

Εγχειρίδιο του ΚΙΤ *artus*[®] HSV-1/2 LC PCR

▽Σ 24 (αριθ. καταλόγου 4500063)

▽Σ 96 (αριθ. καταλόγου 4500065)

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το όργανο *LightCycler*[®]

Έκδοση 1

CE

IVD

REF

4500063, 4500065

HB

1046888



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2

MAT

1046888EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων κάθε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία των δειγμάτων μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

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

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και η επίτευξη καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφτείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

1. Περιεχόμενα	4
2. Αποθήκευση	5
3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές	5
4. Γενικές προφυλάξεις	5
5. Πληροφορίες σχετικά με τα παθογόνα	6
6. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	6
7. Περιγραφή του προϊόντος	6
8. Πρωτόκολλο	7
8.1 Απομόνωση του DNA	7
8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	11
8.3 Ποσοτικοποίηση	12
8.4 Προετοιμασία της PCR	13
8.5 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler</i>	17
9. Ανάλυση δεδομένων	19
10. Αντιμετώπιση προβλημάτων	23
11. Ειδικά χαρακτηριστικά	25
11.1 Αναλυτική ευαισθησία	25
11.2 Ειδικότητα	27
11.3 Ακρίβεια	28
11.4 Ανθεκτικότητα	32
11.5 Αναπαραγωγιμότητα	32
11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση	33
12. Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος	33
13. Πληροφορίες για την ασφάλεια	33
14. Έλεγχος ποιότητας	33
15. Βιβλιογραφία	33
16. Επεξήγηση των συμβόλων	34

Kit artus HSV-1/2 LC PCR

Για χρήση με το όργανο LightCycler.

1. Περιεχόμενα

	Επισήμανση και περιεχόμενα	Αρ. είδους 4500063 24 αντιδράσεις	Αρ. είδους 4500065 96 αντιδράσεις
Μπλε	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Κόκκινο	HSV1 LC/RG/TM QS 1α 1 x 10 ⁴ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV1 LC/RG/TM QS 2α 1 x 10 ³ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV1 LC/RG/TM QS 3α 1 x 10 ² αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV1 LC/RG/TM QS 4α 1 x 10 ¹ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV2 LC/RG/TM QS 1α 1 x 10 ⁴ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV2 LC/RG/TM QS 2α 1 x 10 ³ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV2 LC/RG/TM QS 3α 1 x 10 ² αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκινο	HSV2 LC/RG/TM QS 4α 1 x 10 ¹ αντίγραφα/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Πράσινο	HSV LC IC	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	Νερό (βαθμού PCR)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

α QS = Πρότυπο ποσοτικοποίησης

IC = Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

2. Αποθήκευση

Τα υλικά του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR αποθηκεύονται στους -15°C έως -30°C και διατηρούνται σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επανειλημμένη ψύξη/απόψυξη ($>2x$) θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς ενδέχεται να μειωθεί η ευαισθησία. Σε περίπτωση μη τακτικής χρήσης, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η αποθήκευση στους $+4^{\circ}\text{C}$ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα, μίας χρήσης
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναμίκτης περιδίνησης
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- Σετ αντιστάθμισης χρώματος (Roche Diagnostics, αριθ. καταλ. 2 158 850) για εγκατάσταση αρχείου «Crosstalk Color Compensation» (Αντιστάθμιση χρώματος παρεμβολής)
- Τριχοειδή *LightCycler* (20 μl)
- Μονάδα ψύξης *LightCycler*
- Όργανο *LightCycler*
- Εργαλείο πωματισμού *LightCycler*

4. Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει να φροντίζει ώστε να τηρούνται πάντα οι εξής οδηγίες:

- Να χρησιμοποιούνται στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου και αμπλικόνια) πρέπει να εκχυλίζεται, να αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Να γίνεται πλήρης απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.
- Μετά την απόψυξη, τα υλικά θα πρέπει να αναμειγνύονται και να υποβάλλονται σε σύντομη φυγοκέντρωση.
- Η εργασία πρέπει να εκτελείται ταχέως σε πάγο ή στη μονάδα ψύξης *LightCycler*.

5. Πληροφορίες σχετικά με τα παθογόνα

Ο ιός του απλού έρπητα (HSV) ανευρίσκεται σε υγρά από περιοχές αλλοιώσεων, στον σίελο και σε κολπικές εκκρίσεις. Μεταδίδεται κατά κύριο λόγο μέσω άμεσης επαφής με τις περιοχές των αλλοιώσεων και με τη σεξουαλική επαφή, καθώς και περιγεννητικά. Η πλειονότητα των HSV-θετικών περιστατικών χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις του δέρματος, των βλεννογόνων της στοματικής κοιλότητας και των γεννητικών οργάνων. Η λοίμωξη με HSV μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθής (το >90 % των περιστατικών αυτών είναι ασυμπτωματικά) είτε υποτροπιάζουσα (δευτεροπαθής). Η πρωτοπαθής λοίμωξη με HSV-1 μπορεί να οδηγήσει, μεταξύ άλλων, σε ουλοστοματίτιδα, ερπητικό έκζεμα, κερατοεπιπεφυκίτιδα και εγκεφαλίτιδα. Η πρωτοπαθής λοίμωξη με HSV-2 παρουσιάζεται, μεταξύ άλλων, ως αιδιοκολπίτιδα, μηνιγγίτιδα και γενικευμένος έρπης στα νεογνά. Τα κύρια συμπτώματα της δευτεροπαθούς λοίμωξης είναι δερματικές αλλοιώσεις στη μύτη, στο στόμα και στην περιοχή των γεννητικών οργάνων. Ακόμη βαρύτερες είναι οι υποτροπιάζουσες μορφές της κερατοεπιπεφυκίτιδας και της μηνιγγίτιδας.

6. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

Η διάγνωση παθογόνων με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου. Στην PCR πραγματικού χρόνου, το προϊόν της ενίσχυσης ανιχνεύεται με φθορίζουσες χρωστικές. Οι ουσίες αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσδένονται ειδικά στο προϊόν της ενίσχυσης. Η παρακολούθηση των εντάσεων του φθορισμού κατά τη διάρκεια της PCR (δηλ. σε πραγματικό χρόνο) επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συσσωρευόμενου προϊόντος, χωρίς να χρειάζεται να ανοιχθούν ξανά τα σωληνάρια αντίδρασης μετά τη διαδικασία PCR (Mackay, 2004).

7. Περιγραφή του προϊόντος

Το Kit *artus* HSV-1/2 LC PCR είναι σύστημα έτοιμο προς χρήση για την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση του DNA του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2 μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία ακολουθείται από ανάλυση της καμπύλης τήξης στο όργανο *LightCycler*. Το *HSV LC Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μιας περιοχής 148 bp του γονιδιώματος του ιού του απλού έρπητα και για την άμεση ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2 του οργάνου *LightCycler*. Επιπλέον, το kit *artus* HSV-1/2 LC περιλαμβάνει ένα δεύτερο, ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για τον εντοπισμό πιθανής αναστολής της PCR. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμόμετρου F3. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης PCR για τον ιό HSV δεν μειώνεται (βλ. 11.1 Αναλυτική

ευαισθησία). Για τη διάκριση μεταξύ των υποτύπων, το σύστημα χρησιμοποιεί την ειδική θερμοκρασία τήξης των ανιχνευτών. Κατά το βήμα ανάλυσης της καμπύλης τήξης, ανιχνεύεται ένα σήμα στο κανάλι φθορισμόμετρου F2 για τον HSV-1 στους 69°C και για τον HSV-2 στους 66°C. Ανάλογα με τις διάφορες συνθήκες εκχύλισης και ως αποτέλεσμα των αντίστοιχων συνθηκών επεξεργασίας με ρυθμιστικό διάλυμα, οι εν λόγω τιμές μπορεί να αποκλίνουν κατά 1 – 2°C. Ωστόσο, η απόκλιση αυτή είναι ίδια και για τους δύο υποτύπους. Παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* και *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. ενότητα 8.3 Ποσοτικοποίηση.

Προσοχή: Το προφίλ θερμοκρασίας για την ανίχνευση των HSV-1 και HSV-2 με τη χρήση του κιτ *artus HSV-1/2 LC PCR* είναι αντίστοιχο των προφίλ του κιτ *artus EBV LC PCR*, του κιτ *artus VZV LC PCR* και του κιτ *artus CMV LC PCR*. Συνεπώς, οι προσδιορισμοί PCR αυτών των συστημάτων *artus* μπορούν να διενεργηθούν και να αναλυθούν σε μία μόνο διαδικασία. Λάβετε υπόψη τις συστάσεις που παρέχονται σχετικά με την ανάλυση PCR στα κεφάλαια 8.3 Ποσοτικοποίηση και 9. Ανάλυση δεδομένων.

8. Πρωτόκολλο

8.1 Απομόνωση του DNA

Κιτ απομόνωσης DNA διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Οι ποσότητες δείγματος για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA εξαρτώνται από το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Για τη διενέργεια της απομόνωσης του DNA, ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ. Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης:

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Ορός, πλάσμα, ENY, επιχρίσματα	Κιτ QIAamp® UltraSens® Virus (50)	53 704	QIAGEN	περιέχεται
	Κιτ QIAamp DNA Mini (50)	51 304	QIAGEN	δεν περιέχεται
ENY	Κιτ EZ1® DSP Virus (48)*	62 724	QIAGEN	περιέχεται

*Προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με το BioRobot® EZ1 DSP Workstation (αριθ. καταλ. 9001360) και με το EZ1 DSP Virus Card (αριθ. καταλ. 9017707).

Σημαντική επισήμανση σχετικά με τη χρήση των κιτ QIAamp UltraSens Virus και QIAamp DNA Mini:

- Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Εάν το επιλεγμένο κιτ απομόνωσης δεν περιέχει φορέα RNA, συνιστάται ανεπιφύλακτα η προσθήκη του φορέα (RNA-Homopolymer Poly(A) [RNA-ομοπολυμερές πολυ(A)], Amersham Biosciences, αρ. καταλ. 27-4110-01) για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από σωματικά υγρά ελεύθερα κυττάρων και υλικό με χαμηλή περιεκτικότητα σε DNA/RNA (π.χ. ENY). Προχωρήστε ως εξής σε αυτές τις περιπτώσεις:
 - α) Επανεναυρώστε τον λυοφιλοποιημένο φορέα RNA χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (μη χρησιμοποιήσετε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) του κιτ εκχύλισης (π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα ΑΕ του κιτ QIAamp DNA Mini) και προετοιμάστε αραιώση με συγκέντρωση 1 μg/μl. Χωρίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε επαρκή αριθμό κλασμάτων για τις ανάγκες σας και αποθηκεύστε τα στους -20°C. Αποφεύγετε την επανειλημμένη απόψυξη (>2x) ενός κλάσματος φορέα RNA.
 - β) Χρησιμοποιήστε 1 μg φορέα RNA ανά 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Για παράδειγμα, εάν το πρωτόκολλο εκχύλισης απαιτεί τη χρήση 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, προσθέστε 2 μl φορέα RNA (1 μg/μl) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Πριν από την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* κατά περίπτωση, βλ. 8.2 *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα μεταφοράς 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
Συνολικός όγκος	202 μl	2.424 μl
Όγκος ανά εκχύλιση	200 μl έκαστο	200 μl

- γ) Χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Το μείγμα δεν δύναται να αποθηκευτεί.

- Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Για να αυξήσετε τη σταθερότητα του φορέα RNA που παρέχεται με το kit QIAamp UltraSens Virus, συνιστούμε την ακόλουθη διαδικασία κατά παρέκκλιση των οδηγιών του εγχειριδίου χρήστη του kit εκχύλισης:

α) Επανεπαιωρήστε τον λυοφιλοποιημένο φορέα RNA πριν από την πρώτη χρήση του kit εκχύλισης σε 310 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης που παρέχεται με το kit (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl, μη χρησιμοποιήσετε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Καταμερίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε επαρκή αριθμό κλασμάτων για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -20°C. Αποφεύγετε την επανειλημμένη απόψυξη (>2x) ενός κλάσματος φορέα RNA.

β) Πριν από την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* κατά περίπτωση, βλ. 8.2 *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα μεταφοράς 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 ανά εκχύλιση	800 μl έκαστο	800 μl

γ) Χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Το μείγμα δεν δύναται να αποθηκευτεί.

- Συνιστάται η έκλουση του DNA σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης για τη λήψη της μέγιστης ευαισθησίας του kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.
- Το **kit** QIAamp UltraSens Virus επιτρέπει τη συμπύκνωση του δείγματος. Εάν χρησιμοποιείτε διαφορετικό υλικό δείγματος εκτός από ορό ή πλάσμα, παρακαλούμε προσθέστε τουλάχιστον 50% (v/v) αρνητικού ανθρώπινου πλάσματος στο δείγμα.
- Όταν χρησιμοποιείτε πρωτόκολλα απομόνωσης με ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης που περιέχουν **αιθανόλη**, πρέπει να εκτελέσετε ένα πρόσθετο βήμα φυγοκέντρησης (τρία λεπτά, 13.000 rpm) πριν από την έκλουση, για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει την πιθανή αναστολή της PCR.

- Δεν επιτρέπεται η χρήση του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR σε συνδυασμό με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη **φαινόλη**.

Σημαντική σημείωση σχετικά με τη χρήση του kit EZ1 DSP Virus:

- Η χρήση **φορέα** RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Προσθέστε την κατάλληλη ποσότητα φορέα RNA σε κάθε εκχύλιση, ακολουθώντας τις οδηγίες στο *εγχειρίδιο EZ1 DSP Virus Kit (EZ1 DSP Virus Kit Handbook)*.

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλ. 8.2 *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*).

8.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί με το κιτ παρέχεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (HSV LC IC)*. Με αυτό ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να **ελέγξει τόσο τη διαδικασία απομόνωσης του DNA όσο και μια πιθανή αναστολή της PCR (βλέπε Σχ. 1)**. Αν χρησιμοποιείτε το κιτ EZ1 DSP Virus για εκχύλιση, πρέπει να προσθέσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* σύμφωνα με τις οδηγίες στο *εγχειρίδιο EZ1 DSP Virus Kit*. Αν χρησιμοποιείτε το κιτ QIAamp UltraSens Virus ή το κιτ QIAamp DNA Mini, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στην απομόνωση σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, αν χρησιμοποιείται το κιτ QIAamp DNA Mini (QIAGEN), το DNA εκλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ. Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 5 μl του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Η ποσότητα του προστιθέμενου *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλουσης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και ο φορέας RNA (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

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

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

Προαιρετικά, το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* μπορεί να χρησιμοποιηθεί **αποκλειστικά για τον έλεγχο μιας πιθανής αναστολής της PCR** (βλ. Σχ. 2). Για τον σκοπό αυτό, προσθέστε 0,5 μl *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* για κάθε αντίδραση απευθείας σε 15 μl *HSV LC Master*. Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήστε 15 μl κύριου μείγματος* παρασκευασμένου όπως περιγράφεται παραπάνω και στη συνέχεια προσθέστε 5 μl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλαπλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *HSV LC Master* και του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων (βλ. 8.4 Προετοιμασία της PCR).

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

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

και τα kit *artus* CMV LC PCR περιέχουν επίσης πανομοιότυπο *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*.

8.3 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* και *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*) χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και προστίθενται στον ίδιο όγκο (5 μl). Για την παραγωγή μιας πρότυπης καμπύλης στο όργανο *LightCycler*, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και τα τέσσερα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* του HSV-1 και του HSV-2 και να οριστούν ως πρότυπα στην οθόνη «*Sample Loading*» (Φόρτωση δείγματος) με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις (βλ. *εγχειρίδιο χειριστή του LightCycler [LightCycler Operator's Manual]*, έκδοση 3.5, κεφάλαιο Β, 2.4. Εισαγωγή δεδομένων δειγμάτων). Η πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται όπως περιγράφεται παραπάνω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα διαδικασίες, υπό τον όρο ότι χρησιμοποιείται τουλάχιστον ένα πρότυπο με **μία** δεδομένη συγκέντρωση στην εκάστοτε εκτελούμενη διαδικασία. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να εισαχθεί η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε προηγουμένως (βλ. *εγχειρίδιο χειριστή του LightCycler*, έκδοση 3.5, κεφάλαιο Β, 4.2.5. Ποσοτικοποίηση με εξωτερική πρότυπη καμπύλη). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις στα αποτελέσματα λόγω διακυμάνσεων μεταξύ των διαφορετικών διαδικασιών PCR.

Εάν έχετε ενσωματώσει περισσότερα από ένα συστήματα ανίχνευσης έρπητα *artus* στη διαδικασία PCR, αναλύστε χωριστά αυτά τα διαφορετικά συστήματα με τα αντίστοιχα *πρότυπα ποσοτικοποίησης*.

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

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

Προσέξτε ότι στον παραπάνω τύπο εισάγεται κατ' αρχήν ο αρχικός όγκος δείγματος. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν ο όγκος δείγματος μεταβάλλεται πριν από την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων (π.χ. μείωση του όγκου λόγω φυγοκέντρωσης ή αύξηση του όγκου λόγω προσθήκης συμπληρώματος στον απαιτούμενο όγκο προς απομόνωση).

Σημαντικό: Μια κατευθυντήρια οδηγία για την ποσοτική ανάλυση των συστημάτων *artus* στο όργανο *LightCycler* παρέχεται στη διεύθυνση www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 ή στο όργανο**

LightCycler 2.0 [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 η μονάδα ψύξης και οι προσαρμογείς τριχοειδών (παρελκόμενα του οργάνου *LightCycler*) έχουν προψυχθεί στους +4°C. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό τριχοειδών *LightCycler* στους προσαρμογείς της μονάδας ψύξης. Βεβαιωθείτε ότι συμπεριλαμβάνεται τουλάχιστον ένα *πρότυπο ποσοτικοποίησης* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* και *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*) καθώς και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*νερό, βαθμού PCR*) ανά διαδικασία PCR. Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* και *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*). Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως, να αναμειγνύονται (με επανειλημμένη αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομη περιδίνηση) και να υποβάλλονται σε σύντομη φυγοκέντρηση.

Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου για να παρακολουθήσετε τη διαδικασία απομόνωσης του DNA και να ελέγξετε για πιθανή αναστολή της PCR*, το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου πρέπει να έχει προστεθεί ήδη στην απομόνωση (βλ. 8.2. *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (για μια σχηματική αναπαράσταση βλ. Σχ. 1):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του κύριου μείγματος	<i>HSV LC Master</i>	15 μl	180 μl
	<i>HSV LC IC</i>	0 μl	0 μl
	Συνολικός όγκος	15 μl	180 μl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Κύριο μείγμα	15 μl	15 μl έκαστο
	Δείγμα	5 μl	5 μl έκαστο
	Συνολικός όγκος	20 μl	20 μl έκαστο

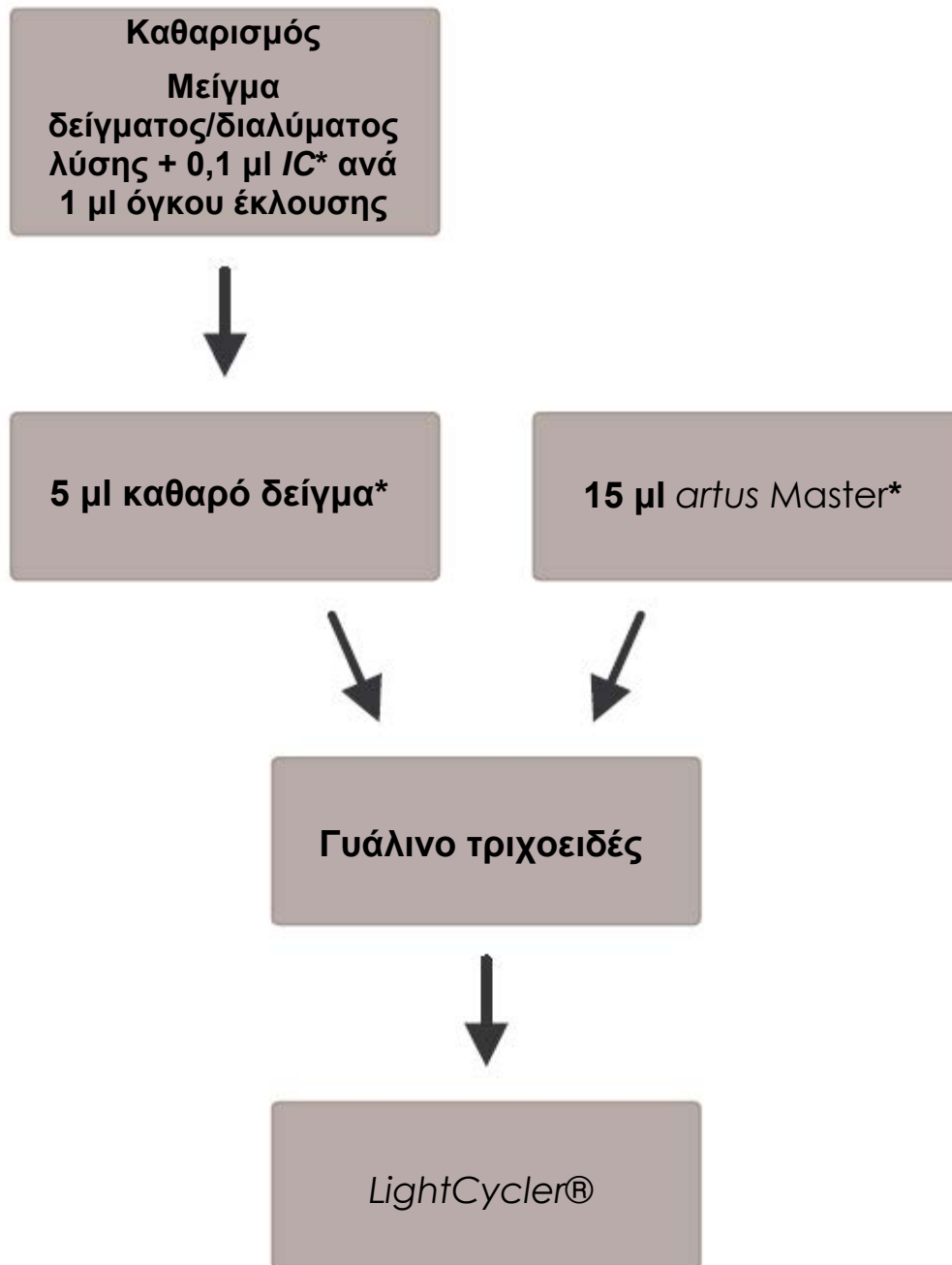
Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου αποκλειστικά για έλεγχο της αναστολής της PCR*, το πρότυπο θα πρέπει να προστεθεί απευθείας στο *HSV LC Master*. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλ. Σχ. 2 για μια σχηματική απεικόνιση):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του κύριου μείγματος	<i>HSV LC Master</i>	15 μl	180 μl
	<i>HSV LC IC</i>	0,5 μl	6 μl
	Συνολικός όγκος	15,5 μl*	186 μl*
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Κύριο μείγμα	15 μl*	15 μl έκαστο*
	Δείγμα	5 μl	5 μl έκαστο
	Συνολικός όγκος	20 μl	20 μl έκαστο

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

Μεταφέρετε με πιπέτα 15 μl του κύριου μείγματος στην πλαστική δεξαμενή κάθε τριχοειδούς. Στη συνέχεια, προσθέστε 5 μl του εκλουσμένου DNA του δείγματος. Αντιστοίχως, πρέπει να χρησιμοποιηθούν 5 μl τουλάχιστον ενός από τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (HSV1 LC/RG/TM QS 1–4 και HSV2 LC/RG/TM QS 1–4)* ως θετικό πρότυπο ελέγχου και 5 μl νερού (*νερό, βαθμού PCR*) ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου. Κλείστε τα τριχοειδή. Για να μεταφέρετε το μείγμα από την πλαστική δεξαμενή στο τριχοειδές, φυγοκεντρήστε τους προσαρμογείς που περιέχουν τα τριχοειδή σε μια επιτραπέζια φυγόκεντρο για δέκα δευτερόλεπτα στα 400 x g (2.000 rpm) το μέγιστο.

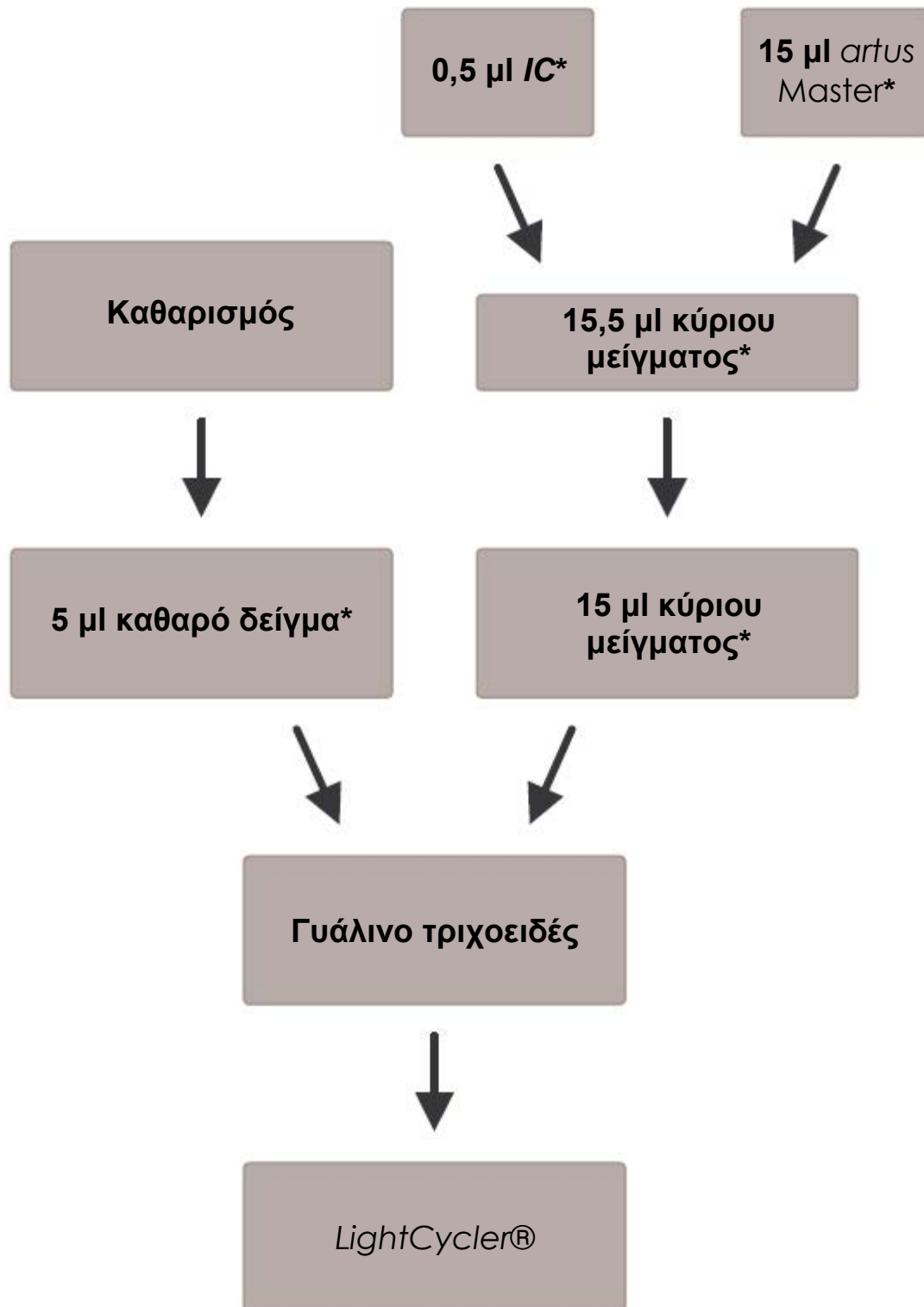
Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία καθαρισμού



Σχ. 1: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών για τον έλεγχο της διαδικασίας καθαρισμού και της αναστολής της PCR.

* Βεβαιωθείτε ότι έχει γίνει πλήρης απόψυξη, καλή ανάμειξη και σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο *artus* Master



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

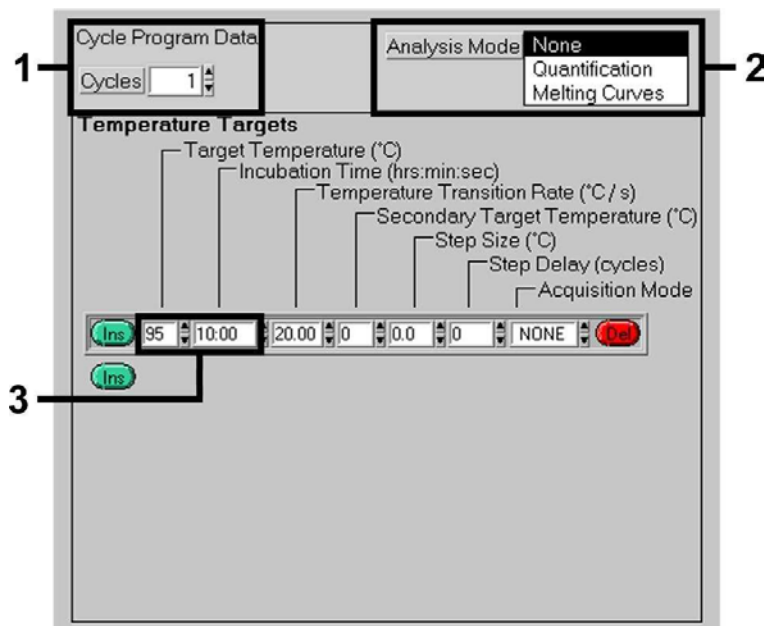
* Βεβαιωθείτε ότι έχει γίνει πλήρης απόψυξη, καλή ανάμειξη και σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

8.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*

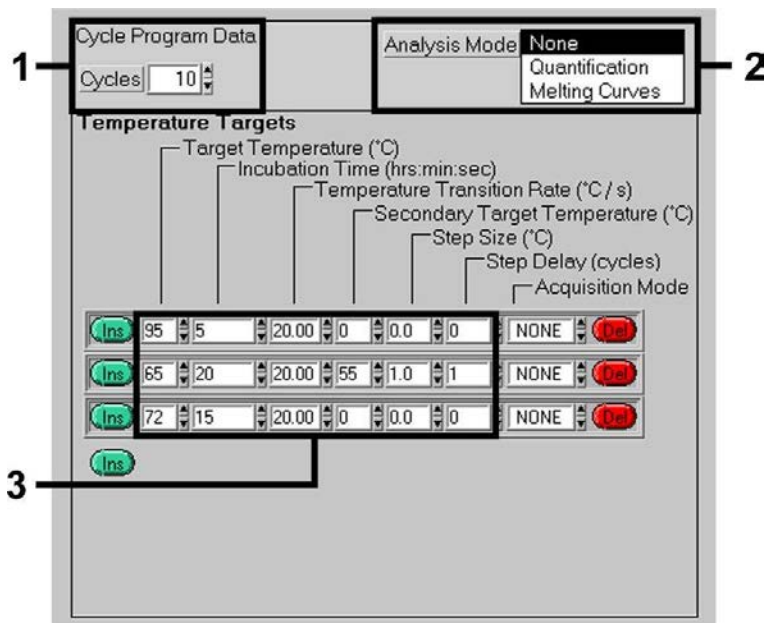
Για την ανίχνευση του DNA του ιού του απλού έρπητα, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο *LightCycler*, σύμφωνα με τα πέντε παρακάτω βήματα (βλ. Σχ. 3 – 7).

- A. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης, Σχ. 3
- B. Βήμα επαφής, Σχ. 4
- C. Ενίσχυση του DNA, Σχ. 5
- D. Καμπύλη τήξης, Σχ. 6
- E. Ψύξη, Σχ. 7

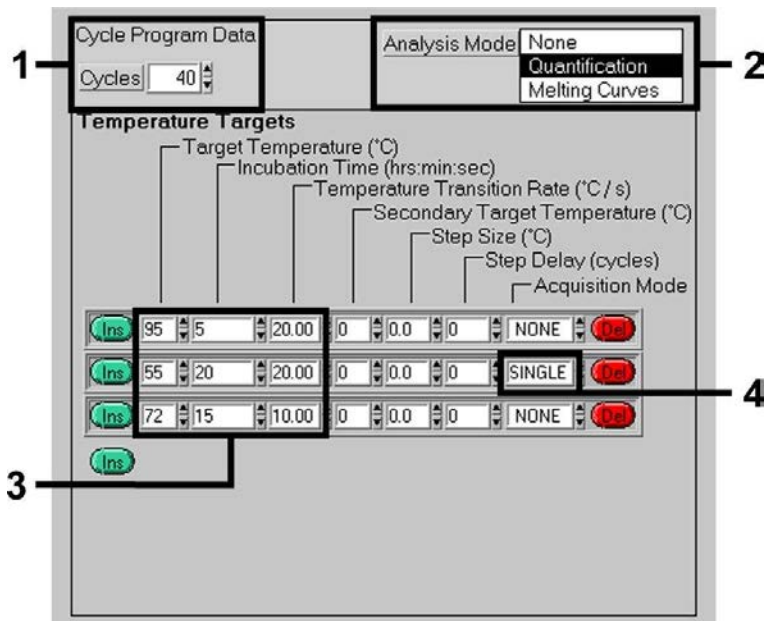
Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ρυθμίσεις «*Analysis Mode*» (Λειτουργία ανάλυσης), «*Cycle Program Data*» (Δεδομένα προγράμματος κύκλου) και «*Temperature Targets*» (Στόχοι θερμοκρασίας). Στα σχήματα οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με έντονο μαύρο πλαίσιο. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler*, ανατρέξτε στο *εγχειρίδιο χειριστή του LightCycler*.



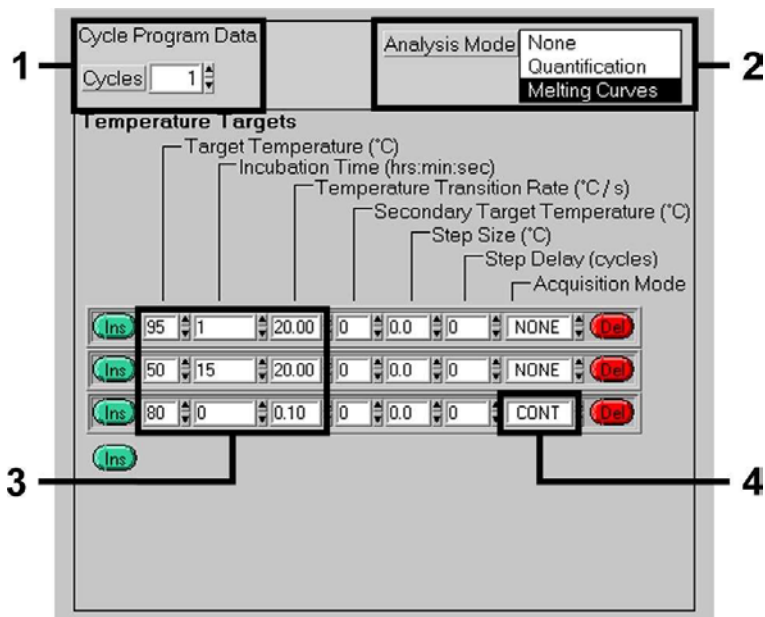
Σχ. 3: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.



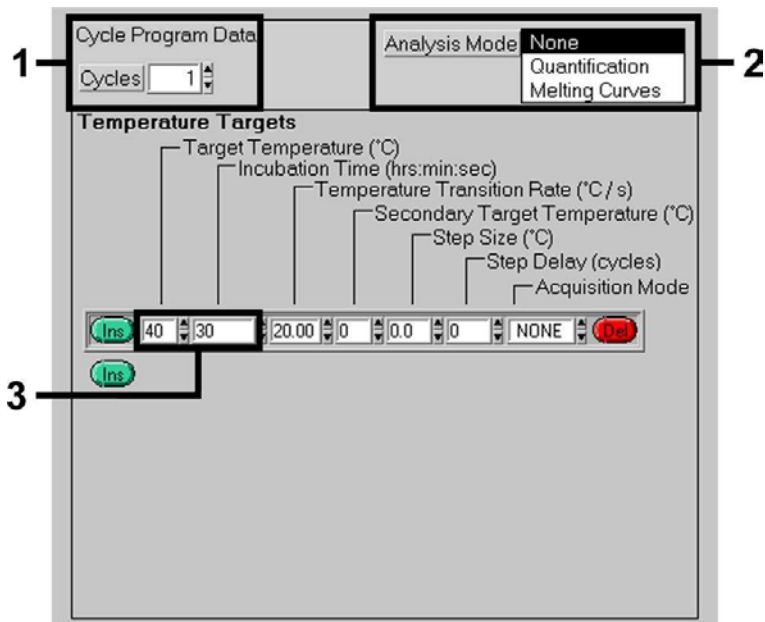
Σχ. 4: Βήμα επαφής.



Σχ. 5: Ενίσχυση του DNA.



Σχ. 6: Καμπύλη τήξης.



Σχ. 7: Ψύξη.

9. Ανάλυση δεδομένων

Στις πολυχρωματικές αναλύσεις, εμφανίζονται παρεμβολές μεταξύ των καναλιών φθορισμόμετρου. Το λογισμικό του οργάνου *LightCycler* περιέχει ένα αρχείο που ονομάζεται «*Color Compensation File*» (Αρχείο αντιστάθμισης χρώματος), το οποίο αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές. Ανοίξτε αυτό το αρχείο πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την εκτέλεση της PCR πατώντας το κουμπί «*Choose CCC File*» (Επιλογή αρχείου CCC) ή «*Select CC Data*» (Επιλογή δεδομένων CC). Εάν δεν έχει εγκατασταθεί αρχείο «*Color Compensation File*», δημιουργήστε το αρχείο σύμφωνα με τις οδηγίες στο *εγχειρίδιο χειριστή του LightCycler*. Μετά την ενεργοποίησή του

«*Color Compensation File*», εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα στα κανάλια φθορισμόμετρου F1, F2 και F3. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων PCR που ελήφθησαν με το kit *artus HSV-1/2 LC PCR*, ορίστε τις επιλογές προβολής φθορισμού F2/Back-F1 για τη διαδικασία ανάλυσης PCR του HSV και τις επιλογές F3/Back-F1 για τη διαδικασία PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, αντίστοιχα. Για την ανάλυση των ποσοτικών διαδικασιών, ακολουθήστε τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα 8.3 Ποσοτικοποίηση και στην **τεχνική σημείωση για την ποσοτικοποίηση στο όργανο LightCycler 1.1/1.2/1.5 ή στο όργανο LightCycler 2.0** στη διεύθυνση www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Εάν έχετε ενσωματώσει περισσότερα από ένα συστήματα ανίχνευσης έρπητα *artus* στη διαδικασία PCR, αναλύστε χωριστά αυτά τα διαφορετικά συστήματα με τα αντίστοιχα πρότυπα ποσοτικοποίησης. Αυτό ισχύει και για την ανάλυση των δύο υποτύπων του HSV. Επομένως, για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων HSV-1 ανατρέξτε στην πρότυπη καμπύλη που έχει δημιουργηθεί με τα πρότυπα HSV-1 (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4*). Προχωρήστε με τον ίδιο τρόπο για τα δείγματα HSV-2, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη που βασίζεται στην ανάλυση των προτύπων HSV-2 (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*).

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1.

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

Στην περίπτωση αυτή, η ανίχνευση σήματος στο κανάλι F3/Back-F1 μπορεί να αγνοηθεί, καθώς οι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA του HSV (θετικό σήμα στο κανάλι F2/Back-F1) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή σε απουσία του σήματος φθορισμού του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1 (ανταγωνισμός).

Η διαφοροποίηση μεταξύ των αμπλικονίων HSV-1 και HSV-2 μπορεί να γίνει βάσει των σημείων τήξης (κανάλι F2/Back-F1, πρόγραμμα «*melting curve*» [καμπύλη τήξης]), δηλαδή 69°C για τον HSV-1 και 66°C για τον HSV-2. Ανάλογα με τις διάφορες συνθήκες εκχύλισης και ως αποτέλεσμα των αντίστοιχων συνθηκών επεξεργασίας με ρυθμιστικό διάλυμα, οι εν λόγω τιμές μπορεί να αποκλίνουν κατά 1 – 2°C. Ωστόσο, η απόκλιση αυτή είναι ίδια και για τους δύο υποτύπους.

2. Στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1 δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1.
Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο DNA του HSV. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

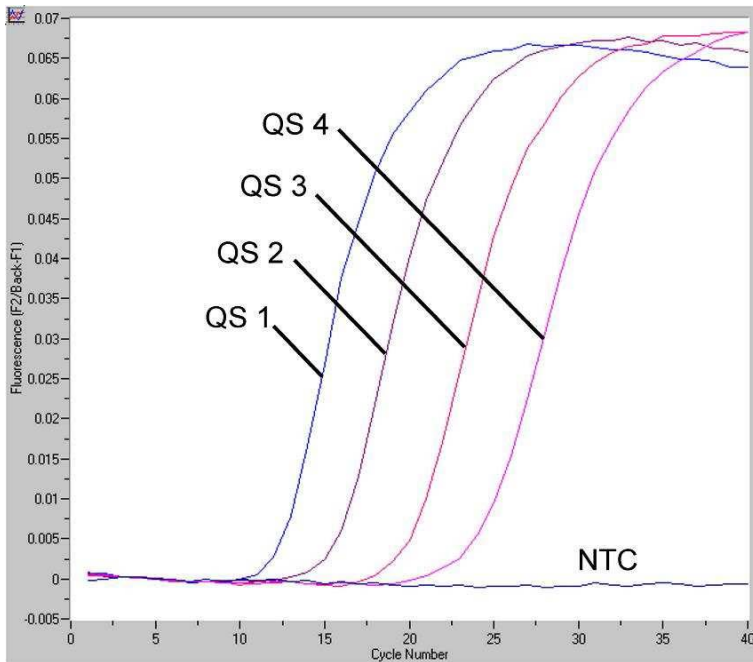
Όταν η PCR του HSV είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

3. Δεν ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι F2/Back-F1 ή στο κανάλι F3/Back-F1.

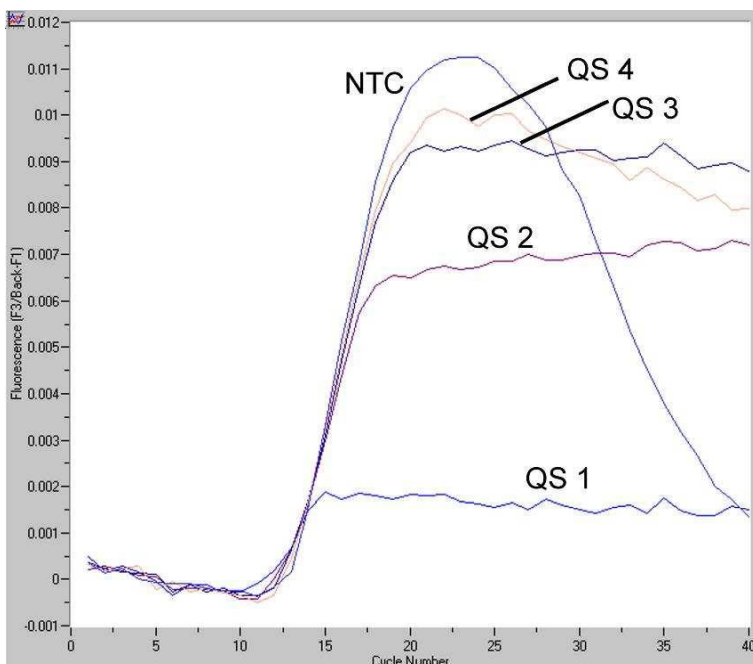
Δεν υπάρχει δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

Πληροφορίες σχετικά με τις αιτίες των σφαλμάτων και την επίλυσή τους παρέχονται στην ενότητα 10. Αντιμετώπιση προβλημάτων.

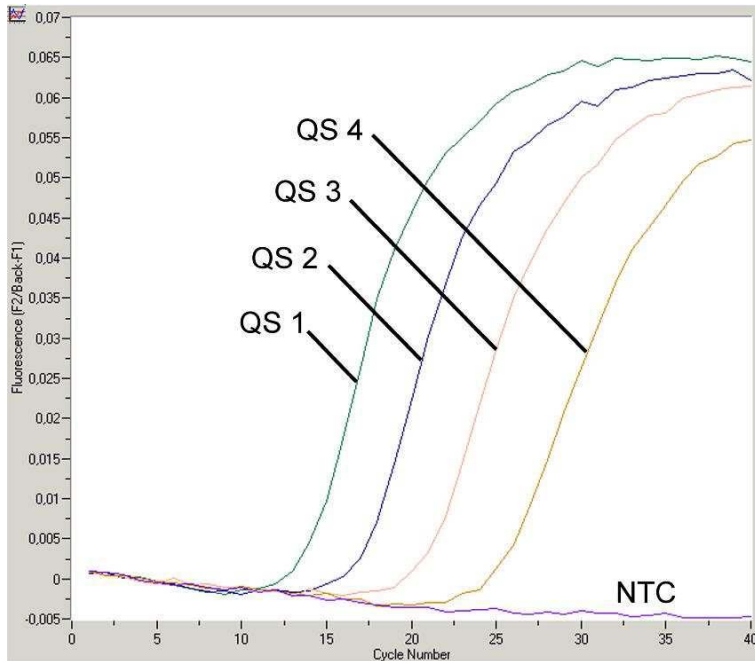
Στο Σχ. 8 έως Σχ. 12 παρέχονται παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR, καθώς και οι καμπύλες τήξης για τη διαφοροποίηση.



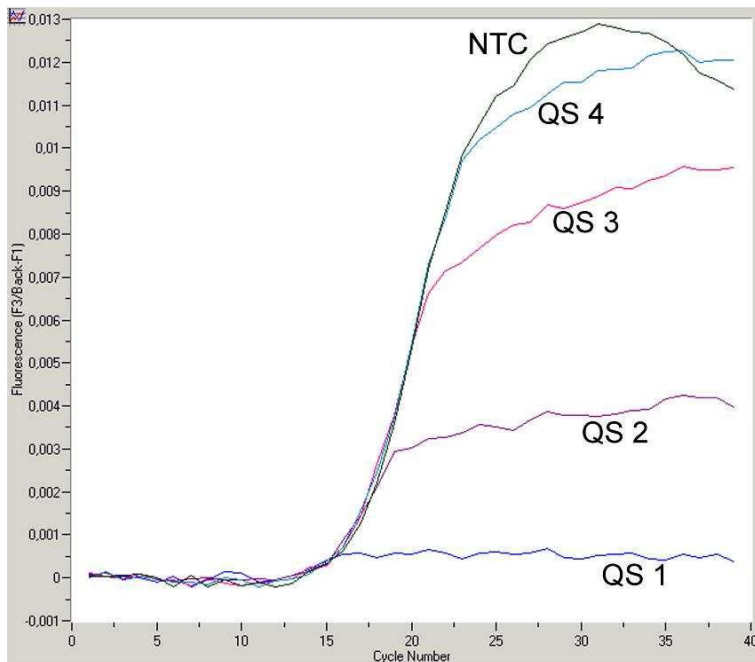
Σχ. 8: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4) στο κανάλι φθορισμού F2/Back-F1. NTC: nontemplate control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



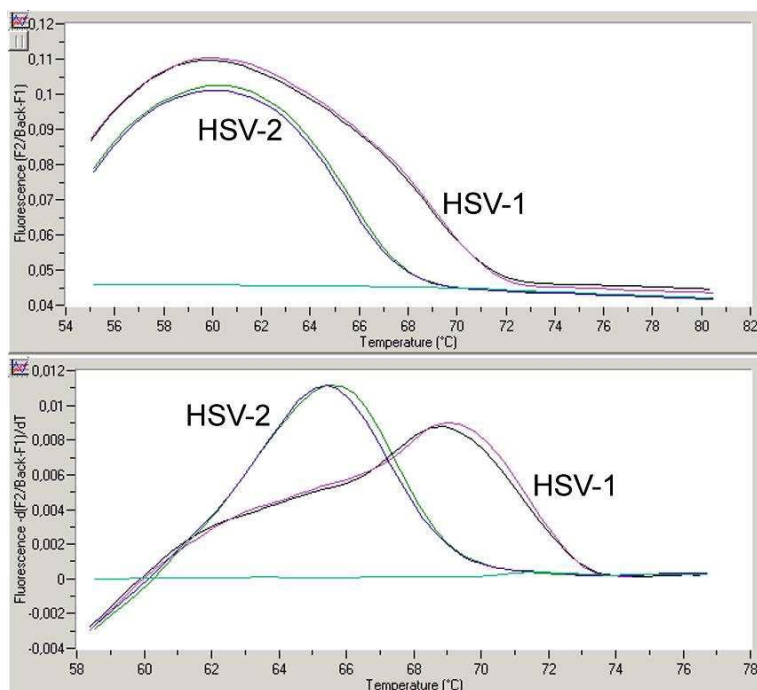
Σχ. 9: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* (IC) στο κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back-F1 με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Σχ. 10: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1. NTC: nontemplate control (αρνητικό πρότυπο ελέγχου).



Σχ. 11: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* (IC) στο κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back-F1 με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (HSV2 LC/RG/)



Σχ. 12: Εμφάνιση της διαφοροποίησης μεταξύ των HSV-1 και HSV-2 στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1 (πρόγραμμα *Melting Curve*).

10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Απουσία σήματος με θετικά πρότυπα ελέγχου (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* και *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1:

- Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμόμετρου για την ανάλυση των δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.
 - ➔ Για την ανάλυση των δεδομένων, επιλέξτε το κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1 για την PCR του HSV και το κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back-F1 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.
- Λανθασμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του οργάνου *LightCycler*.
 - ➔ Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο (βλ. 8.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*).
- Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης PCR.
 - ➔ Ελέγξτε τα βήματά εργασίας βάσει του σχήματος μεταφοράς με πιπέτα (βλ. 8.4 Προετοιμασία της PCR) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα υλικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα 2. Αποθήκευση ή είχε παρέλθει η ημερομηνία λήξης του kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.

- Ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο kit, εάν είναι απαραίτητο.

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back-F1 και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι F2/Back-F1:

- Μη συμμόρφωση των συνθηκών της PCR με το πρωτόκολλο.
 - Ελέγξτε τις συνθήκες της PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- Αναστολή της PCR.
 - Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA) και τηρείτε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
 - Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA έχει εκτελεστεί το συνιστώμενο πρόσθετο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την έκλυση (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA).
- Απώλεια του DNA κατά την εκχύλιση.
 - Εάν είχε προστεθεί το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στην εκχύλιση, μπορεί η απουσία του σήματος του *πρότυπου εσωτερικού ελέγχου* να υποδεικνύει απώλεια του DNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA) και τηρείτε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα υλικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες που παρέχονται στην ενότητα 2. Αποθήκευση ή είχε παρέλθει η ημερομηνία λήξης του kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.
 - Ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο kit, εάν είναι απαραίτητο.

Σήματα με τα αρνητικά πρότυπα ελέγχου στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1 της ανάλυσης PCR.

- Προέκυψε επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR.
 - Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε πολλαπλές επαναλήψεις.
 - Εάν είναι δυνατόν, σφραγίστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος προς εξέταση.
 - Μεταφέρετε με πιπέτα τα θετικά πρότυπα ελέγχου αυστηρά στο τέλος.
 - Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

- Προέκυψε επιμόλυνση κατά την εκχύλιση.
 - ➔ Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR του δείγματος προς εξέταση χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.
 - ➔ Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

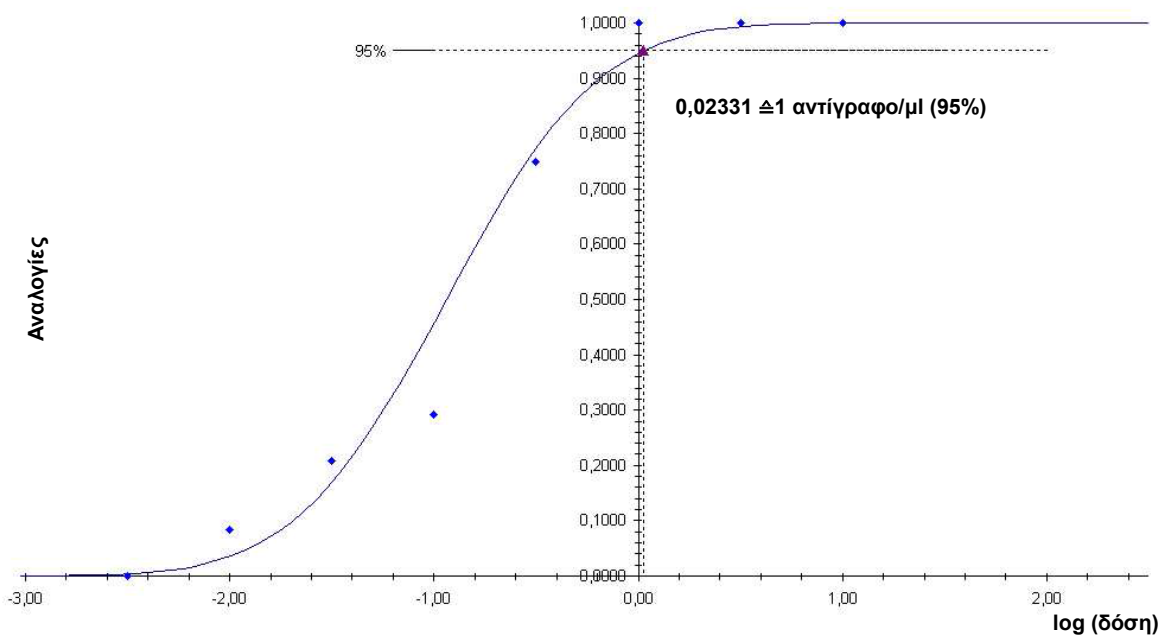
Στην περίπτωση που προκύψουν άλλα ερωτήματα ή προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τεχνική μας εξυπηρέτηση.

11. Ειδικά χαρακτηριστικά

11.1 Αναλυτική ευαισθησία

Για τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR, δημιουργήθηκε μια πρότυπη σειρά αραιώσεων από 31,6 μέχρι ονομαστικά 0,01 ισοδύναμα*/μl αντιγράφων HSV-1 και HSV-2, η οποία αναλύθηκε στη συνέχεια με το kit *artus* HSV-1/2 LC PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ επαναλήψεις. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit παρουσιάζεται στα Σχ. 13 και 14. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR για τον HSV-1 και τον HSV-2 είναι σταθερά 1 αντίγραφο/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα 95% να ανιχνευτεί 1 αντίγραφο/μl.

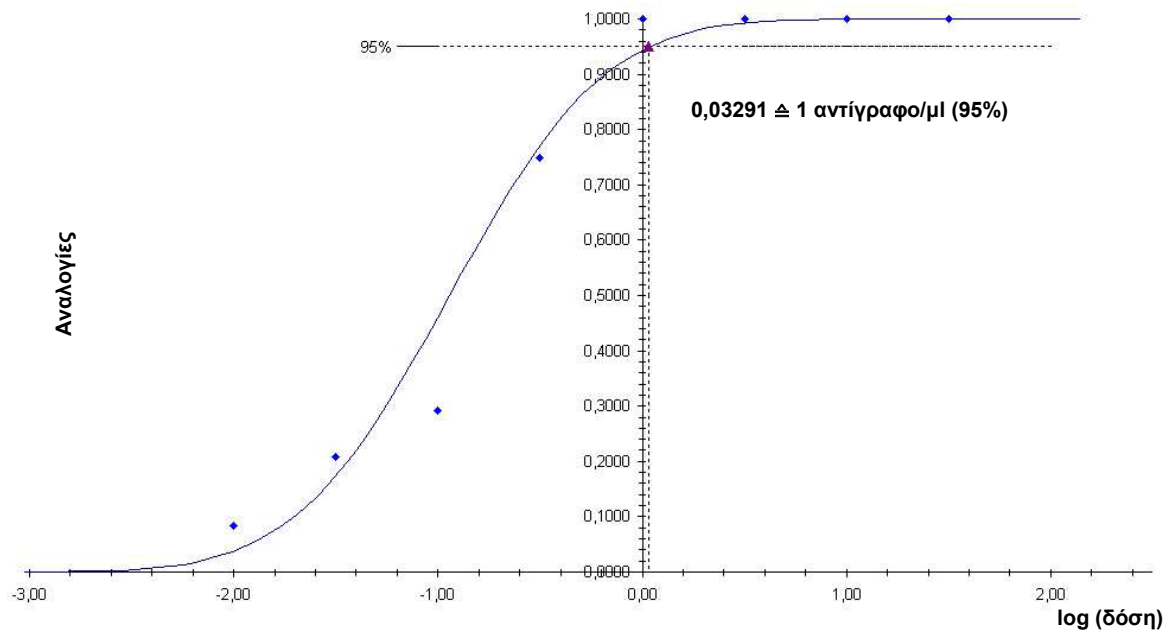
Ανάλυση Probit: Ιός του απλού έρπητα 1 (LightCycler)



* Το πρότυπο είναι ένα κλωνοποιημένο προϊόν PCR, η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκοπικής απορρόφησης και φθορισμού.

Σχ. 13: Αναλυτική ευαισθησία του κιτ *artus* HSV-1/2 LC PCR (HSV-1).

Ανάλυση Probit: Ιός του απλού έρπητα 2 (LightCycler)



Σχ. 14: Αναλυτική ευαισθησία του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR (HSV-2).

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR διασφαλίζεται κατά κύριο λόγο μέσω της επιλογής των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και μέσω της τήρησης αυστηρών συνθηκών για την αντίδραση. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές ελέγχθηκαν βάσει συγκριτικής ανάλυσης των αλληλουχιών για πιθανή ομολογία με όλες τις αλληλουχίες που έχουν δημοσιευτεί σε τράπεζες γονιδίων. Συνεπώς, έχει διασφαλιστεί η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών στελεχών.

Επιπλέον, η ειδικότητα επικυρώθηκε με 30 διαφορετικά HSV-αρνητικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Τα δείγματα αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς ενισχυτές και ανιχνευτές του HSV που περιλαμβάνονται στο *HSV LC Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του kit *artus* HSV-1/2 LC, η ομάδα προτύπων ελέγχου που παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακα 1) ελέγχθηκε για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Κανένα από τα εξεταζόμενα παθογόνα δεν προκάλεσε αντίδραση.

Πίνακας 1. Έλεγχος της ειδικότητας του kit με δυνητικώς διασταυρούμενα αντιδρώντα παθογόνα

Ομάδα μαρτύρων	HSV-1/2 (F2/Back-F1)	Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (F3/Back-F1)
Ανθρώπινος ερπητοϊός 3 (ιός ανεμοβλογιάς-ζωστήρα)	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 4 (ιός Epstein-Barr)	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 5 (κυτταρομεγαλοϊός)	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 6 A	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 6 B	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 7	–	+
Ανθρώπινος ερπητοϊός 8 (ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi)	–	+

11.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR παρέχουν δυνατότητα προσδιορισμού της ολικής διακύμανσης της ανάλυσης. Η ολική διακύμανση αποτελείται από την **ενδοαναλυτική διακύμανση** (διακύμανση πολλαπλών αποτελεσμάτων δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης στο πλαίσιο ενός μεμονωμένου πειράματος), τη **διαναλυτική διακύμανση** (διακύμανση πολλαπλών αποτελεσμάτων της ανάλυσης που παρήχθησαν σε διαφορετικά όργανα του ίδιου τύπου από διαφορετικούς χειριστές εντός του ίδιου εργαστηρίου) και τη **διακύμανση μεταξύ των παρτίδων** (διακύμανση πολλαπλών αποτελεσμάτων της ανάλυσης με χρήση περισσότερων παρτίδων). Συγχρόνως υπολογίζεται κάθε φορά η τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής διακύμανσης τόσο για την ειδική PCR του παθογόνου, όσο και για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Η συλλογή των δεδομένων ακρίβειας για το kit *artus* HSV-1/2 LC PCR έγινε με τη χρήση του *προτύπου ποσοτικοποίησης* με την κατώτατη συγκέντρωση (QS 4, 10 αντίγραφα/μl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με οκτώ επαναλήψεις. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές C_T των καμπυλών ενίσχυσης (C_T: κύκλος κατωφλίου, βλ. Πίνακα 2 και Πίνακα 4). Επιπλέον, τα δεδομένα ακρίβειας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε αντίγραφα/μl καθορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών C_T (βλ. Πίνακα 3/Πίνακα 5). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η γενική στατιστική διασπορά οποιουδήποτε

δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση είναι 1,67% (C_T, HSV-1) και 1,95% (C_T, HSV-2) ή 20,66% (συγκέντρωση, HSV-1) και 22,42% (συγκέντρωση, HSV-2), για την ανίχνευση του *πρωτύπου εσωτερικού ελέγχου* 1,23% (C_T, HSV-1) και 1,04% (C_T, HSV-2). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των καθορισμένων διακυμάνσεων.

Πίνακας 2. Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-1 με βάση τις τιμές C_T

	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής διακύμανσης [%]
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,03	0,00	0,23
Διαναλυτική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Διαναλυτική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,12	0,01	0,99
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,17	0,03	1,40
Συνολική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Συνολική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,15	0,02	1,23

Πίνακας 3. Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-1 με βάση τα ποσοτικά αποτελέσματα (σε αντίγραφα/μl)

	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής διακύμανσης [%]
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Διαναλυτική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Συνολική διακύμανση: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Πίνακας 4: Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-2 με βάση τις τιμές C_T

Ιός του απλού έρπητα 2	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής διακύμανσης [%]
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,04	0,00	0,33
Διαναλυτική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Διαναλυτική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,12	0,01	0,98
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,14	0,02	1,12
Συνολική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Συνολική διακύμανση: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,13	0,02	1,04

Πίνακας 5. Δεδομένα ακρίβειας για τον HSV-2 με βάση τα ποσοτικά αποτελέσματα (σε αντίγραφα/μl)

Ιός του απλού έρπητα 2	Τυπική απόκλιση	Διακύμανση	Συντελεστής διακύμανσης [%]
Ενδοαναλυτική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Διαναλυτική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Διακύμανση μεταξύ παρτίδων: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Συνολική διακύμανση: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

11.4 Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR. 30 HSV-αρνητικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού εμβολιάστηκαν με 3 αντίγραφα/μl όγκου έκλουσης DNA προτύπου ελέγχου του HSV-1 (τριπλάσια συγκέντρωση του ορίου ανίχνευσης). Μετά την εκχύλιση με το kit QIAamp DNA Mini (βλ. 8.1 Απομόνωση του DNA), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το kit *artus* HSV-1/2 LC PCR. Η ανάλυση του HSV-2 διενεργήθηκε με παρόμοιο τρόπο (30 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού, 3 αντίγραφα/μl DNA προτύπου ελέγχου του HSV-2). Το ποσοστό αποτυχίας για το σύνολο των δειγμάτων HSV-1 και HSV-2 ήταν 0%. Η ανθεκτικότητα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω του καθαρισμού και της ανάλυσης 30 HSV-αρνητικών δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ήταν 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Ως εκ τούτου, η ανθεκτικότητα του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR είναι $\geq 99\%$.

11.5 Αναπαραγωγιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR καθώς και τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

11.6 Διαγνωστική αξιολόγηση

Επί του παρόντος, το kit *artus* HSV-1/2 LC PCR υποβάλλεται σε μια σειρά μελετών αξιολόγησης.

12. Περιορισμοί χρήσης του προϊόντος

- Η χρήση όλων των αντιδραστηρίων επιτρέπεται αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστικούς σκοπούς.
- Το προϊόν προορίζεται για χρήση από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro*.
- Η ακριβής τήρηση των οδηγιών του εγχειριδίου χρήστη είναι απολύτως απαραίτητη για την επίτευξη των βέλτιστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Πρέπει να δίνεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των υλικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

13. Πληροφορίες για την ασφάλεια

Για πληροφορίες σχετικά με την ασφάλεια του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR, συμβουλευτείτε το αντίστοιχο δελτίο δεδομένων ασφαλείας (safety data sheets, SDS). Τα δελτία SDS διατίθενται ηλεκτρονικά σε βολική και συμπαγή μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety.

14. Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO 9001 και ISO 13485 σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του kit *artus* HSV-1/2 LC PCR ελέγχεται έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών, προκειμένου να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα του προϊόντος.

15. Βιβλιογραφία

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004, 10 (3): 190 – 212.
- (2) Whiley DM, Sirmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003, 22: 764 – 767.

16. Επεξήγηση των συμβόλων



Ημερομηνία λήξης



Κωδικός παρτίδας



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός υλικού



Εγχειρίδιο



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αιθανόλη



Παγκόσμιος αριθμός εμπορικού είδους



<N>

Περιέχει ποσότητα που επαρκεί για <N> δοκιμασίες



Περιορισμός θερμοκρασίας

QS

Πρότυπο ποσοτικοποίησης

IC

Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Kit artus HSV-1/2 LC PCR

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group), *Light Cycler*® (Roche Diagnostics).

Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμη και αν δεν συνοδεύονται από ρητή σχετική επισήμανση.

Το kit *artus HSV-1/2 LC PCR*, το BioRobot EZ1 DSP Workstation και το kit και η κάρτα EZ1 DSP Virus είναι *in vitro* διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα με σήμανση CE, σύμφωνα με την οδηγία 98/79/EK για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση *in vitro*. Δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες.

Τα kit QIAamp προορίζονται μόνο για γενική εργαστηριακή χρήση. Καμία δήλωση ή περιγραφή δεν αποσκοπεί στην παροχή πληροφοριών για τη διάγνωση, την πρόληψη ή τη θεραπεία ασθενειών.

Η αγορά των kit *artus PCR* συνοδεύεται από περιορισμένη άδεια χρήσης των kit στο πλαίσιο της διαδικασίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για ανθρώπινες και κτηνιατρικές *in vitro* διαγνωστικές χρήσεις σε συνδυασμό με θερμοκυκλοποιητή, του οποίου η χρήση στην αυτόματη εκτέλεση της διαδικασίας PCR καλύπτεται από το προκαταβολικό τέλος άδειας χρήσης είτε μέσω καταβολής του αντιτίμου στην Applied Biosystems είτε σύμφωνα με τους όρους αγοράς, δηλ. ως εγκεκριμένος θερμοκυκλοποιητής. Η διαδικασία PCR καλύπτεται από τα αντίστοιχα διπλώματα ευρεσιτεχνίας ξένων χωρών με τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας των ΗΠΑ υπ' αριθ. 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, τα οποία κατέχει η F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007–2015 QIAGEN. Με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

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

