

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *artus*[®] HI Virus-1 RG RT-PCR



24 (αρ. καταλόγου 4513263)



96 (αρ. καταλόγου 4513265)

Έκδοση 1



Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με όργανα Rotor-Gene[®] Q



4513263, 4513265



1049310EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724

Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R5



1049310EL



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.

Περιεχόμενο

Περιεχόμενα του kit	6
Σύμβολα	6
Αποθήκευση	7
Προβλεπόμενη χρήση	7
Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος	8
Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις	8
Ποιοτικός έλεγχος	9
Εισαγωγή	10
Αρχή λειτουργίας	10
Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό	10
Χαρακτηριστικά απόδοσης	11
Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που προμηθεύεται ο χρήστης	22
Σημαντικές σημειώσεις	23
Γενικές προφυλάξεις	23
Συλλογή, φύλαξη και μεταφορά δειγμάτων	23
Απομόνωση RNA	25
Εσωτερικός μάρτυρας	25
Ρύθμιση του κατωφλίου για την ανάλυση PCR	26
Ποσοτικοποίηση	26
Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων	28
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	38
Βιβλιογραφία	41
Πληροφορίες παραγγελίας	42

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit		(24)	(96)
Αρ. καταλόγου		4513263	4513265
Αριθμός αντιδράσεων		24	96
Μπλε	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Βιολετί	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 αντιδράσεις	8 x 12 αντιδράσεις
Κόκκινο	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Κόκκινο	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Πράσινο	HI Virus-1 RG IC [†]	IC 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Λευκό	Νερό (βαθμού PCR)	1.000 μl	1.000 μl
	Εγχειρίδιο	 1	1

* Πρότυπο ποσοτικοποίησης.

† Εσωτερικός μάρτυρας.

Σύμβολα



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> δοκιμασίες



Ημερομηνία λήξης













In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας

	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιέχει
	Αριθμός
	Υδροχλωρική γουανιδίνη
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Σημαντική σημείωση

Αποθήκευση

Τα συστατικά του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR θα πρέπει να φυλάσσονται στους -30°C έως -15°C και είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη (>2 φορές) διότι μπορεί να επιφέρει έκπτωση της ευαισθησίας του προσδιορισμού. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να καταψύχονται σε κλάσματα. Η φύλαξη στους $2-8^{\circ}\text{C}$ δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 5 ώρες.

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR είναι ένας *in vitro* έλεγχος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων για την ποσοτικοποίηση του RNA του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) σε ανθρώπινο πλάσμα. Αυτό το kit διαγνωστικού ελέγχου χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) και είναι διαμορφωμένο για χρήση μαζί με τα όργανα Rotor-Gene Q. Η δοκιμασία μπορεί να ποσοτικοποιήσει RNA του HIV-1 στο εύρος $120 - 1 \times 10^8$ HIV-1 IU/ml. Δείγματα πλάσματος που

περιέχουν τους Υπότυπους Ομάδας M A–H έχουν επικυρωθεί για χρήση στον προσδιορισμό.

i Η χρήση του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR δεν επιτρέπεται μαζί με όργανα Rotor-Gene Q 2plex.

Το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με την εκάστοτε κλινική εκδήλωση και άλλους εργαστηριακούς δείκτες για την πρόγνωση της νόσου και για χρήση ως βοήθημα στην αξιολόγηση της απόκρισης του ιού σε αντιρετροϊκή αγωγή, όπως αυτή μετράται από μεταβολές των επιπέδων RNA του HIV-1 σε πλάσμα EDTA. Το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR δεν προορίζεται για χρήση ως εξέταση διαλογής για HIV ή ως διαγνωστική δοκιμασία για την επιβεβαίωση λοίμωξης από HIV.

Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

Η χρήση όλων των αντιδραστηρίων επιτρέπεται αποκλειστικά για in vitro διαγνωστικούς σκοπούς.

Το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό στις in vitro διαγνωστικές διαδικασίες.

Για βέλτιστα αποτελέσματα της PCR απαιτείται αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήσης.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

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.

Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

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.

Ποιοτικός έλεγχος

Σε συμμόρφωση με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για την διασφάλιση ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

Εισαγωγή

Το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα για την ανίχνευση RNA του ιού HIV-1 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) σε όργανα Rotor--Gene Q. Τα HI Virus-1 RG Master A και B περιέχουν αντιδραστήρια και ένζυμα για την αντίστροφη μεταγραφή και την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 93 bp του γονιδιώματος HIV-1 και για την απευθείας ανίχνευση του ειδικού προϊόντος ενίσχυσης (αμπλικόνιο) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green του Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, ή Rotor-Gene 6000, ή Cycling A.FAM™ (πηγή 470 nm, ανιχνευτής 510 nm) του Rotor-Gene 3000.

Επιπλέον, το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR περιλαμβάνει ακόμη ένα ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για τη διαπίστωση τυχόν αναστολής της PCR. Το σύστημα αυτό ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας (IC) στο κανάλι φθορισμού Cycling Orange του Rotor-Gene Q, ή Rotor-Gene 6000, ή Cycling A.ROX™ (πηγή 585 nm, ανιχνευτής 610 nm) του Rotor-Gene 3000. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης HI Virus-1 RT-PCR (βλέπε «Αναλυτική ευαισθησία», σελίδα 11) δεν μειώνεται. Παρέχονται εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες (HI Virus-1 RG QS 1–4), οι οποίοι καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της ποσότητας του ιικού RNA. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε «Ποσοτικοποίηση», σελίδα 26.

Αρχή λειτουργίας

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

Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι ένας ρετροϊός που ευθύνεται για το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Υπάρχουν δύο τύποι του HIV που ευθύνονται για λοιμώξεις στον άνθρωπο, ο HIV-1 και ο HIV-2, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τη λοιμογόνο δράση και τον επιπολασμό τους. Οι περισσότερες αναφερθείσες περιπτώσεις AIDS σε όλο τον κόσμο έχουν αποδοθεί στον HIV-1. Η λοίμωξη με HIV προκύπτει μέσω της μεταφοράς μολυσμένου αίματος, κολπικού υγρού, μητρικού γάλακτος και

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 10, 190.

άλλων σωματικών υγρών. Σε αυτά τα σωματικά υγρά, ο HIV ανευρίσκεται τόσο με τη μορφή ελεύθερων ιικών σωματιδίων όσο και με την μορφή ιού, εντός των μολυσμένων ανοσοκυττάρων. Οι τρεις κύριες οδοί μετάδοσης είναι η σεξουαλική επαφή χωρίς προστασία, οι μολυσμένες βελόνες και η μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί περιγεννητικά ή μέσω του μητρικού γάλακτος.

Ο ιός HIV προσβάλλει κυρίως κύτταρα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα βοηθητικά T κύτταρα (ιδιαίτερα τα CD4⁺). Η λοίμωξη από HIV οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των CD4⁺ T κυττάρων. Όταν ο αριθμός των CD4⁺ T κυττάρων πέσει κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο, η κυτταρική ανοσία χάνεται και ο οργανισμός γίνεται σταδιακά όλο και περισσότερο επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις.

Τα συμπτώματα του συνδρόμου AIDS εκδηλώνονται σε προχωρημένο στάδιο της λοίμωξης από HIV, όταν το αποδυναμωμένο ανοσοποιητικό σύστημα δεν μπορεί πλέον να αντιμετωπίσει τις ευκαιριακές λοιμώξεις. Σε αυτό το στάδιο, ο προσβεβλημένος ασθενής αναπτύσσει σταδιακά συμπτώματα, τα οποία πυροδοτούνται από αυτού του είδους τις λοιμώξεις. Στις συνηθέστερες λοιμώξεις συγκαταλέγονται η χρόνια διάρροια από κρυπτοσπορίδια, η οφθαλμική λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό, η πνευμονία από πνευμονοκύστη, η τοξοπλάσμωση και η φυματίωση όπως και οι λοιμώξεις με στελέχη του συμπλέγματος *Mycobacterium avium*. Επιπλέον, παρατηρείται συχνά η ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου, το σάρκωμα Kaposi ή το λέμφωμα. Προς το παρόν δεν υπάρχει θεραπεία για το AIDS, πιστεύεται δε πως η πλειοψηφία των προσβεβλημένων από HIV ατόμων θα καταλήξουν τελικά από σχετιζόμενη με AIDS ασθένεια. Οι εξελίξεις ωστόσο, στις θεραπείες κατά του HIV/AIDS, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που καταπολεμούν τον ίδιο τον ιό, όπως και εκείνων που αποτρέπουν ή αντιμετωπίζουν ευκαιριακές λοιμώξεις, έχουν βελτιώσει σημαντικά το προσδόκιμο και την ποιότητα ζωής μεγάλου αριθμού ασθενών με HIV/AIDS.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ευαισθησία

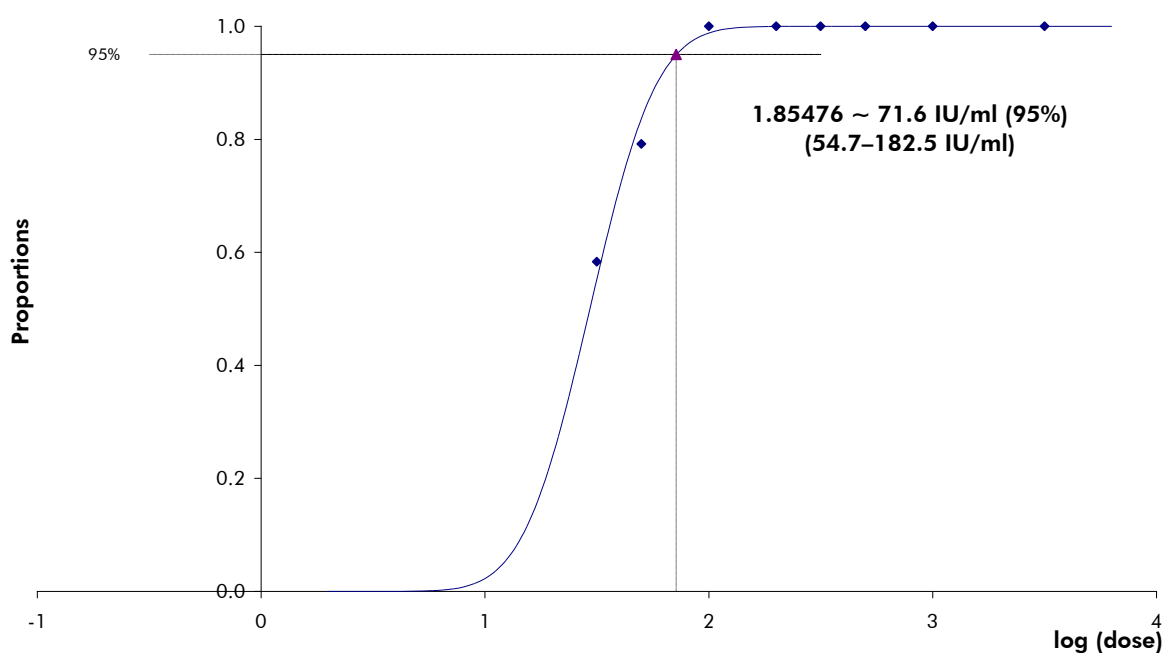
Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης καθώς και το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (όριο ευαισθησίας) αξιολογήθηκαν για το kit *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό καθορίστηκε με τη βοήθεια κλινικών θετικών στον HIV δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης. Απεναντίας, το αναλυτικό όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης με τη βοήθεια ενός προτύπου γνωστής συγκέντρωσης.

Για τον καθορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας του kit *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*, προετοιμάστηκε τυπική σειρά αραιώσης από 0,0316 έως 31,6 IU*/μl και υποβλήθηκε σε ανάλυση στο Rotor-Gene 3000 σε συνδυασμό με το

κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης probit. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene 3000 είναι 4,5 IU/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 4,5 IU/μl ανιχνεύεται με πιθανότητα 95%.

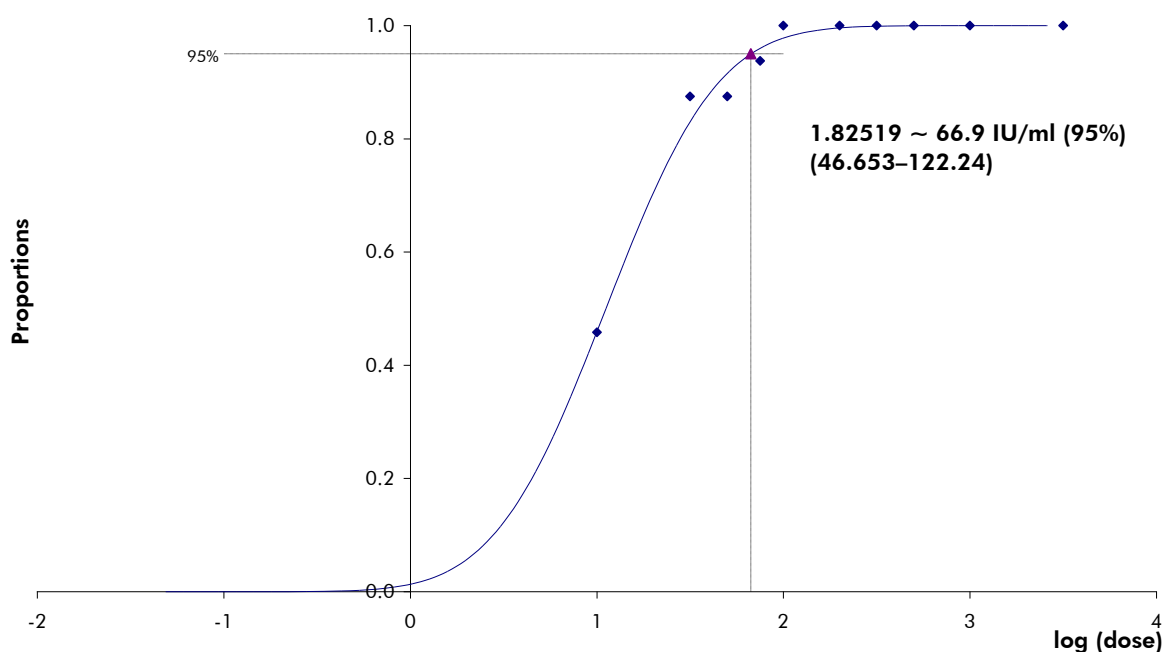
* Το πρότυπο είναι ένα *in vitro* μεταγεγραμμένο RNA, η συγκέντρωση του οποίου βαθμονομήθηκε βάσει του 2ου Διεθνούς Προτύπου για τον ιό HBV (Π.Ο.Υ.).

Η αναλυτική ευαισθησία λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (κιτ QIAamp[®] DSP Virus, QIAGEN) του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR στα όργανα Rotor-Gene προσδιορίστηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσης του 2ου Διεθνούς Προτύπου του Π.Ο.Υ. για το RNA του HIV-1 για τους προσδιορισμούς τεχνολογίας ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (NAT) (κωδικός 97/650) από 10 έως 3.160 HIV IU/ml με εμβολιασμό σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Αυτά υποβλήθηκαν σε εκχύλιση RNA με το κιτ QIAamp DSP Virus (QIAGEN, όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 25 μl). Καθεμία από τις αραιώσεις αναλύθηκε με το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR σε 3 διαφορετικές ημέρες σε 8 θυγατρικούς κλώνους. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια ανάλυσης probit. Μια γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene 3000 είναι 71,6 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 71,6 IU/ml ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικόνα 1. Ανάλυση probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 3000). Αναλυτική ευαισθησία λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus, QIAGEN) του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR στο όργανο Rotor-Gene 3000.

Το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR σε συνδυασμό με το Rotor-Gene Q/6000 είναι 66,9 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 66,9 IU/ml ανιχνεύονται με πιθανότητα 95%.



Εικόνα 2. Ανάλυση probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000). Αναλυτική ευαισθησία λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό (κιτ QIAamp DSP Virus, QIAGEN) του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR στο όργανο Rotor-Gene 6000.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR διασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών, καθώς και από την τήρηση αυστηρών συνθηκών για την αντίδραση. 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 διασφαλίστηκε με ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων και μία εκτέλεση PCR σε όργανα Rotor-Gene με τους ακόλουθους γονότυπους (βλέπε Πίνακα 1).

Εκτός αυτού, η ειδικότητα επαληθεύτηκε με 100 διαφορετικά HIV αρνητικά δείγματα πλάσματος. Αυτά δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους ειδικούς για HIV ανιχνευτές και εκκινητές που περιλαμβάνονται στο HI Virus-1 RG Master.

Ελέγχθηκε μία πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR με χρήση της ομάδας μαρτύρων που παρατίθεται στον Πίνακα 2. Κανένας από τους εξεταζόμενους παθογόνους παράγοντες δεν προκάλεσε αντίδραση. Δεν παρουσιάστηκαν διασταυρούμενες αντιδραστικότητες σε μεικτές λοιμώξεις.

Πίνακας 1. Εξέταση της ειδικότητας σχετικών γονότυπων

Ιός	Γονότυποι	Προέλευση	HIV (FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (ROX)
Ιός HIV-1	A	NIBSC*	+	+
Ιός HIV-1	B	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	C	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	D	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	E	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	F	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	G	NIBSC	+	+
Ιός HIV-1	H	NIBSC	+	+

* Εθνικό Ινστιτούτο Βιολογικών Προτύπων και Ελέγχου (National Institute for Biological Standards and Control), Hertfordshire.

Πίνακας 2. Έλεγχος της ειδικότητας του kit με δυνητικώς διασταυρούμενα αντιδρώντα παθογόνα

Ομάδα μαρτύρων	HIV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Orange ή Cycling A.ROX)
Ιός ηπατίτιδας A	-	+
Ιός ηπατίτιδας B	-	+
Ιός ηπατίτιδας C	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 1 (ιός απλού έρπητα 1)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 2 (ιός απλού έρπητα 2)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 3 (ιός ανεμοβλογιάς-ζωστήρα)	-	+
Ανθρώπινος ιός έρπητα 5 (κυτταρομεγαλοϊός)	-	+

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 2. Συνέχεια

Ομάδα μαρτύρων	HIV (Cycling Green ή Cycling A.FAM)	Εσωτερικός μάρτυρας (Cycling Orange ή Cycling A.ROX)
Ανθρώπινος ιός Τ- κυτταρικής λευχαιμίας τύπος 1 και τύπος 2	–	+
Εντεροϊός	–	+
Παρβοϊός Β19	–	+
Κίτρινος πυρετός	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

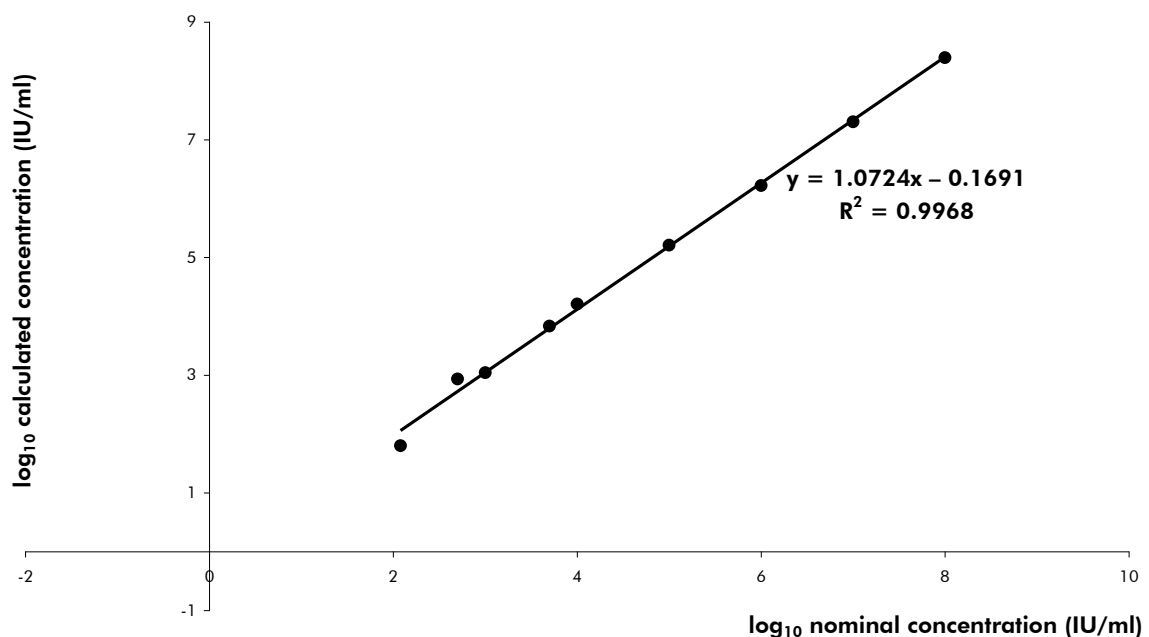
Γραμμικό εύρος της ποσοτικοποίησης

Το γραμμικό εύρος (αναλυτική μέτρηση) του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR προσδιορίστηκε αναλύοντας μια σειρά αραιώσης ενός μεταγραφήματος *in vitro* του HIV από 1×10^8 IU/μl έως 1 IU/μl. Προηγουμένως έγινε βαθμονόμηση της σειράς αραιώσης έναντι του Διεθνούς Προτύπου για το RNA του ιού HIV του Π.Ο.Υ.

Κάθε αραιώση εξετάστηκε σε θυγατρικούς κλώνους ($n = 8$) με χρήση του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR στα όργανα Rotor-Gene.

Το γραμμικό εύρος του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR προσδιορίστηκε ότι καλύπτει συγκεντρώσεις από 5 IU/μl μέχρι τουλάχιστον 1×10^8 IU/μl.

Το γραμμικό εύρος λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR προσδιορίστηκε αναλύοντας μια σειρά αραιώσης του πάνελ ποσοτικοποίησης OptiQuant HIV-1 RNA από 1×10^8 IU/ml έως 120 IU/ml. Ο καθαρισμός διενεργήθηκε εις διπλούν με χρήση του kit QIAamp DSP Virus (όγκος εκχύλισης: 0,5 ml, όγκος έκλουσης: 25 μl). Καθένα από τα 9 δείγματα αναλύθηκε με χρήση του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Το γραμμικό εύρος λαμβάνοντας υπόψη τον καθαρισμό του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR προσδιορίστηκε ότι καλύπτει συγκεντρώσεις από 120 IU/ml μέχρι τουλάχιστον 1×10^8 IU/ml (βλέπε Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Γραμμικό εύρος του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Υπολογισμός του γραμμικού εύρους της ποσοτικοποίησης. Η ευθεία γραμμή προσδιορίστηκε με γραμμική παλινδρόμηση των \log_{10} υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων με τις \log_{10} ονομαστικές συγκεντρώσεις. Η εξίσωση της γραμμής παλινδρόμησης περιλαμβάνεται στην εικόνα.

Ακρίβεια

Τα δεδομένα ακρίβειας του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR συλλέχθηκαν με τη βοήθεια οργάνων Rotor-Gene και παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού της ολικής διακύμανσης του προσδιορισμού. 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). Τα ληφθέντα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της τυπικής απόκλισης, της διασποράς και του συντελεστή διακύμανσης για το ειδικό παθογόνο και την PCR εσωτερικού μάρτυρα.

Τα δεδομένα ακρίβειας του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR συλλέχθηκαν με χρήση του προτύπου ποσοτικοποίησης της χαμηλότερης συγκέντρωσης (QS4, 10 IU/μl). Η δοκιμασία εκτελέστηκε με 8 θυγατρικούς κλώνους. Τα δεδομένα ακρίβειας υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές C_T των καμπυλών ενίσχυσης (C_T : κύκλος κατωφλίου, βλέπε Πίνακα 3). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η γενική στατιστική διασπορά οποιουδήποτε δείγματος με την αναφερθείσα συγκέντρωση είναι 1,66% (C_T) και 2,15% (C_T) για την ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα. Οι τιμές αυτές βασίζονται στο σύνολο των επιμέρους τιμών των εξεταζομένων μεταβλητοτήτων.

Πίνακας 3. Δεδομένα ακρίβειας με βάση τις τιμές C_T

	Τιμή C_T	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Μεταβλητότητα εντός του προσδιορισμού: Εσωτερικός μάρτυρας	31,24	0,18	0,58
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Μεταβλητότητα μεταξύ προσδιορισμών: Εσωτερικός μάρτυρας	31,65	0,36	1,13
Μεταβλητότητα μεταξύ	35,40	0,61	1,73

παρτίδων: HI Virus-1 RG QS 4			
Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων: Εσωτερικός μάρτυρας	31,20	0,55	1,76
Συνολική διασπορά: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Συνολική διασπορά: Εσωτερικός μάρτυρας	31,40	0,67	2,15

Ανθεκτικότητα

Η επικύρωση της ανθεκτικότητας επιτρέπει τον καθορισμό του συνολικού ποσοστού αποτυχίας του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Εμβολιάσθηκαν 100 HIV αρνητικά δείγματα πλάσματος με 4,5 IU/μl όγκου έκλουσης μάρτυρα RNA του HIV (τριπλάσια συγκέντρωση του αναλυτικού ορίου ευαισθησίας). Μετά από εκχύλιση με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus, τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Το ποσοστό αποτυχίας για τον HIV ανήλθε, για το σύνολο των δειγμάτων, στο 0%. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα του εσωτερικού μάρτυρα αξιολογήθηκε με τον καθαρισμό και ανάλυση των 100 HIV αρνητικών δειγμάτων πλάσματος. Το συνολικό ποσοστό αποτυχίας ανήλθε στο 0%. Δεν παρατηρήθηκαν αναστολές. Για το λόγο αυτό, η ανθεκτικότητα του κιτ *artus* HI Virus-1 είναι $\geq 99\%$.

Αναπαραγωγιμότητα

Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας παρέχουν τη δυνατότητα τακτικής αξιολόγησης της απόδοσης του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR καθώς και μία σύγκριση της αποτελεσματικότητας με άλλα προϊόντα. Αυτά τα δεδομένα λαμβάνονται από τη συμμετοχή σε καθιερωμένα προγράμματα επάρκειας.

Διαγνωστική αξιολόγηση

Το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR αξιολογήθηκε σε μια μελέτη. Συγκρίνοντας το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR με τη δοκιμασία COBAS® TaqMan® HIV-1, 241 δείγματα πλάσματος αναλύθηκαν αναδρομικά. Όλα τα δείγματα πλάσματος είχαν προηγουμένως αναλυθεί σε θετικά ή αρνητικά με χρήση της δοκιμασίας COBAS TaqMan HIV-1 για διάγνωση ρουτίνας.

RNA από HIV για την εξέταση του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR απομονώθηκε με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus, και διενεργήθηκε ανάλυση στο όργανο Rotor-Gene 6000. Για συγκριτική εξέταση με τη δοκιμασία COBAS TaqMan HIV-1, RNA από HIV απομονώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που παρέχονται στο ένθετο της συσκευασίας. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με χρήση του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-

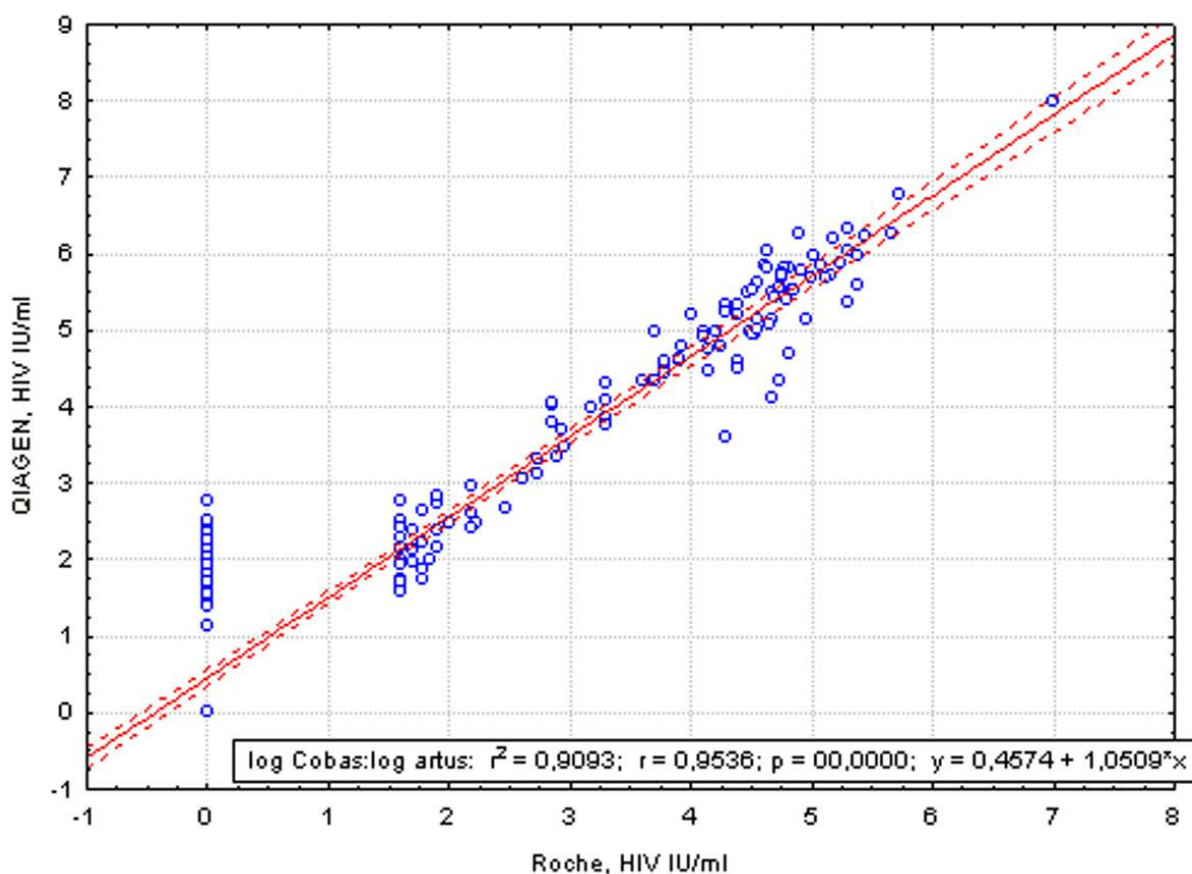
PCR συγκρίθηκαν με εκείνα της δοκιμασίας COBAS TaqMan HIV-1 (βλέπε Πίνακα 4 και Εικόνα 4).

105 από τα 126 δείγματα που ήταν θετικά με τη δοκιμασία COBAS TaqMan HIV-1 ήταν επίσης θετικά με το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 113 από τα 115 δείγματα που ήταν αρνητικά με τη δοκιμασία COBAS TaqMan HIV-1 ήταν επίσης αρνητικά με το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Εάν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας COBAS TaqMan HIV-1 λαμβάνονται ως αναφορά, η διαγνωστική ευαισθησία είναι 98,1%, και η διαγνωστική ειδικότητα είναι 84,3%.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα των 241 δειγμάτων πλάσματος EDTA που αναλύθηκαν αναδρομικά

		Δοκιμασία COBAS TaqMan HIV-1		
		+	-	Σύνολο
Κιτ <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR	+	105	21	126
	-	2	113	115



Εικόνα 4. Σύγκριση της δοκιμασίας COBAS TaqMan HIV-1 (Roche, HIV· με καθαρισμό δείγματος με χρήση του συστήματος COBAS AmpliPrep) με το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR (QIAGEN, HIV· με καθαρισμό δείγματος με χρήση του κιτ QIAamp DSP Virus). Η συσχέτιση των ποσοτικών αποτελεσμάτων και από τα δύο συστήματα δοκιμασίας (Πίνακας 4) αναλύθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα από τα δύο κιτ παρουσιάζονται σε ένα γράφημα (νεφελόγραμμα) ΧΥ με κλίμακα log-log.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια που προμηθεύεται ο χρήστης

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ απομόνωσης RNA (βλέπε «Απομόνωση RNA», σελίδα 25)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)*
- Στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Αναδευτήρας τύπου vortex*
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Όργανο Rotor-Gene Q ή Rotor-Gene*[†] με κανάλια φθορισμού για τα Cycling Green και Cycling Orange ή με κανάλια φθορισμού για τα Cycling A.FAM και Cycling A.ROX
- Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 με έκδοση λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94· Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23) ή υψηλότερη
- Strip Tubes and Caps (Σωληνάρια και καπάκια ταινιών), 0,1 ml, για χρήση με στροφέα 72 φρεατίων (αρ. καταλόγου 981103 ή 981106)
- Εναλλακτικά: PCR Tubes (Σωληνάρια PCR), 0,2 ml, για χρήση με στροφέα 36 φρεατίων (αρ. καταλόγου 981005 ή 981008)
- Cooling block (Τεμάχιο ψύξης) (τεμάχιο φόρτωσης 72 σωληναρίων των 0,1 ml, αρ. καταλόγου 9018901, ή τεμάχιο φόρτωσης 96 σωληναρίων των 0,2 ml, αρ. καταλόγου 9018905)

* Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

[†] Η χρήση του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR δεν επιτρέπεται μαζί με όργανα Rotor-Gene Q 2plex.

Σημαντικές σημειώσεις

Γενικές προφυλάξεις

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

- Χρησιμοποιείτε στείρα ρύγχη πιπέτας με φίλτρο.
- Φυλάσσετε και λαμβάνετε θετικά υλικά (δείγματα, θετικούς μάρτυρες και προϊόντα πολλαπλασιασμού) χωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε χωρικά διαχωρισμένη εγκατάσταση.
- Αποψύχετε σχολαστικά όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.
- Μετά την απόψυξη, αναμίξτε τα συστατικά (πιέζοντας την πιπέτα επαναλαμβανόμενα προς τα επάνω και προς τα κάτω ή με παλμική ανάδευση (vortex)) και φυγοκεντρήστε σύντομα.
- Εργάζεστε γρήγορα και διατηρείτε τα συστατικά σε πάγο ή μέσα στο τεμάχιο ψύξης (τεμάχιο φόρτωσης 72/96 φρεατίων).

Συλλογή, φύλαξη και μεταφορά δειγμάτων

i Όλα τα δείγματα να χειρίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Μόνο τα ακόλουθα υλικά δείγματος είναι επιτρεπτά, για τα οποία πρέπει να τηρούνται αυστηρά οι ακόλουθοι κανόνες και ειδικές οδηγίες σχετικά με τη συλλογή, τη μεταφορά και τη φύλαξη.

i Τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι τώρα καταδεικνύουν το μείγμα πλάσμα-EDTA ή πλάσμα-κιτρικό ως το καταλληλότερο υλικό δείγματος για την ανίχνευση του HIV. Για το λόγο αυτό, συνιστάται να χρησιμοποιείτε αυτά τα υλικά σε συνδυασμό με το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Η εσωτερική τεκμηρίωση της εγκυρότητας του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR έγινε με ανθρώπινα δείγματα πλάσματος-EDTA. Άλλα υλικά δείγματος δεν έχουν επαληθευτεί. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά το συνιστώμενο kit απομόνωσης RNA (βλέπε «Απομόνωση RNA», σελίδα 25) για την προετοιμασία των δειγμάτων.

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

Συλλογή δειγμάτων

Κάθε αιματοληψία έχει σαν αποτέλεσμα τον τραυματισμό αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες, τριχοειδή αγγεία). Επιτρέπεται μόνο η χρήση αβλαβούς και αποστειρωμένου υλικού. Για τη λήψη αίματος διατίθενται υλικά μίας χρήσης. Κατά την παρακέντηση των φλεβών δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται πολύ

λεπτές τριχοειδείς βελόνες. Η λήψη φλεβικού αίματος πρέπει να πραγματοποιείται σε κατάλληλα μέρη της καμπής του αγκώνα, του αντιβραχιόνιου ή της ράχης του καρπού. Το αίμα παραλαμβάνεται με τυποποιημένα σωληνάρια (κόκκινο κάλυμμα, Sarstedt ή ομοιότυπα σωληνάρια άλλου κατασκευαστή). Πρέπει να λαμβάνεται όγκος 5–10 ml αίματος EDTA. Τα σωληνάρια πρέπει να αναδεύονται με ανατροπή αμέσως μετά τη δειγματοληψία (8 x, χωρίς ανατάραξη).

i Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ηπαρινισμένα ανθρώπινα δείγματα (βλέπε «Παρεμβαλλόμενες ουσίες», σελίδα 24).

Αποθήκευση δειγμάτων

Το πλήρες αίμα πρέπει να διαχωρίζεται σε πλάσμα και κυτταρικά συστατικά με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 800–1.600 x g εντός 6 ωρών. Το διαχωρισμένο πλάσμα πρέπει να μεταφερθεί σε αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου. Η ευαισθησία της εξέτασης μπορεί να μειωθεί μέσω κατάψυξης ρουτίνας ή μακροχρόνιας φύλαξης των δειγμάτων. Το ενθυλακωμένο RNA του ιού είναι σταθερό για πολλές ημέρες όταν αποθηκεύεται στους 4°C, για εβδομάδες όταν αποθηκεύεται στους -20°C, αλλά και για μήνες όταν αποθηκεύεται στους -70°C.*

Μεταφορά δειγμάτων

Το υλικό των δειγμάτων θα πρέπει κατ' αρχήν να μεταφέρεται σε άθραυστο δοχείο μεταφοράς. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποτραπεί ο εν δυνάμει κίνδυνος μόλυνσης λόγω διαφυγής του δείγματος. Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται σύμφωνα με τις τοπικές και εθνικές οδηγίες για τη μεταφορά παθογόνων υλικών.†

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

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Τα αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης (≤ 15 mg/dl) και λιπιδίων (≤ 800 mg/dl) και τα αιμολυτικά δείγματα δεν επηρεάζουν το σύστημα. Η ηπαρίνη (≥ 10 IU/ml) επηρεάζει την PCR. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα τα οποία έχουν συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιέχουν ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Επίσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα ασθενών που υποβάλλονται σε αγωγή με ηπαρίνη.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, σελ. 452–456.

† International Air Transport Association (Διεθνής Ένωση Αεροπορικών Μεταφορών, IATA). Dangerous Goods Regulations (Κανονισμοί περί Επικίνδυνων Εμπορευμάτων).

Απομόνωση RNA

Το kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, αρ. καταλόγου 60704) έχει επικυρωθεί για τον καθαρισμό ιικού RNA από ανθρώπινο πλάσμα για χρήση μαζί με το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Εκτελέστε τον καθαρισμό του ιικού RNA σύμφωνα με τις οδηγίες στο εγχειρίδιο kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

i Η χρήση φορέα RNA είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και επομένως για την απόδοση DNA/RNA. Για την αύξηση της σταθερότητας του φορέα RNA που παρέχεται με το kit QIAamp DSP Virus, συνιστούμε να ακολουθείτε τις πληροφορίες σχετικά με την ανασύσταση και τη φύλαξη του φορέα RNA που δίνονται στο εγχειρίδιο οδηγιών («Προετοιμασία αντιδραστηρίων και ρυθμιστικών διαλυμάτων»).

Πριν την έναρξη κάθε εκχύλισης, ένα μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και φορέα RNA (και εσωτερικού μάρτυρα, όπου εφαρμόζεται, βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», παρακάτω) θα πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο σύμφωνα με το σχήμα μεταφοράς με πιπέτα στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σχήμα μεταφοράς με πιπέτα για χρήση με το kit QIAamp DSP Virus

Αριθμός δειγμάτων	1	12
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (AL)*	550 μl	6.600 μl
Φορέας RNA (1 μg/μl)	6,2 μl	74,4 μl
Συνολικός όγκος	556,2 μl	6.674,4 μl
Όγκος ανά εκχύλιση	500 μl	ανά 500 μl

* Περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*) για πληροφορίες ασφάλειας.

i 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.

i Ο εσωτερικός μάρτυρας του kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στη διαδικασία απομόνωσης (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», παρακάτω).

Εσωτερικός μάρτυρας

Παρέχεται ένας εσωτερικός μάρτυρας (HI Virus-1 RG IC). Με τη βοήθειά του, ο χρήστης παρακολουθεί τη διαδικασία απομόνωσης RNA και ελέγχει τυχόν αναστολή της PCR. Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε τον εσωτερικό

μάρτυρα στην απομόνωση, σε αναλογία 0,1 μl ανά 1 μl όγκου έκλουσης. Για παράδειγμα, με χρήση του kit QIAamp DSP Virus, το RNA εκλύεται σε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (AVE). Επομένως, αρχικά θα πρέπει να προστεθούν 6 μl του εσωτερικού μάρτυρα.

i Ο εσωτερικός μάρτυρας και ο φορέας RNA (βλέπε «Απομόνωση RNA», σελίδα 25) πρέπει να προστίθενται μόνο στο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή απευθείας στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

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

i Μην προσθέτετε τον εσωτερικό μάρτυρα και το φορέα RNA απευθείας στο υλικό του δείγματος.

Προαιρετικά, ο εσωτερικός μάρτυρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά για τον έλεγχο τυχόν αναστολής της PCR. Για αυτήν την εφαρμογή, προσθέστε τον εσωτερικό μάρτυρα απευθείας στο μείγμα HI Virus-1 RG Master A και HI Virus-1 RG Master B, όπως περιγράφεται στο βήμα 2β του πρωτοκόλλου (σελίδα 29).

Ρύθμιση του κατωφλίου για την ανάλυση PCR

Οι βέλτιστες ρυθμίσεις κατωφλίου για ένα δεδομένο συνδυασμό του οργάνου Rotor-Gene Q και του kit *artus* RG PCR πρέπει να καθορίζονται εμπειρικά δοκιμάζοντας κάθε επιμέρους συνδυασμό, εφόσον πρόκειται για σχετική τιμή ανάλογα με τη συνολική διαγνωστική ροή εργασίας. Ως σημείο εκκίνησης, το κατώφλι μπορεί να ρυθμιστεί σε μια προκαταρκτική τιμή 0,04 για την ανάλυση της πρώτης εκτέλεσης PCR, αλλά αυτή η τιμή θα πρέπει να ρυθμιστεί περαιτέρω σε μια συγκριτική ανάλυση των επόμενων εκτελέσεων της ροής εργασίας. Το κατώφλι πρέπει να ρυθμιστεί χειροκίνητα μόλις πάνω από το σήμα υποβάθρου των αρνητικών μαρτύρων και αρνητικών δειγμάτων. Η μέση τιμή κατωφλίου που υπολογίζεται από αυτά τα πειράματα το πιθανότερο είναι ότι θα λειτουργεί για την πλειονότητα των μελλοντικών εκτελέσεων, αλλά ο χρήστης θα πρέπει παρόλ' αυτά να πραγματοποιεί ανασκόπηση της παραγόμενης τιμής κατωφλίου σε τακτικά διαστήματα. Η τιμή κατωφλίου θα βρίσκεται συνήθως στο εύρος από 0,03–0,05 και πρέπει να στρογγυλοποιείται σε έως και τρία δεκαδικά ψηφία.

Ποσοτικοποίηση

Τα εσώκλειστα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HI Virus-1 RG QS 1–4) αντιμετωπίζονται ως προηγούμενως καθαρισμένα δείγματα και

χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος (20 µl). Για να δημιουργήσετε μία πρότυπη καμπύλη σε όργανα Rotor-Gene Q θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε και τα 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης και να τα ορίσετε στο πλαίσιο διαλόγου «EDIT SAMPLES» (επεξεργασία δειγμάτων) ως πρότυπα με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (βλέπε εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου).

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

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

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

Συντελεστής μετατροπής

1 IU/ml αντιστοιχεί σε 0,50 αντίγραφα/ml για την ανίχνευση του RNA από HIV-1 στο Rotor-Gene Q σε συνδυασμό με χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIAamp DSP Virus. Ο συντελεστής μετατροπής αποτελεί μια προσέγγιση με βάση ένα μέσο συντελεστή στο δυναμικό εύρος του προσδιορισμού.

* Το πρότυπο έχει βαθμονομηθεί με χρήση του Διεθνούς Προτύπου για τον HIV (Π.Ο.Υ.).

Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων

- i** Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη
- Προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε «Σημαντικές σημειώσεις», σελίδες 23–26.
 - Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το Rotor-Gene Q προτού ξεκινήσετε το πρωτόκολλο. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
 - Βεβαιωθείτε ότι τουλάχιστον ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης καθώς και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό, βαθμού PCR) συμπεριλαμβάνονται ανά εκτέλεση PCR. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήστε και τα 4 παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HI Virus-1 RG QS 1–4) για κάθε εκτέλεση PCR.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι το τεμάχιο ψύξης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q) έχει προψυχθεί στους 2–8°C.
- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποψύχονται πλήρως, να αναμειγνύονται (με επαναλαμβανόμενη πίεση προς τα επάνω και προς τα κάτω της πιπέτας ή με ταχεία ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex) και να φυγοκεντρούνται σύντομα.

Διαδικασία

1. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων PCR στους προσαρμογείς του τεμαχίου ψύξης.
 2. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας απομόνωσης RNA και τον έλεγχο ως προς τυχόν αναστολή της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2α. Εάν χρησιμοποιείτε τον εσωτερικό μάρτυρα αποκλειστικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθήστε το βήμα 2β.
- 2α. Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει ήδη προστεθεί στην απομόνωση (βλέπε «Εσωτερικός μάρτυρας», σελίδα 25). Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.**
- Το μείγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 6. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της απομόνωσης RNA και τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 μl	144 μl
HI Virus-1 RG Master B	18 μl	216 μl
HI Virus-1 RG IC	0 μl	0 μl
Συνολικός όγκος	30 μl	360 μl

- 2β. Ο εσωτερικός μάρτυρας πρέπει να προστεθεί απευθείας στο μείγμα HI Virus-1 Master A και HI Virus-1 Master B. Σε αυτήν την περίπτωση, προετοιμάστε ένα μείγμα master, σύμφωνα με τον Πίνακα 7.**

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

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος master (ο εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τον έλεγχο της αναστολής PCR)

Αριθμός δειγμάτων	1	12
HI Virus-1 RG Master A	12 μl	144 μl
HI Virus-1 RG Master B	18 μl	216 μl
HI Virus-1 RG IC	2 μl	24 μl
Συνολικός όγκος	32 μl*	384 μl*

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

- 3. Διανείμετε με πιπέτα 30 μl του μείγματος master σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 20 μl του εκλουσμένου RNA δείγματος (βλέπε Πίνακα 8). Αντίστοιχα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 20 μl τουλάχιστον ενός από τα πρότυπα ποσοτικοποίησης (HI Virus-1 RG QS 1–4) ως θετικός μάρτυρας και 20 μl νερού (νερό, βαθμού PCR) ως αρνητικός μάρτυρας.**

Πίνακας 8. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR

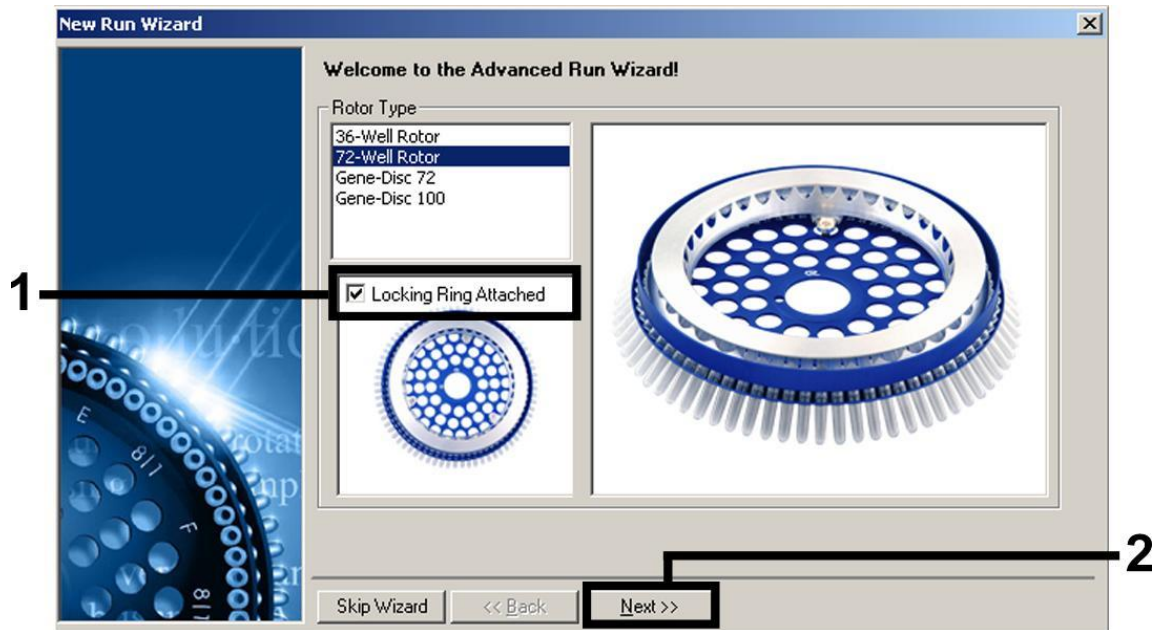
Αριθμός δειγμάτων	1	12
Μείγμα master	30 µl	ανά 30 µl
Δείγμα	20 µl	ανά 20 µl
Συνολικός όγκος	50 µl	ανά 50 µl

4. Κλείστε τα σωληνάρια PCR. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (προαιρετικό εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene) έχει τοποθετηθεί επάνω από το στροφέα για την αποτροπή του ακούσιου ανοίγματος των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
5. Για την ανίχνευση RNA από HIV-1, δημιουργήστε ένα θερμοκρασιακό προφίλ σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού	Σχήματα 5, 6, 7
Αντίστροφη μεταγραφή του RNA	Σχήμα 8
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start	Σχήμα 9
Ενίσχυση του cDNA	Σχήμα 10
Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού	Σχήμα 11
Έναρξη της εκτέλεσης	Σχήμα 12

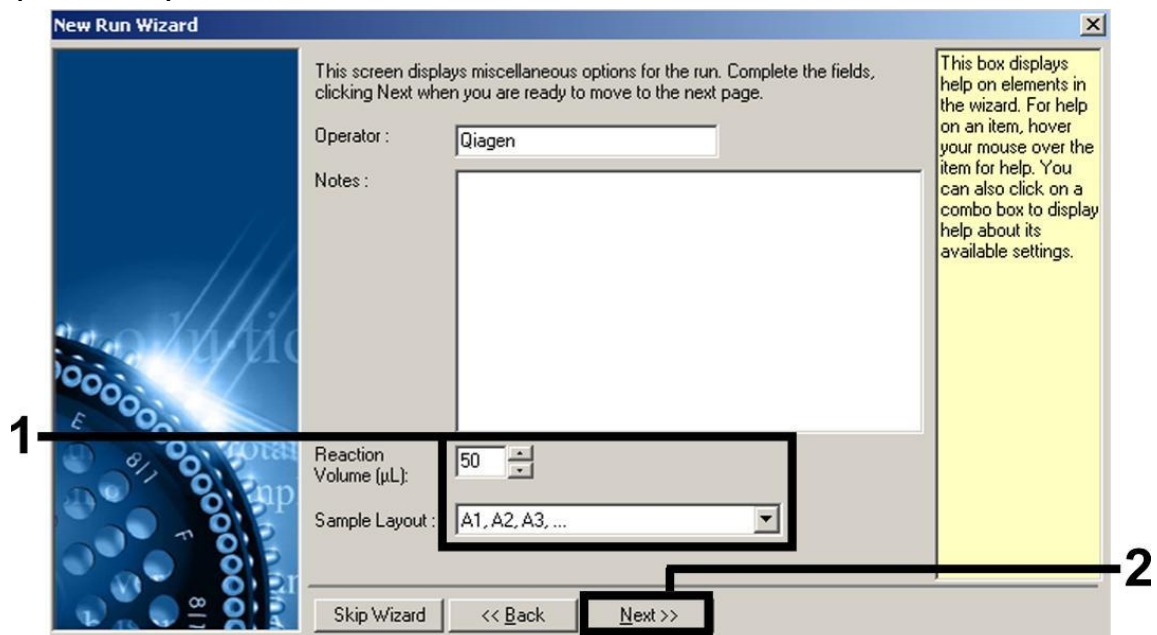
Όλες οι προδιαγραφές αναφέρονται στο Rotor-Gene Q με έκδοση λογισμικού 1.7.94, Rotor-Gene 6000 με εκδόσεις λογισμικού 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, και Rotor-Gene 3000 με έκδοση λογισμικού 6.0.23. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene παρακαλείστε να ανατρέξετε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου. Στις απεικονίσεις, οι ρυθμίσεις αυτές πλαισιώνονται με έντονο μαύρο χρώμα. Περιλαμβάνονται απεικονίσεις για τα όργανα Rotor-Gene Q. Όπου απαιτούνται διαφορετικές τιμές για το Rotor-Gene 3000, αυτές οι διαφορές περιγράφονται στο κείμενο.

6. Ανοίξτε κατ'αρχήν το πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 5). Επιλέξτε το πλαίσιο «LOCKING RING ATTACHED» (προσαρτημένος δακτύλιος ασφάλισης) και κάντε κλικ στο «NEXT» (επόμενο).



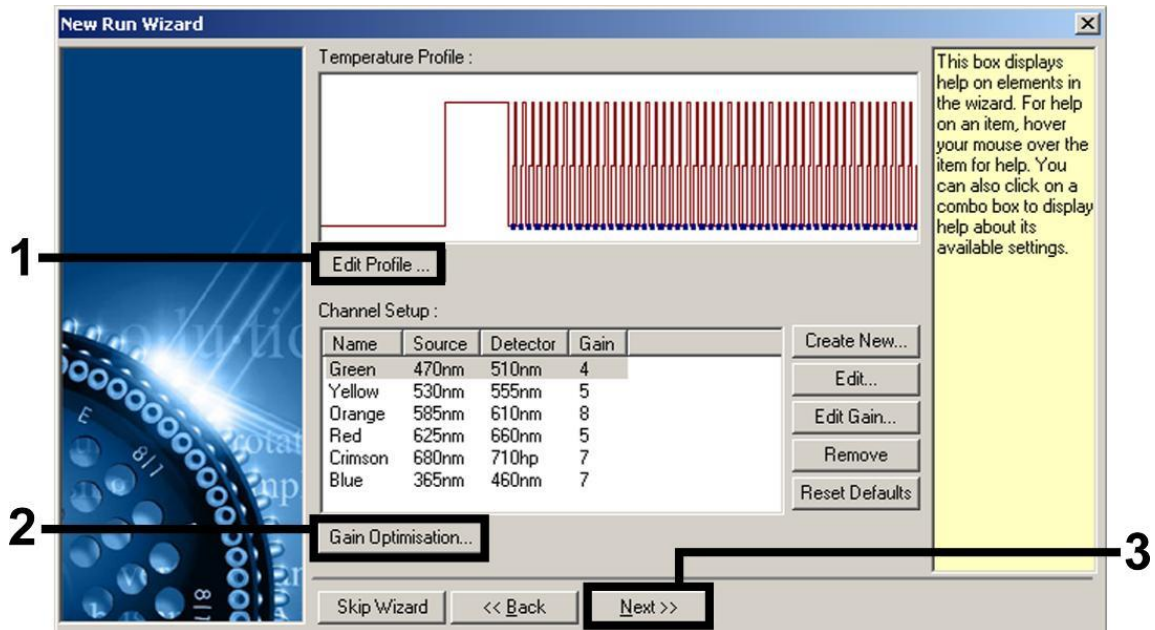
Εικόνα 5. Το πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD».

7. Επιλέξτε 50 ως τον όγκο αντίδρασης PCR και κάντε κλικ στο «NEXT» (Εικόνα 6).

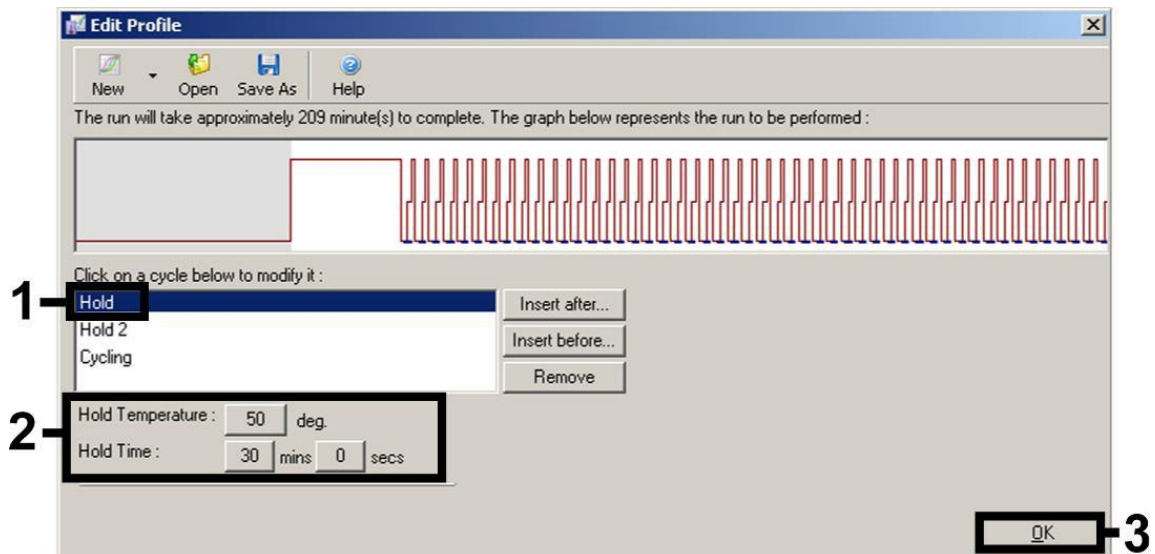


Εικόνα 6. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων του προσδιορισμού.

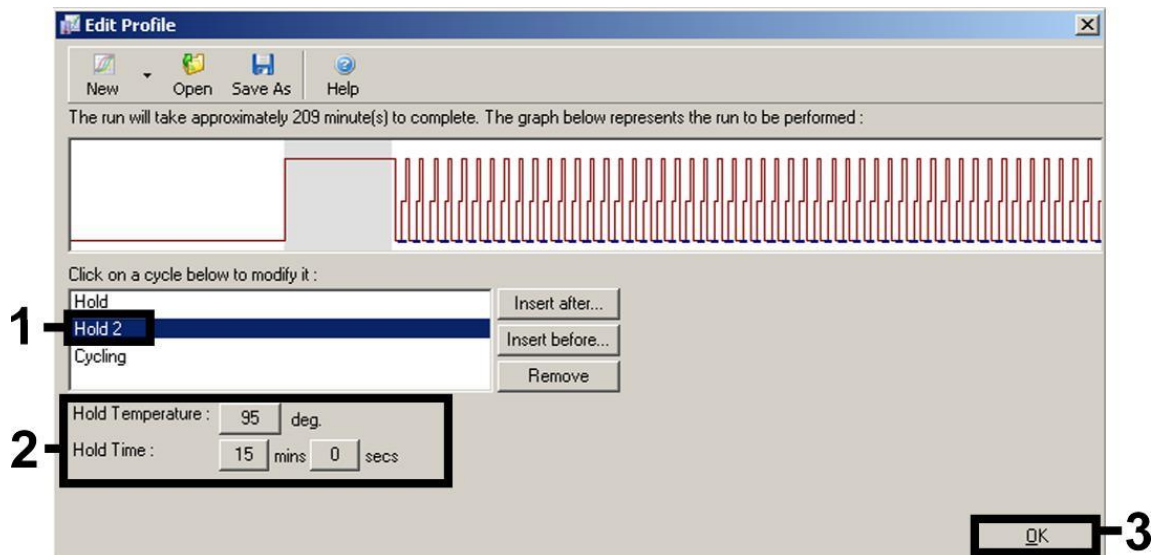
8. Κάντε κλικ στο κουμπί «EDIT PROFILE» (επεξεργασία προφίλ) στο ακόλουθο πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (Εικόνα 7) και προγραμματίστε το θερμοκρασιακό προφίλ με τον τρόπο που φαίνεται στις Εικόνες 7–10.



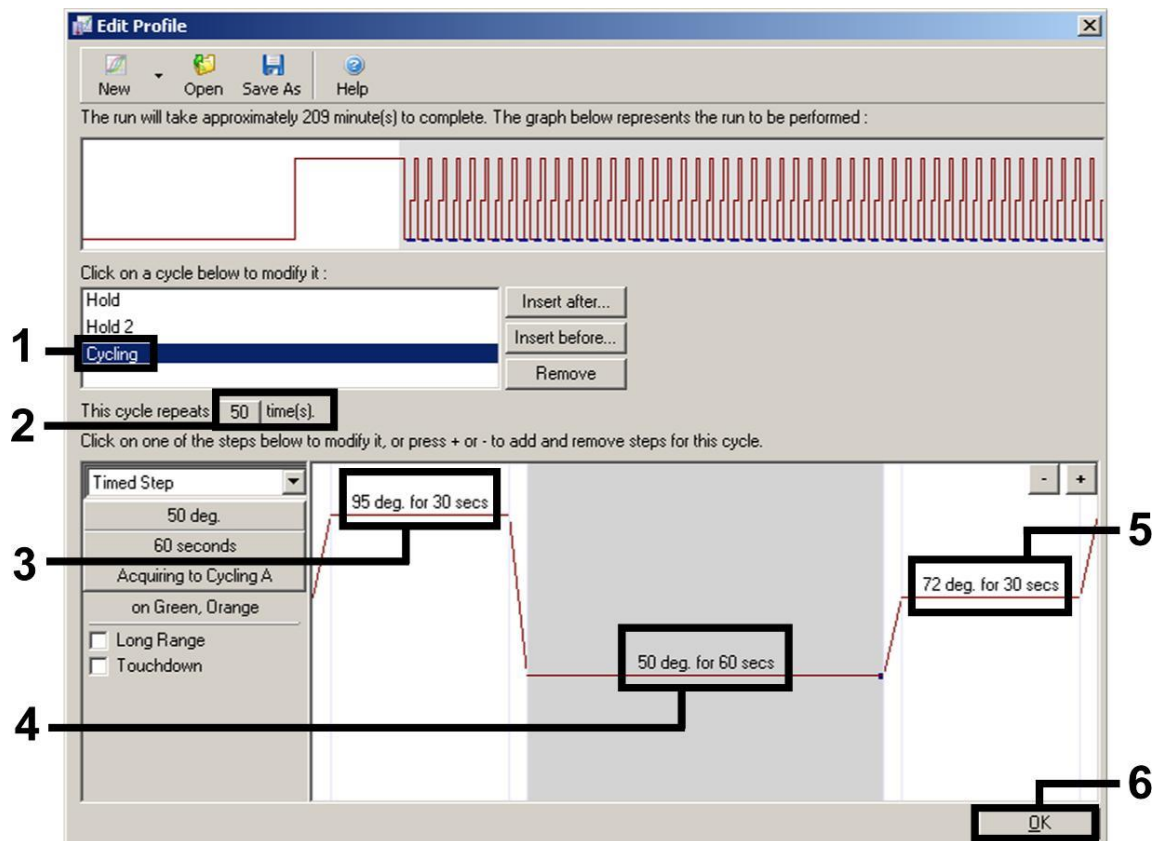
Εικόνα 7. Επεξεργασία του προφίλ.



Εικόνα 8. Αντίστροφη μεταγραφή του RNA.



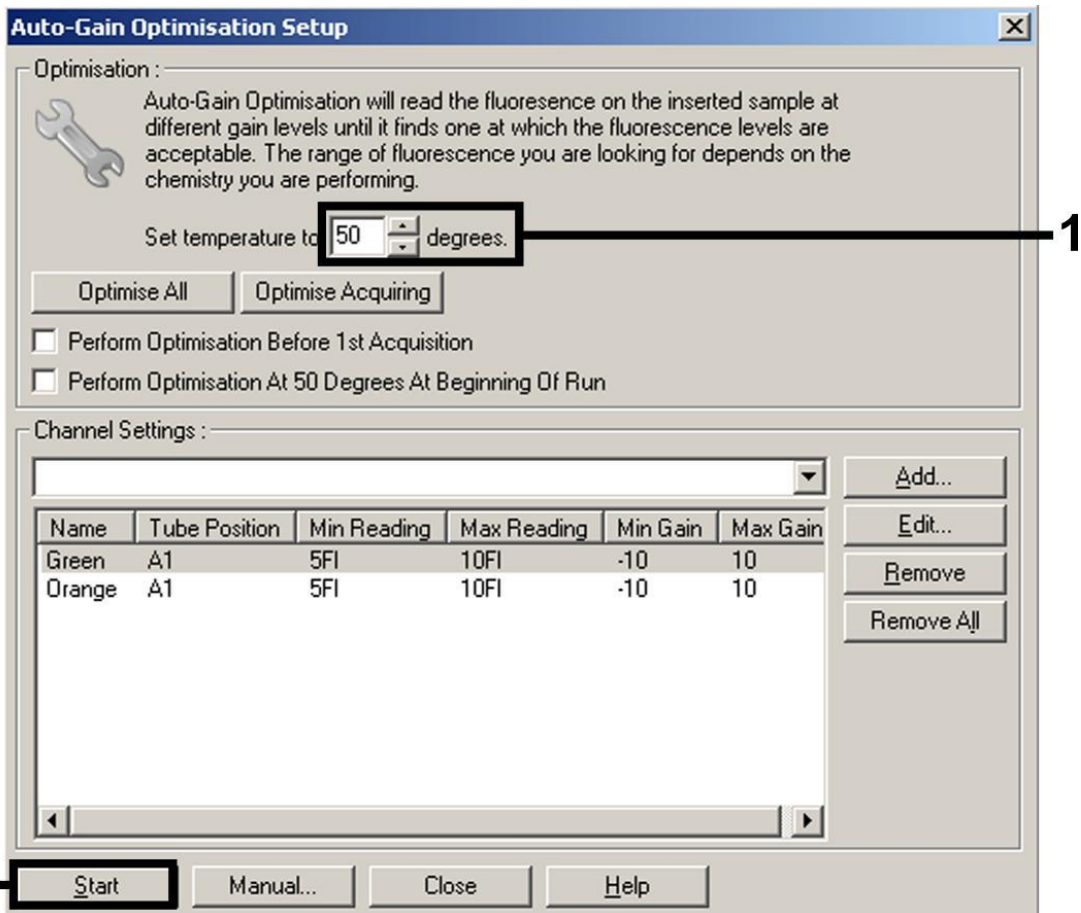
Εικόνα 9. Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου hot-start.



Εικόνα 10. Ενίσχυση του cDNA. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr, ROX».

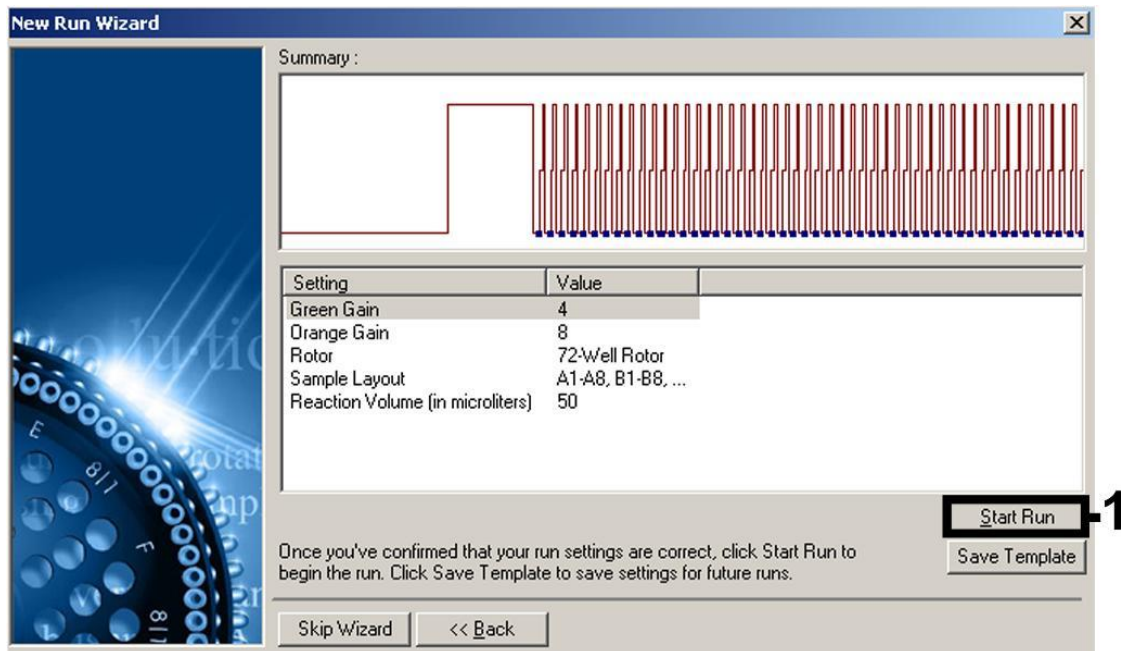
9. Τό εύρος ανίχνευσης των καναλιών φθορισμού πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις εντάσεις φθορισμού στα σωληνάρια PCR. Κάντε κλικ στο «GAIN OPTIMISATION» (βελτιστοποίηση απολαβής) στο πλαίσιο διαλόγου «NEW RUN WIZARD» (βλέπε Εικόνα 7) για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου «AUTO-GAIN OPTIMISATION SETUP» (ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής). Ρυθμίστε τη θερμοκρασία βαθμονόμησης στο 50 για να αντιστοιχεί στη

θερμοκρασία ανασύνδεσης του προγράμματος ενίσχυσης (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Προσαρμογή της ευαισθησίας του καναλιού φθορισμού. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «ROX».

10. Οι τιμές απολαβής που καθορίζονται από τη βαθμονόμηση του καναλιού αποθηκεύονται αυτομάτως και παρατίθενται στο τελευταίο παράθυρο μενού της διαδικασίας προγραμματισμού (Εικόνα 12). Κάντε κλικ στο «START RUN» (εκκίνηση εκτέλεσης).



Εικόνα 12. Έναρξη της εκτέλεσης. Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, το λογισμικό θα καθορίζει τις φθορίζουσες χρωστικές ως «FAM/Sybr» και «ROX».

11. . Τα ακόλουθα αποτελέσματα (11α, 11β και 11γ) είναι διαθέσιμα. Παραδείγματα θετικών και αρνητικών αντιδράσεων PCR παρέχονται στην Εικόνα 13 και στην Εικόνα 14.

Ο Πίνακας 9 παρουσιάζει κατευθυντήριες οδηγίες για την ερμηνεία των ποσοτικών αποτελεσμάτων.

- 11α. Ανιχνεύτηκε σήμα στο κανάλι φθορισμού **Cycling Green**. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι θετικό: το δείγμα περιέχει RNA από HIV-1.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ανίχνευση ενός σήματος στο κανάλι Cycling Orange μπορεί να αγνοηθεί, και αυτό διότι υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις RNA από HIV-1 (θετικό σήμα στο κανάλι Cycling Green) μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση ή απώλεια σήματος φθορισμού του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Orange (ανταγωνισμός).



Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM για το θετικό σήμα και Cycling A.ROX για τον εσωτερικό μάρτυρα.

11β. Στο κανάλι φθορισμού Cycling Green δεν ανιχνεύεται σήμα. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται σήμα του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι Cycling Orange. Στο δείγμα δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο RNA του HIV-1. Το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό.

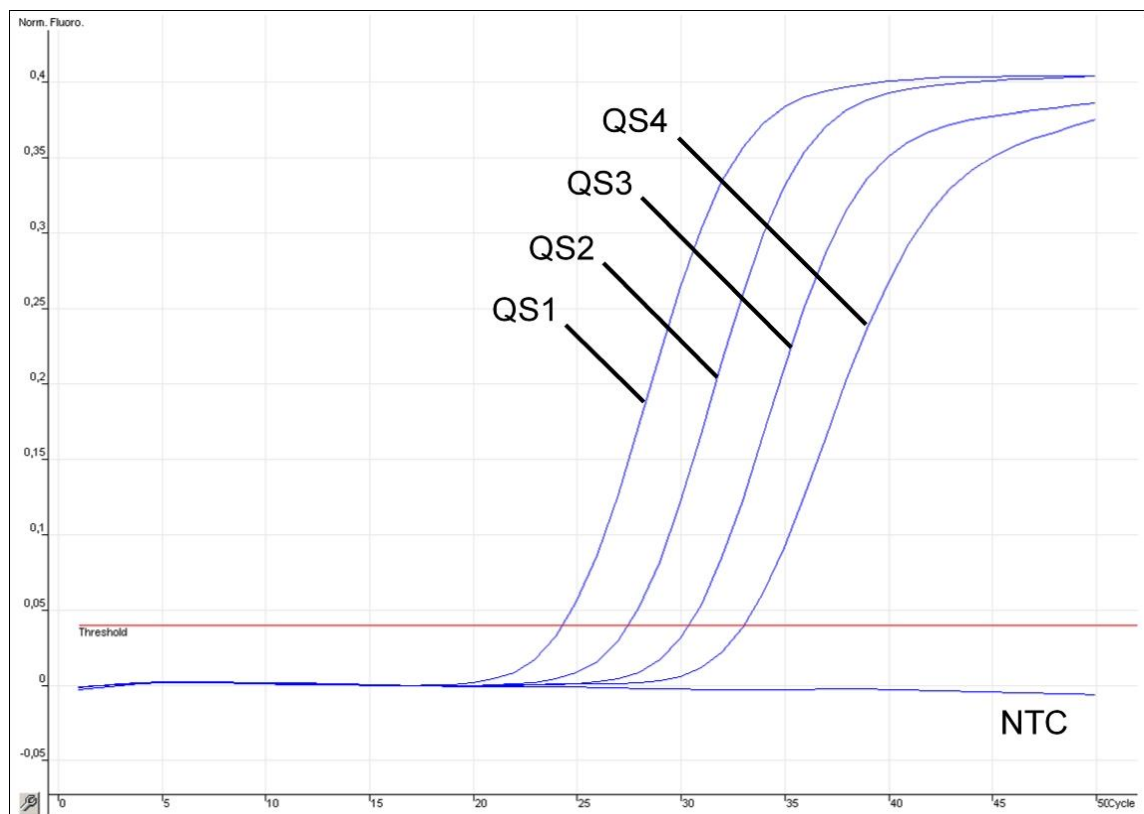
Στην περίπτωση αρνητικής RT-PCR για τον ιό HIV-1, το ανιχνευμένο σήμα του εσωτερικού μάρτυρα αποκλείει το ενδεχόμενο αναστολής της RT-PCR.

i Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.ROX για τον εσωτερικό μάρτυρα και απουσία σήματος για το Cycling A.FAM.

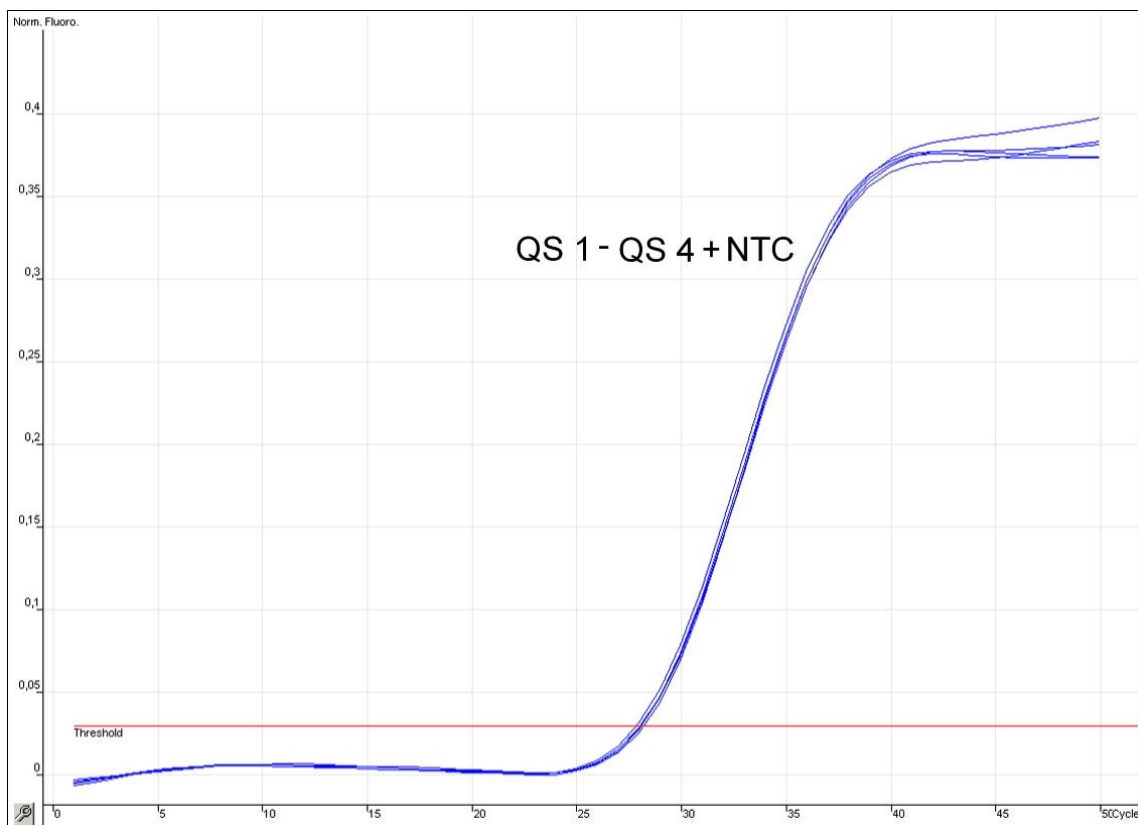
11γ. Κανένα σήμα δεν ανιχνεύεται στο κανάλι Cycling Green ή στο κανάλι Cycling Orange. Η λήψη αποτελέσματος δεν είναι δυνατή.

Πληροφορίες σχετικά με τις πηγές σφαλμάτων και την επίλυσή τους θα βρείτε στο «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», σελίδα 38.

i Σημειώστε ότι, στο Rotor-Gene 3000, τα αντίστοιχα κανάλια είναι Cycling A.FAM και Cycling A.ROX.



Εικόνα 13. Ανίχνευση των προτύπων ποσοτικοποίησης (HI Virus-1 RG QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green. NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 14. Ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα (IC) στο κανάλι φθορισμού **Cycling Orange** με ταυτόχρονη ενίσχυση των προτύπων ποσοτικοποίησης (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (αρνητικός μάρτυρας).

Πίνακας 9. Ερμηνεία των ποσοτικών αποτελεσμάτων






Αποτέλεσμα	Ερμηνεία
HIV RNA >72 IU/ml	Το αποτέλεσμα βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους δοκιμασίας. Η πιθανότητα ανίχνευσης HIV RNA είναι >95%. Το θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας είναι στατιστικά διασφαλισμένο.
HIV RNA <72 IU/ml	Το αποτέλεσμα βρίσκεται εκτός του καθορισμένου εύρους δοκιμασίας. Η αναπαραγωγικότητα του θετικού αποτελέσματος δεν είναι διασφαλισμένη.
HIV RNA negative	Δεν ανιχνεύτηκε HIV RNA.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι(-ες) να απαντήσουν σε οποιεσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com).






Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος με θετικούς μάρτυρες (HI Virus-1 RG QS 1–4) στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM

- α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για ανάλυση δεδομένων PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο  Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM για την ανάλυση HI Virus-1 RT-PCR και το κανάλι φθορισμού Cycling Orange ή Cycling A.ROX για την RT-PCR εσωτερικού μάρτυρα.
- β) Λανθασμένος προγραμματισμός του θερμοκρασιακού προφίλ στο όργανο Rotor--Gene  Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 28.
- γ) Λανθασμένη διαμόρφωση της PCR  Ελέγξτε τα βήματα του σχήματος διανομής με πιπέτα και επαναλάβετε την PCR εάν είναι απαραίτητο. Βλέπε «Πρωτόκολλο: PCR και ανάλυση δεδομένων», σελίδα 28.
- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση» (σελίδα 7)  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο kit, εάν χρειαστεί.
- ε) Το kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR έχει λήξει  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο kit, εάν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα στο κανάλι φθορισμού *Cycling Orange* ή *Cycling A.ROX* και ταυτόχρονη απουσία σήματος στο κανάλι *Cycling Green* ή *Cycling A.FAM*

- α) Οι συνθήκες PCR δεν συμμορφώνονται με το πρωτόκολλο  Ελέγξτε τις συνθήκες PCR (βλ. παραπάνω) και επαναλάβετε την PCR με διορθωμένες ρυθμίσεις, εάν είναι απαραίτητο.
- β) Συνέβη αναστολή της PCR  Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- γ) Χάθηκε RNA κατά την εκχύλιση  Εάν ο εσωτερικός μάρτυρας προστέθηκε στην εκχύλιση, η απουσία σήματος του εσωτερικού μάρτυρα μπορεί να υποδεικνύει απώλεια RNA κατά την εκχύλιση. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη μέθοδο απομόνωσης (βλέπε «Απομόνωση RNA», σελίδα 25) και ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- δ) Οι συνθήκες φύλαξης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση» (σελίδα 7)  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.
- ε) Το κιτ *artus HI Virus-1 RG RT-PCR* έχει λήξει  Ελέγξτε τις συνθήκες φύλαξης και την ημερομηνία λήξης (βλ. ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε νέο κιτ, εάν χρειαστεί.

Σχόλια και προτάσεις

Σήματα με τους αρνητικούς μάρτυρες στο κανάλι φθορισμού Cycling Green ή Cycling A.FAM της ανάλυσης PCR

α) Συνέβη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR

ⓘ Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε αντίγραφα.

ⓘ Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.

ⓘ Βεβαιωθείτε πως οι θετικοί μάρτυρες διανέμονται με πιπέτα τελευταίοι.

ⓘ Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

β) Συνέβη επιμόλυνση κατά την εκχύλιση

ⓘ Επαναλάβετε την εκχύλιση και την PCR του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο, χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.

ⓘ Βεβαιωθείτε πως ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μία μεγάλη, ενημερωμένη online βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της QIAGEN. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε – είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού ή ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κτλ.

Για ένα πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με το Τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: 2 Master, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (96)	Για 96 αντιδράσεις: 2 Master, 4 πρότυπα ποσοτικοποίησης, εσωτερικός μάρτυρας, νερό (βαθμού PCR)	4513265
QIAamp DSP Virus Kit — για τον καθαρισμό ιικών νουκλεϊκών οξέων από ανθρώπινο πλάσμα για in vitro διαγνωστικούς σκοπούς		
QIAamp DSP Virus Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες περιδίνισης QIAamp MinElute [®] , ρυθμιστικά διαλύματα, αντιδραστήρια, σωληνάρια, επεκτάσεις στήλης και σύνδεσμοι VacConnector	60704
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002022

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

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q — για εξαιρετική απόδοση στην PCR πραγματικού χρόνου		
Rotor-Gene Q 5plex System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001580

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
Rotor-Gene Q 6plex System	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Όργανο PCR πραγματικού χρόνου με 6 κανάλια (μπλε, πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ), συμπεριλαμβάνεται φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9001590
Παρελκόμενα Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης με μία πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml.	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία της αντίδρασης σε τυπική διάταξη 8 x 12 με χρήση 96 σωληναρίων των 0,2 ml.	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 1.000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2.500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και καπακιών για 10.000 αντιδράσεις	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1.000)	1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10.000)	10 x 1.000 σωληνάρια λεπτού τοιχώματος για 1.000 αντιδράσεις	981008

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Οι οδηγίες ή τα εγχειρίδια χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στο www.qiagen.com ή μπορούν να ζητηθούν από τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή από τον τοπικό σας διανομέα.

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

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.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute®, Rotor-Gene® (Όμιλος QIAGEN)· COBAS®, TaqMan® (Όμιλος Roche)· FAM™, ROX™ (Life Technologies Corporation)· SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

Το κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR και το κιτ QIAamp DSP Virus είναι διαγνωστικά κιτ που φέρουν τη σήμανση CE σύμφωνα με την Οδηγία 98/79/EK για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα για τη διάγνωση in vitro. Δεν διατίθεται σε όλες τις χώρες.

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο κιτ artus HI Virus-1 RG RT-PCR* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτά τα κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο κιτ artus HI Virus-1 RG RT-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 κιτ και/ή η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ 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 κιτ 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 κιτ και/ή τα συστατικά του.

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

© 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

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)

