

# Προϋποθέσεις εφαρμογής και έλεγχος ποιότητας μοριακών τεχνικών για τη διάγνωση λοιμώξεων

**Α. Μεντής**

Διαγνωστικό Εργαστήριο Λοιμωδών Νοσημάτων  
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Γρίπης Νοτίου Ελλάδος  
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Ερυθράς/Ιλαράς Ελλάδος,  
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Πολιοϊών/Εντεροϊών Ελλάδος  
Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας

**ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ**



# Θέματα προς συζήτηση

- Επιμολύνσεις: πρόληψη - αντιμετώπιση
- Θέματα βιοασφάλειας
- Βελτιστοποίηση μοριακών μεθόδων
- Επιβεβαίωση / επικύρωση μεθόδων
- Control που πρέπει να χρησιμοποιούνται



# Επιμολύνσεις μοριακών μεθόδων



# Πρόληψη επιμολύνσεων

Διαχωρισμός χώρων πραγματοποίησης PCR

Καλή εργαστηριακή πρακτική

Φυσικές μέθοδοι διαχωρισμού

Παρασκευή DNA/RNA σε BSC ή hood ή PCR-workstation

Φίλτρα στα tips

Υπεριώδης ακτινοβολία

Αντιδραστήρια PCR σε μικρές ποσότητες

Χρησιμοποίηση μαρτύρων

Αδρανοποίηση προϊόντων πολλαπλασιασμού με  
χημικές/βιοχημικές μεθόδους

Κλειστά συστήματα





E.I. Pasteur

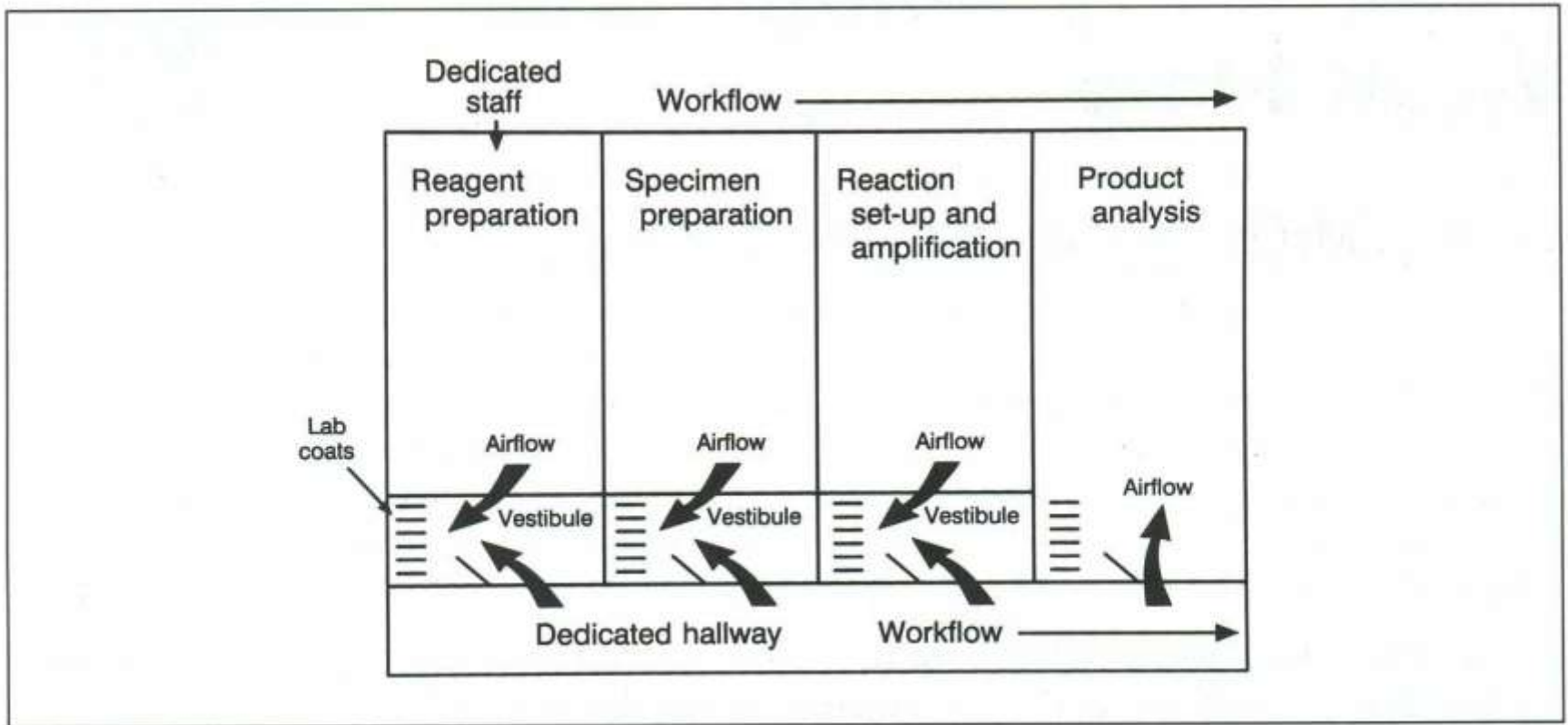
# Ερώτηση

Ποια από τις παρακάτω τεχνικές έχει τον μικρότερο κίνδυνο επιμολύνσεων

- A. RT-PCR
- B. real time PCR
- Γ. nested PCR
- Δ. PCR



# Diagnostic Molecular Microbiology, 1993



# Διαχείριση κλινικών δειγμάτων & μοριακή ανάλυση

## Προετοιμασία αντιδραστηρίων PCR

Κλινικό Δείγμα

Λύση-Καθαρισμός

Απομόνωση  
Νουκλεϊκού Οξέος

mRNA  
Ίικό RNA  
rRNA

### Προετοιμασία των δειγμάτων

### Προετοιμασία της αντίδρασης

RT-PCR

cDNA

### Εκτέλεση της αντίδρασης

Κλωνοποίηση

Αλληλούχηση

### Ανάλυση των προϊόντων

Προϊόντα

Ηλεκτροφόρηση





# Προετοιμασία αντιδραστηρίων PCR

## Προετοιμασία των δειγμάτων

## Προετοιμασία της αντίδρασης

## Εκτέλεση της αντίδρασης

## Ανάλυση των προϊόντων

Κλινικό Δείγμα

Λύση-Καθαρισμός

Απομόνωση  
Νουκλεϊκού Οξέος

mRNA  
Ίικό RNA  
rRNA

Γενωμικό DNA

RT-PCR

cDNA

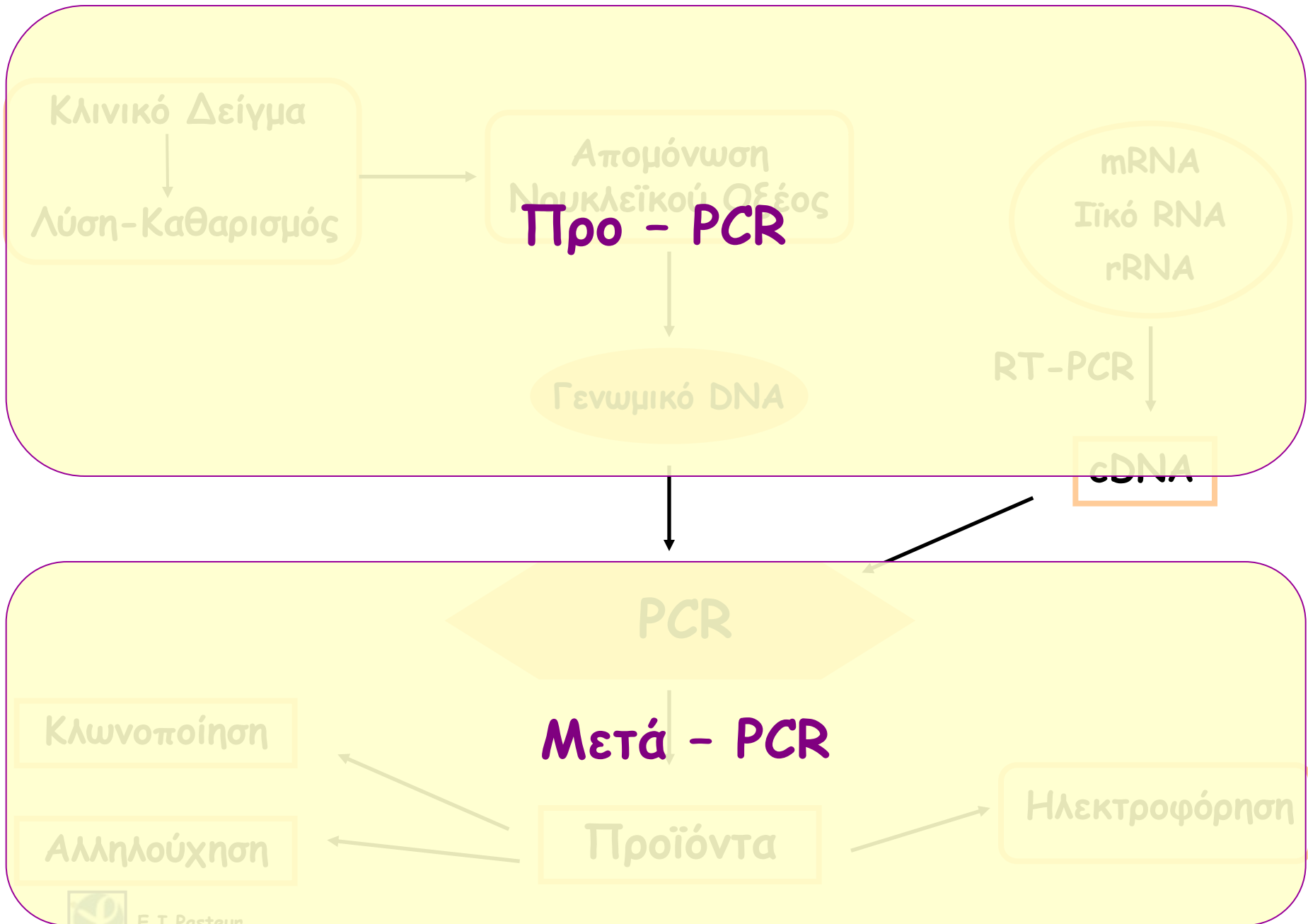
Κλωνοποίηση

Αλληλούχηση

Προϊόντα

Ηλεκτροφόρηση





# ΧΩΡΟΤΑΞΙΚΟΣ Διαχωρισμός των 2 φάσεων



Κατεργασία των δειγμάτων

Εκτέλεση PCR  
Ανάλυση προϊόντων

**Pre-PCR lab**

**Post-PCR lab**

Ροή δειγμάτων  
για εκτέλεση PCR





# Ερώτηση

Ο μικρότερος απαιτούμενος αριθμός χώρων (δωματίων) για τη σωστή εκτέλεση μίας διαγνωστικής PCR είναι:

- Α. 4 χώροι
- Β. 3 χώροι
- Γ. 2 χώροι
- Δ. 5 χώροι



# Το PCR του ...φτωχού

- Ένας χώρος → χρήση θαλάμων βιολογικής ασφάλειας, PCR workstation, χρήση απολυμαντικών και UV
- **Όχι σε χώρο καλλιέργειών μικροοργανισμών!**
- Χρονικός χωρισμός!
- Core PCR facility!



# Ζητήματα βιοασφάλειας (CMR)

- Σε ποιά φάση της επεξεργασίας του δείγματος αυτό γίνεται μη μολυσματικό?
  - Πολλά kit περιέχουν άλατα γουανιδίνης, τα οποία διασπούν την κυτταρική ακεραιότητα και εξουδετερώνει τις ανασταλτικές ουσίες.
  - Εργασία σε Θάλαμο Βιοασφάλειας (BSC)
  - Αυτόκαυστο



# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

## Αντιδραστήρια-συνθήκες PCR

- συγκέντρωση Mg
- συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών που επιδρούν στην ευαισθησία και ειδικότητα
- θερμοκρασίες πρόσδεσης - (annealing)
- πολυμεράση





# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

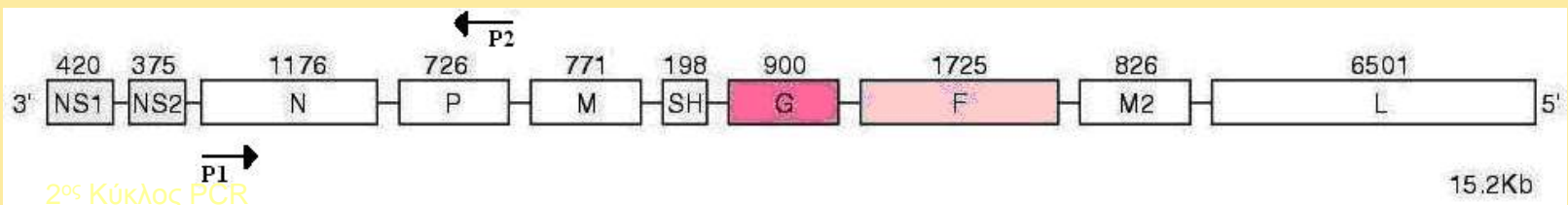


# Multiplex Nested RT-PCR για την ανίχνευση και τυποποίηση του αναπνευστικού ιού

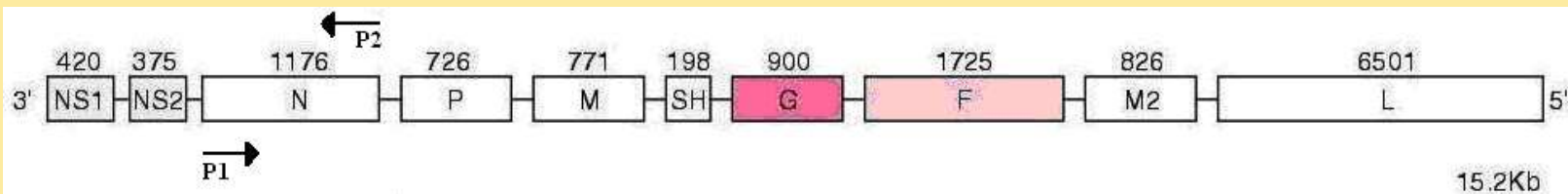
J Clin Microbiol 1998; 36: 2990-2995

- Γονίδιο στόχος: Νουκλεοπρωτεΐνη (N) και Φωσφοπρωτεΐνη (P), N

1<sup>ος</sup> Κύκλος PCR



2<sup>ος</sup> Κύκλος PCR



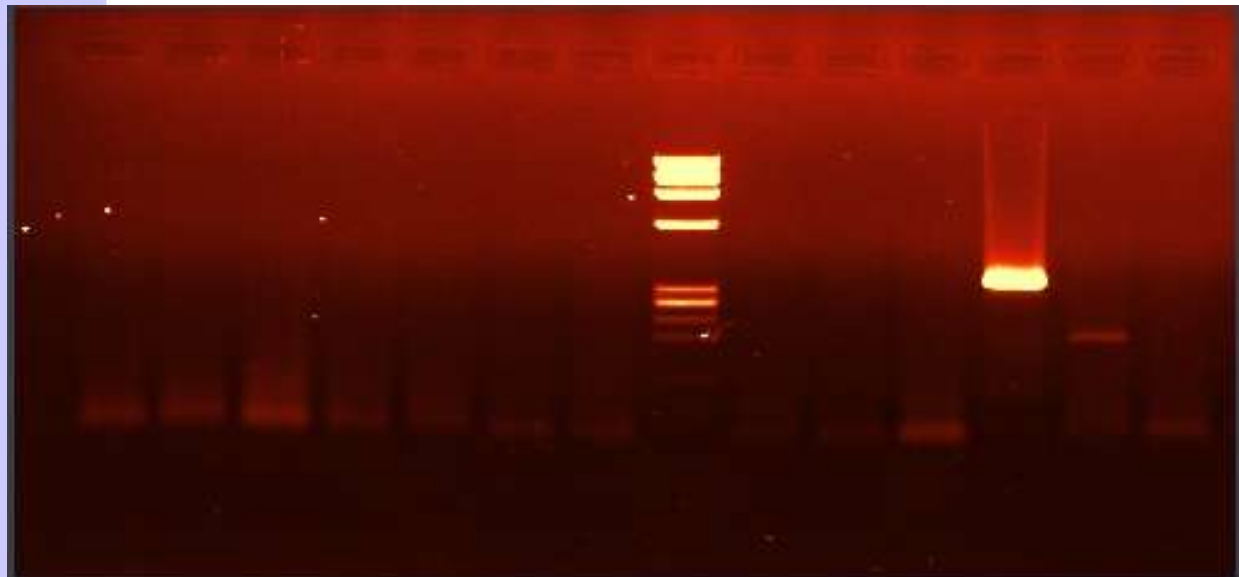


# QUALITY CONTROL for MOLECULAR DIAGNOSTICS

Block 4, Kelvin Campus,  
West of Scotland Science Park,  
Glasgow, G20 0SP  
Scotland

Tel: +44 (0) 141 945 6474  
Fax: +44 (0) 141 945 5795  
www.qcmd.org  
info@qcmd.org

## EISS 2006 Molecular RSV Proficiency Programme



programme.

Expected  
Result

RSV06-07	
RSV06-08	
RSV06-09	
RSV06-10	

1:DMEM/FCS - Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Foetal Calf Serum.



## Προετοιμασία δειγμάτων

1. Σε μικροσωληνάρια (0,5ml) της PCR τοποθετούνται τα εξής αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10	1X
dNTP μίγμα (10mM)	2	0,2mM
MgCl <sub>2</sub>	3	1,5mM
Primer 1 (20μM)	2,5	0,5μM
Primer 2 (20μM)	2,5	0,5μM
DNA	4	
Ταq πολυμεράση (1/10 Dilution)	4	1U/μl
dH <sub>2</sub> O	72	

- Συνολικός όγκος 100μl
- Το ποσό του H<sub>2</sub>O προστίθεται ανάλογα με τον όγκο του DNA που πρέπει να χρησιμοποιηθεί.

2. Σύντομη φυγοκέντρωση για λίγα sec ώστε τα αντιδραστήρια να συγκεντρωθούν στον πάτο του σωλήνα. Ανάδευση. Σύντομη φυγοκέντρωση.

3. Τοποθέτηση του δείγματος και του αρνητικού μάρτυρα στη συσκευή PCR.

4. Η συσκευή προγραμματίζεται ως εξής:

95°C @ 5min  
x 1 φορά

93°C @ 30sec: μετουσίωση  
55°C @ 30sec: σύνδεση των primers  
72°C @ 45sec: σύνθεση DNA  
x 35 κύκλους

72°C @ 8min: extension DNA

Διαρκώς (Hold) 4°C

Θα ακολουθήσει ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (2%) που περιέχει EtBr (0,5μg/ml).



# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

- Επιλογή συγκεντρώσεων Mg
- Επιλογή συγκεντρώσεων εκκινητών
- Βελτιστοποίηση θερμοκρασιών



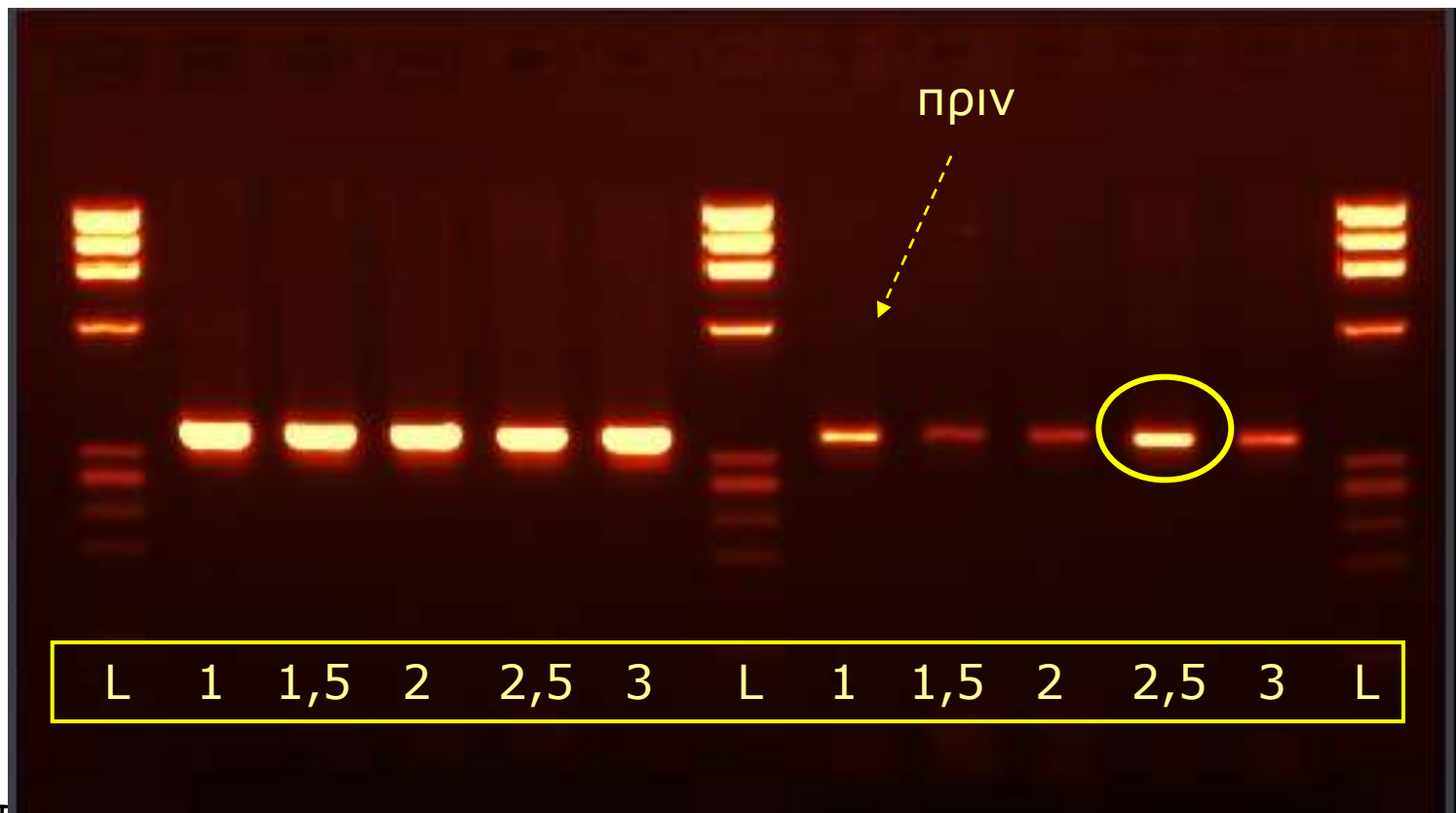
# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

- **Επιλογή συγκεντρώσεων Mg**
- Επιλογή συγκεντρώσεων εκκινητών
- Βελτιστοποίηση θερμοκρασιών



# Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης $MgCl_2$ στην 1<sup>η</sup> PCR.

- Εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις  $MgCl_2$  οι οποίες κυμαίνονταν από 1 mM ως και 3mM



# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

- Επιλογή συγκεντρώσεων Mg
- **Επιλογή συγκεντρώσεων εκκινητών**
- Βελτιστοποίηση θερμοκρασιών





# Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών

- Stock of primers: 100pmol/μl

- Υποδιπλάσιες αραιώσεις:

50pmol/μl,

25pmol/μl,

12,5pmol/μl,

6,25pmol/μl και

3,125pmol/μl

για κάθε έναν από τους εκκινητές.



# Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών

F primer

R primer

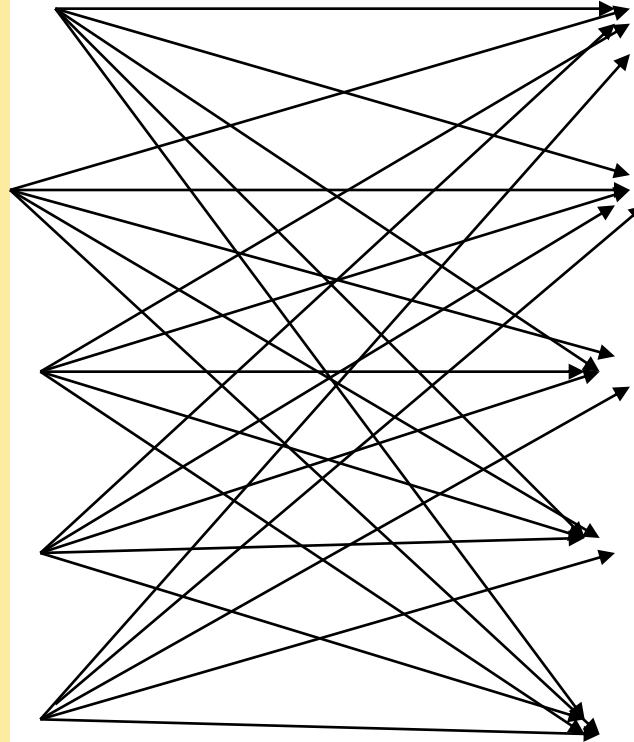
50pmol/μl

25pmol/μl

12,5pmol/μl

6,25pmol/μl

3,125pmol/μl



50pmol/μl

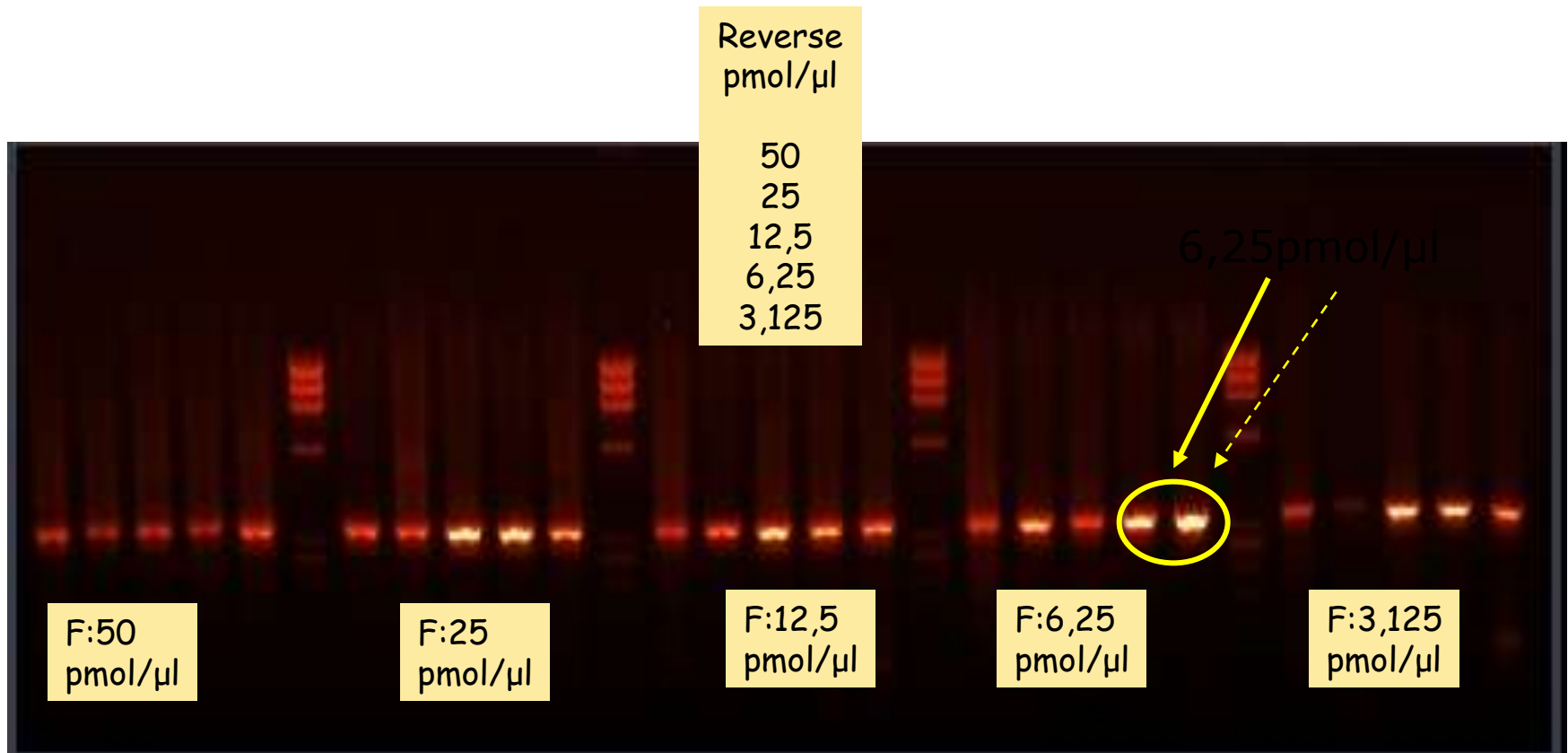
25pmol/μl

12,5pmol/μl

6,25pmol/μl

3,125pmol/μl

# Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινήτων για την 1<sup>η</sup> PCR



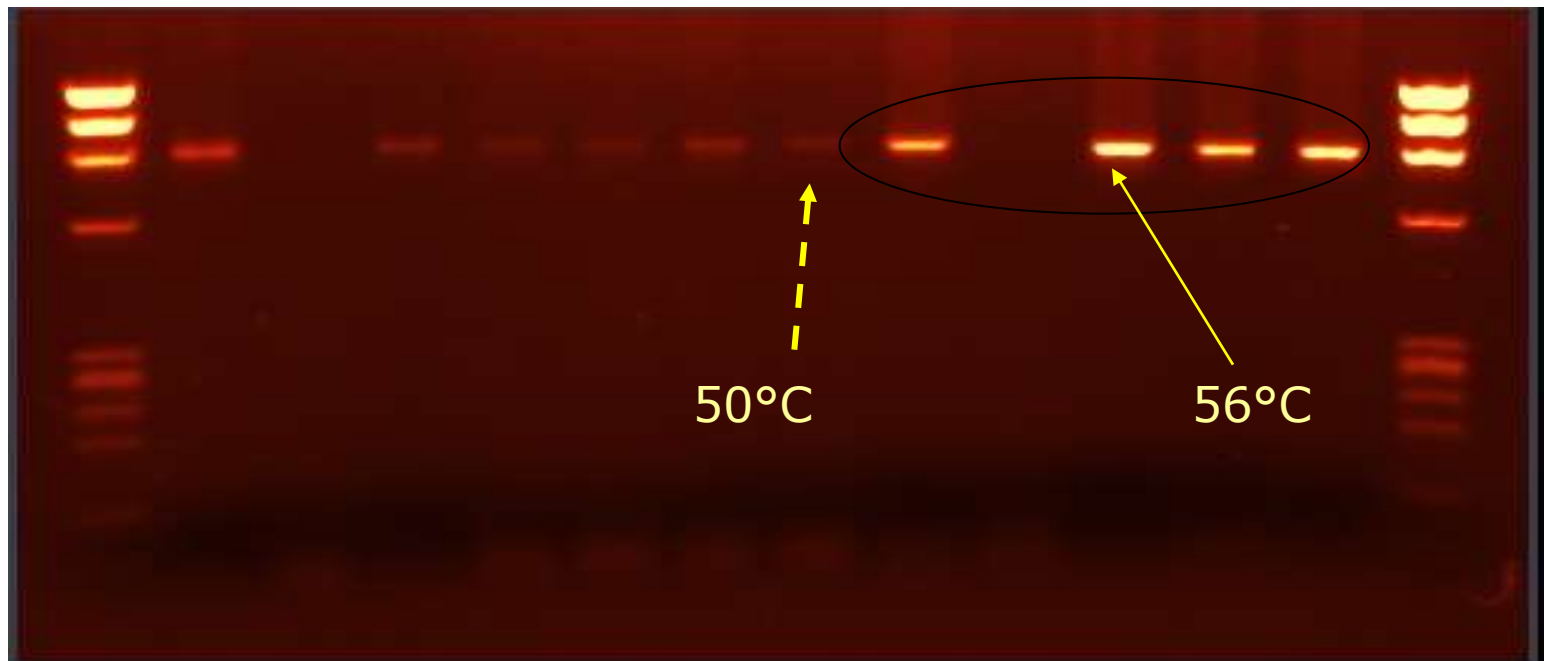
# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

- Επιλογή συγκεντρώσεων Mg
- Επιλογή συγκεντρώσεων εκκινήτων
- **Βελτιστοποίηση θερμοκρασιών**



# Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών στην 1<sup>η</sup> PCR.

- Εφαρμογή της μεθόδου σε εύρος θερμοκρασιών 42-57,5°C



## Σύγκριση πριν και μετά την βελτιστοποίηση

	Μονάδες	Πριν ...	Μετά...
Primers	pmol/μl	3,125	6,25
Annealing Temperature	°C	50	56
MgCl <sub>2</sub>	mM	1	2,5
dNTPs	mM	0,2	0,2



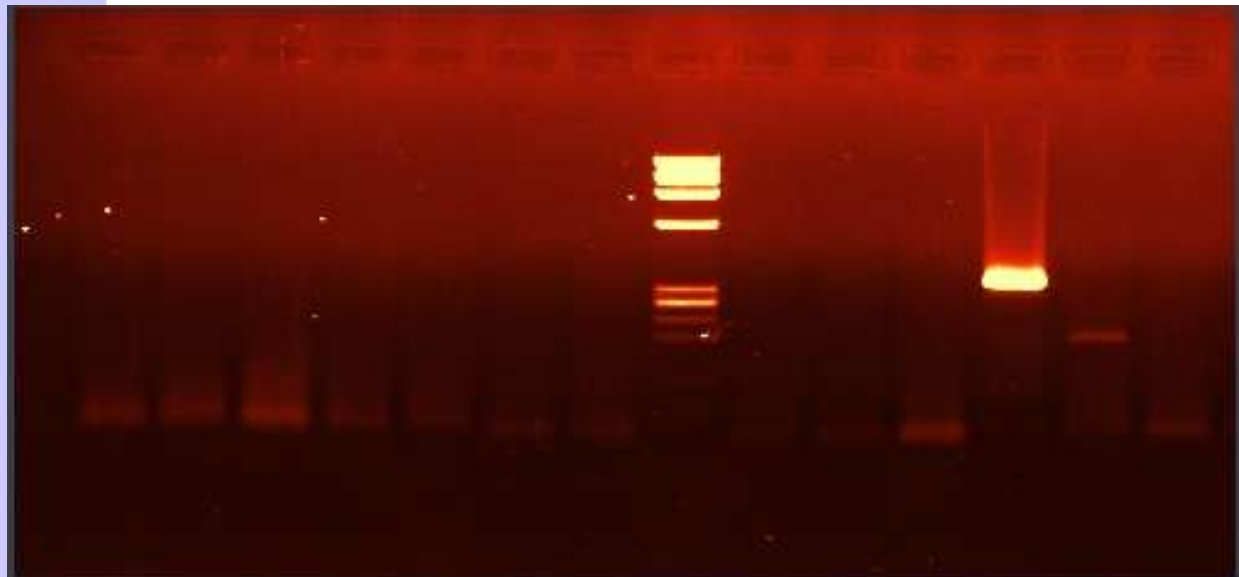


# QUALITY CONTROL for MOLECULAR DIAGNOSTICS

Block 4, Kelvin Campus,  
West of Scotland Science Park,  
Glasgow, G20 0SP  
Scotland

Tel: +44 (0) 141 945 6474  
Fax: +44 (0) 141 945 5795  
www.qcmd.org  
info@qcmd.org

## EISS 2006 Molecular RSV Proficiency Programme



programme.

Expected  
Result

RSV06-07	
RSV06-08	
RSV06-09	
RSV06-10	

1:DMEM/FCS - Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Foetal Calf Serum.



# Ποιοτικός Έλεγχος (Οκτώβριος 2006)

Δείγμα 1: Τύπος Α

Δείγμα 2: Τύπος Α και Β

Δείγμα 3: Τύπος Α

Δείγμα 4: Αρνητικό

Δείγμα 5: Τύπος Β

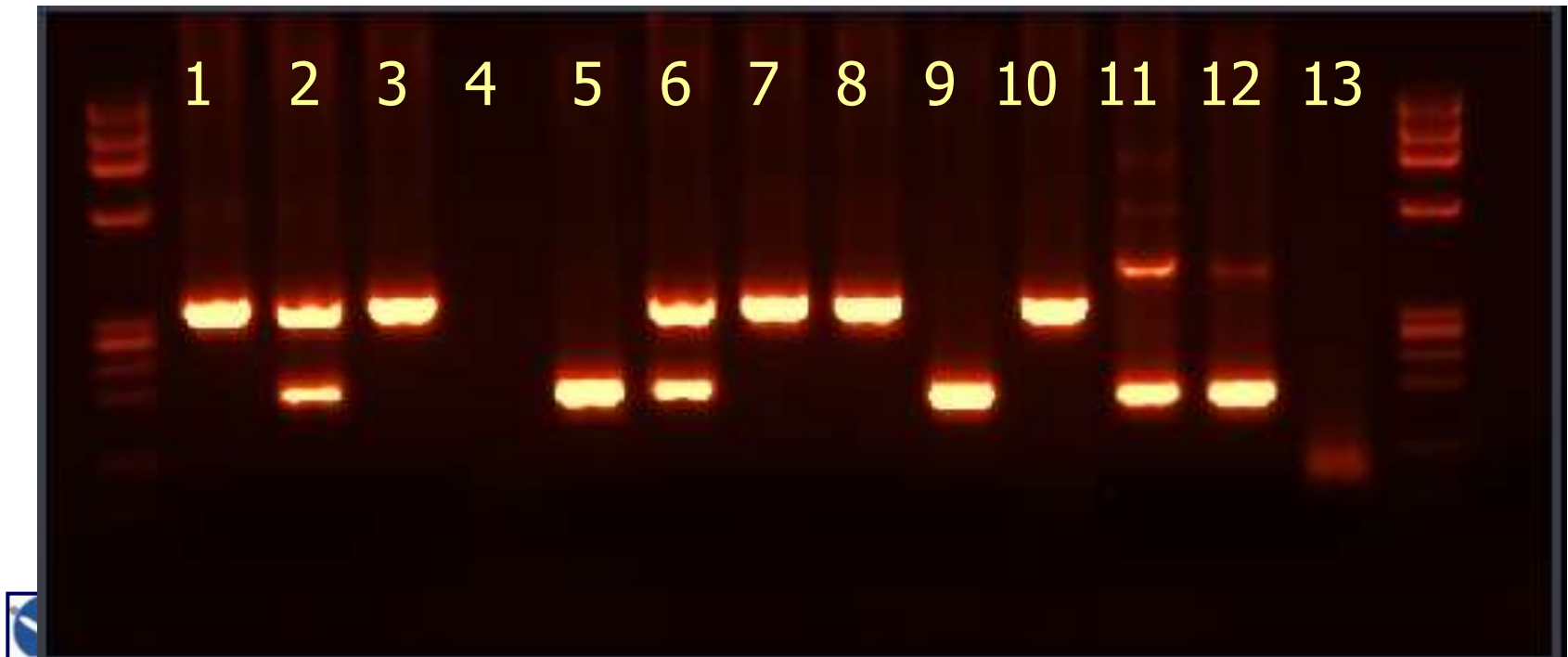
Δείγμα 6: Τύπος Α και Β

Δείγμα 7: Τύπος Α

Δείγμα 8: Τύπος Α

Δείγμα 9: Τύπος Β

Δείγμα 10: Τύπος Α







Block 4, Kelvin Campus,  
West of Scotland Science Park,  
Glasgow, G20 0SP  
Scotland

Tel: +44 (0) 141 945 6474  
Fax: +44 (0) 141 945 5795  
www.qcmd.org  
info@qcmd.org

## QUALITY CONTROL for MOLECULAR DIAGNOSTICS

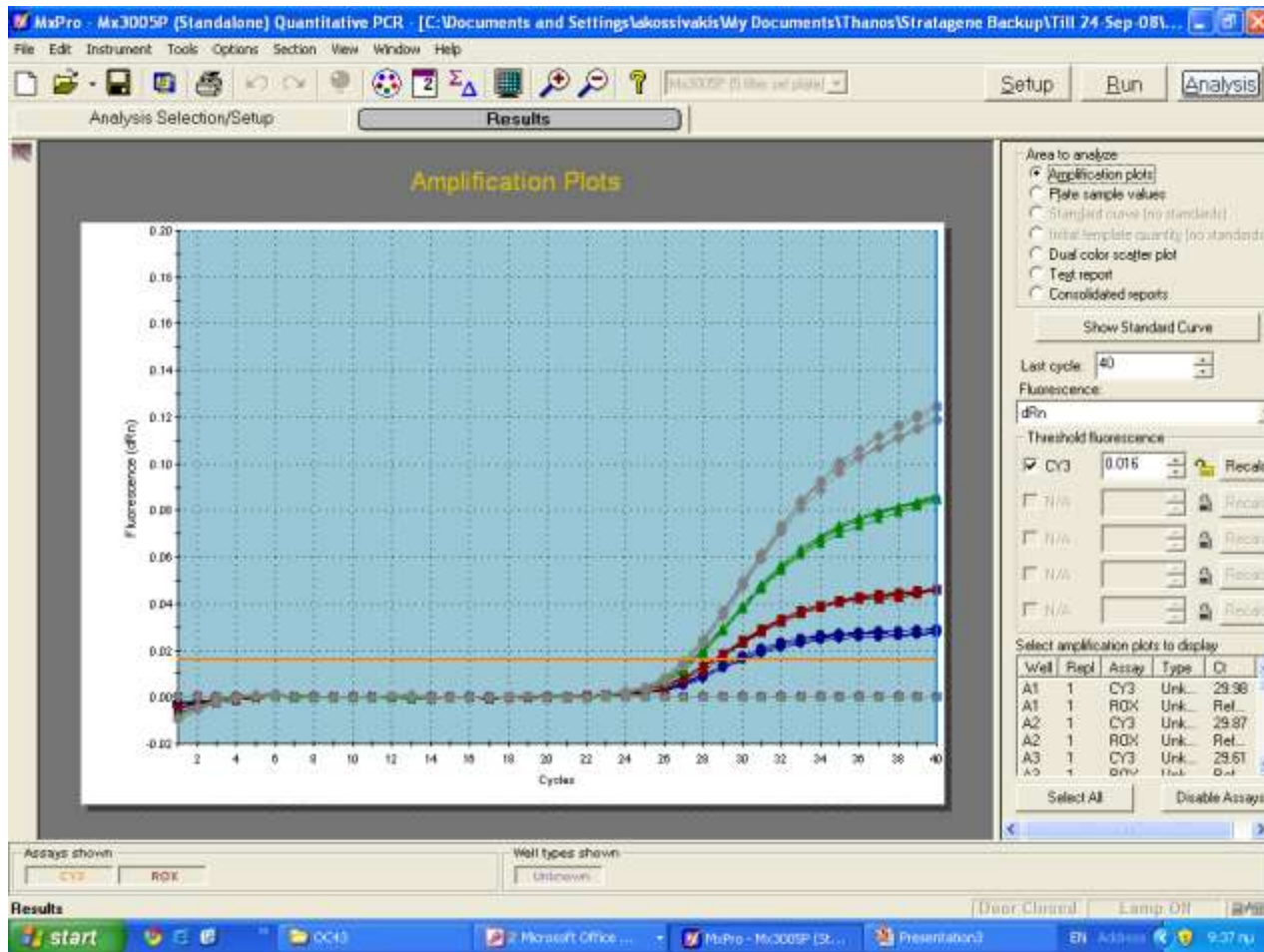
### EISS 2006 Molecular RSV Proficiency Programme

Thank you for participating in the EISS 2006 Molecular RSV Proficiency Programme.  
Listed below are the expected results for the programme.

Panel Code	Matrix <sup>1</sup>	Sample contents	Target Value (Dilution)	Expected Result
<b>RSV06-01</b>	DMEM/FCS	RSV A	$1.0 \times 10^{-5}$	Positive
<b>RSV06-02</b>	DMEM/FCS	RSV A and B	$2.0 \times 10^{-5} / 2.0 \times 10^{-4}$	Positive
<b>RSV06-03</b>	DMEM/FCS	RSV A	$1.0 \times 10^{-6}$	Positive
<b>RSV06-04</b>	DMEM/FCS	RSV negative		Negative
<b>RSV06-05</b>	DMEM/FCS	RSV B	$2.0 \times 10^{-5}$	Positive
<b>RSV06-06</b>	DMEM/FCS	RSV A and B	$2.0 \times 10^{-5} / 2.0 \times 10^{-4}$	Positive
<b>RSV06-07</b>	DMEM/FCS	RSV A	$1.0 \times 10^{-5}$	Positive
<b>RSV06-08</b>	DMEM/FCS	RSV A	$2.0 \times 10^{-6}$	Positive
<b>RSV06-09</b>	DMEM/FCS	RSV B	$2.0 \times 10^{-5}$	Positive
<b>RSV06-10</b>	DMEM/FCS	RSV A	$2.0 \times 10^{-6}$	Positive

1:DMEM/FCS - Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Foetal Calf Serum.

# Βελτιστοποίηση rt-PCR



# Ερώτηση

Ο παράγοντας που παίζει το σημαντικότερο ρόλο κατά τη βελτιστοποίηση μίας μεθόδου real-time PCR είναι:

- A. Οι εκκινητές
- B. Τα dNTPs
- Γ. Οι μοριακοί ανιχνευτές
- Δ. Η συγκέντρωση  $MgCl_2$



# Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης Α.Ε.




Παράρτημα G1/1 του Πιστοποιητικού Αρ. 623

ΕΠΙΣΗΜΟ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ της  
ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ

Επικύρωση και  
επαλήθευση  
μοριακών  
μεθόδων

Μας βοηθούν να αποκτήσουμε εμπιστοσύνη  
στις μεθόδους μας!

Τύποι δοκιμών / Μετρούμενες ιδιότητες	Εφαρμοζόμενες μέθοδοι/ Χρησιμοποιούμενες τεχνικές
1. Ανίχνευση RNA εντεροϊών	<i>Εσωτερική μέθοδος</i> (Κωδικός εξέτασης: 30706) Real-Time NASBA, NucliSens EasyQ, bioMérieux, βασισμένη στο: “Guidance in the development of an in-house nucleic acid amplification assay by making use of the NucliSens EasyQ Basic kit, 2005”*
1. Ταυτόχρονη ανίχνευση DNA ιών απλού έρπητα 1 και 2	<i>Εσωτερική μέθοδος</i> (Κωδικός εξέτασης : 30701 & 30709) TaqMan Real-Time PCR, Stratagene Mx3005P, βασισμένη στη βιβλιογραφία: Adelson et al, J Clin Virol 2005, 25-34*
1. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός DNA κυτταρομεγαλοϊού	<i>Εσωτερική μέθοδος</i> (Κωδικός εξέτασης : 30703) ποσοτική FRET Real-Time PCR, LightCycler, βασισμένη στη βιβλιογραφία: Schaade et al, J Clin Microbiol 2000, 4006-9*
1. Ανίχνευση RNA ιών γρίπης τύπου Α  <b>Ι. Π. Pasteur</b>	<i>Εσωτερική μέθοδος</i> (Κωδικός εξέτασης : 30603 & 30604) πολλαπλής TaqMan Real-Time RT- PCR, Stratagene Mx3005P, βασισμένη σε πρωτόκολλο του European Influenza Surveillance System (EISS)*



# Είδη μεθόδων που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια

## IVD μέθοδοι

FDA Federal Food, Drug, and Cosmetic Act  
EU Directive 98/79/EC

## IVD τροποποιημένες από το εργαστήριο

εκχύλιση, πολλαπλασιασμός ή ανίχνευση προϊόντος  
είδη δειγμάτων

## Analyte Specific Reagents (ASR)

ASR δεν είναι διαγνωστικές δοκιμές, GMP  
Είναι ενεργά συστατικά in house μεθόδων

## Research-use-only (RUO) products

- Προορίζονται για ερευνητικούς σκοπούς και όχι για διάγνωση. Η παραγωγή τους δεν ελέγχεται
- Δεν πωλούνται με ενδεικνυόμενη χρήση και οδηγίες

## Μη εγκεκριμένες μέθοδοι

### Εσωτερικές, (in house, home brew)

Πρότυπες μέθοδοι (συγγράματα)  
Μέθοδοι του εργαστηρίου



E.I. Pasteur



## Επαλήθευση/ επιβεβαίωση

Analytic Specific Reagent.  
Analytical and performance  
characteristics are not established"

For research use only.  
Not for use in diagnostic products"

## Επικύρωση!



# Verification/validation Επαλήθευση/επικύρωση

## ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ-ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

EU (Directive IVD- Directive 98/79/EC)  
Clinical Laboratory Improvement Amendments  
(CLIA)

FDA

ISO

Clinical and Laboratory Standards Institute  
(CLSI)

College American Pathologists (CAP)

## ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Cumitech 31A: Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory

- Authors: Richard Clark, Michael Lewinski, Michael Loeffelholz, Robert Tibbetts. Coordinating Ed: Susie Sharp
- Focus on general microbiology procedures
- Updates
  - Recommendations for # specimens to test
  - More detailed guidance on verification process
  - Updated CLIA, FDA regulations impacting laboratories



Advancing Excellence

COMMISSION ON LABORATORY ACCREDITATION

Laboratory Accreditation Program

MOLECULAR PATHOLOGY CHECKLIST

Clinical Chemistry 55:4  
611-622 (2009)

## Additional References

- CLSI MM03-A2, Molecular diagnostic methods for infectious diseases
- CLSI MM06-A, Quantitative molecular methods for infectious diseases

Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline—  
Second Edition

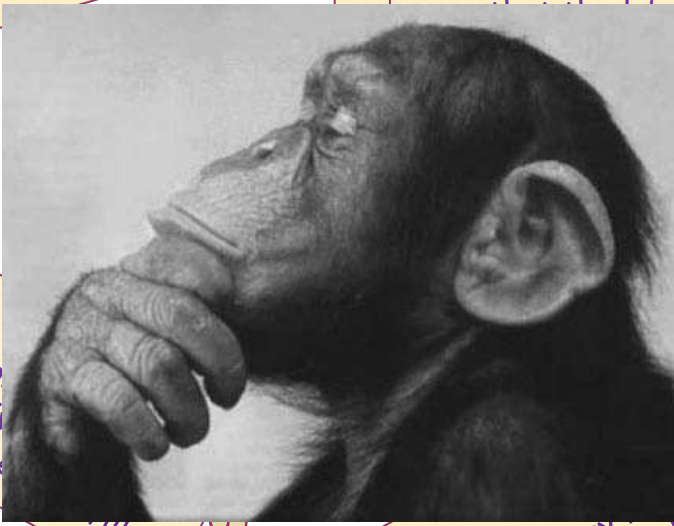
MM03-A2  
Vol. 26, No. 8  
Replaces MM03-P2  
Vol. 25, No. 11

# Verification/validation Επαλήθευση/επικύρωση

**WHO**  
**Validation:** "the action (or process) of proving that a procedure, process, system equipment or method used works as expected and achieves the intended result"

**ISO 9000**  
Verification is defined as "confirmation through the provision of objective evidence that specified requirements have been fulfilled"

**ISO 9000**  
**Validation** is defined as "confirmation, through the provision of objective evidence, that requirements for a specific intended use or application have been fulfilled"



**FDA**  
**Verification** of FDA-approved (validated) tests: confirmation (a one-time process) that a laboratory in its own hands using an cleared or -approved test can replicate the manufacturer's performance assuming that the laboratory has the same intended use as the FDA-approved test

**FDA**  
If an FDA-approved test is altered then it may no longer be either appropriate for its intended use (ie, valid) or analytically sound (ie, verifiable). Therefore, the laboratory is required to perform its own validation.



# Επικύρωση/επαλήθευση

## Επικύρωση (Validation)

Η δοκιμή είναι κατάλληλη για την ενδεικνυόμενη χρήση

- Για κατασκευαστές IVD kit
- Για χρήση ASR, RUO και in house μεθόδων από τα εργαστήρια

Διαδικασία: 1 φορά  
Απαιτείται μεγάλος σχετικά αριθμός δειγμάτων



## Επαλήθευση ή επιβεβαίωση (Verification)

Στα χέρια μας η δοκιμή χρησιμοποιείται σωστά και έχει την αναμενόμενη απόδοση από αναλυτικής πλευράς

Για εργαστήρια πριν την εφαρμογή εμπορικών IVD μεθόδων

Διαδικασία: 1 φορά  
Μικρότερος σχετικά αριθμός δειγμάτων  
Λιγότερο επίπονη διαδικασία





# Διαδικασία επικύρωσης μεθόδων NAT

1. Επιλογή αλληλουχιών στόχων, εκκινήτων και ανιχνευτών
2. Επιβεβαίωση της ταυτότητας του προϊόντος
3. Προτυποποίηση αντιδραστηρίων και πρωτοκόλλων
4. Προσδιορισμός του cut-off
5. Προσδιορισμός Πιστότητας (Precision), Ορθότητας (Trueness), Ακρίβειας (Accuracy)
6. Ευαισθησία και ειδικότητα
7. Έλεγχος διασταυρούμενων αντιδράσεων



# Επαλήθευση/επικύρωση εργαστηριακών εξετάσεων

		Είδος δοκιμής	Μοριακές μέθοδοι	
			Ποιοτικές	Ποσοτικές
Επικύρωση	Επαλήθευση			



# Επαλήθευση/επικύρωση εργαστηριακών εξετάσεων

		Είδος δοκιμής	Μοριακές μέθοδοι	
			Ποιοτικές	Ποσοτικές
Ε π ι κ ύ ρ ω σ η	Ε π α λ ή θ ε υ σ η	Αναλυτικό εύρος μέτρησης (Μελέτη γραμμικότητας)		✓
		Πιστότητα		✓
		Ακρίβεια, ορθότητα	✓	✓
		Όρια αναφοράς (φυσιολογικές τιμές)	✓	✓
		Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)		✓



# Επαλήθευση/επικύρωση εργαστηριακών εξετάσεων

		Είδος δοκιμής	Μοριακές μέθοδοι	
			Ποιοτικές	Ποσοτικές
Επικύρωση	Επαλήθευση	Αναλυτικό εύρος μέτρησης (Μελέτη γραμμικότητας)		✓
		Πιστότητα		✓
		Ακρίβεια, ορθότητα	✓	✓
		Όρια αναφοράς (φυσιολογικές τιμές)	✓	✓
		Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)		✓
		Αναλυτική ειδικότητα	✓	✓
		Αναλυτική ευαισθησία (LoD)	✓	✓
		Κλινική επικύρωση	✓	✓



# Δείγματα για ελέγχους

## Τι δείγματα χρησιμοποιούνται

- Κλινικά δείγματα ασθενών καλά χαρακτηρισμένα
- Δείγματα QC
- Δείγματα EQA
- Δείγματα διεργαστηριακού ελέγχου
- Κλωνοποιημένα γονίδια μικροοργανισμών σε πλασμίδια
- Κυτταροκαλλιέργειες ιών
- Εμβόλια

## Προμηθευτές

- Εργαστήρια αναφοράς
- WHO
- Statens Seruminstitut
- NIBSC
- EQA schemes
  - UK NEQAS
  - QCMD
  - INSTAND eV
- Εταιρείες
  - BBI Diagnostics
  - Advanced Biotechnologies
  - Ambion

Δείγματα με γνωστή περιεκτικότητα πληθυσμού (αριθμού) του μικροοργανισμού ή με ποσοτικοποιημένο RNA ή DNA

Οι έλεγχοι πρέπει να γίνονται στο βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για τους ελέγχους στην πράξη.

Σε περίπτωση που δεν επαρκεί ο αριθμός των βιολογικών δειγμάτων, πρέπει να "κατασκευασθούν δείγματα" με τον ενοφθαλμίζοντας τον υπό έλεγχο παθογόνο παράγοντα σε αρνητικά δείγματα **"spiked"** δείγματα.

## Ποσοτικές μέθοδοι: Αναλυτικό εύρος μέτρησης (Reportable Range)

Το εύρος των τιμών των αποτελεσμάτων που μπορούν να μετρηθούν με αξιοπιστία χωρίς συγκέντρωση, αραιώση ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία του κλινικού δείγματος.

**Γραμμικότητα** είναι η ικανότητα της μεθόδου να παράγει τιμές αποτελεσμάτων που είναι ευθέως ανάλογες των συγκεντρώσεων της ουσίας στο δείγμα

**Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης** - lower limit of quantification (LLOQ) και το

**Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης** - upper limit of quantification (ULOQ)

Αραιώσεις θετικού δείγματος (1:2, 1:5, 1:10)  
Σύγκριση τιμών και συγκεντρώσεων  
Το αναλυτικό εύρος μέτρησης υπολογίζεται από την γραμμική περιοχή

**Επαλήθευση**  
5 - 7 συγκεντρώσεις x2

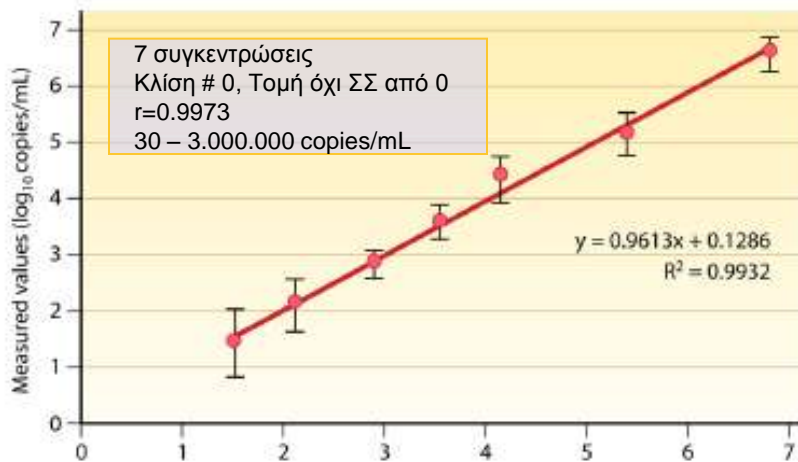
**Επικύρωση**  
7 - 11 αραιώσεις x2-4

ίδια μέτρα

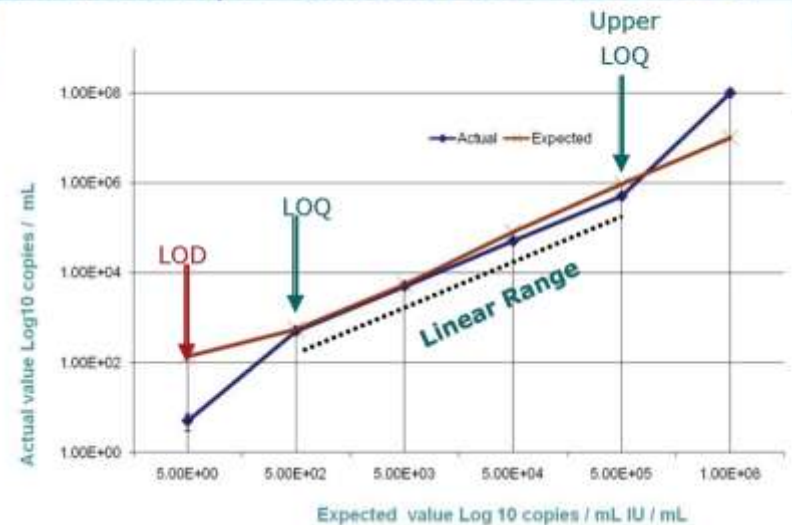
Log μετατροπή,  
Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης  
Υπολογισμός κλίσεως, τομής και r



# Αναλυτικό εύρος μέτρησης (Reportable Range)



## Relationship Between LOD and LOQ



# Αναλυτική ευαισθησία – κατώτερο όριο ανίχνευσης

Είναι καλύτερα να χρησιμοποιείται ο όρος Κατώτερο Όριο Ανίχνευσης (LoD)

Στις ποσοτικές μετρήσεις με τη μέτρηση διαδοχικών δειγμάτων

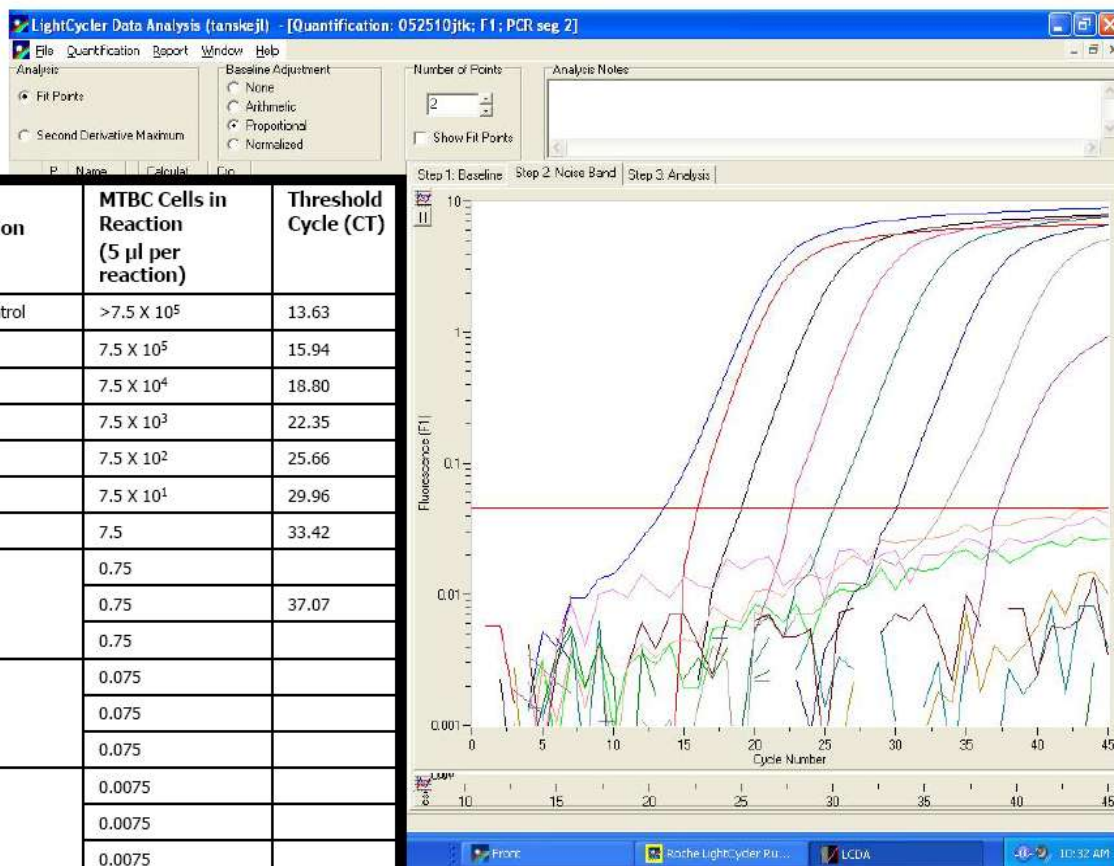
Το κατώτερο ποσό ανίχνευσης

Δεν είναι απαραίτητο να είναι

Για ιατρικές εφαρμογές με μέτρηση διαδοχικών δειγμάτων με γνωστή περιοχή αντίγραφο

Αραιώσεις με τιμές αναμενόμενου κατώτερου ορίου ανίχνευσης

## Sensitivity



Designation	MTBC Cells in Reaction (5 µl per reaction)	Threshold Cycle (CT)
Positive Control	>7.5 X 10 <sup>5</sup>	13.63
10+8	7.5 X 10 <sup>5</sup>	15.94
10+7	7.5 X 10 <sup>4</sup>	18.80
10+6	7.5 X 10 <sup>3</sup>	22.35
10+5	7.5 X 10 <sup>2</sup>	25.66
10+4	7.5 X 10 <sup>1</sup>	29.96
10+3	7.5	33.42
10+2	0.75	
	0.75	37.07
	0.75	
10+1	0.075	
	0.075	
	0.075	
10+0	0.0075	
	0.0075	
	0.0075	
Negative Control	0	

ωω





# LoD - LoQ HCV

Ανίχνευση HCV RNA	Αντίγραφα/mL		
	LoD		LoQ
	Πλάσμα	Ορός	Πλάσμα
Ποιοτική μέθοδος (Taqman)	135	162	-
Ποσοτική μέθοδος (bDNA)	3.200	-	7.000



# Πιστότητα - Precision

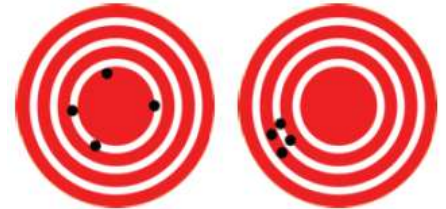
Πόσο καλά μπορεί μία δεδομένη μέτρηση να αναπαραχθεί όταν μία δοκιμή εφαρμόζεται επανειλημένα σε πολλαπλές μερίδες ενός ομογενούς δείγματος (τυχαίο αναλυτικό σφάλμα)

**Επαναληψιμότητα** ίδιας σειράς - ίδιας μέρας (within-run) που περιλαμβάνει μετρήσεις την ίδια ημέρα σε ίδιες συνθήκες (χειριστής, παρτίδες αντιδραστηρίων, όργανα, εργαστήριο).

**Αναπαραγωγιμότητα** μεταξύ ημερών (day-to-day imprecision) περιλαμβάνει μετρήσεις σε διαφορετικές ημέρες και συνθήκες

## Προσδιορισμός πιστότητας

Πειράματα επαναλήψεων για να εκτιμηθεί η διακύμανση των αποτελεσμάτων σε συνθήκες λειτουργίας του εργαστηρίου



## Ποιοτικές δοκιμές

Δείγματα γύρω από το όριο ανίχνευσης

- 20% > LoD
- LoD
- 20% < LoD

40 επαναλήψεις



# Πιστότητα - Precision

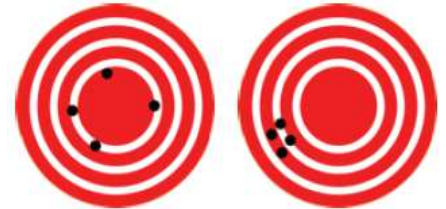
Πόσο καλά μπορεί μία δεδομένη μέτρηση να αναπαραχθεί όταν μία δοκιμή εφαρμόζεται επανειλημμένα σε πολλαπλές μερίδες ενός ομογενούς δείγματος (τυχαίο αναλυτικό σφάλμα)

**Επαναληψιμότητα** ίδιας σειράς - ίδιας μέρας (within-run) που περιλαμβάνει μετρήσεις την ίδια ημέρα σε ίδιες συνθήκες (χειριστής, παρτίδες αντιδραστηρίων, όργανα, εργαστήριο).

**Αναπαραγωγιμότητα** μεταξύ ημερών (day-to-day imprecision) περιλαμβάνει μετρήσεις σε διαφορετικές ημέρες και συνθήκες

## Προσδιορισμός πιστότητας

Πειράματα επαναλήψεων για να εκτιμηθεί η διακύμανση των αποτελεσμάτων σε συνθήκες λειτουργίας του εργαστηρίου



## Ποσοτικές δοκιμές

Δείγματα:

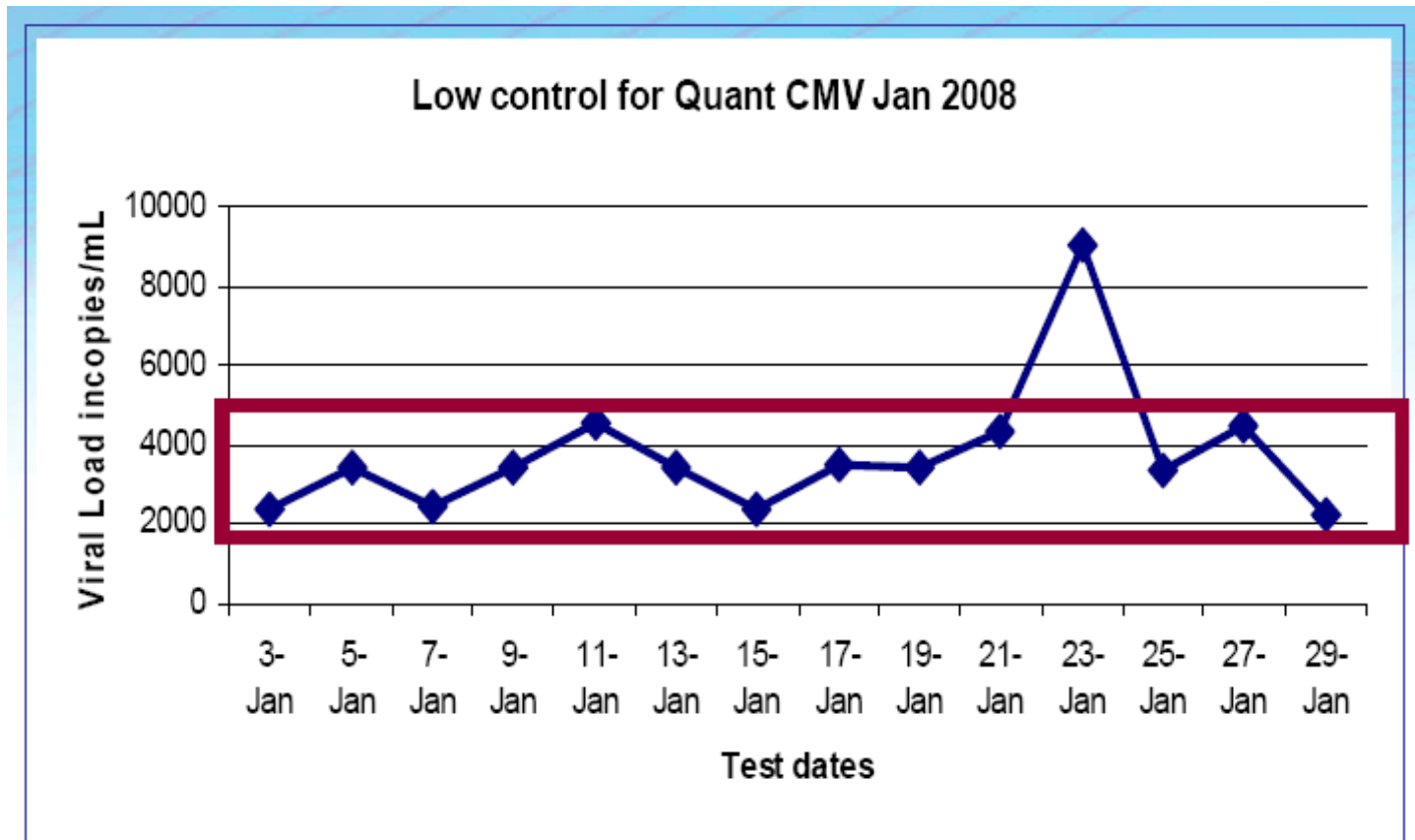
- 1 με υψηλή συγκέντρωση
- 1 με χαμηλή
- 1 στο όριο LoD

**Δεν έχουν καθορισθεί σαφή κριτήρια αποδεκτής πιστότητας για μοριακές μεθόδους**

Σταθ  
Συντε  
ΑΝΟ



# Πιστότητα



# Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει **μόνο το παθόγνο-στόχο** και στο ότι η **ποσοτικοποίηση** του στόχου δεν επηρεάζεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις από σχετιζόμενα νουκλεϊνικά οξέα ή άλλες παρεμβολές που σχετίζονται με το δείγμα

```
Athens.GR/isolate05 TA
EF690657.1|isolate C...
EF690655.1|isolate C...
EF690651.1|isolate C...
EF690647.1|isolate C...
EF690652.1|isolate C...
EF690653.1|isolate C...
EF690645.1|isolate C...
EF690644.1|isolate C...
EF690642.1|isolate C...
EF690646.1|isolate C...
EF690654.1|isolate C...
EF690649.1|isolate C...
EF690648.1|isolate C...
EF690656.1|isolate C...
EF690643.1|isolate C...
```

παρόμοια γενετική δομή  
νουκλεοτιδικών αλληλουχιών  
στόχου και άλλων μικροβίων

τραπεζών δεδομένων αλληλουχιών (BLAST)

- Πειραματικά

## Ενδογενείς

- Αιμοσφαιρίνη
- Χολερυθρίνη
- Μεταβολίτες (π.χ. Διαβήτης, πολλαπλούν μυέλωμα)
- Φάρμακα
- Παρεντερική διατροφή

## Εξωγενείς

- Κρέμες χεριών
- Ταλκ γαντιών
- Περιέκτες δειγμάτων

```
900      3910
AACAGCTGGTGTTCACATC
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
C.....C.....
```

ου περιέχουν το στόχο  
όδου

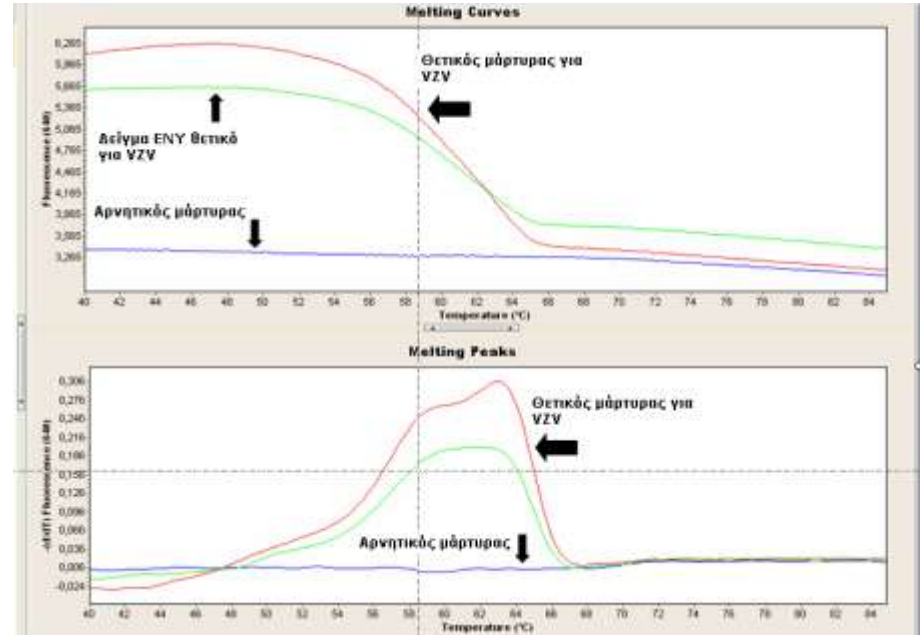
ου περιέχουν την

- παρεμβαίνουσα ουσία με ή χωρίς το στόχο, στο ίδιο πείραμα
- Ο στόχος πρέπει να βρίσκεται κοντά στο χαμηλό άκρο του αναλυτικού εύρους μέτρησης



# Επιβεβαίωση της ταυτότητας του προϊόντος

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μίας μεθόδου, το προϊόν που παράγεται από μία NAT ελέγχεται για την αυθεντικότητά του με αλληλούχηση, ειδικό υβριδισμό, διπλή (nested) PCR, ή με πέψη με περιοριστικό ένζυμο.



# Αναλυτική ειδικότητα

Δείγματα με χαμηλή  
συγκέντρωση του στόχου

Δείγματα που περιέχουν το  
στόχο, ενοφθαλμίζονται με:  
- Αραιωτικό υγρό (control)  
- την παρεμβαίνουσα ουσία (test),  
- παρόμοιους μικροοργανισμούς (test)

Δεν υπάρχει οδηγία

Συγκεντρώσεις δειγμάτων

Είδος δειγμάτων

Αριθμός δειγμάτων

t-test κατά ζεύγη

Επεξεργασία αποτελεσμάτων



# Ακρίβεια (accuracy) ορθότητα (trueness)

**Ορισμός:** Πόσο συμφωνεί μια δοκιμή με μέθοδο αναφοράς, μέθοδο συγκρίσεως, ή συνδυασμό μεθόδων  
Οι μελέτες ακρίβειας είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της επικύρωσης της μεθόδου

**Ποιοτικές δοκιμές:** δύσκολη εφαρμογή, μιά δοκιμή είναι σωστή ή λανθασμένη σε σχέση με την αναφοράς

**Ποσοτικές δοκιμές:** πόσο κοντά είναι η τιμή μετρήσεως με την τιμή που είναι αποδεκτή είτε ως συμβατικά αληθινή ή την τιμή αναφοράς  
Η ακρίβεια εκφράζεται ως bias (έλλειψη συμφωνίας) μεταξύ της μεθόδου και της μεθόδου αναφοράς

## **Μέθοδος συγκρίσεως**

Διπλά δείγματα αναλύονται παράλληλα με τη νέα και τη μέθοδο συγκρίσεως. Εάν με μέθοδο αναφοράς οι ακριβείς τιμές γνωστές

## **Μέθοδος ανακτήσεως**

Καλά χαρακτηρισμένα κλινικά δείγματα ή αρνητικά δείγματα ενοφθαλμισμένα (spiked) με γνωστές ποσότητες του μικροβίου, ελέγχονται με την δοκιμή και συγκρίνονται τα αποτελέσματα





# Ακρίβεια (accuracy) ορθότητα (trueness)

1/3 χαμηλές τιμές  
1/3 μεσαίες  
1/3 υψηλές τιμές

Κλινικά δείγματα  
Αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού, των νοσημάτων που αναμένονται, ηλικίας και φύλου  
Πρότυπα HIV, HAV, HBV, HCV parnonivirus B19, CMV, EBV  
Δείγματα ποιοτικού ελέγχου  
Κάθε γονότυπος ξεχωριστά

Συγκεντρώσεις δειγμάτων

Είδος δειγμάτων

Ποιοτικές: 50 θετικά, 50 αρνητικά  
In house: 50 θετικά, 100 αρνητικά  
Σε 5 ημέρες κατ' ελάχιστον

Αριθμός δειγμάτων



**Ανάλυση δεδομένων και κριτήρια αποδοχής.**

Οι μοριακές μέθοδοι γενικά πλιό ευαίσθητες από τα "χρυσά πρότυπα" και η σύγκριση δύσκολη εάν έχουν μικρότερο LOD



# Αναλυτική vs κλινική επικύρωση μεθόδου

Η **αναλυτική επικύρωση** της μεθόδου εστιάζεται στο παθογόνο που ανιχνεύεται με την μέθοδο, ενώ η **κλινική επικύρωση** στη σχετιζόμενη νόσο ή την κατάσταση του ασθενούς

Η κλινική επικύρωση αποσκοπεί στον καθορισμό των παραμέτρων: κλινική ευαισθησία, κλινική ειδικότητα, θετική και αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου.

	ΝΟΣΟΣ			
ΜΕΘΟΔΟΣ	Παρουσία	Απουσία		
Θετική	α	β	α+β	<b>ΘΠΑ</b> $a/a+b$
Αρνητική	γ	δ	γ+δ	<b>ΑΠΑ</b> $\delta/\gamma+\delta$
	α+γ	β+δ	α+β+γ+δ	
	<b>Ευαισθησία</b> $a/a+\gamma$	<b>Ειδικότητα</b> $\delta/\beta+\delta$		

Απαιτείται κλινική διάγνωση!



# Κλινική επικύρωση μεθόδου

Μέθοδος με υψηλή αναλυτική ευαισθησία δεν έχει κατ' ανάγκη διαγνωστική ευαισθησία.

## Μειωμένη διαγνωστική ειδικότητα

- Αποικισμός
- Νεκροί μικροοργανισμοί (HSV, zovirax)

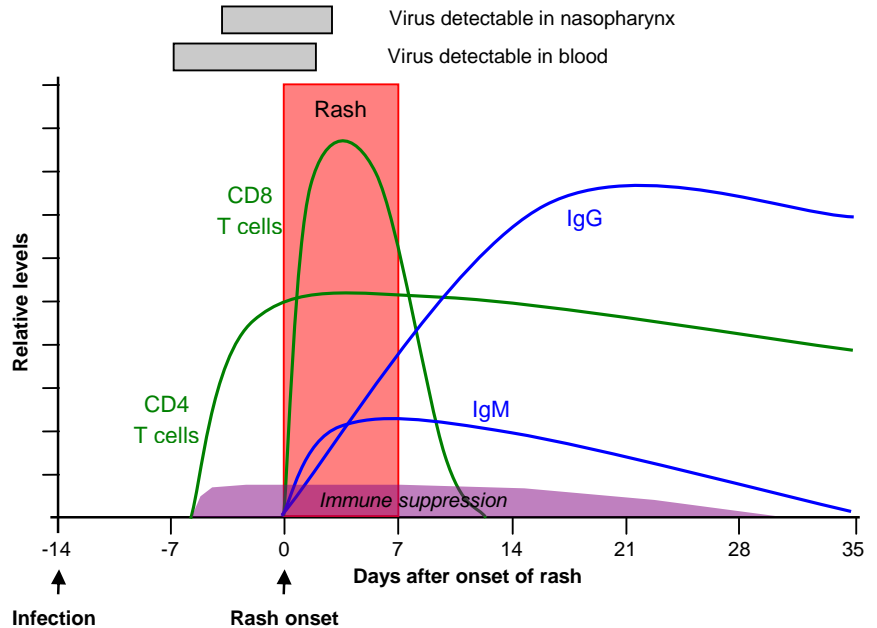


# Ίλαρά: Αξιολόγηση μεθόδου real time RT-PCR

rt PCR	IgM (+)	IgM (-)	Total
Αναπν (+)	70	4	74
Αναπν (-)	1	6	7
<b>Σύνολο</b>	<b>71</b>	<b>10</b>	<b>81</b>
Αίμα (+)	38	3	41
Αίμα (-)	7	5	12
<b>Σύνολο</b>	<b>45</b>	<b>8</b>	<b>53</b>
Ούρα (+)	29	2	31
Ούρα (-)	0	0	0
<b>Σύνολο</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>31</b>

Ορολογικά (-)  
rRT-PCR (+)

Total number of specimens			
rt PCR	IgM(+)	IgM(-)	Total
(+)	137	9	146
(-)	8	11	19
	<b>145</b>	<b>20</b>	<b>165</b>



ΘΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ  
(CONTROL) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ PCR



# Μάρτυρες (control) που είναι απαραίτητοι κατά τη διεκτέργεια διαγνωστικής PCR (Anonymus 2002, AFNOR)

<b>Εσωτερικός μάρτυρας</b> (Internal Amplification Control)	Περιέχει χιμαιρικό - μη σχετικό DNA που προστίθεται στο master mix και δύναται να πολλαπλασιάσει με τους ίδιους εκκινητές όπως το DNA στόχος. Η διαφοροποίηση από το προϊόν της PCR θα γίνεται από τη διαφορά στο μέγεθος του προϊόντος του DNA στόχου από το προϊόν του IAC.
<b>Θετικός μάρτυρας της διαδικασίας</b> (Processing positive control)	Αρνητικά δείγματα εμβολιασμένα με επαρκή ποσότητα παθογόνου μικροβίου, τα οποία υφίστανται τη συνολική διαδικασία του πρωτοκόλλου.
<b>Αρνητικός μάρτυρας της διαδικασίας</b> (Processing negative control)	Αρνητικά δείγματα εμβολιασμένα με επαρκή ποσότητα συγγενικού, αλλά μη-στόχου παθογόνου μικροβίου, τα οποία υφίστανται τη συνολική διαδικασία του πρωτοκόλλου.
<b>Αρνητικός μάρτυρας</b> Contemplate control (blank)	Περιέχει όλα τα αντιδραστήρια, αλλά όχι DNA στόχο ή IAC
<b>Μάρτυρας των εγκαταστάσεων</b> (Premise control)	Σωληνάριο που περιέχει το master mix και το οποίο αφήνεται ανοικτό στο χώρο της PCR (PCR setup room) για να ανιχνεύσει πιθανή μόλυνση από DNA στο περιβάλλον.
<b>Swab-test</b>	



# Ερώτηση

**Ο θετικός μάρτυρας σε μία μέθοδο PCR πρέπει:**

- A. Να είναι θετικός, αλλά να έχει συγκέντρωση κοντά στο όριο ανίχνευσης
- B. Να είναι θετικός, με μεσαία συγκέντρωση
- Γ. Να είναι θετικός με υψηλή συγκέντρωση
- Δ. Κανένα από τα παραπάνω





# Θετικός μάρτυρας

➤ Ασθενώς θετικά control!



# Μάρτυρας εκχυλίσσεως και ανασταλτικών ουσιών

## Ανασταλτικές ουσίες

- Χολικά άλατα
- Ουρία
- Αίμη
- Ηπαρίνη
- IgG



# Μάρτυρας εκχυλίσεως και ανασταλτικών ουσιών

**ΜΑΡΤΥΡΕΣ**  
(Ενδογενείς)

Housekeeping genes

**ΓΟΝΙΔΙΑ**

albumin,  $\beta$ -globin,  
actin,  $\alpha$ -tubulin



1. Hep-2
2. ΑΙΜΑ
3. ΕΝΥ



Notes & Tips

## SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations

Tania Nolan<sup>a</sup>, Rebecca E. Hands<sup>b</sup>, William Ogunkolade<sup>b</sup>, Stephen A. Bustin<sup>b\*</sup>

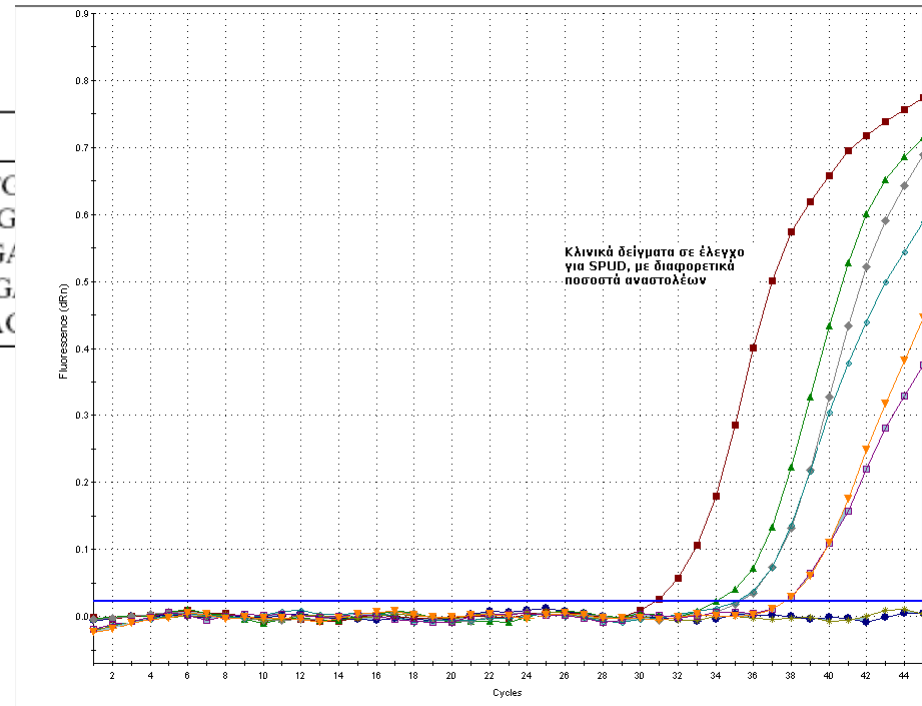
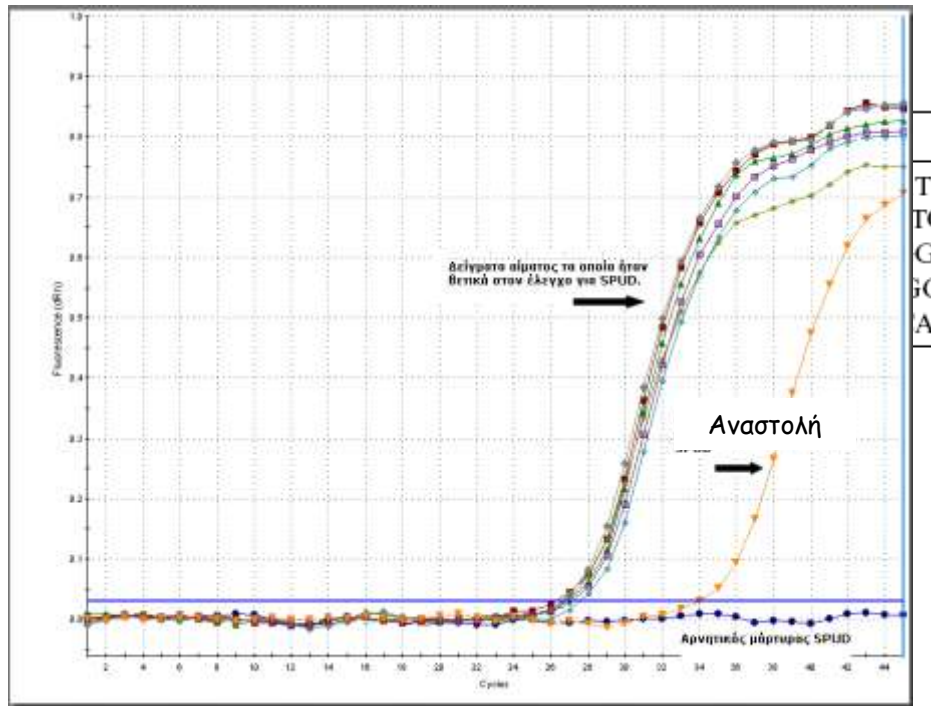
<sup>a</sup> Sigma-Aldrich, Haverhill CB9 8DP, UK

<sup>b</sup> Institute of Cell and Molecular Science, Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London, London E1 1BB, UK

Received 3 November 2005

Available online 20 February 2006

# Μάρτυρας SPUD



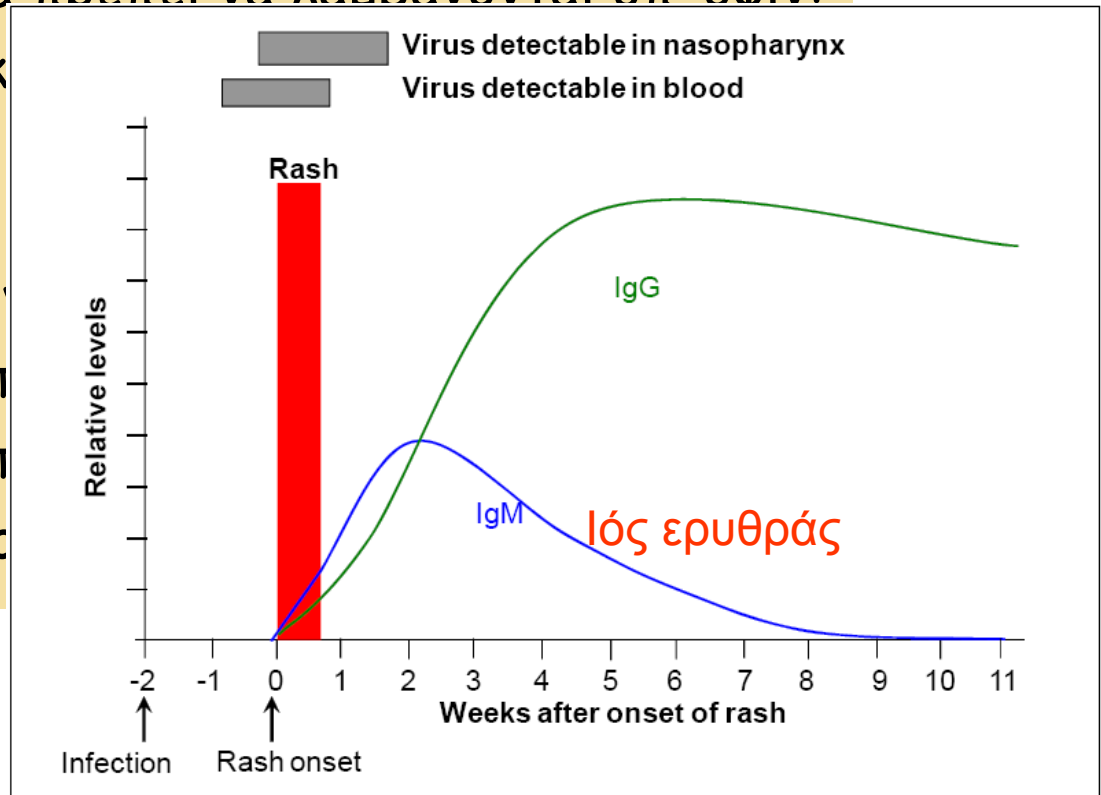


E.I. Pasteur

# Εισαγωγή

Για την ερμηνεία πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν:

- Το ιστορικό κλινικών σημείων του ασθενή
- Η γνώση της νόσου
- Ο χρόνος διεξαγωγής των εξετάσεων
- Η καταλληλότητα των εξετάσεων
- Η καταλληλότητα της μεθόδου
- Η απόδοση των εξετάσεων

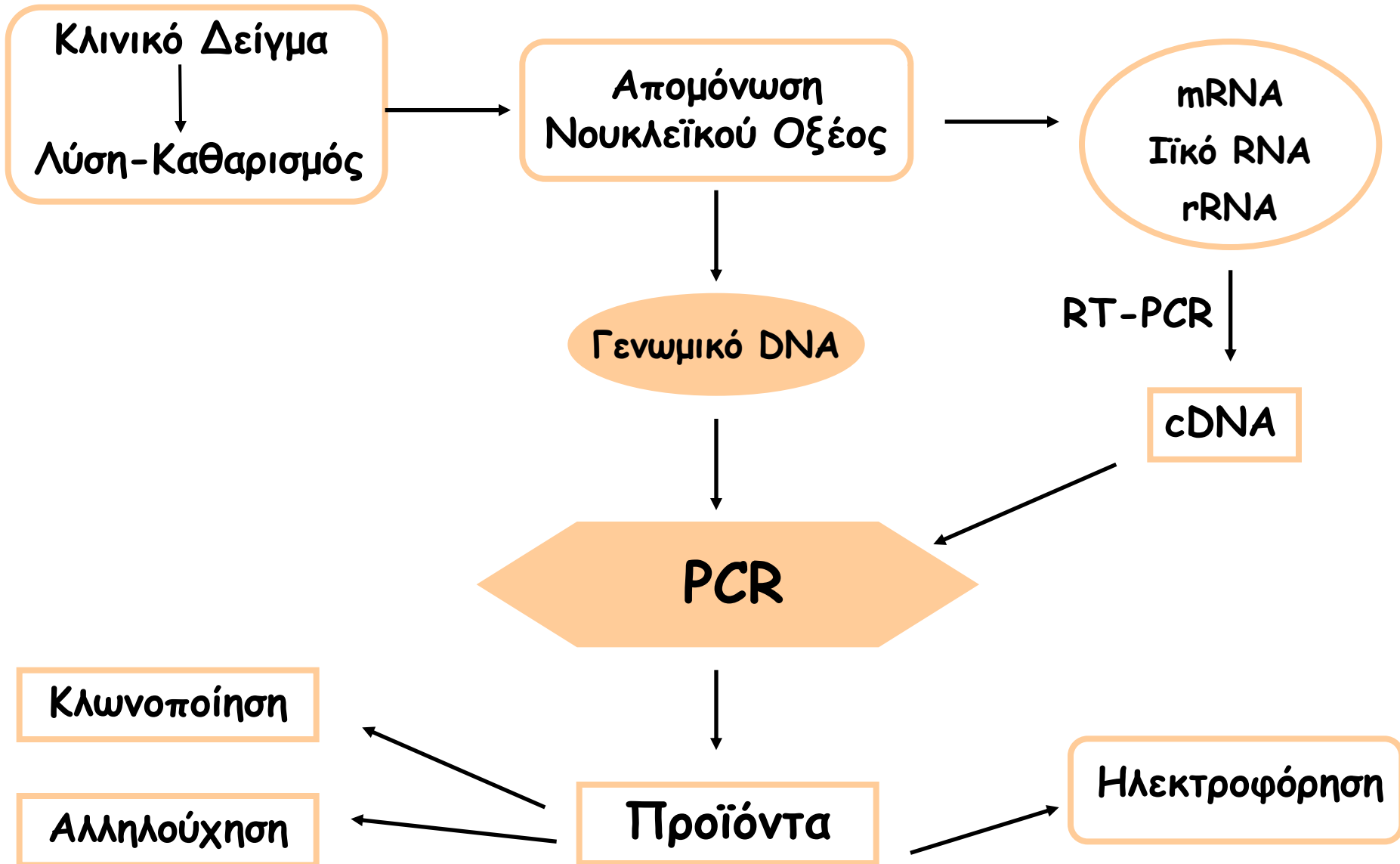


# Οδηγίες ελάχιστων απαιτήσεων για επικύρωση/επιβεβαίωση rt-PCR

Sloan, Clin Microbiol Newsletter, 2007

Προσδιορισμός	FDA	In-house
Ακρίβεια-ποιοτικές	50 (+) δείγματα 50 (-)	50 (+) δείγματα 50 (-)
Ακρίβεια -ποσοτικές	20 (+) δείγματα 50 (-)	40 (+) δείγματα 50 (-)
Πιστότητα - ποιοτικές	Θετικός και αρνητικός μάρτυρας	Θετικός και αρνητικός μάρτυρας
Πιστότητα - ποσοτικές	3 επαναλήψεις σε 2 συγκεντρώσεις (within run and between day)	2 συγκεντρώσεις εις διπλούν, 2 φορές την ημέρα
Αναλυτική ευαισθησία - LOD	(-)	60 μετρήσεις
Αναλυτική ειδικότητα	(-)	Προσδιορισμός όλων των μορίων που μπορεί να επιδρούν (όμοια χημική ή γενετική δομή)
Φάσμα μετρήσεων	3-4 συγκεντρώσεις εις διπλούν	3-4 συγκεντρώσεις εις διπλούν
Φυσιολογικές τιμές	20 δείγματα ανά κατηγορία	120 δείγματα ανά κατηγορία

# Διαχείριση κλινικών δειγμάτων & μοριακή ανάλυση





# Επικύρωση/Επιβεβαίωση NAT μεθόδων

- IVD/CE, FDA



Επιβεβαίωση (Verification)

- RUO

- ASR

- In-house



Επικύρωση (Validation)



## Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Γρίπης Ν. Ελλάδος

- Α. Κοσσυβάκης
- Α. Καλλιάρopoulos
- Β. Πόγκα
- Α. Μουτούση

## Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Ερυθράς/Ιλαράς

- Ε. Χορευτή

## Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Εντεροϊών/Πολιοϊών

- Μ. Λογοθέτη
- Ε. Αφεντάκη

## Διαγνωστικό τμήμα

- Μ. Παπαϊωάννου
- Ε. Χορευτή
- Β. Μαρτίνεζ
- Π. Στέφου
- Σ. Στέφου
- Β. Λαμπροπούλου
- Α. Τζίφα
- Ε. Παναγιωτίδου
- Μ. Καψάλη

## Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας

- Δ. Σγούρας
- Ε. Παναγιωτοπούλου
- Κ. Παπαδάκος



# Σχέση επιπολασμού και προγνωστικής αξίας της μεθόδου

- Παράδειγμα: ορολογική μέθοδος με ευαισθησία 95% και ειδικότητα 95%

## Επιπολασμός νόσου 10%

	Ασθενής	Υγιής	Σύνολο
Θετικό	95	45	140
Αρνητικό	5	855	860
Σύνολο	100	900	1000

Ευαισθησία	95
Ειδικότητα	95
Θετική Προγνωστική αξία	68
Αρνητική Προγνωστική αξία	99

## Επιπολασμός νόσου 1%

	Ασθενής	Υγιής	Σύνολο
Θετικό	10	50	60
Αρνητικό	1	941	942
Σύνολο	11	991	1002

Ευαισθησία	90
Ειδικότητα	80
Θετική Προγνωστική αξία	16
Αρνητική Προγνωστική αξία	99.5

# Εξασφάλιση θετικών δειγμάτων

- Κλινικά δείγματα
- Εμπορικά διαθέσιμα
- Από εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο (NEQAS, QCMD)
- Από άλλο εργαστήριο



TABLE 2. Possible protocol for determining reportable range, analytical sensitivity, and precision in combined experiments based on current CLSI guidelines

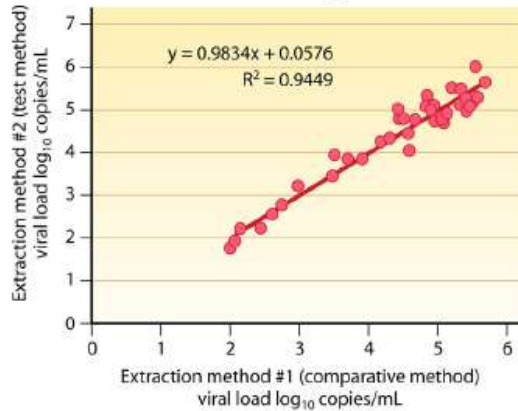
Performance characteristic	Analyte concentration tested <sup>a</sup>											Comment(s)
	Low					Medium			High			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Reportable range (for quantitative assays)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	7-11 concentrations across anticipated measuring range; 2-4 replicates on same day
Analytical sensitivity (LOD)	×	×	×	×	×							8-12 replicates of 4-5 samples at the low concentration end over 5 days
Precision												
Qualitative assay	×	×	×									Use concentrations at LOD, 20% above LOD, and 20% below LOD; test in duplicate over 15 days (include data from analytical sensitivity runs to provide data over 20 days)
Quantitative assay		×			×					×		Use high, low, and LOD concentrations; test in duplicate over 19 days (include data from reportable range study as day 1 to provide data over 20 days)

<sup>a</sup> ×, the concentration is tested. The reportable range is from concentration 2 to concentration 10; the LOD, LLOQ, and upper limit of linearity are at concentrations 2, 4, and 10, respectively.

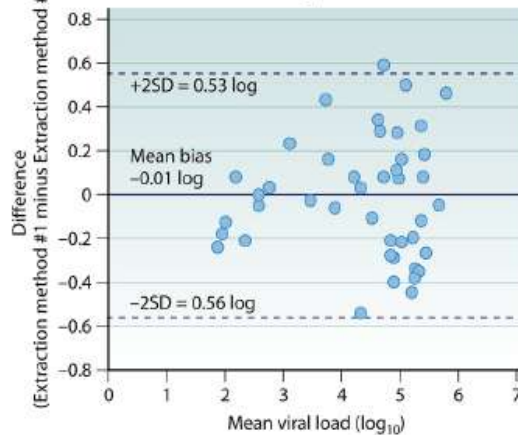


# Accuracy (trueness) (Burd)

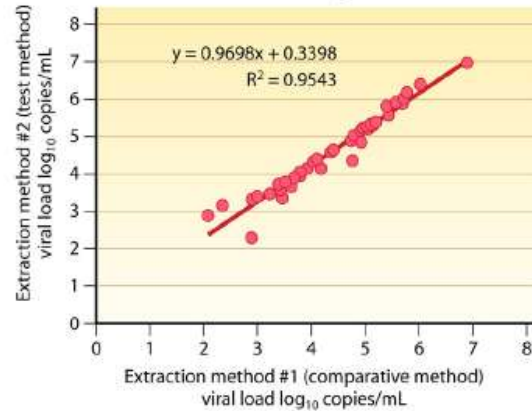
**A** Cytomegalovirus Viral Load PCR  
Extraction system #1 vs. Extraction system #2  
XY scatter plot



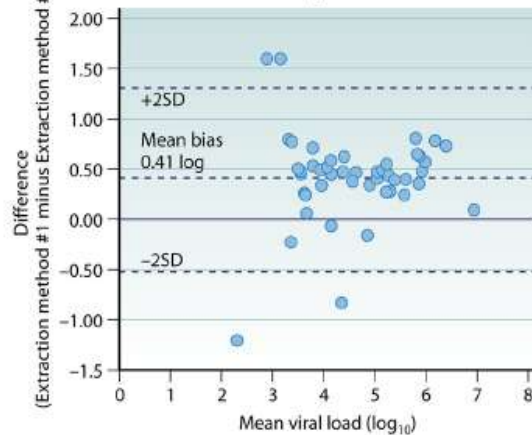
**B** Cytomegalovirus Viral Load PCR  
Extraction system #1 vs. Extraction system #2  
Bias plot



**C** BK Viral Load PCR  
Extraction system #1 vs. Extraction system #2  
XY scatter plot



**D** BK Viral Load PCR  
Extraction system #1 vs. Extraction system #2  
Bias plot

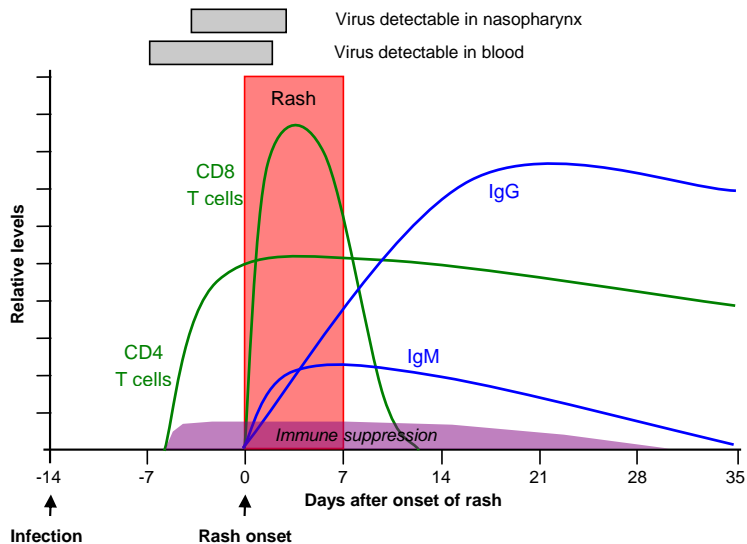


# Measles cases, 2005-6 Greece

rt PCR	IgM (+)	IgM (-)	Total
Resp (+)	70	8	78
Resp (-)	1	6	7
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>14</b>	<b>85</b>
Blood (+)	38	7	45
Blood (-)	7	5	12
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>12</b>	<b>57</b>
Urine (+)	29	2	31
Urine (-)	0	0	0
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>31</b>

Total number of specimens			
rt PCR	IgM(+)	IgM(-)	Total
RT (+)	137	17	154
RT (-)	8	11	19
	<b>145</b>	<b>28</b>	<b>173</b>

Serology (-) specimens,  
culture positive



# Σύγκριση μοριακής (NASBA) -Κ/Α για ανίχνευση εντεροϊών από κόπρανα από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας 2007

Δείγματα κοπράνων	NASBA	
	+	-
65	46	19





# Σύγκριση μοριακής (NASBA) -Κ/Α για ανίχνευση εντεροϊών από κόπρανα από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας 2007

Δείγματα κοπράνων	NASBA		Κ/Α	
	+	-	+	-
65	46	19	33	32



# Σύγκριση μοριακής (NASBA) -Κ/Α για ανίχνευση εντεροϊών από κόπρανα από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας 2007

Δείγματα κοπράνων	NASBA		Κ/Α		Κ/Α-PCR	
	+	-	+	-	+	-
65	46	19	33	32	46	19

