/130%
R εις το τετράγωνο (R^2)	> 0,98

Μη έγκυρη ποσοτική εκτέλεση

Μια ποσοτική εκτέλεση είναι μη έγκυρη εάν η εκτέλεση δεν έχει ολοκληρωθεί ή εάν κάποια από τις συνθήκες μάρτυρα για έγκυρη ποσοτική εκτέλεση δεν έχει εκπληρωθεί.

Σε περίπτωση μη έγκυρης ποσοτικής εκτέλεσης, επαναλάβετε την PCR ή εκχυλίστε ξανά DNA από τα αρχικά δείγματα εάν δεν έχει απομείνει DNA.

Ποιοτική ανάλυση

Η σύνοψη της ερμηνείας των αποτελεσμάτων φαίνεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Σύνοψη ερμηνείας αποτελεσμάτων

Αναγνωριστικό δείγματος	Κανάλι ανίχνευσης			Ερμηνεία αποτελέσματος
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ*	ΘΕΤΙΚΟ†	Ανιχνεύτηκε ειδικό για HHV-6A και HHV-6B DNA.
B	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ*	ΘΕΤΙΚΟ†	Ανιχνεύτηκε ειδικό για HHV-6A DNA.
Γ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ†	Ανιχνεύτηκε ειδικό για HHV-6B DNA.
Δ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	Δεν ανιχνεύτηκε ειδικό για HHV-6A ή HHV-6B DNA. Το δείγμα δεν περιέχει ανιχνεύσιμες ποσότητες ειδικού για HHV-6A ή HHV-6B DNA.
E	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Αναστολή PCR ή αποτυχία αντιδραστηρίου. Επαναλάβετε τη διαδικασία με το αρχικό δείγμα ή συλλέξτε και εξετάστε ένα νέο δείγμα.

* Λόγω νέων δεδομένων αλληλουχίας, δεν μπορεί να αποκλειστεί η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του ειδικού για HHV-6B συστήματος ανίχνευσης με ορισμένα στελέχη του HHV-6A. Αυτά τα στελέχη θα οδηγήσουν σε αδύναμο σήμα στο κανάλι ανίχνευσης HHV-6B (Cycling Red) επιπλέον του σήματος στο κανάλι ανίχνευσης HHV-6A (Cycling Green).

† Η ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Yellow δεν απαιτείται για θετικά αποτελέσματα στο κανάλι ανίχνευσης Cycling Green ή στο κανάλι ανίχνευσης Cycling Red. Τα υψηλά φορτία HHV-6A ή HHV-6B στο δείγμα μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σημάτων εσωτερικού μάρτυρα.

Ποσοτική ανάλυση

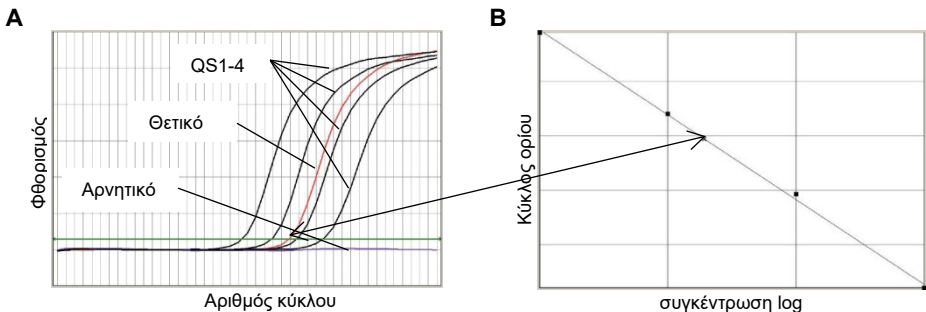
Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit περιέχει 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης (Quantification Standards, QS). Για να δημιουργηθεί μια πρότυπη καμπύλη για ποσοτική ανάλυση, αυτά πρέπει να οριστούν ως πρότυπα με κατάλληλες συγκεντρώσεις (Πίνακας 1, σελίδα 11). Μπορεί να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη για ποσοτική ανάλυση με τη χρήση προτύπων γνωστών συγκεντρώσεων.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = κύκλος ορίου
- m = κλίση
- N_0 = αρχική συγκέντρωση
- b = τεταγμένη

Οι συγκεντρώσεις θετικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης μπορούν να προκύψουν από την πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$



Εικόνα 9. Πρότυπα ποσοτικοποίησης, ένα θετικό και ένα αρνητικό δείγμα που εμφανίζονται σε (Α) ένα γράφημα ενίσχυσης και (Β) στην ανάλυση πρότυπης καμπύλης.

Σημείωση: Η συγκέντρωση του δείγματος εμφανίζεται σε IU/μl και αφορά τη συγκέντρωση ιικού DNA στο έκλουσμα.

Χρησιμοποιήστε τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο για να προσδιορίσετε το ιικό φορτίο του αρχικού δείγματος.

$$\text{Ιικό φορτίο (δείγμα) [IU/ml]} = \frac{\text{Όγκος (έκλουσμα) [\mu\text{l}] x ιικό φορτίο (έκλουσμα) [IU/\mu\text{l}]}{\text{Εισαγωγή δειγμάτων [ml]}}$$

Περιορισμοί

- Η χρήση αυτού του προϊόντος περιορίζεται σε προσωπικό που έχει λάβει ειδικές οδηγίες και εκπαίδευση στις τεχνικές real-time PCR και σε in vitro διαγνωστικές διαδικασίες.
- Η ορθή εργαστηριακή πρακτική είναι ουσιαστικής σημασίας για την ορθή απόδοση αυτού του προσδιορισμού.
- Απαιτείτε ιδιαίτερη προσοχή για τη διατήρηση της καθαρότητας των συστατικών του κιτ και των προετοιμασιών αντίδρασης. Να παρακολουθείτε στενά όλα τα αντιδραστήρια για τυχόν ρύπους και επιμόλυνση. Απορρίψτε τυχόν αντιδραστήρια που υποψιάζεστε ότι έχουν επιμολυνθεί.
- Απαιτείται η εφαρμογή κατάλληλων διαδικασιών συλλογής, μεταφοράς, αποθήκευσης και επεξεργασίας δειγμάτων για τη βέλτιστη απόδοση αυτού του προσδιορισμού.
- Μην χρησιμοποιήσετε αυτόν τον προσδιορισμό απευθείας στο δείγμα. Εφαρμόστε τις ισχύουσες διαδικασίες εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων πριν από τη χρήση αυτού του προσδιορισμού.
- Η παρουσία αναστολέων PCR μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά ή μη έγκυρα αποτελέσματα.
- Οι πιθανές μεταλλάξεις στις περιοχές-στόχους του γονιδιώματος του HHV-6A και/ή του HHV-6B που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στο κιτ μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας των παθογόνων.
- Όπως ισχύει για κάθε διαγνωστική εξέταση, ερμηνεύστε τα αποτελέσματα που προκύπτουν με το *artus* HHV-6 RG PCR Kit λαμβάνοντας υπόψη όλα τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.
- Λόγω νέων δεδομένων αλληλουχίας, δεν μπορεί να αποκλειστεί η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του ειδικού για HHV-6B συστήματος ανίχνευσης με ορισμένα στελέχη του HHV-6A. Αυτά τα στελέχη θα οδηγήσουν σε αδύναμο σήμα στο κανάλι ανίχνευσης HHV-6B (Cycling Red) επιπλέον του σήματος στο κανάλι ανίχνευσης HHV-6A (Cycling Green).

Ποιοτικός έλεγχος

Κάθε παρτίδα του *artus* HHV-6 RG PCR Kit ελέγχεται έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών, ώστε να διασφαλίζεται η σταθερή ποιότητα του προϊόντος.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα ειδικά χαρακτηριστικά απόδοσης του *artus* HHV-6 RG PCR Kit προσδιορίστηκαν με χρήση ειδικού για HHV-6A DNA (στέλεχος GS) και ειδικού για HHV-6B DNA (στέλεχος Z-29) με γνωστές συγκεντρώσεις.

Αναλυτική ευαισθησία

Ως αναλυτική ευαισθησία του *artus* HHV-6 RG PCR Kit ορίζεται η συγκέντρωση (αντίγραφα ανά μl του εκλούσματος) ειδικού για HHV-6A ή ειδικού για HHV-6B DNA που μπορεί να ανιχνευτεί με πιθανότητα $\geq 95\%$. Η αναλυτική ευαισθησία καθορίστηκε με ανάλυση μιας σειράς αραιώσεων DNA HHV-6A και HHV-6B με γνωστή συγκέντρωση (Πίνακες 7 και 8).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναλυτικής ευαισθησίας της ειδικής ενίσχυσης HHV-6A

Συγκέντρωση εισαγωγής (αντίγραφα/ml)	Αριθμός αντιγράφων	Αριθμός θετικών	Ποσοστό επιτυχίας (%)
3,33	18	18	100
1,05	18	18	100
0,33	18	11	61
0,11	18	10	56
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	1	6
0,001	18	0	0

Πίνακας 8. Αποτελέσματα PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αναλυτικής ευαισθησίας της ειδικής ενίσχυσης HHV-6B

Συγκέντρωση εισαγωγής (αντίγραφα/ml)	Αριθμός αντιγράφων	Αριθμός θετικών	Ποσοστό επιτυχίας (%)
10,50	18	18	100
3,33	36	36	100
1,05	18	16	89
0,33	18	8	44
0,11	18	1	6
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	0	0

Η αναλυτική ευαισθησία του *artus* HHV-6 RG PCR Kit, που καθορίστηκε με πιθανοτική ανάλυση (probit), για την ανίχνευση ειδικού για HHV-6A DNA είναι 1,46 αντίγραφα/μl εκλούσματος [95% διαστήματος εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI): 0,72–4,57 αντίγραφα/μl] και η αναλυτική ευαισθησία για την ανίχνευση ειδικού για HHV-6B DNA είναι 2,58 αντίγραφα/μl εκλούσματος (95% CI: 1,44-6,30 αντίγραφα/μl).

Ειδικότητα ανάλυσης

Η ειδικότητα ανάλυσης του *artus* HHV-6 RG PCR Kit διασφαλίζεται από την προσεκτική επιλογή ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών και ανιχνευτών). Τα ολιγονουκλεοτίδια ελέγχονται με ανάλυση σύγκρισης αλληλουχιών έναντι δημόσια διαθέσιμων αλληλουχιών για να διασφαλιστεί ότι ανιχνεύονται όλοι οι σχετικοί γονότυποι HHV-6. Επιπλέον, η ειδικότητα του *artus* HHV-6 RG PCR Kit αξιολογήθηκε με εξέταση ενός πάνελ γονιδιωματικού DNA/RNA εκχυλισμένου από άλλους ερπητοϊούς ή άλλα παθογόνα που σχετίζονται με ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Πίνακας 9).

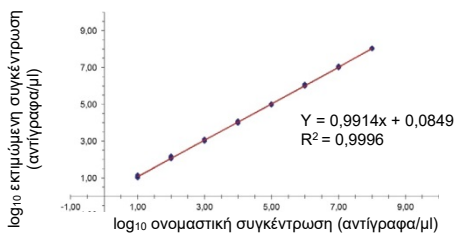
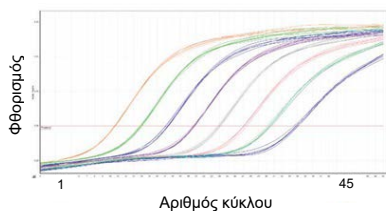
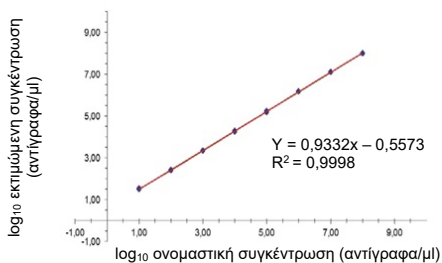
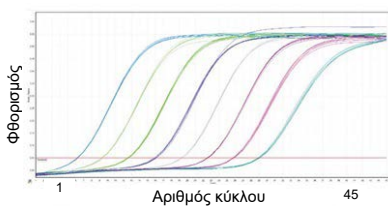
Πίνακας 9. Οργανισμοί που εξετάστηκαν για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Οργανισμός	Κανάλι ανίχνευσης		
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Red (HHV-6B)	Cycling Yellow (IC)
Ιός του απλού έρπητα 1	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός του απλού έρπητα 2	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός ανεμοβλογιάς-ζωστήρα	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός Epstein-Barr	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Κυτταρομεγαλιός	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ανθρώπινος ιός έρπητα 7	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ανθρώπινος ιός έρπητα 8	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός BK	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός JC	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Παρβοϊός B19	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός ηπατίτιδας A	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός ηπατίτιδας B	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ιός ηπατίτιδας C	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV) 1	Αρνητικό	Αρνητικό	Έγκυρο

Το *artus* HHV-6 RG PCR Kit δεν επέδειξε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με κανέναν από τους καθορισμένους οργανισμούς.

Γραμμικό εύρος

Το γραμμικό εύρος του *artus* HHV-6 RG PCR Kit αξιολογήθηκε με ανάλυση μιας λογαριθμικής σειράς αραιώσης ειδικού για HHV-6A και ειδικού για HHV-6B DNA με τη χρήση συγκεντρώσεων από 1×10^8 έως 10^0 αντίγραφα/μl (Εικόνα 10). Αναλύθηκαν τουλάχιστον 6 αντίγραφα ανά αραιώση.

A**B**

Εικόνα 10. Καμπύλες ενίσχυσης και ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης μιας σειράς αραιώσης (A) ειδικού για HHV-6A και (B) ειδικού για HHV-6B DNA.

Το γραμμικό εύρος του *artus* HHV-6 RG PCR Kit εκτείνεται σε ένα διάστημα τουλάχιστον 7 τάξεις μεγέθους για ειδικό για HHV-6A και για HHV-6B DNA.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια του *artus* HHV-6 RG PCR Kit καθορίστηκε μέσω της μεταβλητότητας εντός του προσδιορισμού (μεταβλητότητα εντός του ίδιου πειράματος), της μεταβλητότητας μεταξύ προσδιορισμών (μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων) και της μεταβλητότητας μεταξύ παρτίδων (μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών παρτίδων παραγωγής).

Τα δεδομένα μεταβλητότητας εκφράζονται ως τιμές τυπικής απόκλισης, διασποράς και συντελεστή διακύμανσης. Τα δεδομένα βασίζονται στην ανάλυση ποσοτικοποίησης καθορισμένων συγκεντρώσεων γονιδιωματικού DNA HHV-6 και στις τιμές κύκλου ορίου (C_T) σε συνάρτηση με τον εσωτερικό μάρτυρα (Πίνακες 10–12). Αναλύθηκαν τουλάχιστον 6 αντίγραφα ανά δείγμα για τη μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού, τη μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών και τη μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων. Η συνολική διασπορά υπολογίστηκε με τον συνδυασμό των 3 αναλύσεων.

Πίνακας 10. Ακρίβεια ενίσχυσης του HHV-6A

Ειδικό σύστημα HHV-6A	Μέση συγκέντρωση (αντίγραφα/μl)	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού	22,07	2,75	7,56	12,50
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών	23,32	2,88	8,28	12,34
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων	23,63	3,02	9,10	12,76
Συνολική διασπορά	23,94	2,85	8,12	11,90

Πίνακας 11. Ακρίβεια ενίσχυσης του HHV-6B

Ειδικό σύστημα HHV-6B	Μέση συγκέντρωση (αντίγραφα/μl)	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού	21,58	4,83	23,32	22,37
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών	25,55	3,62	13,10	14,17
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων	24,54	4,63	21,44	18,87
Συνολική διασπορά	24,23	4,36	19,04	18,01

Πίνακας 12. Ακρίβεια ενίσχυσης εσωτερικού μάρτυρα

Εσωτερικός μάρτυρας	Μέσος κύκλος ορίου (C _T)	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού	21,97	0,11	0,01	0,51
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών	21,98	0,09	0,01	0,40
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων	21,97	0,10	0,01	0,44
Συνολική διασπορά	21,97	0,09	0,01	0,39

Διαγνωστική αξιολόγηση

Η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα του *artus* HHV-6 RG PCR Kit αξιολογούνται τακτικά με ανάλυση δειγμάτων αναφοράς και διαγνωστικών δειγμάτων που έχουν αναλυθεί προηγουμένως με μεθόδους αναφοράς (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Διαγνωστική αξιολόγηση του *artus* HHV-6 RG PCR Kit

		<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
		HHV-6A	HHV-6B	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
Μέθοδος αναφοράς	HHV-6A	8	0	0
	HHV-6B	0	19	0
	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	0	0	3

Επαναληψιμότητα







Η ειδικότητα, η ευαισθησία και η ακρίβεια ποσοτικοποίησης του *artus* HHV-6 PCR Kit αξιολογήθηκαν με ανάλυση καθιερωμένων πάνελ επάρκειας για HHV-6. Για τη διασφάλιση της επαναληψιμότητας του *artus* HHV-6 RG PCR Kit, αξιολογήθηκαν η ειδικότητα και η ευαισθησία με ανάλυση καθιερωμένων πάνελ επάρκειας για HHV-6, καθώς και χαρακτηρισμένων διαγνωστικών δειγμάτων σε τακτική βάση (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Αποτελέσματα της ανάλυσης ενός πάνελ επάρκειας για HHV-6 (QCMD)

Πάνελ επάρκειας			<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
Αναγνωριστικό δείγματος	Περιεχόμενο δείγματος	Αναμενόμενη συγκέντρωση (αντίγραφα/ml)	Συγκέντρωση HHV-6A που ανιχνεύτηκε (αντίγραφα/ml)	Συγκέντρωση HHV-6B που ανιχνεύτηκε (αντίγραφα/ml)	Εσωτερικός μάρτυρας
HHV6DNA14-01	HHV-6B	1002	–	474	Έγκυρο
HHV6DNA14-02	HHV-6A	596	94	–	Έγκυρο
HHV6DNA14-03	HHV-6A	3020	522	–	Έγκυρο
HHV6DNA14-04	HHV-6A	171	66	–	Έγκυρο
HHV6DNA14-05	HHV-6B	10.000	–	6330	Έγκυρο
HHV6DNA14-06	HHV-6B	294	–	93	Έγκυρο
HHV6DNA14-07	HCMV	–	–	–	Έγκυρο
HHV6DNA14-08	Αρηθτικό για HHV-6	–	–	–	Έγκυρο
HHV6DNA14-09	HHV-6B	843	–	894	Έγκυρο
HHV6DNA14-10	HHV-6B	8954	–	9300	Έγκυρο

Σύμβολα

Σε αυτές τις οδηγίες χρήσης χρησιμοποιούνται τα σύμβολα του ακόλουθου πίνακα.

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
 96	Περιέχει υλικό που επαρκεί για 96 δοκιμασίες
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής

Σύμβολο

Ορισμός συμβόλου



Ημερομηνία λήξης



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες ή/και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμού (για πληροφορίες επικοινωνίας επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Αναφορά

1. Govind, S., Hockley, J., Morris, C., and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260259/WHO-BS-2017.2321-eng.pdf>.

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: Master A, Master B, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, H ₂ O (νερό κατηγορίας PCR)	4521265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Για 50 παρασκευές DNA: 50 QIAamp Mini Spin Columns, πρωτεϊνάση K, αντιδραστήρια, ρυθμιστικά διαλύματα, Collection Tubes (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Για 250 παρασκευές DNA: 250 QIAamp Mini Spin Columns, πρωτεϊνάση K, αντιδραστήρια, ρυθμιστικά διαλύματα, Collection Tubes (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q και παρελκόμενα		
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
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

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Κυκλοποιητής real-time PCR με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει Priority Package με λογισμικό, εγκατάσταση, κατάρτιση, εγγύηση 3 ετών στα εξαρτήματα και την εργασία και 3 επισκέψεις προληπτικής συντήρησης.	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Κυκλοποιητής real-time PCR με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει Priority Package με λογισμικό, εγκατάσταση, κατάρτιση, εγγύηση 2 ετών στα εξαρτήματα και την εργασία και 2 επισκέψεις προληπτικής συντήρησης.	9001865
Rotor-Gene Q 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	9001640
Rotor-Gene Q 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	9001570

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Όργανο real-time PCR με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει Priority Package με λογισμικό, εγκατάσταση, κατάρτιση, εγγύηση 3 ετών στα εξαρτήματα και την εργασία και 3 επισκέψεις προληπτικής συντήρησης.	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Όργανο real-time PCR με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει Priority Package με λογισμικό, εγκατάσταση, κατάρτιση, εγγύηση 2 ετών στα εξαρτήματα και την εργασία και 2 επισκέψεις προληπτικής συντήρησης.	9001869
Rotor-Gene Q 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	9001660
Rotor-Gene Q 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	9001590

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάκια του 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1.000 αντιδράσεις των 10–50 μl	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 10.000 αντιδράσεις των 10–50 μl	981106

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Ημερομηνία	Αλλαγές
R4, Σεπτέμβριος 2018	Αλλαγή των μονάδων αναφοράς προσδιορισμού από αντίγραφα σε διεθνείς μονάδες (International Units - IU).
R5, Νοέμβριος 2019	Αφαίρεση σημείωσης σχετικά με τον συντελεστή μετατροπής για τα πρότυπα ποσοτικοποίησης του artus HHV-6 RG PCR Kit (96) από το ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου. Αναθεώρηση της ενότητας «Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς» ώστε να περιλαμβάνει πληροφορίες για τα HHV-6A και HHV-6B.

Συμφωνία περιορισμένης άδειας χρήσης για το *artus* HHV-6 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 συστατικά που περιλαμβάνονται στο 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, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο εγχειρίδιο αυτό 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 χρήσης που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit και/ή η χρήση/οι χρήσεις του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit 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 kit 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 οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας χρήσης, ανατρέξτε στον ιστότοπο 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 οποιασδήποτε είδους, πέρα από αυτό το συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης που απορρέει από την αγορά, δεν παρέχεται δια του προϊόντος.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene®, Sample to Insight® (Όμιλος QIAGEN), FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific ή οι θυγατρικές της), Cy® (GE Healthcare). Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και εάν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

1117341 11-19 HB-1996-005 © 2019 altona Diagnostics GmbH, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

