

Εγχειρίδιο ΚΙΤ

artus[®] Parvo B19 LC PCR



24 (αρ. καταλόγου 4504063)



96 (αρ. καταλόγου 4504065)

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το όργανο *LightCycler*[®]

Φεβρουάριος 2018 – Έκδοση 1



4504063, 4504065



1112175EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R4

MAT

1112175EL



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

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

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

Πίνακας περιεχομένων

1. Περιεχόμενο	4
2. Αποθήκευση	4
3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές	4
4. Γενικές προφυλάξεις	5
5. Προβλεπόμενη χρήση	5
6. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες	5
7. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου	5
8. Περιγραφή προϊόντος	6
9. Πρωτόκολλο	6
9.1 Απομόνωση DNA	6
9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου	7
9.3 Ποσοτικοποίηση	7
9.4 Προετοιμασία της PCR	8
9.5 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler</i>	11
10. Ανάλυση δεδομένων	12
11. Αντιμετώπιση προβλημάτων	13
12. Ειδικά χαρακτηριστικά	14
12.1 Αναλυτική ευαισθησία	14
12.2 Ειδικότητα	15
12.3 Ακρίβεια	15
12.4 Ανθεκτικότητα	16
12.5 Αναπαραγωγιμότητα	17
13. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος	17
14. Πληροφορίες ασφάλειας	17
15. Ποιοτικός έλεγχος	17
16. Βιβλιογραφία	17
17. Επεξήγηση των συμβόλων	18

Κιτ *artus* Parvo B19 LC PCR

Για χρήση με το όργανο *LightCycler*.

1. Περιεχόμενο

	Επισημάνση και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4504063 24 αντιδράσεις	Αρ. είδους 4504065 96 αντιδράσεις
Μπλε	<i>Parvo B19 LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Κίτρινο	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol[¶]</i>	1 x 400 μl	1 x 400 μl
Κόκκιν ο	<i>Parvo B19 LC QS 1[¶]</i> 1 x 10 ⁶ IU/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκιν ο	<i>Parvo B19 LC QS 2[¶]</i> 1 x 10 ⁴ IU/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκιν ο	<i>Parvo B19 LC QS 3[¶]</i> 1 x 10 ³ IU/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκιν ο	<i>Parvo B19 LC QS 4[¶]</i> 1 x 10 ² IU/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Κόκκιν ο	<i>Parvo B19 LC QS 5[¶]</i> 1 x 10 ¹ IU/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Πράσιν ο	<i>Parvo B19 LC IC[¶]</i>	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	Νερό (κατηγορίας PCR)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

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

2. Αποθήκευση

Τα υλικά του κιτ *artus* Parvo B19 LC PCR αποθηκεύονται στους -15°C έως -30°C και διατηρούνται σταθερά μέχρι την ημερομηνία που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επαναληπτική ψύξη/απόψυξη (> 2 x) θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί με αυτό τον τρόπο μειώνεται η ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους στους +4°C δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε ενότητα **9.1 Απομόνωση DNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- *Color Compensation Set* (Σετ αντιστάθμισης χρώματος) (Roche Diagnostics, αρ. κατηγ. 2 158 850) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *CROSSTALK COLOR COMPENSATION* (αντιστάθμιση χρώματος αλληλοπαρεμβολής)
- Τριχοειδή *LightCycler* (20 μl)
- Μονάδα ψύξης *LightCycler*
- Όργανο *LightCycler*
- Εργαλείο πωματισμού *LightCycler*

4. Γενικές προφυλάξεις

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 εκχυλίζεται, να αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Πλήρη απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση τους.
- Στη συνέχεια, καλή ανάμειξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρησης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή στη μονάδα ψύξης *LightCycler*.

5. Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *artus Parvo B19 LC PCR* είναι ένας *in vitro* έλεγχος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση του DNA του παρβοϊού B19 σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα EDTA.

Το kit χρησιμοποιεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο και είναι διαμορφωμένο για χρήση με το kit *QIAamp UltraSens Virus*, το kit *QIAamp DNA Mini* και τα όργανα *Roche LightCycler 1.1/1.2/1.5/2.0*.

Το kit δεν προορίζεται για χρήση ως έλεγχος αίματος/προϊόντων αίματος για λοίμωξη από τον παρβοϊό B19.

Το kit *artus Parvo B19 LC PCR* προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση από επαγγελματίες του τομέα της υγείας.

6. Πληροφορίες σχετικά με τους παθογόνους παράγοντες

Η πλειονότητα των λοιμώξεων με παρβοϊό B19 είναι κλινικά ασυμπτωματικές. Τα συμπτώματα μιας οξείας λοίμωξης με παρβοϊό B19 είναι παρόμοια με εκείνα της γρίπης, αλλά μπορεί επίσης να μοιάζουν με εκείνα της ερυθράς (γερμανική ιλαρά) και, ιδίως στους ενήλικες, με εκείνα των ρευματισμών. Ο παρβοϊός B19 είναι μια σημαντική αιτία απλαστικής κρίσης σε ασθενείς με αιμολυτική αναιμία. Ορισμένες φορές παρατηρούνται θανατηφόρες επιπλοκές, ιδίως μετά από λοιμώξεις της μητέρας κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου.

7. Αρχή της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

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

8. Περιγραφή προϊόντος

Το kit *artus Parvo B19 LC PCR* αποτελεί ένα έτοιμο-για-χρήση σύστημα για την ανίχνευση DNA του παρβοϊού B19 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στο όργανο *LightCycler*. Το *Parvo B19 LC Master* περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 259 bp του γονιδιώματος του παρβοϊού B19 και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2 του οργάνου *LightCycler*. Πέραν αυτού, το kit *artus Parvo B19 LC PCR* περιέχει ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR. Αυτό ανιχνεύεται ως *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμόμετρου F3. Δεν μειώνεται το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής PCR του παρβοϊού B19 (βλέπε ενότητα **12.1 Αναλυτική ευαισθησία**). Μαζί παρέχονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*), με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός του φορτίου του παθογόνου παράγοντα. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα **9.3 Ποσοτικοποίηση**.

9. Πρωτόκολλο

9.1 Απομόνωση DNA

Κιτ απομόνωσης DNA διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Οι ποσότητες δείγματος για τη διαδικασία απομόνωσης DNA εξαρτώνται από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο. Παρακαλούμε εκτελείτε την απομόνωση DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης:

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων	Αρ. καταλόγου	Κατασκευαστής	Φορέας RNA
Ορός, πλάσμα	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (Κιτ QIAamp® UltraSens® Virus) (50)	53 704	QIAGEN	περιέχεται
	QIAamp DNA Mini Kit (Κιτ QIAamp DNA Mini) (50)	51 304	QIAGEN	δεν περιέχεται

- Η χρήση του **φορέα RNA** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Εάν το επιλεγμένο κιτ απομόνωσης δεν περιέχει φορέα RNA, παρακαλούμε σημειώστε ότι η προσθήκη του φορέα [RNA-Homopolymer Poly(A) (RNA-ομοπολυμερές πολυ(A)), Amersham Biosciences, αρ. κατηγ. 27-4110-01] συνιστάται θερμά για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από σωματικά υγρά ελεύθερα κυττάρων και υλικό με χαμηλή περιεκτικότητα σε DNA/RNA (π.χ. ENY). Παρακαλούμε προχωρήστε ως εξής σε αυτές τις περιπτώσεις:
 - α) Επανεπαιρωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (μη χρησιμοποιείτε 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 έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -20°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (> 2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.
 - β) Χρησιμοποιήστε 1 μg φορέα RNA ανά 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Για παράδειγμα, εάν το πρωτόκολλο εκχύλισης υποδεικνύει 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, παρακαλούμε προσθέστε 2 μl φορέα RNA (1 μg/μl) απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και προτύπου εσωτερικού ελέγχου, όπου εφαρμόζεται, βλέπε ενότητα **9.2 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	ανά 200 μl

- α) Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.
- Η χρήση του **φορέα RNA** είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA. Για να αυξήσετε τη σταθερότητα του φορέα RNA που παρέχεται με το κιτ QIAamp UltraSens Virus, συνιστούμε την ακόλουθη διαδικασία κατά παρέκκλιση του εγχειριδίου χρήστη του κιτ εκχύλισης:
 - α. Επανεπαιρωρήστε το λυοφιλοποιημένο φορέα RNA πριν από την πρώτη χρήση του κιτ εκχύλισης σε 310 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης που παρέχεται με το κιτ (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl, μη χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης). Καταμερίστε αυτό το διάλυμα φορέα RNA σε έναν αριθμό υποπολλαπλασίων επαρκών για τις ανάγκες σας και φυλάξτε τα στους -20°C. Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη απόψυξη (> 2 x) ενός υποπολλαπλασίου φορέα RNA.
 - β. Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και προτύπου εσωτερικού ελέγχου, όπου εφαρμόζεται, βλέπε ενότητα **9.2 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	ανά 800 μl

- c. Παρακαλούμε χρησιμοποιείτε για την εκχύλιση φρέσκο παρασκευασμένο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA αμέσως μετά την παρασκευή του. Η φύλαξη του μείγματος δεν είναι δυνατή.
- Συνιστάται η έκλυση του DNA σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης για να λάβετε τη μέγιστη ευαισθησία του kit *artus Parvo B19 LC PCR*.
 - Το **kit QIAamp UltraSens Virus** επιτρέπει τη συμπύκνωση του δείγματος. Εάν χρησιμοποιείτε υλικό δείγματος άλλο από ορό ή πλάσμα, παρακαλούμε προσθέστε τουλάχιστον 50% (v/v) αρνητικού ανθρώπινου πλάσματος στο δείγμα.
 - Κατά τη χρήση πρωτοκόλλων απομόνωσης με ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης που περιέχουν **αιθανόλη**, βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την έκλυση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (τρία λεπτά, 13.000 rpm) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει πιθανή αναστολή της PCR.
 - Η χρήση του kit *artus Parvo B19 LC PCR* δεν επιτρέπεται μαζί με μεθόδους απομόνωσης με βάση τη **φαινόλη**.

Σημαντικό: Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* του kit *artus Parvo B19 LC PCR* μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε ενότητα **9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου**).

9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου

Μαζί παραδίδεται και ένα *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (Parvo B19 LC IC)*. Με αυτό ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να **ελέγξει τόσο την απομόνωση του DNA όσο και μια ενδεχόμενη αναστολή της PCR** (βλέπε Εικ. 1). Για την εφαρμογή αυτή, προσθέστε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλυσης. Για παράδειγμα, με χρήση του kit QIAamp UltraSens Virus, το DNA εκλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος AVE. Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 5 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*. Η ποσότητα του προστιθέμενου *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* εξαρτάται **μόνο** από τον όγκο έκλυσης. Το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και ο φορέας RNA (βλέπε ενότητα **9.1 Απομόνωση DNA**) επιτρέπεται να προστεθούν μόνο

- στο μείγμα 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 μείγμα *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης/φορέα RNA πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του (αποθήκευση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο μπορεί να οδηγήσει, μετά από μερικές ώρες, σε αποτυχία του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης). **Μην** προσθέτετε το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* και το φορέα RNA 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 αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε 0,5 μl του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* και 2 μl *Parvo B19 LC Mg-Sol* ανά αντίδραση απευθείας σε 13 μl *Parvo B19 LC Master*. Χρησιμοποιήστε για κάθε αντίδραση PCR 15 μl του παρασκευασμένου όπως αναφέρεται παραπάνω *Master Mix** και στη συνέχεια προσθέστε 5 μl του καθαρού δείγματος. Εάν θέλετε να εκτελέσετε μια διαδικασία PCR για πολλά δείγματα, αυξήστε τον όγκο του *Parvo B19 LC Master*, του *Parvo B19 LC Mg-Sol* και του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων (βλέπε ενότητα **9.4 Προετοιμασία της PCR**).

9.3 Ποσοτικοποίηση

Τα παρεχόμενα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (Parvo B19 LC QS 1–5)* 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 χρησιμοποιούνται και τα πέντε *πρότυπα ποσοτικοποίησης* και να καθορίζονται στην οθόνη *SAMPLE LOADING* (φόρτωση δείγματος) ως πρότυπα με τις καθορισμένες συγκεντρώσεις [βλέπε εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*, έκδοση 3.5, κεφάλαιο B, 2.4. Εισαγωγή δεδομένων δειγμάτων]. Η πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται όπως παραπάνω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα εκτελέσεις, υπό τον όρο ότι χρησιμοποιείται τουλάχιστον ένα πρότυπο **μίας** δεδομένης συγκέντρωσης στην τρέχουσα εκτέλεση. Για το σκοπό αυτό, απαιτείται να εισαχθεί η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε προηγουμένως [βλέπε εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*,

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

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 διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών εκτελέσεων PCR.

Προσοχή: Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης ορίζονται ως IU/μl. Για τη μετατροπή των τιμών που έχουν καθορισθεί με βάση την πρότυπη καμπύλη σε IU/ml υλικού δείγματος πρέπει να εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Αποτέλεσμα (IU/ml)} = \frac{\text{Αποτέλεσμα (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Όγκος έκλουσης (}\mu\text{l)}}{\text{Όγκος δείγματος (ml)}}$$

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

Σημαντικό: Οδηγίες για την ποσοτική ανάλυση των συστημάτων *artus* στα όργανα *LightCycler* θα βρείτε στη διεύθυνση <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler1> για το *LightCycler 1.1/1.2/1.5* και στη διεύθυνση <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler2> για το *LightCycler 2.0*.

9.4 Προετοιμασία της PCR

Διασφαλίστε ότι η μονάδα ψύξης καθώς και οι προσαρμογείς τριχοειδών (παρελκόμενα του οργάνου *LightCycler*) έχουν προψυχθεί στους +4°C. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό τριχοειδών *LightCycler* στους προσαρμογείς της μονάδας ψύξης. Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης καθώς και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*νερό, κατηγορίας PCR*) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε για κάθε διαδικασία PCR όλα τα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*). Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμειγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και στη συνέχεια να φυγοκεντρώνται 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 στην απομόνωση (βλέπε 9.2 Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου). Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 1):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>Parvo B19 LC Master</i>	13 μl	156 μl
	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol</i>	2 μl	24 μl
	<i>Parvo B19 LC IC</i>	0 μl	0 μl
	Συνολικός όγκος	15 μl	180 μl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 μl	ανά 15 μl
	Δείγμα	5 μl	ανά 5 μl
	Συνολικός όγκος	20 μl	ανά 20 μl

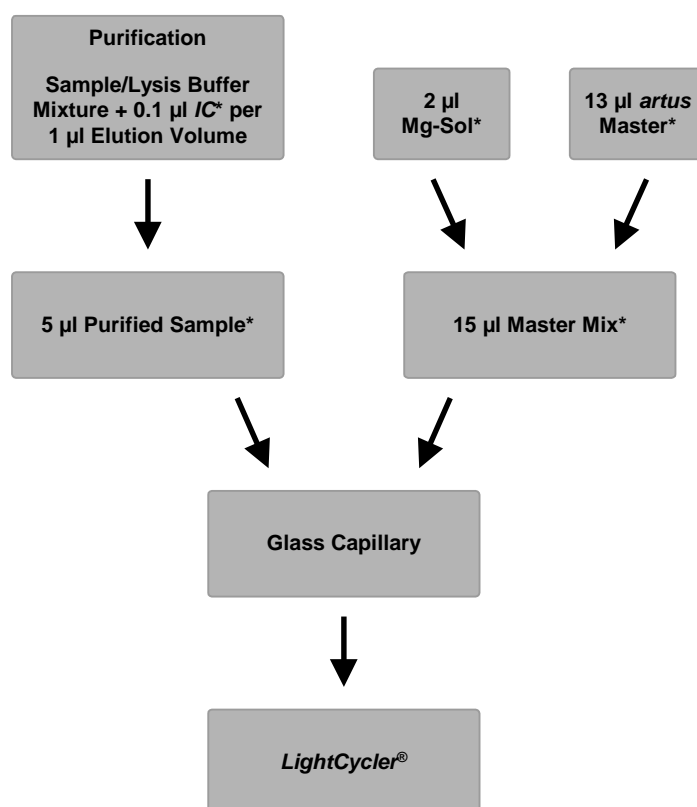
Εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, θα πρέπει αυτό να προστεθεί απευθείας στο *Parvo B19 LC Master*. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε επίσης και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 2):

	Αριθμός δειγμάτων	1	12
--	-------------------	---	----

1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>Parvo B19 LC Master</i>	13 µl	156 µl
	<i>Parvo B19 LC Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
	<i>Parvo B19 LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Συνολικός όγκος	15 µl*	186 µl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	15 µl	ανά 15 µl
	Δείγμα	5 µl	ανά 5 µl
	Συνολικός όγκος	20 µl	ανά 20 µl

Μεταφέρετε με πιπέτα 15 µl του Master Mix στην πλαστική δεξαμενή κάθε τριχοειδούς. Στη συνέχεια, προσθέστε 5 µl του εκλουσμένου DNA δείγματος. Αντιστοίχως, 5 µl τουλάχιστον ενός από τα *πρότυπα ποσοτικοποίησης (Parvo B19 LC QS 1 – 5)* πρέπει να χρησιμοποιούνται ως θετικό πρότυπο ελέγχου και 5 µl νερού (*νερό, κατηγορίας 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 σε μέγιστο 400 x g (2.000 rpm).

Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία καθαρισμού

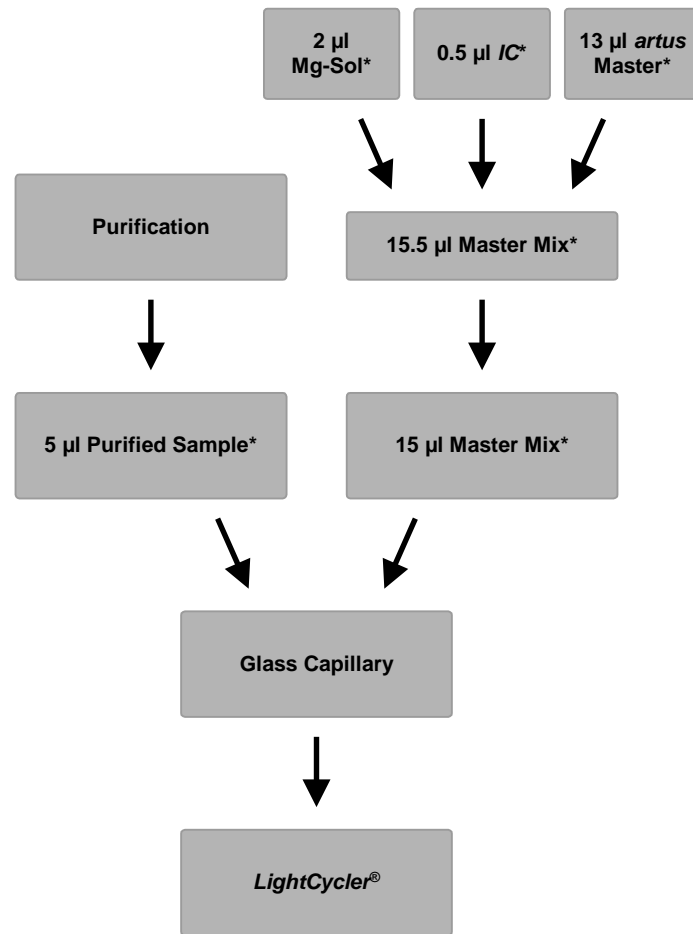


Εικ. 1: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών για τον έλεγχο της διαδικασίας καθαρισμού και της αναστολής της PCR.

*Φροντίστε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμειξη και τη σύντομη φυγοκέντρωση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

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

Προσθήκη του προτύπου εσωτερικού ελέγχου στο *artus* Master



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

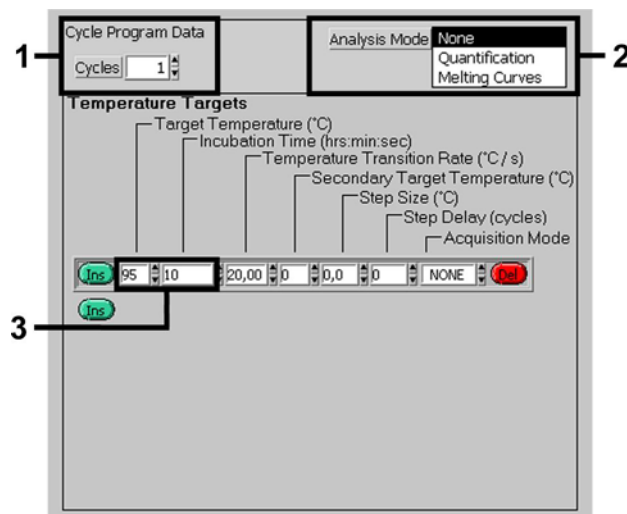
*Φροντίστε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμιξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

9.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*

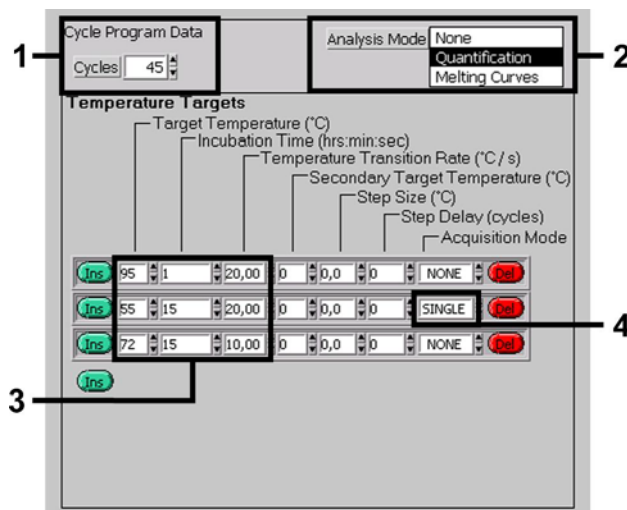
Για την ανίχνευση του DNA παρβοϊού B19, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο *LightCycler* σύμφωνα με τα ακόλουθα τρία βήματα (βλέπε Εικ. 3 - 5).

- A. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης Εικ. 3
- B. Ενίσχυση του DNA Εικ. 4
- Γ. Ψύξη Εικ. 5

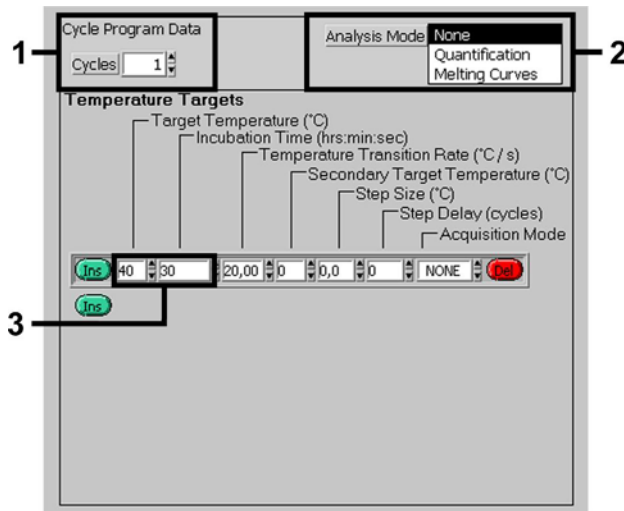
Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ρυθμίσεις για *ANALYSIS MODE* (λειτουργία ανάλυσης), *CYCLE PROGRAM DATA* (δεδομένα προγράμματος κύκλου) και *TEMPERATURE TARGETS* (στόχοι θερμοκρασίας). Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler*, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*).



Εικ. 3: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης.



Εικ. 4: Ενίσχυση του DNA.



Εικ. 5: Ψύξη.

10. 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 ενεργοποιώντας το κουμπί *CHOOSE CCC FILE* (επιλογή αρχείου CCC) ή *SELECT CC DATA* (επιλογή δεδομένων CC). Εάν δεν έχει εγκατασταθεί *COLOR COMPENSATION FILE*, δημιουργήστε το αρχείο σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο χειριστή *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*). Μετά την ενεργοποίηση του *COLOR COMPENSATION FILE*, εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα στα κανάλια φθορισμόμετρου F1, F2 και F3. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων PCR που ελήφθησαν με το κιτ *artus Parvo B19 LC PCR*, επιλέξτε τις επιλογές εμφάνισης φθορισμού F2/Back-F1 για την αναλυτική PCR του παρβοϊού B19 και F3/Back-F1 για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*, αντίστοιχα. Για την ανάλυση ποσοτικών δοκιμών, ακολουθήστε τις οδηγίες που υπάρχουν στην **ενότητα 9.3 Quantitation** και στις Τεχνικές σημειώσεις, που βρίσκονται στις ακόλουθες ηλεκτρονικές διευθύνσεις: <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler1> για το LightCycler 1.1/1.2/1.5 και <https://www.qiagen.com/TechnicalNoteLightCycler2> για το LightCycler 2.0.

Ενδέχεται να προκύψουν τα εξής αποτελέσματα:

1. Ένα σήμα ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: Το δείγμα περιέχει DNA του παρβοϊού B19.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι F3/Back-F1 μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις DNA από παρβοϊό B19 (θετικό σήμα στο κανάλι F2/Back-F1) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* στο κανάλι F3/Back-F1 (ανταγωνισμός).

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 παρβοϊού B19. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

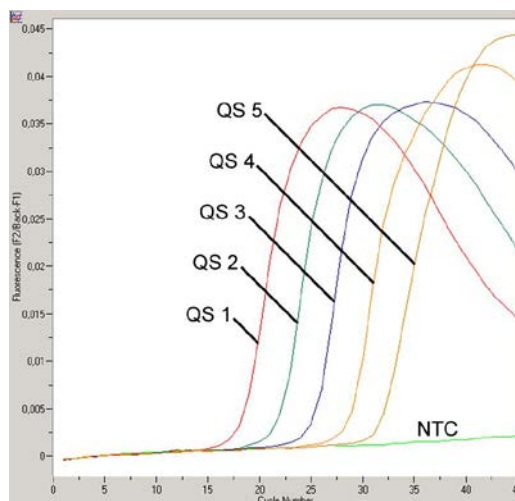
Όταν η PCR του παρβοϊού B19 είναι αρνητική, το ανιχνευμένο σήμα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* αποκλείει την πιθανότητα αναστολής της PCR.

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

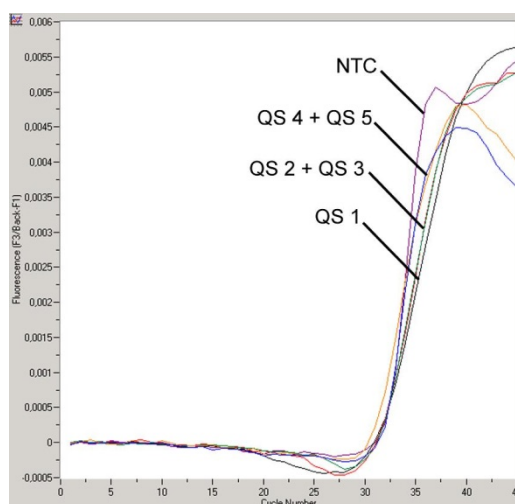
Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαγνωστικής αξιολόγησης.

Υποδείξεις σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους παρατίθενται στην ενότητα 11. **Αντιμέτωπη προβλημάτων.**

Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR αναφέρονται στην Εικ. 6 και Εικ. 7.



Εικ. 6: Ανίχνευση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).



Εικ. 7: Ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου (IC)* στο κανάλι φθορισμόμετρου F3/Back-F1 με ταυτόχρονη ενίσχυση των *προτύπων ποσοτικοποίησης* (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*). NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).

11. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Απουσία σήματος με θετικά πρότυπα ελέγχου (*Parvo B19 LC QS 1 – 5*) στο κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1:

- Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμόμετρου για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.
 - Για ανάλυση δεδομένων, επιλέξτε το κανάλι φθορισμόμετρου F2/Back-F1 για την αναλυτική PCR του παρβοϊού B19 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 (βλέπε ενότητα **9.5 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler***).
- Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης της PCR.
 - Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **9.4 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2. Αποθήκευση** ή το kit *artus Parvo B19 LC PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε 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:

- 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 συνιστώμενη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε **9.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
 - Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA έχει εκτελεστεί το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρησης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την έκλυση (βλέπε **9.1 Απομόνωση DNA**).
- Υφίστανται απώλειες DNA κατά την εκχύλιση.
 - Εάν το *πρότυπο εσωτερικού ελέγχου* έχει προστεθεί στην εκχύλιση, μπορεί η απουσία του σήματος του προτύπου εσωτερικού ελέγχου να σημαίνει απώλειες DNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **9.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
- Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας **2. Αποθήκευση** ή το kit *artus Parvo B19 LC PCR* έχει λήξει.
 - Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε 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.

- Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR.
 - Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια κατ' επανάληψη.
 - Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.
 - Εισάγετε με πιπέτα τα θετικά πρότυπα ελέγχου αυστηρά στο τέλος.
 - Βεβαιωθείτε ότι οι χώροι εργασίας και τα μηχανήματα απολυμαίνονται συχνά.
- Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση.
 - Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR των εξεταζόμενων δειγμάτων με τη χρησιμοποίηση νέων αντιδραστηρίων.
 - 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.

12. Ειδικά χαρακτηριστικά

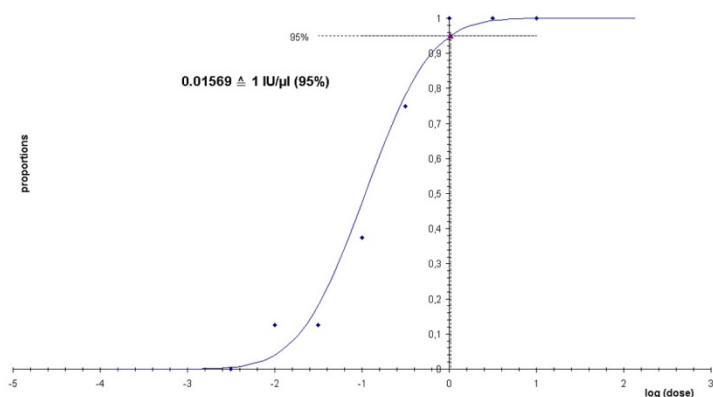
12.1 Αναλυτική ευαισθησία

Για την εγκυρότητα του kit *artus Parvo B19 LC PCR* καθορίστηκαν τόσο το αναλυτικό όριο ανίχνευσης όσο και το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (όρια ευαισθησίας). Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον παρβοϊό B19 δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης. Απεναντίας, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε χωρίς κλινικά δείγματα και ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης με τη βοήθεια ενός προτύπου γνωστής συγκέντρωσης.

Για τον προσδιορισμό της **αναλυτικής ευαισθησίας** του kit *artus Parvo B19 LC PCR*, δημιουργήθηκε μια πρότυπη σειρά αραιώσεων από 116,6 μέχρι ονομαστικά 0,03 Parvo B19 IU^{*}/μl και στη συνέχεια αυτή αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το kit *artus Parvo B19 LC PCR*. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης Probit παρουσιάζεται στην Εικ. 8. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του kit *artus Parvo B19 LC PCR* είναι 1 IU/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 1 IU/μl ανιχνεύεται με πιθανότητα 95%.

^{*} Το πρότυπο που χρησιμοποιείται εδώ είναι ένα κλωνοποιημένο προϊόν PCR, η συγκέντρωση του οποίου βαθμονομήθηκε βάσει του διεθνούς προτύπου για τον παρβοϊό B19 (Π.Ο.Υ.).

Ανάλυση Probit: Παρβοϊός B19 (*LightCycler*)



Εικ. 8: Αναλυτική ευαισθησία του kit *artus Parvo B19 LC PCR*.

Η αναλυτική ευαισθησία λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό του kit *artus Parvo B19 LC PCR* προσδιορίστηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσεων βάσει του διεθνούς προτύπου για τον παρβοϊό B19 (Π.Ο.Υ.) με εμβολιασμό σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA με το kit QIAamp UltraSens Virus (όγκος εκχύλισης: 1 ml, όγκος έκλουσης: 70 μl). Καθεμία από τις έξι αραιώσεις αναλύθηκε με το kit *artus Parvo B19 LC PCR* σε τρεις διαφορετικές ημέρες σε οκτώ θυγατρικούς κλώνους. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης Probit. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό, του kit *artus Parvo B19 LC PCR* βρίσκεται κατά συνέπεια στις 125 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 125 IU/ml ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.

12.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του kit *artus Parvo B19 LC PCR* 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. Η ανιχνευσιμότητα όλων των σχετικών γονότυπων συνεπώς διασφαλίστηκε.

Η εγκυρότητα της ειδικότητας αξιολογήθηκε με τη χρήση 30 διαφορετικών δειγμάτων πλάσματος, τα οποία ήταν αρνητικά στον παρβοϊό B19. Αυτά δεν εμφάνισαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για τον παρβοϊό B19 εκκινητές και ανιχνευτές που περιέχονται στο *Parvo B19 LC Master*.

Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας του kit *artus Parvo B19 LC PCR*, η ομάδα μαρτύρων που παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα (βλέπε Πίνακας 1) ελέγχθηκε για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση.

Πίνακας 1: Ειδικός έλεγχος του kit με δυνητικά διασταυρούμενους αντιδρώντες παθογόνους παράγοντες.

Ομάδα μαρτύρων	Παρβοϊός B19 (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 λευχαιμίας Τ κυττάρων 1	-	+
Ανθρώπινος ιός λευχαιμίας Τ κυττάρων 2	-	+

12.3 Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακριβείας, για το kit *artus Parvo B19 LC PCR*, επιτρέπουν την εξακρίβωση της ολικής διακύμανσης (ολική διασπορά) της ανάλυσης. Η ολική διασπορά αποτελείται από τη μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων δειγμάτων της ίδιας συγκέντρωσης, στα πλαίσια ενός πειράματος), τη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού που παρήχθησαν σε

διαφορετικά όργανα του ίδιου τύπου από διαφορετικούς χειριστές εντός του ίδιου εργαστηρίου) και τη **μεταβλητότητα μεταξύ των παρτίδων** (μεταβλητότητα πολλαπλών αποτελεσμάτων του προσδιορισμού με χρήση περισσότερων παρτίδων). Συγχρόνως υπολογίζεται κάθε φορά η τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής μεταβλητότητας τόσο για τη συγκεκριμένη PCR του παθογόνου παράγοντα, όσο και για την PCR του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου*.

Τα δεδομένα αυτά εξετάστηκαν, για το kit *artus Parvo B19 LC PCR*, βάσει του *προτύπου ποσοτικοποίησης* με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (QS 5, 10 IU/μl). Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με τη μορφή οκταπλών προσδιορισμών. Τα δεδομένα ακριβείας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές Ct των καμπυλών ενίσχυσης (βλ. Ct: κύκλος κατωφλίου, βλέπε Πίνακας 2). Επιπλέον, τα δεδομένα ακριβείας για τα ποσοτικά αποτελέσματα σε IU/μl προσδιορίστηκαν με χρήση των αντίστοιχων τιμών Ct (βλέπε Πίνακας 3). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η ολική διασπορά ενός τυχαίου δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση ανέρχεται σε 1,62% (Ct) ή 33,37% (συγκέντρωση), για την ανίχνευση του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* σε 2,13% (Ct). Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των τιμών Ct.

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,12	0,01	0,36
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,08	0,01	0,27
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,43	0,18	1,34
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,66	0,44	2,29
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,47	0,22	1,44
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,70	0,44	2,39
Συνολική διασπορά: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,52	0,27	1,62
Συνολική διασπορά: <i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>	0,62	0,39	2,13

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ακριβείας βάσει των ποσοτικών αποτελεσμάτων (σε IU/μl).

	Τυπική απόκλιση	Διασπορά	Συντελεστής μεταβλητότητας [%]
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,70	0,49	6,04
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	0,93	0,87	8,01
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	4,12	16,77	52,63
Συνολική διασπορά: <i>Parvo B19 LC QS 5</i>	3,34	11,13	33,37

12.4 Ανθεκτικότητα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας συμβάλλει στην εξέταση του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του kit *artus Parvo B19 LC PCR*. 30 αρνητικά στον παρβοϊό B19 δείγματα ορού εμβολιάστηκαν με 6 IU/μl όγκου έκλουσης προτύπου ελέγχου DNA του παρβοϊού B19 (τριπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού ορίου ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του kit QIAamp DNA Mini (βλέπε ενότητα **9.1 Απομόνωση DNA**), τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το kit *artus Parvo B19 LC PCR*. Το ποσοστό αποτυχίας για τον παρβοϊό B19 ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Η ανθεκτικότητα του *προτύπου εσωτερικού ελέγχου* ελέγχθηκε επιπλέον μέσω του καθαρισμού και της ανάλυσης 30 αρνητικών στον παρβοϊό B19 δειγμάτων ορού. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Έτσι, η ανθεκτικότητα του kit *artus Parvo B19 LC PCR* ανέρχεται στο $\geq 99\%$.

12.5 Αναπαραγωγικότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγικότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του kit *artus* Parvo B19 LC PCR καθώς και μια σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

13. 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.
- Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Για ορισμένες αλληλουχίες σχετιζόμενες με το γονότυπο 3, η αξίωση απόδοσης δεν μπορεί να είναι εγγυημένη. Λόγω μεταλλάξεων στην περιοχή σύνδεσης των εκκινητών/ανιχνευτών, θα μπορούσε να προκύψει σημαντική μείωση της ευαισθησίας (Baylis and Buchheit, 2009).
- Αν και σπάνιες, οι μεταλλάξεις εντός των εξαιρετικά συντηρημένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος που καλύπτονται από τους εκκινητές και/ή τον ανιχνευτή του kit, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ποσοτικές τιμές ή αδυναμία ανίχνευσης της παρουσίας του ιού στις περιπτώσεις αυτές. Η εγκυρότητα και η απόδοση της σχεδίασης του προσδιορισμού αναθεωρούνται ανά τακτά διαστήματα.

14. Πληροφορίες ασφάλειας

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN®.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.















15. Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO σύστημα διαχείρισης ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του kit *artus* Parvo B19 LC PCR ελέγχθηκε έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών προκειμένου να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα του προϊόντος.

16. Βιβλιογραφία

- (1) Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR Tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (5): 2013 - 2019.
- (2) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (3) Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13 – 20.

17. Επεξήγηση των συμβόλων

	Ημερομηνία λήξης
	Κωδικός παρτίδας
	Κατασκευαστής
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός υλικού
	Εγχειρίδιο
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Συστατικά
	Περιέχει
	Αριθμός
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
 <N>	Περιέχει ποσότητα που επαρκεί για <N> δοκιμασίες
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
QS	<i>Πρότυπο ποσοτικοποίησης</i>
IC	<i>Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου</i>
Mg-Sol	<i>Διάλυμα μαγνησίου</i>

Kit *artus* Parvo B19 LC PCR

Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, UltraSens® (Όμιλος QIAGEN)· *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λ.π. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημαίνονται ειδικά ως τέτοια.

Το kit *artus* Parvo B19 LC PCR είναι ένα διαγνωστικό kit που φέρει τη σήμανση CE σύμφωνα με την οδηγία 98/79/EK για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση in vitro. Δεν διατίθεται σε όλες τις χώρες.

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

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

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

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του kit *artus* Parvo B19 LC PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του kit *artus* Parvo B19 LC PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο kit artus Parvo B19 LC PCR* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο kit artus Parvo B19 LC PCR* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το kit και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα συστατικά του.

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

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066
Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11
Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556
Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779
Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)
China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325
Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942
Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413
France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928
Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400
Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425
Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061
Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980
Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300
Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145
Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067
Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436
The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602
Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712
Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368
Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050
Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328
Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12
UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999
USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1112175EL

