



# **artus<sup>®</sup> EBV LC PCR Kit**

## **Εγχειρίδιο**

 24 (Αρ. Καταλόγου 4501063)  
 96 (Αρ. Καταλόγου 4501065)

Διαγνωστικό προϊόν in vitro ποσοτικού προσδιορισμού

Για τη χρήση με το όργανο *LightCycler<sup>®</sup>*

Έκδοση 1 η



4501063, 4501065



1046892EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2

**MAT**

1046892EL



## **QIAGEN: Sample and Assay Technologies**

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

Η **QIAGEN** θέτει **πρότυπα**:

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

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Πίνακας περιεχομένων

<b>1. Περιεχόμενο.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Αποθήκευση .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Γενικά μέτρα ασφάλειας .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες .....</b>	<b>7</b>
<b>6. Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Περιγραφή προϊόντος.....</b>	<b>8</b>
<b>8. Πρωτόκολλο .....</b>	<b>9</b>
8.1. Απομόνωση DNA .....	9
8.2. Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου .....	12
8.3. Ποσοτικοποίηση .....	14
8.4. Προετοιμασία της PCR .....	15
8.5. Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler</i> .....	19
<b>9. Αξιολόγηση.....</b>	<b>22</b>
<b>10. Αντιμετώπιση προβλημάτων .....</b>	<b>25</b>
<b>11. Ειδικά χαρακτηριστικά.....</b>	<b>27</b>
11.1. Αναλυτική ευαισθησία.....	27
11.2. Ειδικότητα.....	28
11.3. Ακρίβεια.....	29
11.4. Επαναληψιμότητα.....	31
11.5. Διαγνωστική αξιολόγηση .....	31
<b>12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος.....</b>	<b>31</b>
<b>13. Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις .....</b>	<b>31</b>

<b>14. Ποιοτικός έλεγχος .....</b>	<b>32</b>
<b>15. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>32</b>
<b>16. Ερμηνεία των συμβόλων .....</b>	<b>33</b>

# artus EBV LC PCR Kit

Για τη χρήση με το όργανο *LightCycler*

## 1. Περιεχόμενο

	Όνομασία και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4501063 24 αντιδράσεις	Αρ. είδους 4501065 96 αντιδράσεις
<b>Μπλε</b>	<i>EBV LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Κόκκινο</b>	<i>EBV LC/RG/TM QS 1<sup>α</sup></i> <i>5 x 10<sup>4</sup> cop/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Κόκκινο</b>	<i>EBV LC/RG/TM QS 2<sup>α</sup></i> <i>5 x 10<sup>3</sup> cop/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Κόκκινο</b>	<i>EBV LC/RG/TM QS 3<sup>α</sup></i> <i>5 x 10<sup>2</sup> cop/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Κόκκινο</b>	<i>EBV LC/RG/TM QS 4<sup>α</sup></i> <i>5 x 10<sup>1</sup> cop/μl</i>	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Πράσινο</b>	<i>EBV LC IC<sup>α</sup></i>	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
<b>Λευκό</b>	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

<sup>α</sup> QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης  
IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

## 2. Αποθήκευση

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

### 3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Αρ. κατ. 2 158 850) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *Crosstalk Color Compensation*
- Τριχοειδείς σωλήνες *LightCycler* (20 μl)
- Cooling Block *LightCycler*
- Όργανο *LightCycler*
- Capping Tool *LightCycler*

### 4. Γενικά μέτρα ασφάλειας

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

- Χρησιμοποίηση στείρων ρυγχών πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου, προϊόντα πολλαπλασιασμού) πρέπει να καθαρίζεται, αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Πλήρη απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση τους.
- Στη συνέχεια καλή ανάμιξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρωσης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή σε Cooling Block *LightCycler*.

## **5. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες**

Η μετάδοση του ιού Epstein-Barr (EBV) γίνεται από το στόμα, κατά κύριο λόγο με το μολυσμένο σάλιο. Η μόλυνση από EBV εξελίσσεται κατά κανόνα χωρίς συμπτώματα, και ιδιαίτερα στην παιδική ηλικία. Κλινική ένδειξη οξείας μόλυνσης είναι ο αδενικός πυρετός του Pfeiffer, με εμφάνιση πυρετού, κόπωσης, κυνάγχης καθώς και διόγκωσης των λεμφογαγγλίων και της σπλήνας. Σε ορισμένους ασθενείς, οι παραπάνω διαταραχές ενδέχεται να υποδηλώνουν υποτροπές σε χρόνια βάση. Περιστατικά βαρείας λοίμωξης από EBV παρατηρούνται ιδιαίτερα σε άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή και σε άτομα με δυσλειτουργία των T-κυττάρων.

## **6. Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR**

Η διάγνωση παθογόνων οργανισμών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου παράγοντα. Στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου, η ανίχνευση γίνεται με τη βοήθεια φθορίζουσων χρωστικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσκολλώνται ειδικά στο προϊόν του πολλαπλασιασμού της PCR. Η μέτρηση των εντάσεων φθορισμού, κατά την εξέλιξη της PCR πραγματικού χρόνου, επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων, χωρίς να χρειάζεται να ανοιχθούν και πάλι τα σωληνάρια των δειγμάτων μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR (Mackay, 2004).

## 7. Περιγραφή προϊόντος

Το *artus* EBV LC PCR Kit είναι ένα σύστημα έτοιμο προς χρήση για την ανίχνευση του DNA του EBV, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στο όργανο *LightCycler*. Το *EBV LC Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για τον ειδικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος μεγέθους 97 bp, του γονιδιώματος του EBV καθώς και για την άμεση ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού στο φθοριομετρικό κανάλι F2 του οργάνου *LightCycler*. Πέραν αυτού, το *artus* EBV LC PCR Kit περιέχει, για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR, ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα πολλαπλασιασμού. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο φθοριομετρικό κανάλι F3. Επιπλέον δεν επηρεάζεται αρνητικά το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής PCR του EBV (βλέπε **11.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Ανατρέξτε σχετικά στην ενότητα **8.2 Ποσοτικοποίηση**.

**Λάβετε υπόψη:** Το προφίλ θερμοκρασίας, για την ανίχνευση του DNA του EBV με τη βοήθεια του *artus* EBV LC PCR Kit, αντιστοιχεί με αυτό του *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, του *artus* VZV LC PCR Kit και του *artus* CMV LC PCR Kit. Συνεπώς οι αντιδράσεις της PCR, για αυτά τα *artus* συστήματα, μπορούν να εκτελούνται και να αναλύονται σε μία διαδικασία. Συγχρόνως λάβετε υπόψη τις ειδικές υποδείξεις της αξιολόγησης στην ενότητα **8.3 Ποσοτικοποίηση** και στο κεφάλαιο **9. Αξιολόγηση**.



## 8. Πρωτόκολλο

### 8.1. Απομόνωση DNA

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

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης	Αρ. καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Ορός, πλάσμα, ENY	QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Δεν περιέχεται
	QIAamp UltraSens <sup>®</sup> Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	περιέχεται
Κύτταρα αίματος	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	Δεν περιέχεται
Πλάσμα	EZ1 <sup>®</sup> DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	περιέχεται

\* Για τη χρήση σε συνδυασμό με το BioRobot<sup>®</sup> EZ1 DSP Workstation (Αρ. κατ. 9001360) και τη EZ1 DSP Virus Card (Αρ. κατ. 9017707).

#### Σημαντικές υποδείξεις για τη χρήση του QIAamp UltraSens Virus Kit, το QIAamp DNA Blood Mini Kit και του QIAamp DNA Mini Kit:

- Η προσθήκη του **φορέα RNA** έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και επομένως για την παραλαβή του DNA/RNA. Σε περίπτωση που το χρησιμοποιούμενο κιτ απομόνωσης δεν περιέχει φορέα RNA, παρακαλούμε λάβετε υπόψη ότι για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από σωματικά υγρά χωρίς κύτταρα ή υλικά με μικρή περιεκτικότητα σε DNA/RNA (π.χ. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό), συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη φορέα RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Αρ. κατ. 27-4110-01). Παρακαλούμε συνεχίστε κατά τον ακόλουθο τρόπο:
  - α) Αναμίξτε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA με το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (όχι με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) του κιτ απομόνωσης

(π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα ΑΕ του QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit) και παρασκευάστε μία αραιώση με συγκέντρωση 1 µg/µl. Διαμοιράστε το διάλυμα αυτό του φορέα RNA στον ανάλογο αριθμό ποσοτήτων που αντιστοιχεί στις ανάγκες σας και φυλάξτε αυτές στους -20°C. Αποφύγετε την επαναληπτική απόψυξη (> 2 χ) των ποσοτήτων του φορέα RNA.

- b) Πριν από κάθε απομόνωση προσθέστε 1 µg φορέα RNA ανά 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Εάν π.χ. το πρωτόκολλο εκχύλισης προβλέπει 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ανά δείγμα, τότε προσθέστε 2 µl φορέα RNA (1 µg/µl) κατευθείαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Πριν από την έναρξη κάθε απομόνωσης πρέπει να παρασκευασθεί ένα πρόσφατο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εάν είναι *απαραίτητο προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, βλέπε **8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**) σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα.

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης	π.χ. 200 µl	π.χ. 2.400 µl
Φορέας RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>202 µl</b>	<b>2.424 µl</b>
<b>Όγκος για την απομόνωση</b>	<b>200 µl</b>	<b>ανά 200 µl</b>

- c) Για την απομόνωση χρησιμοποιήστε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως. Αποθήκευση του μίγματος δεν είναι δυνατή.
- Η προσθήκη του **φορέα RNA** έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και επομένως για την παραλαβή του DNA/RNA. Για να επιτύχουμε μία υψηλότερη σταθερότητα του φορέα RNA, ο οποίος παρέχεται μαζί με το QIAamp UltraSens Virus Kit, προτείνουμε την ακόλουθη παραλλακτική διαδικασία σύμφωνα με τα δεδομένα του εγχειριδίου του kit απομόνωσης:
    - a. Αναμίξτε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA πριν από την πρώτη χρήση του kit απομόνωσης με 310 µl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης που περιέχεται στο kit (τελική συγκέντρωση 1 µg/µl, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Διαμοιράστε το διάλυμα αυτό του φορέα

RNA στον ανάλογο αριθμό ποσοτήτων που αντιστοιχεί στις ανάγκες σας και φυλάξτε αυτές στους -20°C. Αποφύγετε την επαναληπτική απόψυξη (> 2 x) των ποσοτήτων του φορέα RNA.

- b. Πριν από την έναρξη κάθε απομόνωσης πρέπει να παρασκευασθεί ένα πρόσφατο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εάν είναι απαραίτητο *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, βλέπε **8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**) σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα.

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης AC	800 μl	9.600 μl
Φορέας RNA (1 μg/μl)	5,6 μl	67,2 μl
Συνολικός όγκος	805,6 μl	9.667,2 μl
Όγκος για την απομόνωση	800 μl	ανά 800 μl

- c. Για την απομόνωση χρησιμοποιήστε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως. Αποθήκευση του μίγματος δεν είναι δυνατή.
- Με τη χρήση του **QIAamp UltraSens Virus Kit** μπορεί να επιτευχθεί συμπύκνωση του δείγματος. Εάν το υλικό δείγματός σας δεν είναι ορός ή πλάσμα, προσθέστε στο δείγμα τουλάχιστον 50 % (v/v) αρνητικό ανθρώπινο πλάσμα.
  - Τά **αντιπηκτικά** που περιέχονται στα σωληνάρια λήψης αίματος, μπορεί να επιδράσουν ανασταλτικά στην PCR, ωστόσο εξαλείφονται από το προαναφερόμενο kit απομόνωσης. Συνιστάται να μην γίνεται χρήση ηπαρινισμένου αίματος.
  - Σε διαδικασίες απομόνωσης, στις οποίες χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που περιέχει **αιθανόλη**, βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την εκχύλιση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (3 λεπτά, 13.000 στρ./λεπτό) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει πιθανές αναστολές της PCR.
  - Το *artus* EBV LC PCR Kit δεν είναι κατάλληλο για διαδικασίες απομόνωσης που λειτουργούν με βάση τη **φαινόλη**.

### Σημαντική υπόδειξη για τη χρήση του EZ1 DSP Virus Kit:

- Η προσθήκη του **φορέα RNA** έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και επομένως για την παραλαβή του DNA/RNA. Για το λόγο αυτό προσθέστε την απαιτούμενη ποσότητα φορέα RNA σε κάθε διαδικασία απομόνωσης, ακολουθώντας τις οδηγίες του *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

**Σημαντικό:** Το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου του *artus EBV LC PCR Kit* μπορεί να εισαχθεί κατευθείαν στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**).

## 8.2. Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (EBV LC IC)*. Με αυτό έχετε τη δυνατότητα να ελέγξετε **τόσο την απομόνωση του DNA, όσο και μία ενδεχομένη αναστολή της PCR** (βλέπε Εικ. 1). Κατά τη χρήση του **EZ1 DSP Virus Kit** στη διαδικασία απομόνωσης, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* πρέπει να προστίθεται σύμφωνα με τις οδηγίες του *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Κατά τη χρήση του **QIAamp UltraSens Virus Kit**, του **QIAamp DNA Blood Mini Kit** ή του **QIAamp DNA Mini Kit**, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου εκχύλισης. Χρησιμοποιήστε, για παράδειγμα, το **QIAamp DNA Mini Kit** και εκτελέστε την εκχύλιση του DNA σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE και στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Εάν π.χ. η εκχύλιση γίνεται σε 100 μl, τότε προσθέστε αντίστοιχα 10 μl. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο εκχύλισης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και εάν είναι απαραίτητο ο φορέας RNA (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

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

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

Προαιρετικά, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* μπορεί να χρησιμοποιηθεί **αποκλειστικά για τον έλεγχο μιας ενδεχομένης αναστολής της PCR** (βλέπε Εικ. 2). Για το σκοπό αυτό, προσθέστε για κάθε αντίδραση 0,5 μl του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* απευθείας σε 15 μl *EBV LC Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 15 μl του όπως αναφέρεται παρασκευαζόμενου Master Mix\* και στη συνέχεια προσθέστε 5 μl του καθαρισμένου δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μία διαδικασία για πολλά δείγματα, αυξήστε τις απαραίτητες ποσότητες του *EBV LC Master* και του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε **8.4 Προετοιμασία της PCR**).

Το *artus EBV LC PCR Kit* και το *artus CMV LC PCR Kit* περιέχουν ένα ταυτόσημο *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)*. Το *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* και το *artus VZV LC PCR Kit* περιέχουν επίσης ένα ταυτόσημο *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*.

---

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

### 8.3. Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (5 μl). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης στο όργανο *LightCycler*, τοποθετήστε και τα τέσσερα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης, ορίστε τα ως πρότυπα στην *Sample Loading Screen* και προσθέστε τις καθορισμένες συγκεντρώσεις (βλέπε *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Αυτή η πρότυπη καμπύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τις επόμενες ποσοτικοποιήσεις, όταν στην τρέχουσα ανάλυση περιλαμβάνεται τουλάχιστον ένα πρότυπο μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Για το σκοπό αυτό είναι αναγκαία η εισαγωγή της πρότυπης καμπύλης που είχε δημιουργηθεί προηγουμένως (βλέπε *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Ωστόσο, σε αυτήν τη μορφή ποσοτικοποίησης πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα απόκλισης στο αποτέλεσμα λόγω της μεταβλητότητας μεταξύ των διαδικασιών PCR.

**Εάν έχετε ενσωματώσει στην διαδικασία σας περισσότερα από ένα συστήματα Herpes-artus, βεβαιωθείτε ότι τα αναλύετε ξεχωριστά το ένα από το άλλο, με τα αντίστοιχα πρότυπα ποσοτικοποίησης.**

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

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

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

**Σημαντικό:** Για την απλούστευση της ποσοτικής αξιολόγησης συστημάτων *artus* στο όργανο *LightCycler* θα βρείτε σχετικές οδηγίες στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument).

#### 8.4. Προετοιμασία της PCR

Βεβαιωθείτε ότι το Cooling Block (μονάδα ψύξης) με τους περιεχόμενους προσαρμογείς (εξάρτημα του οργάνου *LightCycler*) έχει προψυχθεί περίπου στους +4°C. Τοποθετήστε τον απαραίτητο για τις προγραμματισμένες αντιδράσεις αριθμό τριχοειδών σωλήνων *LightCycler* στον προσαρμογέα του Cooling Block. Φροντίστε για κάθε διαδικασία PCR να υπάρχει τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*Water, PCR grade*). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμιγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και τελικά να φυγοκεντρώνονται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Για την περίπτωση που με το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* θέλετε να ελέγξετε **τόσο την απομόνωση του DNA, όσο και μια ενδεχομένη αναστολή της PCR**, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* πρέπει ήδη να έχει προστεθεί για την απομόνωση (βλέπε **8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 1):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl	ανά 15 µl
	Δείγμα	5 µl	ανά 5 µl
	<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 µl</b>	<b>ανά 20 µl</b>

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

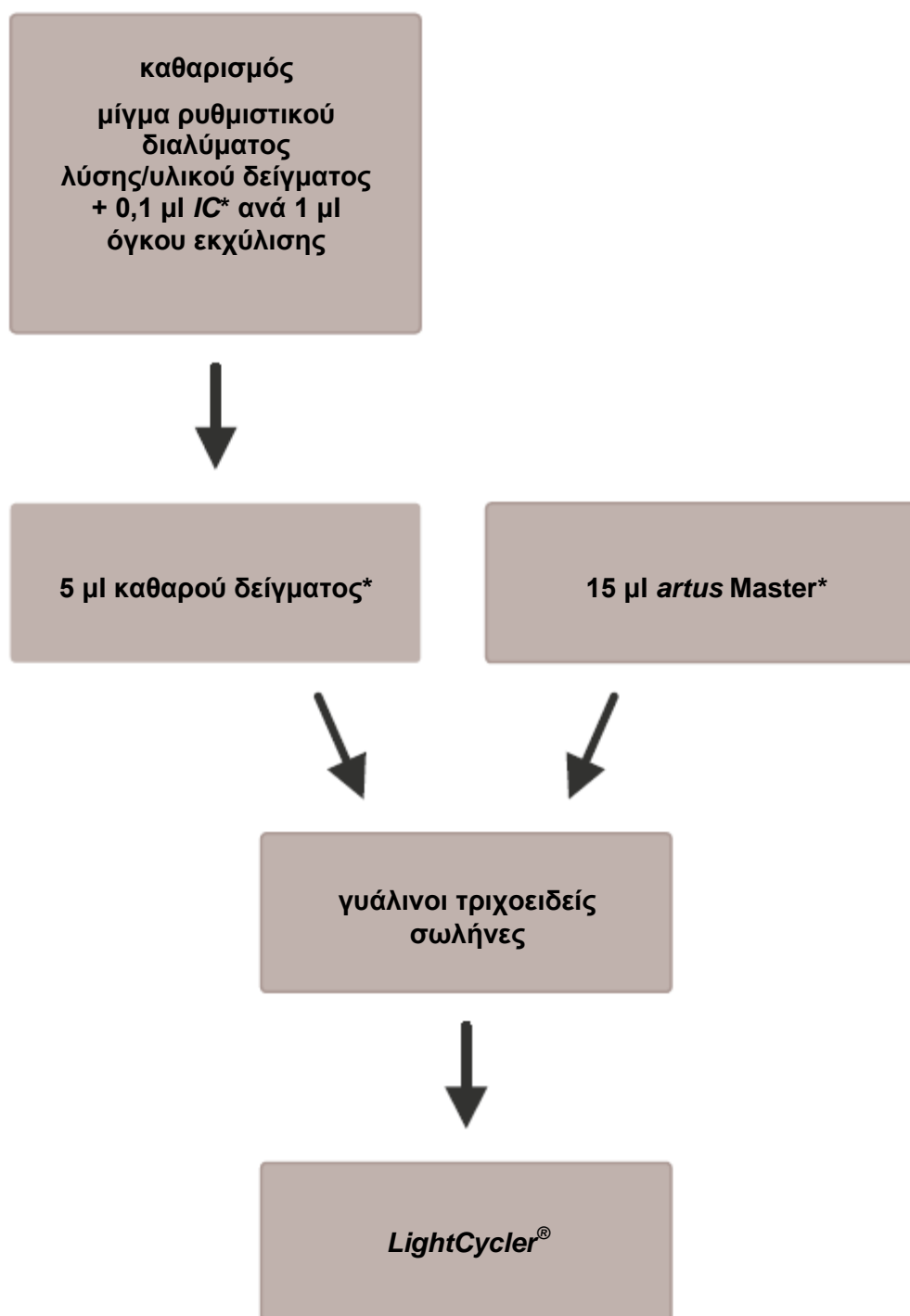
	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	EBV LC Master	15 µl	180 µl
	EBV LC IC	0,5 µl	6 µl
	<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>15,5 µl*</b>	<b>186 µl*</b>
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl*	ανά 15 µl*
	Δείγμα	5 µl	ανά 5 µl
	<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 µl</b>	<b>ανά 20 µl</b>

Εισάγετε με την πιπέτα στο πλαστικό δοχείο κάθε τριχοειδούς σωλήνα 15 µl του Master Mix. Στη συνέχεια προσθέστε 5 µl από το εκχύλισμα του απομονωμένου DNA. Αντίστοιχα πρέπει να προστεθούν ως θετικό πρότυπο ελέγχου 5 µl από ένα *τουλάχιστον πρότυπο ποσοτικοποίησης (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* και ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου 5 µl νερό (*Water, PCR grade*). Κλείστε τους τριχοειδείς σωλήνες. Για να μεταφέρετε το μίγμα από το πλαστικό δοχείο στους τριχοειδείς σωλήνες, φυγοκεντρίστε τους προσαρμογείς με τους τριχοειδείς σωλήνες που περιέχονται σε αυτούς σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 δευτερόλεπτα σε 400 x g (2.000 στρ./λεπτό) κατ' ανώτατο όριο.

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



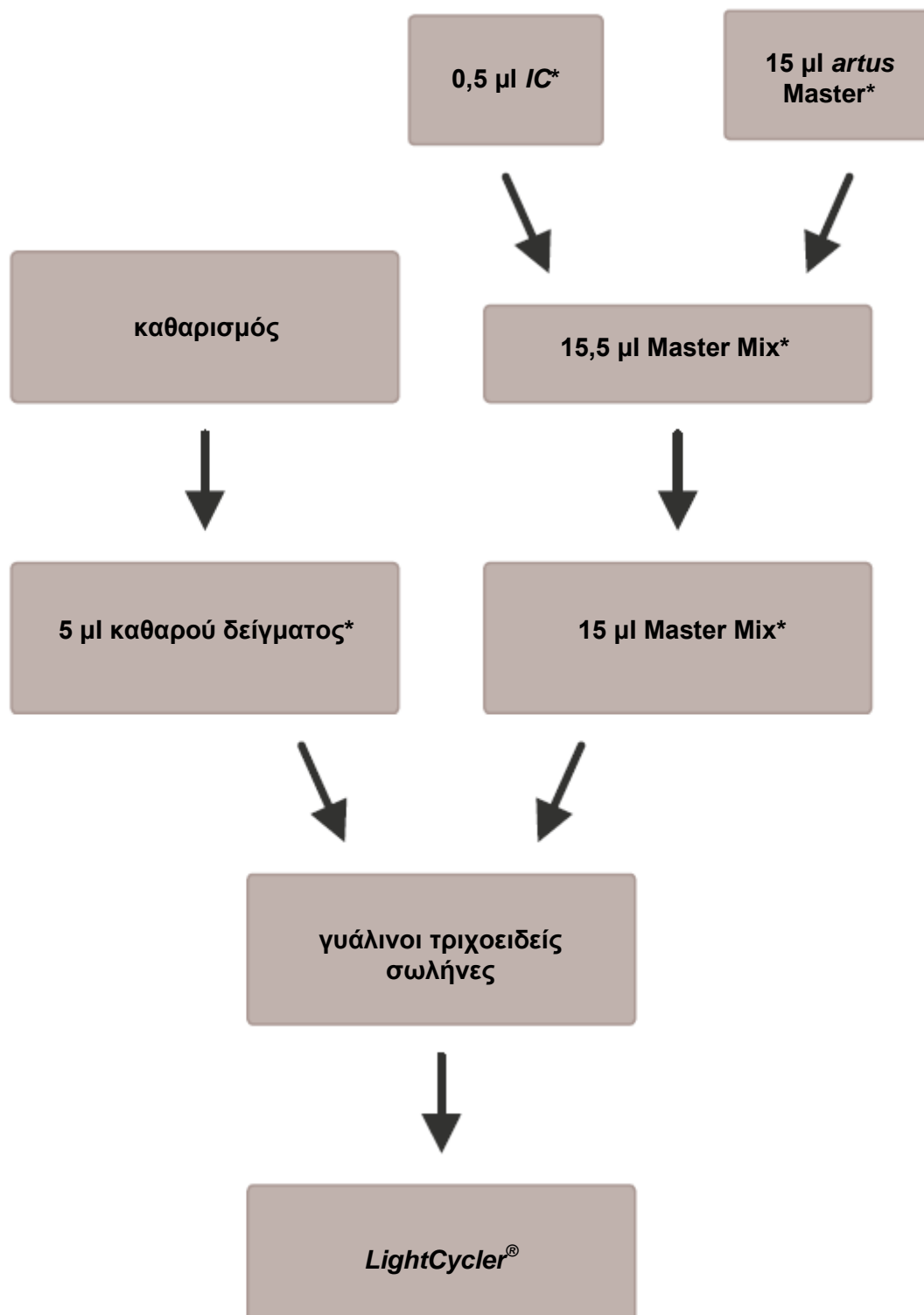
## Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στην απομόνωση



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

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

## Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο *artus* Master



Εικ. 2: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών για τον έλεγχο της αναστολής της PCR.

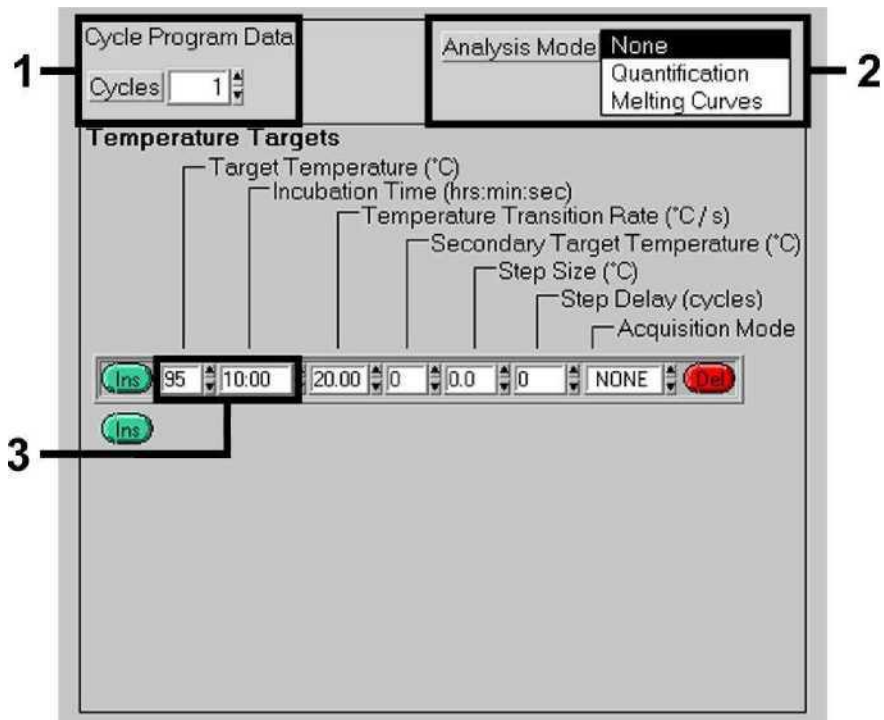
\* Σε κάθε βήμα επεξεργασίας με πιπέτα πρέπει οπωσδήποτε να φροντίσετε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμιξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

## 8.5. Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*

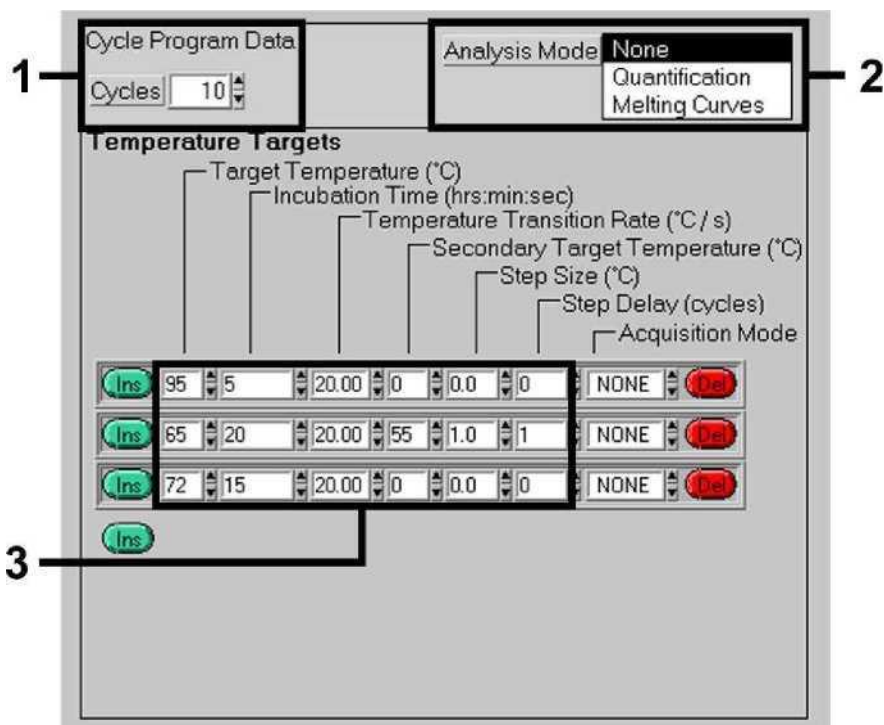
Για την ανίχνευση του DNA του EBV ρυθμίστε στο όργανό σας *LightCycler* ένα προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τα ακόλουθα πέντε στάδια εργασίας (βλέπε Εικ. 3 - 7).

- |                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| A. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start | Εικ. 3 |
| B. Στάδιο Touch Down                         | Εικ. 4 |
| C. Πολλαπλασιασμός του DNA                   | Εικ. 5 |
| D. Καμπύλη τήξης ( <b>προαιρετικά</b> )      | Εικ. 6 |
| E. Ψύξη                                      | Εικ. 7 |

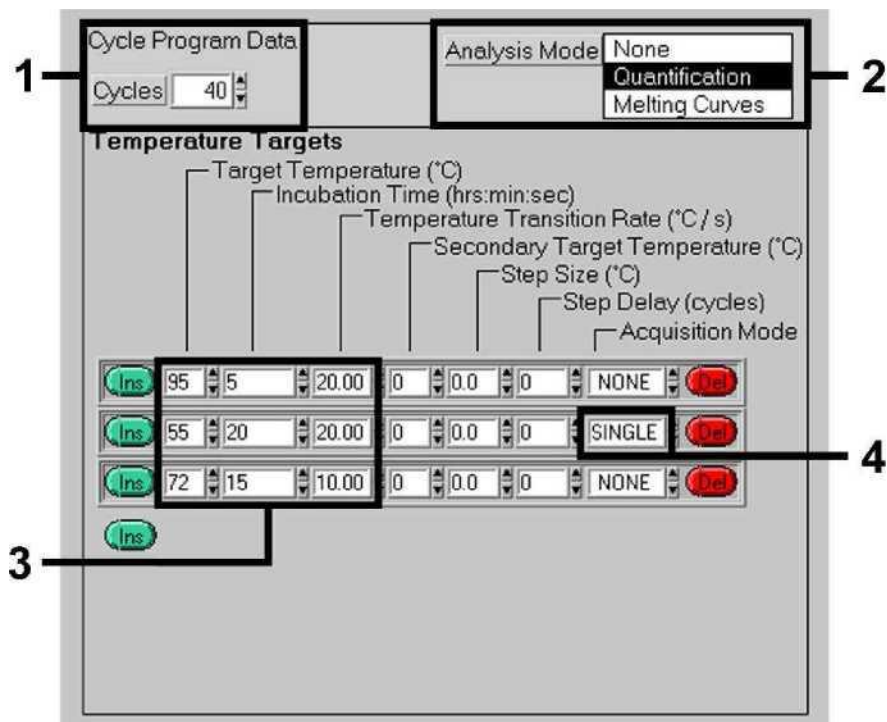
Προσέξτε ιδιαίτερα τις ρυθμίσεις που αφορούν τις παραμέτρους *Analysis Mode* (Τρόπος λειτουργίας ανάλυσης), *Cycle Program Data* (Δεδομένα προγράμματος κυκλοποίησης) και *Temperature Targets* (Στόχοι θερμοκρασίας). Στις εικόνες οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με μαύρο πλαίσιο. Οδηγίες για τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler* θα βρείτε στο *LightCycler Operator's Manual*. Η προετοιμασία του σταδίου D, καμπύλη τήξης, είναι **προαιρετική**. Χρειάζεται ειδικά για τη διαφοροποίηση μεταξύ HSV-1 και HSV-2, κατά τη σύγχρονη χρησιμοποίηση του *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*.



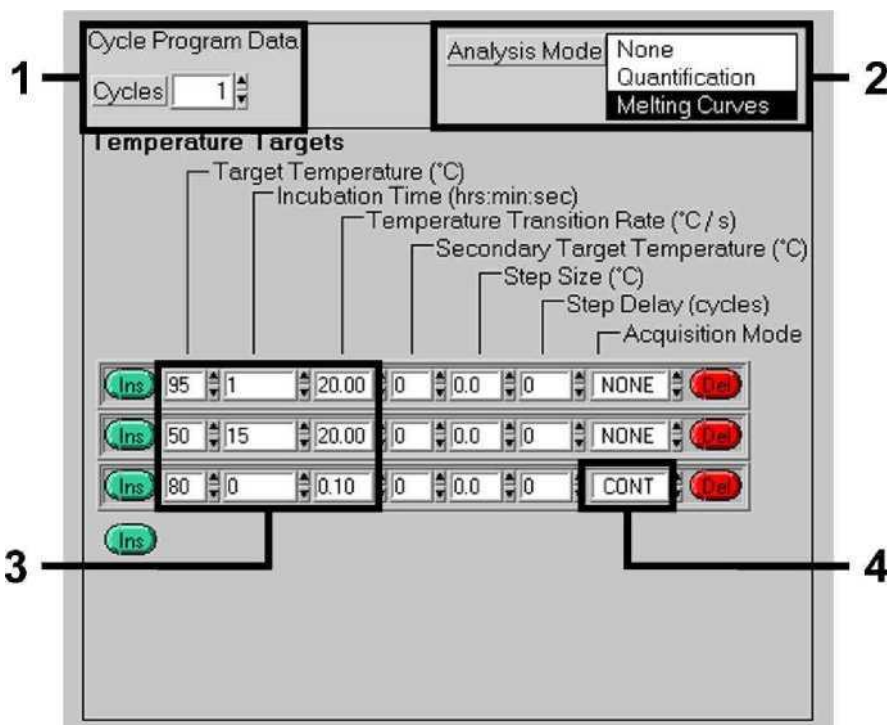
Εικ. 3: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start.



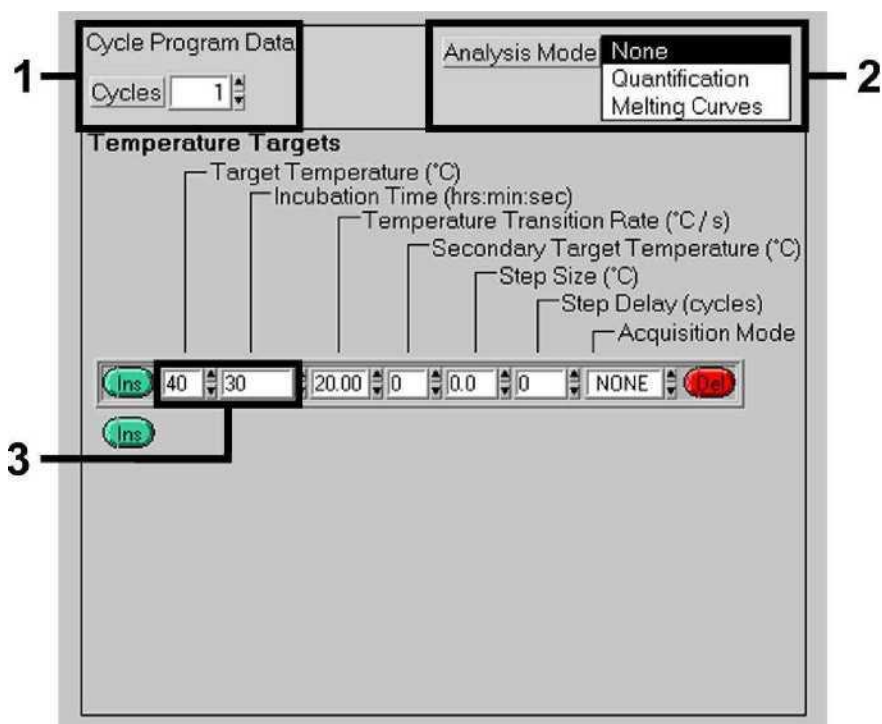
Εικ. 4: Στάδιο Touch Down.



Εικ. 5: Πολλαπλασιασμός του DNA.



Εικ. 6: Καμπύλη τήξης.



Εικ. 7: Ψύξη.

## 9. Αξιολόγηση

Στις αναλύσεις πολλών χρωμάτων προκύπτουν παρεμβολές μεταξύ των φθοριομετρικών καναλιών. Το λογισμικό του οργάνου *LightCycler* περιέχει ένα αρχείο με το χαρακτηρισμό *Color Compensation File*, το οποίο αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές. Το αρχείο αυτό μπορείτε να το ανοίξετε πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης της PCR με το πάτημα του πλήκτρου *Choose CCC File* ή *Select CC Data*. Εάν δεν υπάρχει εγκατεστημένο αρχείο *Color Compensation File*, δημιουργήστε το οι ίδιοι με βάση τις οδηγίες που υπάρχουν στο *LightCycler Operator's Manual*. Μετά την ενεργοποίηση του *Color Compensation File* εμφανίζονται στα φθοριομετρικά κανάλια F1, F2 και F3 ξεχωριστά σήματα. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR, η οποία επιτυγχάνεται με το *artus EBV LC PCR Kit*, παρακαλούμε επιλέξτε τις λειτουργίες προβολής F2/Back-F1 για την αναλυτική PCR του EBV, ή F3/Back-F1 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Για την ανάλυση ποσοτικών διαδικασιών παρακαλούμε να λάβετε οπωσδήποτε υπόψη την ενότητα **8.3 Ποσοτικοποίηση**, καθώς και την **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument**, στην ιστοσελίδα

[www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

Εάν έχετε ενσωματώσει στη διαδικασία της PCR σας περισσότερα από ένα συστήματα Herpes-artus, βεβαιωθείτε ότι αναλύετε ξεχωριστά τα δείγματα του VZV. Για την αξιολόγησή τους, διαλέξτε τις αντίστοιχες θέσεις στην κεφαλή.

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1 ανιχνεύεται ένα σήμα.

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

Στην περίπτωση αυτή η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι F3/Back-F1 είναι άνευ σημασίας, δεδομένου ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις εκκίνησης του DNA του EBV (θετικό σήμα στο κανάλι F2/Back-F1) ενδέχεται να οδηγούν σε μειωμένο έως ανύπαρκτο σήμα φθορισμού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1 (Ανταγωνισμός).

2. Στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1 δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα, παρά μόνο στο κανάλι F3/Back-F1 (σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*).

**Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA του EBV. Συνεπώς, το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.**

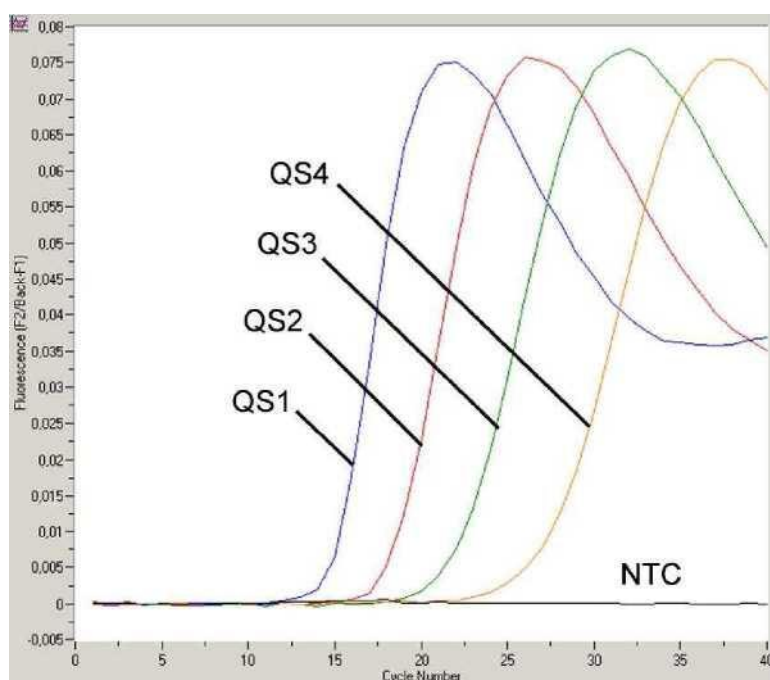
Όταν η PCR του EBV είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα σε κανένα από τα κανάλια F2/Back-F1 ή F3/Back-F1.

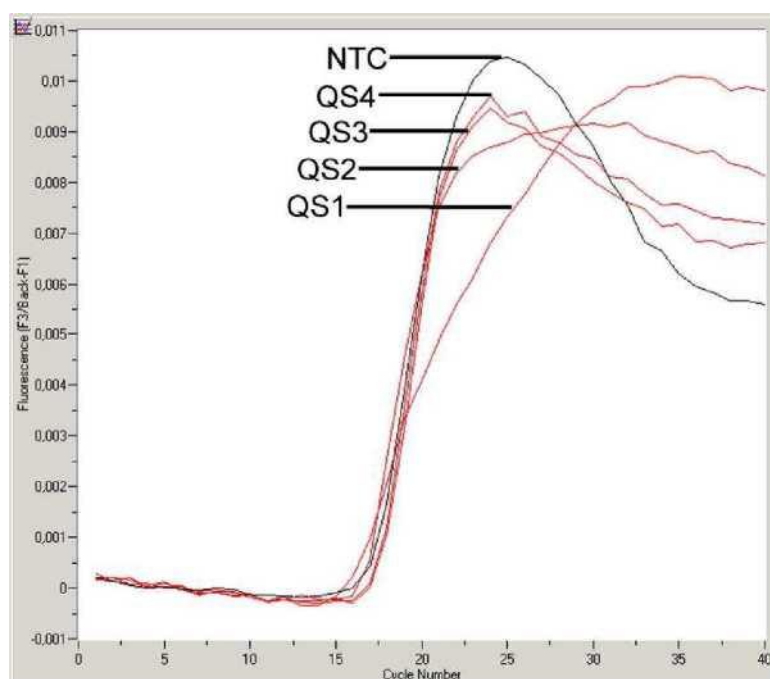
**Δεν υπάρχει δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.**

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

Παραδείγματα για θετικές και αρνητικές αντιδράσεις PCR εμφανίζονται στις Εικ. 8 και 9.



Εικ. 8: Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).



Εικ. 9: Ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC) στο φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1 με ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό των προτύπων ποσοτικοποίησης (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).



## 10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

**Κανένα σήμα στα θετικά πρότυπα ελέγχου (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1:**

- Το φθοριομετρικό κανάλι που επιλέξατε, κατά την ανάλυση των δεδομένων της PCR, δεν ανταποκρίνεται στα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου.
  - Διαλέξτε, για την ανάλυση των δεδομένων, το φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1 για την αναλυτική PCR του EBV και το φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του οργάνου *LightCycler* είναι εσφαλμένος.
  - Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με τα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου (βλέπε **8.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler***).
- Εσφαλμένη διάταξη της αντίδρασης της PCR.
  - Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **8.4 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης, για ένα ή περισσότερα υλικά του κιτ, δεν αντιστοιχούν στις αναφερόμενες προδιαγραφές του κεφαλαίου **2. Αποθήκευση** ή η ημερομηνία λήξης του *artus EBV LC PCR Kit* έχει περάσει.
  - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

**Ασθενές ή ανύπαρκτο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1 με ταυτόχρονη απουσία ενός σήματος στο κανάλι F2/Back-F1:**

- Οι συνθήκες της PCR δεν αντιστοιχούν στο πρωτόκολλο.
  - Ελέγξτε τις συνθήκες της PCR (βλέπε ανωτέρω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- Έγινε αναστολή της PCR.

- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρωσης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την εκχύλιση, έχει εκτελεστεί (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**).
- Υφίστανται απώλειες DNA κατά τον καθαρισμό.
  - Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην απομόνωση, μπορεί η απουσία του σήματος του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* να σημαίνει απώλειες DNA κατά τον καθαρισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα υλικά του κιτ δεν αντιστοιχούν στις αναφερόμενες προδιαγραφές του κεφαλαίου **2. Αποθήκευση** ή η ημερομηνία λήξης του *artus EBV LC PCR Kit* έχει περάσει.
  - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.

### **Σήματα στα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1 της αναλυτικής PCR.**

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

- Επαναλάβετε την απομόνωση και την PCR των εξεταζόμενων δειγμάτων με τη χρησιμοποίηση νέων αντιδραστηρίων.
- Βεβαιωθείτε ότι οι χώροι εργασίας και τα μηχανήματα απολυμαίνονται συχνά.

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

## **11. Ειδικά χαρακτηριστικά**

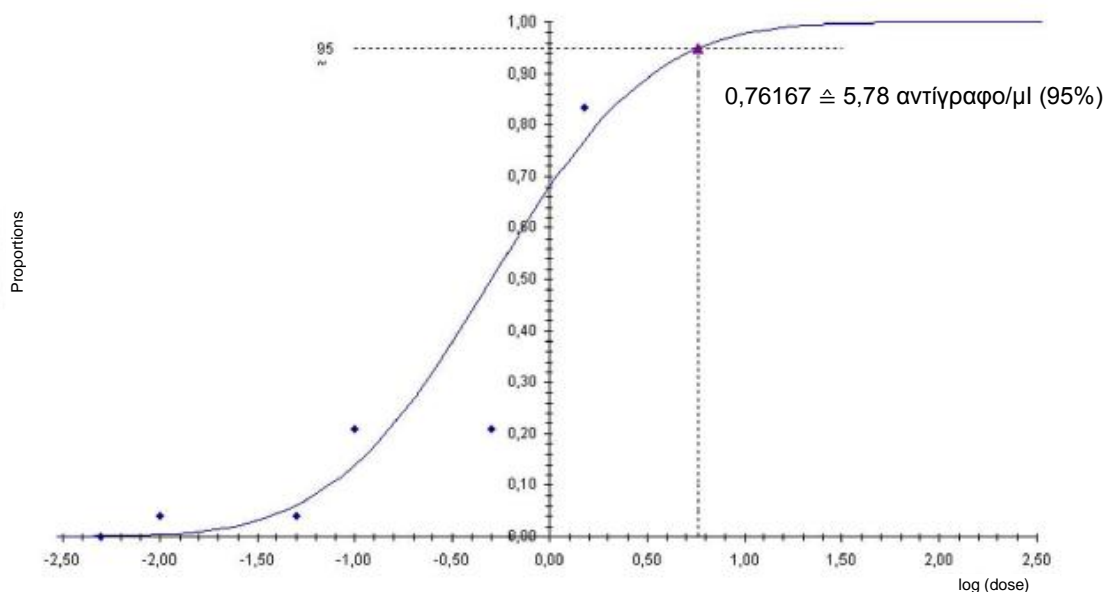
### **11.1. Αναλυτική ευαισθησία**

Για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του *artus* EBV LC PCR Kit δημιουργήθηκε μία πρότυπη σειρά αραιώσεων από 50 ως την ονομαστική τιμή 0,005 ισοδύναμα αντιγράφων\*/μl του EBV και αναλύθηκε με το *artus* EBV LC PCR Kit. Οι έλεγχοι εκτελέστηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Η εξαγωγή του αποτελέσματος έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Η γραφική της αξιολόγηση εμφανίζεται στην Εικ. 10. Επομένως, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του *artus* EBV RG PCR Kit βρίσκεται στα 5,78 αντίγραφα/μl ( $p = 0,05$ ). Αυτό σημαίνει ότι 5,68 αντίγραφα/μl μπορούν να ανιχνευθούν με πιθανότητα 95 %.

---

\* Το πρότυπο που χρησιμοποιείται εδώ είναι ένα κλωνοποιημένο προϊόν PCR, η συγκέντρωση του οποίου έχει προσδιοριστεί με φασματοσκοπική και φθορισμοσκοπική φωτομετρία.

### Ανάλυση Probit: Ιός Epstein-Barr (LightCycler)



Εικ. 10: Αναλυτική ευαισθησία του *artus* EBV LC PCR Kit με τη χρήση του οργάνου *LightCycler* 2.0.

## 11.2. Ειδικότητα

Η ειδικότητα του *artus* EBV LC PCR Kit εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο με την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές έχουν ελεγχθεί με βάση την ανάλυση της σύγκρισης αλληλουχιών για τυχόν ομολογία με κάποια από όλες τις αλληλουχίες που έχουν δημοσιευθεί σε τράπεζες γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο έχει ελεγχθεί και η ανιχνευσιμότητα όλων των σημαντικών γονοτύπων.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση έξι διαφορετικών δειγμάτων ορού, τα οποία ήταν αρνητικά στον EBV. Αυτά δεν εμφάνισαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για EBV εκκινητές και ανιχνευτές που περιέχονται στο *EBV LC Master*.

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

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

Ομάδα ελέγχου	EBV (F2/Back-F1)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (F3/Back-F1)
Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (Ιός απλού έρπητα 1)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (Ιός απλού έρπητα 2)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (Ιός ανεμοβλογιάς-έρπητα ζωστήρα)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (Κυτταρομεγαλοϊός)	-	+
Ανθρώπινος ιός Τ-κυτταρικής λευχαιμίας 1	-	+
Ανθρώπινος ιός Τ-κυτταρικής λευχαιμίας 2	-	+

### 11.3. Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακριβείας, για το *artus* EBV LC PCR Kit, επιτρέπουν την εξακρίβωση της ολικής διακύμανσης (ολική διασπορά) του συστήματος ανάλυσης. Αυτή η ολική διακύμανση προέρχεται από την **μεταβλητότητα Intra-assay** (διασπορά δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης μέσα σε ένα πείραμα), την **μεταβλητότητα Inter-assay** (διασπορά λόγω της χρήσης διαφόρων συσκευών του ίδιου τύπου από διάφορα άτομα εντός ενός εργαστηρίου) και την **μεταβλητότητα Inter-batch** (διασπορά μέσω της χρήσης διαφορετικών παρτίδων). Συγχρόνως υπολογίζεται κάθε φορά η τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής μεταβλητότητας τόσο για τη συγκεκριμένη PCR του παθογόνου παράγοντα, όσο και για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Τα δεδομένα αυτά εξετάστηκαν, για το *artus* EBV LC PCR Kit, βάσει του *προτύπου ποσοτικοποίησης* με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (QS 4: 50 αντίγραφα /μl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει των τιμών Ct των καμπύλων πολλαπλασιασμού. (Ct: *threshold cycle*, Πίνακας 2) και των εξ αυτών δεδομένων ποσοτικών τιμών σε αντίγραφα/μl (Πίνακας 3). Συνεπώς, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος της αναφερομένης συγκέντρωσης ανέρχεται στο 1,17 % (Ct) αναφορικά 14,54 % (συγκέντρωση), για την

ανίχνευση του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο 1,02 % (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των τιμών Ct.

	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Intra-assay μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Intra-assay μεταβλητότητα: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,04	0,00	0,28
Inter-assay μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
Inter-assay μεταβλητότητα: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,11	0,01	0,72
Inter-batch μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
Inter-batch μεταβλητότητα: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,19	0,03	1,23
Ολική διακύμανση: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,17
Ολική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,15	0,02	1,02

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των ποσοτικών τιμών (σε αντίγραφα/μl).

	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Intra-assay μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Inter-assay μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Inter-batch μεταβλητότητα: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Ολική διακύμανση: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

## 11.4. Επαναληψιμότητα

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

## 11.5. Διαγνωστική αξιολόγηση

Το *artus* EBV LC PCR Kit αξιολογείται αυτή τη στιγμή σε αρκετές μελέτες.

## 12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για διαγνωστικούς σκοπούς *in vitro*.
- Η χρήση πρέπει να γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro*.
- Η ακριβής τήρηση του πρωτοκόλλου είναι απολύτως απαραίτητη, για την επίτευξη άριστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις επικέτες των επιμέρους στοιχείων. Τα αντιδραστήρια των οποίων έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

## 13. Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

Πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με το *artus* EBV LC PCR Kit μπορείτε να βρείτε στο φυλλάδιο δεδομένων ασφάλειας (safety data sheet, SDS). Αυτό μπορείτε να το βρείτε ως σύντομο και ευκολόχρηστο αρχείο PDF στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).

## **14. Ποιοτικός έλεγχος**

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

## **15. Βιβλιογραφία**

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



## 16. Ερμηνεία των συμβόλων



Ημερομηνία λήξης



Αριθμός παρτίδας



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός υλικού



Εγχειρίδιο



Διαγνωστικό ιατρικό προϊόν in-vitro



Το περιεχόμενο επαρκεί για <N> τεστ



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμοί θερμοκρασίας

**QS**

*Πρότυπο ποσοτικοποίησης*

**IC**

*Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*

**Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή**

#### *artus* EBV LC PCR Kit

Μάρκες και αποτοιμήσεις  
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); *LightCycler*® (Roche Group).

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

ΤΟ *artus* EBV LC PCR Kit, το BioRobot EZ1 DSP Workstation και τα EZ1 DSP Virus Kit και Card είναι σημασμένα CE διαγνωστικά όργανα και kit σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό 98/79/EK σχετικό με τη διαγνωστική *in vitro*. Δεν είναι διαθέσιμα σε όλες τις χώρες.

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

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

© 2015 QIAGEN, όλα τα δικαιώματα είναι κατοχυρωμένα.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

