

Oktober 2015

Håndbok for *artus*[®] HAdV RG PCR Kit



Versjon 1
Til bruk med Rotor-Gene[®] Qinstrumenter

IVD

CE

REF



R1 MAT

4530265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, TYSKLAND

1096380-NO

Distribuert av QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

Innhold

Bruksområde	4
Sammendrag og forklaring	4
Patogeninformasjon	4
Prosedyreprinsipp	5
Medfølgende materialer	7
Settets innhold	7
Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger	7
Advarsler og forsiktighetsregler	8
Advarsler	8
Forsiktighetsregler	9
Oppbevaring og håndtering av reagensen	10
Komponenter i settet	10
Prosedyre	11
DNA-ekstraksjon	11
Protokoll: Deteksjon av HAdV-spesifikt DNA.	13
Tolking av resultater	24
Kjøringsvaliditet	24
Kvalitativ analyse	25
Kvantitativ analyse	26
Begrensninger	27
Kvalitetskontroll	28

Ytelsesegenskaper	28
Analytisk sensitivitet	29
Analytisk spesifisitet	30
Lineært område	32
Presisjon	33
Diagnostisk evaluering	34
Repeterbarhet	35
Symboler	37
Feilsøkingsveiledning	38
Bestillingsinformasjon	39

Bruksområde

artus[®] HAdV RG PCR Kit (96) er en test til *in vitro*-diagnostikk, basert på real-time PCR-teknologi, til deteksjon og kvantifisering av humant adenovirus (HAdV)-spesifikt DNA.

Sammendrag og forklaring

artus HAdV RG PCR Kit utgjør et brukklart system for deteksjon av HAdV-spesifikt DNA ved bruk av real-time PCR på Rotor-Gene Q-instrumenter. Analysen inkluderer et heterologt forsterkningssystem (intern kontroll) for å identifisere mulig PCR-hemming og bekrefte integriteten til settreagensene.

Patogeninformasjon

Humane adenovirus (HAdV), først isolert på 1950-tallet fra eksplantert adenoidvev, er dobbelttrådede, DNA-virus uten kappe fra *Adenoviridae*-familien, og tilhører *Mastadenovirus*-slekten. De er utbredt verden over uten et sesongbetont smitemønster.

HAdV er klassifisert i 7 arter A–G. Art B er ytterligere inndelt i B1 og B2. Minst 56 ulike serotyper (HAdV-1 til HAdV-56) er beskrevet til dags dato. Adenovirus forårsaker en lang rekke sykdommer, deriblant forkjølelse, faryngitt, bronkitt, pneumoni, diaré, konjunktivitt (øyeinfeksjon), feber, cystitt (blærekatarr eller urinveisinfeksjon), utslett og neurologisk sykdom.

Symptomer på denne sykdommen forårsaket av et adenovirus avhenger av virusets foretrukne vevstropisme. For eksempel forårsakes luftveissykdom ofte av art B1, C eller E, øyesykdom av art B, D eller E, gastroenteritt er påvist generelt å induseres av arti A, F eller G, mens nyre- og urinveisinfeksjoner ofte er forbundet med HAdV av arten B2.

Adenovirusenes epidemiologiske egenskaper varierer i henhold til type. Mens enkelte humane adenovirus er endemiske i deler av verden og infeksjon som regel erverves i barndommen, forårsaker andre typer sporadisk infeksjon og periodiske utbrudd. All HAdV overføres via direkte kontakt, fekal-oral overføring og av og til vannbåren overføring.

Selv om de fleste HAdV-infeksjoner er selvbegrensende, har alvorlig pneumoni oppstått sporadisk hos ellers friske personer. I tillegg kan enkelte typer skape vedvarende asymptomatiske infeksjoner i mandlener, adenoidene og tarmene til infiserte verter, og avskalling kan forekomme i flere måneder eller år. Reaktivering av latente infeksjoner hos verter med nedsatt immunforsvar, for eksempel transplanterte pasienter, kan føre til en livstruende disseminert sykdom.

Siden HAdV er svært resistent mot miljømessige forhold og svært smittefarlig, kan nosokomiale utbrudd av adenovirus-assosiert sykdom, for eksempel keratokonjunktivitt, lett forekomme hvis god praksis for infeksjonskontroll- og hygienepraktiser ikke følges nøye. I enkelte land er rapportering på lokalt regjeringnivå obligatorisk for enkelte typer HAdV-utbrudd.

Prosedyreprinsipp

HAdV RG Master A og HAdV RG Master B inneholder reagenser og enzymer for den spesifikke forsterkningen av målregioner innen HAdV-genomer og for direkte deteksjon av det spesifikke ampikonet i den fluorescerende kanalen Cycling Green for Rotor-Gene Q-instrumenter.

I tillegg inneholder *artus* HAdV RG PCR Kit et heterologt forsterkningssystem for å identifisere mulige feil under analyseprosessen. Dette påvises som en intern kontroll (IC) i den fluorescerende kanalen Cycling Yellow for Rotor-Gene Q-instrumenter.

Prober som er spesifikke for HAdV-DNA er merket med fluoroforet FAM™. Proben spesifikk for den interne kontrollen (IC) er merket med fluoroforet JOE™. Bruken av prober merket med spektralt differensierbare fluoroforer muliggjør samtidig deteksjon og kvantifisering av HAdV-DNA samt deteksjon av den interne kontrollen i de tilsvarende kanalene for Rotor-Gene Q-instrumentet.

Medfølgende materialer

Settets innhold

artus HAdV RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4530265
Antall reaksjoner		96
Blå	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Lilla	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Grønn	HAdV RG IC	1 x 1.000 µl
Rød	HAdV QS*	4 x 250 µl
Hvit	H ₂ O	1 x 500 µl
	Håndbok	1

*artus HAdV RG PCR Kit inneholder 4 kvantifiseringsstandarder (QS1–QS4).

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Før bruk, pass på at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAamp DNA Mini Kit) (QIAGEN kat.nr. 51304 or 51306; se "DNA-ekstraksjon", side 11)

Forbruksvarer

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (0,1 ml strimmelrør og lokk), til bruk med 72-brønns rotor (QIAGEN, kat.nr. 981103 or 981106)
- Nukleasefrie, lavt DNA-bindende mikrosentrifugerør til klargjøring av hovedblandinger
- Nukleasefrie pipettespisser med aerosolbarrierer

Utstyr

- Rotor-Gene Q MDx 5plex-, Rotor-Gene Q 5plex- eller Rotor-Gene Q 6plex-instrument
- Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.1 eller høyere
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminum block for manual reaction setup (Lasteblokk 72 x 0,1 ml rør, aluminumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett) (QIAGEN, kat.nr. 9018901)
- Dedikerte justerbare pipetter til prøveklargjøring
- Dedikerte justerbare pipetter til klargjøring av PCR-masterblanding.
- Dedikerte justerbare pipetter til dispensering av templat-DNA
- Vorteksblender
- Arbeidsbensentrifuge med rotor for 2 ml reaksjonsrør

Advarsler og forsiktighetsregler

For bruk i forbindelse med *in vitro*-diagnostikk.

Les alle instruksjonene nøye for du bruker testen.

Advarsler

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier.

Forsiktighetsregler

- Dette produktet skal kun brukes av personell med spesiell anvisning og opplæring i teknikkene for real-time PCR og *in vitro*-diagnostiske prosedyrer.
- Prøver skal alltid behandles som smittefarlige og/eller biologisk farlige i samsvar med sikre laboratorieprosedyrer.
- Bruk beskyttende puddefrie engangshansker, laboratoriefrakk og vernebriller ved håndtering av prøver.
- Unngå kontaminasjon med mikrober og nuklease (DNase/RNase) av prøven og komponentene i settet.
- Bruk alltid DNase/RNase-frie engangspipettespisser med aerosolbarrierer.
- Bruk alltid beskyttende puddefrie engangshansker ved håndtering av settkomponenter.
- Bruk separerte og segregerte arbeidsområder til prøveklargjøring, reaksjonsoppsett og forsterknings-/deteksjonsaktiviteter. Arbeidsflyten i laboratoriet skal fortsette på en ensrettet måte. Bruk alltid engangshansker i alle områder, og bytt dem før du går inn i et nytt område.
- Dediker forbruksvarer og utstyr til de separate arbeidsområdene, og flytt dem ikke fra område til område.
- Oppbevar positivt og/eller potensielt positivt materiale atskilt fra alle andre komponenter i settet.
- Ikke åpne reaksjonsrørene/-platene etter forsterkning for å unngå kontaminasjon med amplikoner.
- Ytterligere kontroller kan testes i samsvar med retningslinjer eller krav i lokale, statlige og/eller føderale bestemmelser eller godkjenningsorganer.
- Bruk ikke komponenter i settet som har gått ut på dato.
- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til de lokale sikkerhetsforskriftene.

Oppbevaring og håndtering av reagensen

Komponenter i settet

artus HAdV RG PCR Kit sendes på tørris. Komponentene i settet skal ankomme nedfrost. Hvis én eller flere komponenter ikke er nedfrost ved mottak, eller hvis rør har blitt forringet under forsendelse, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling for hjelp. Ved mottak må alle komponenter oppbevares ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Unngå tining og frysing av masterreagenser (mer enn to ganger), siden dette kan redusere analysens ytelse. Frys reagensene i alikvoter hvis de skal brukes på ulike tidspunkt. Ikke oppbevar reagenser ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mer enn 2 timer. Beskytt HAdV RG Master A og HAdV RG Master B mot lys.

artus HAdV RG PCR Kit inkluderer:

- To masterreagenser (HAdV RG Master A og HAdV RG Master B)
- Intern kontroll for templat (HAdV RG IC)
- Fire kvantifiseringsstandarder (HAdV QS1–4)
- Vann av PCR-kvalitet (H_2O)

HAdV RG Master A- og HAdV RG Master B-reagens inneholder alle komponenter (buffer, enzymer, primere og prober) til forsterkning og deteksjon av HAdV-spesifikt DNA og den interne kontrollen i en enkelt reaksjon.

Kvantifiseringsstandardene inneholder standardiserte konsentrasjoner av HAdV-spesifikt DNA. Disse kan brukes hver for seg som positive kontroller eller sammen for å generere en standardkurve, som kan brukes for å bestemme konsentrasjonen av HAdV-spesifikt DNA i prøven. Konsentrasjonene av kvantifiseringsstandardene er oppført i tabell 1.

Tabell 1. Konsentrasjon av kvantifiseringsstandarder

Kvantifiseringsstandard	Konsentrasjon (kopier/ μ l)
QS1	10.000
QS2	1.000
QS3	100
QS4	10

Prosedyre

DNA-ekstraksjon

HAdV-spesifikke målsekvenser forsterkes fra DNA. En analyseytelse avhenger av kvaliteten på templat-DNA. Sørg for å bruke et prøveklargjøringssett som produserer DNA egnet for bruk i nedstrøms PCR.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, katalognr. 51304 eller 51306) er anbefalt for DNA-rensing til bruk med *artus* HAdV RG PCR Kit. Utfør DNA-rensing i samsvar med instruksjonene i *håndboken for QIAamp DNA Mini*.

Siden vaskebufferne i QIAamp DNA Mini Kit inneholder etanol, må du utføre et ekstra sentrifuge-trinn før eluering. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et nytt 2 ml prøvetakingsrør, og kasser det gamle prøvetakingsrøret med filtratet. Sentrifuger i 10 minutter ved omtrent 17.000 x g (~13.000 rpm) på en benkesentrifuge.

Viktig: Bruken av transportør-RNA er avgjørende for ekstraksjonseffektiviteten og -stabiliteten til den ekstraherte nukleinsyren.

Viktig: Etanol er en sterk hemmer i real-time PCR. Hvis prøveklargjøringssettet bruker vaskebufferer som inneholder etanol, må du påse at alle rester av etanol fjernes før eluering av nukleinsyren.

Intern kontroll

artus HAdV PCR Kit inneholder en heterolog intern kontroll, som enten kan brukes som en PCR-hemmingskontroll eller som en kontroll for prøveklargjøringsprosedyren (nukleinsyreekstraksjon) og som en PCR-hemmingskontroll.

Hvis den interne kontrollen brukes som en PCR-hemmingskontroll, men ikke som en kontroll for prøveklargjøringsprosedyren, må du tilsette den interne kontrollen direkte i blandingen av HAdV RG Master A og HAdV RG Master B, som beskrevet i trinn 2b av protokollen (side 14).

Uansett hvilken metode/hvilket system som brukes til nukleinsyreekstraksjon, må ikke den interne kontrollen tilsettes direkte i prøven. Den interne kontrollen skal alltid tilsettes i prøve/lyseringsbufferblandingen. Volumet av intern kontroll som skal tilsettes i prøve/lyseringsbufferblandingen avhenger kun av elueringsvolumet, og utgjør 10 % av elueringsvolumet. For eksempel, ved bruk av QIAamp DNA Mini Kit, elueres DNA i 60 µl buffer-AE. Tilsett derfor 6 µl intern kontroll i prøve/lyseringsbufferblandingen for hver prøve.

Viktig: Ikke tilsett den interne kontrollen og transportør-RNA direkte i prøven.

Protokoll: Deteksjon av HAdV-spesifikt DNA.

Viktige punkter før du starter

- Før du starter prosedyren, les "Forsiktighetsregler", side 9.
- Ta deg tid til å gjøre deg kjent med Rotor-Gene Q-instrumentet før du starter protokollen. Se instrumentets brukerhåndbok.
- Påse at minst én positiv kontroll og én negativ kontroll (vann av PCR-kvalitet) inkluderes per PCR-kjøring.

Ting du skal gjøre før du starter

- Påse at nedkjølingsblokken (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) kjøles ned på forhånd til 2–8 °C.
- Før hver bruk må alle reagensene tines fullstendig, blandes (ved gjentatt pipettering opp og ned eller gjennom hurtig vorteksblending) og sentrifugeres raskt.

Prosedyre

1. Plasser det ønskede antallet PCR-rør i adapterne i nedkjølingsblokken.
2. Hvis du bruker den interne kontrollen for å overvåke DNA-isolasjonsprosedyren og for å kontrollere for mulig PCR-hemming, må du følge trinn 2a. Hvis du bruker den interne kontrollen utelukkende til kontroll av PCR-hemming, må du følge trinn 2b.

Bruk den interne kontrollen i samsvar med trinn 2b for alle prøver, kontroller og kvantifiseringsstandarder som skal analyseres.

2a. Den interne kontrollen er allerede tilsatt i isolasjonen (se "Intern kontroll", side 12). I dette tilfellet må du klargjøre en masterblending i samsvar med tabell 2.

Reaksjonsblandingen inneholder som regel alle komponentene som kreves for PCR, bortsett fra prøven.

Tabell 2. Klargjøring av masterblanding (intern kontroll brukt for å overvåke DNA-isolasjon og kontrollere for PCR-hemming)

Komponent	1 reaksjon	12 reaksjoner
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
Totalvolum	20 µl	240 µl

2b. Den interne kontrollen må tilsettes direkte i blandingen med HAdV RG Master A og HAdV Master B. I dette tilfellet må du klargjøre en masterblanding i samsvar med tabell 3.

Reaksjonsblandingene inneholder alle komponentene som kreves for PCR, bortsett fra prøven.

Tabell 3. Klargjøring av masterblanding (intern kontroll brukt utelukkende til kontroll av PCR-hemming)

Komponent	1 reaksjon	12 reaksjoner
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
Totalvolum	21 µl	252 µl

* Volumøkningen som forårsakes av å tilsette den interne kontrollen ignoreres når man klargjør PCR-analysen. Følsomheten til deteksjonssystemet reduseres ikke.

3. Pipetter 20 µl masterblanding i hvert PCR-rør. Tilsett deretter 10 µl av eluert prøve-DNA og bland godt ved å pipettere flere ganger opp og ned. Tilsvarende, tilsett 10 µl av en positiv kontroll eller kvantifiseringsstandard eller 10 µl vann (av PCR-kvalitet) som en negativ kontroll.

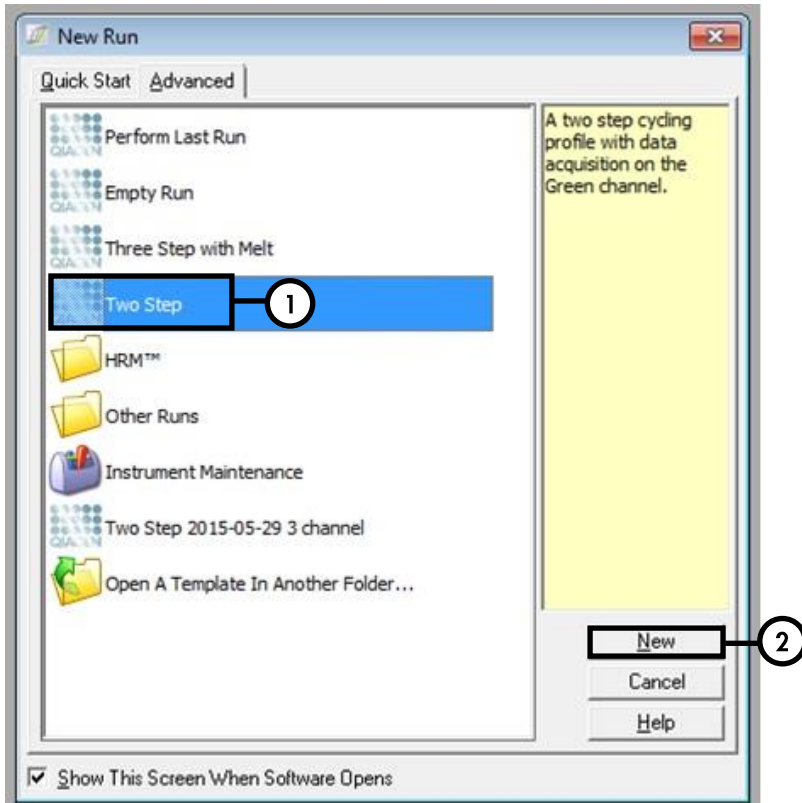
Påse at du minst har én positiv kontroll og én negativ kontroll per kjøring. For kvantifisering, bruk alle 4 kvantifiseringsstandarder (QS1–QS4).

4. Lukk PCR-rørene. Påse at låseringen (tilbehør for Rotor-Gene Q-instrumentet) plasseres oppå rotoren.
5. For deteksjon av HAdV-spesifikt DNA, opprett en temperaturprofil i samsvar med følgende trinn.

Stille inn de generelle analyseparametrene	Figur 1, 2, 3, 4
Innledende aktivering av varmstartsenzymet	Figur 5
Forsterkning av DNA	Figur 6
Justere fluorescenskanalfølsomheten	Figur 7
Starte kjøringen	Figur 8

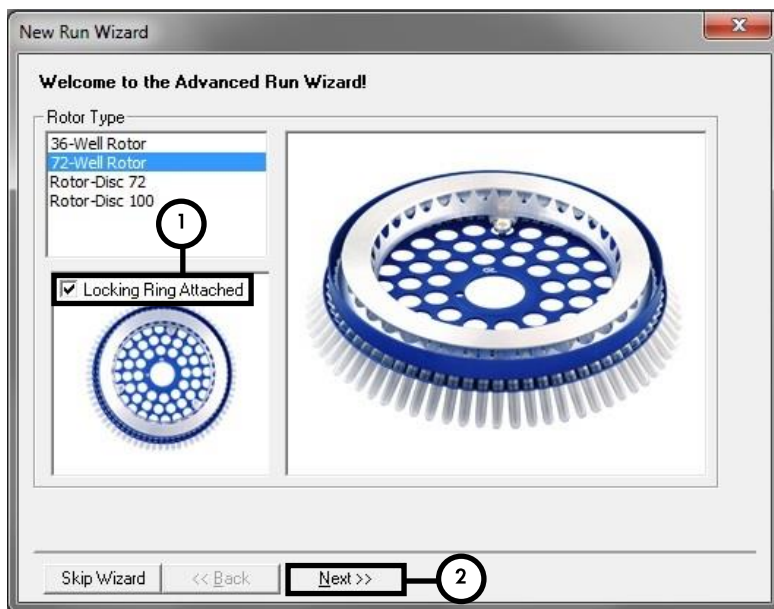
Alle spesifikasjoner henviser til Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.1 og høyere. Du finner mer informasjon om programmering av Rotor-Gene Q-instrumentene i instrumentets brukerhåndbok. I illustrasjonene er disse innstillingene innrammet i fet svart.

6. Først, åpne dialogboksen **New Run Wizard** (Veiviser for ny kjøring) med versjonen **Advanced** (Avansert) og velg **Two Step** (To trinn) (figur 1). Klikk på **Next** (Neste) for å fortsette.



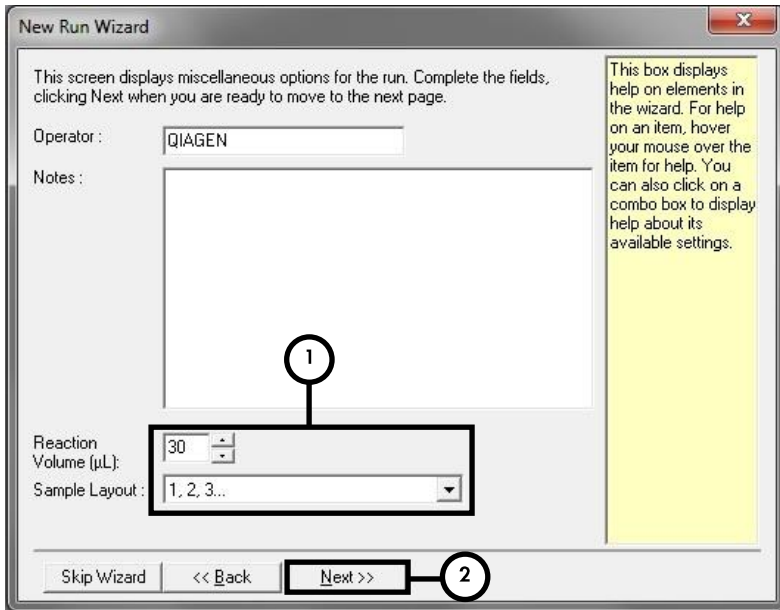
Figur 1. Dialogboksen New Run (Ny kjøring).

7. I neste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 2), merk av boksen **Locking Ring Attached** (Låsering festet) og klikk på **Next**.



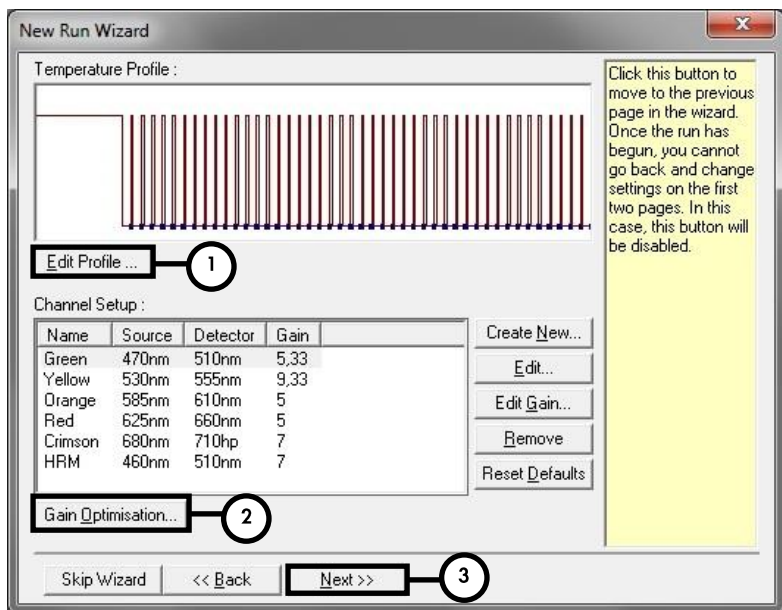
Figur 2. New Run Wizard-dialogboksen.

8. Velg **30** for PCR-reaksjonsvolumet og klikk på **Next** (figur 3).

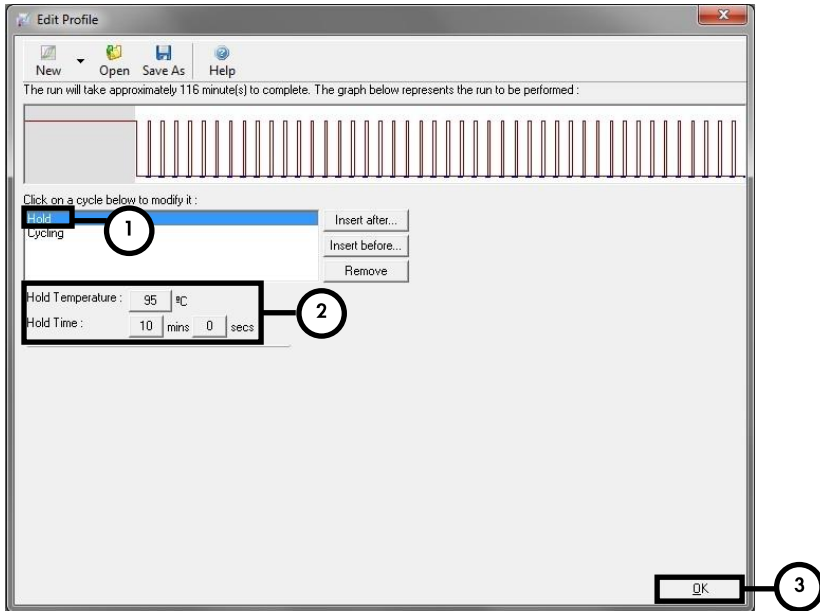


Figur 3. Stille inn de generelle analyseparametrene.

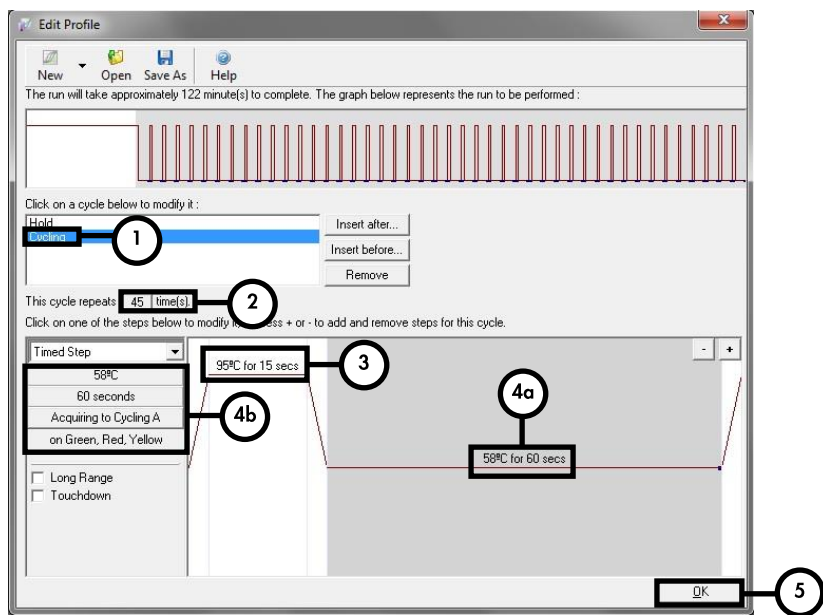
9. Klikk på knappen **Edit Profile** (Rediger profil) i neste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 4) og programmer temperaturprofilen som vist i figur 5–6.



Figur 4. Redigere profilen.

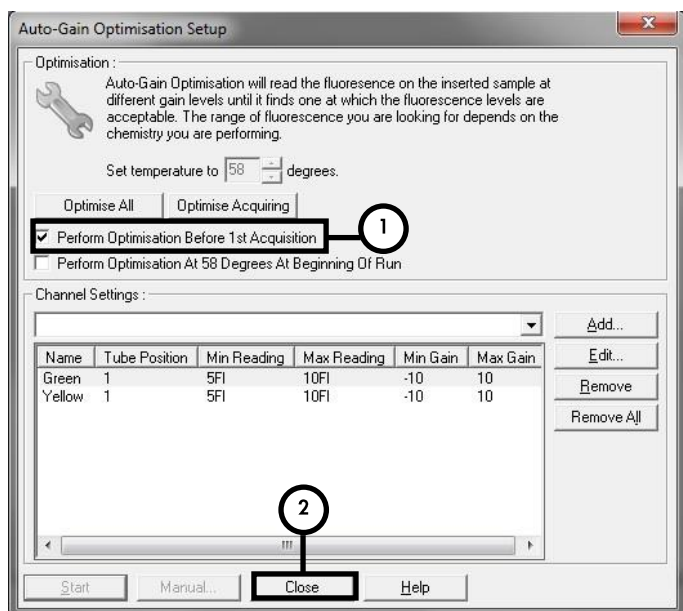


Figur 5. Innledende aktivering av varmstartsenzymet.



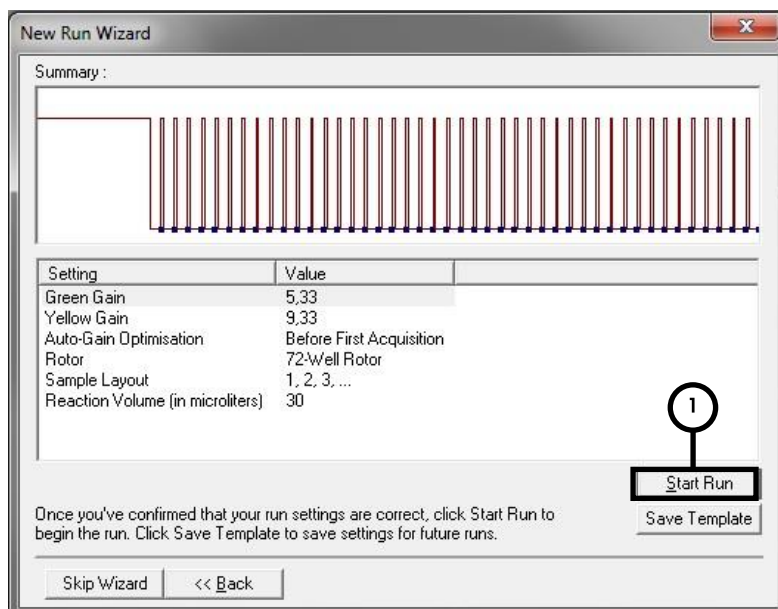
Figur 6. Forsterkning av DNA.

10. Påvisningsområdet for fluorescenskanalene må bestemmes ifølge fluorescensintensitetene i PCR-rørene. Klikk på **Gain Optimisation** (Øk optimalisering) i **New Run Wizard**-dialogboksen (se figur 4, trinn 2) for å åpne dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** (Oppsett av automatisk økning av optimalisering) (figur 7). Merk av boksen **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utfør optimalisering før 1. innhentning) (figur 7). Påse at begge kanaler (grønn og gul) er valgt for **Auto-Gain Optimisation** (Automatisk økning av optimalisering) (figur 7). (Finn kanaler i rullegardinmenyen under **Channel Settings** (Kanalinnstillinger) og klikk på **Add** (Legg til).) Klikk på **Close** (Lukk) i dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** når forsterkning av kalibrering er fullført.



Figur 7. Justere fluorescenskanalfølsomheten.

11. Økningsverdiene som fastsettes av kanalkalibreringen lagres automatisk og listes opp i det siste menyvinduet for programmeringsprosedyren (figur 8). Klikk på **Start Run** (Start kjøring).



Figur 8. Starte kjøringen.

12. Analyser dataene etter at kjøringen er ferdig (se "Talking av resultater", side 24).

Tolking av resultater

Kjøringsvaliditet

Gyldig kvalitativ kjøring

Følgende kontrollbetingelser må oppfylles for at en kvalitativ kjøring skal være gyldig (tabell 4).

Tabell 4. Kontrollbetingelser for en gyldig kvalitativ kjøring

Kontroll-ID	Deteksjonskanal	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Positiv kontroll (QS)	POSITIV	POSITIV
Negativ kontroll	NEGATIV	POSITIV

Ugyldig kvalitativ kjøring

En kvalitativ kjøring er ugyldig hvis kjøringen ikke er fullført eller hvis en av kontrollbetingelsene for en gyldig kvalitativ kjøring ikke er oppfylt.

Ved en ugyldig kvalitativ kjøring må du gjenta PCR eller ekstraher DNA fra originalprøvene på nytt hvis det ikke finnes mer DNA.

Gyldig kvantitativ kjøring

En kvantitativ kjøring er gyldig hvis alle kontrollbetingelser for en gyldig kvalitativ kjøring er oppfylt (se tabell 4, ovenfor). I tillegg, for nøyaktige kvantifiseringsresultater, må en gyldig standardkurve genereres. For en gyldig kvantitativ kjøring må standardkurven ha følgende kontrollparameterverdier (tabell 5).

Tabell 5. Kontrollparametre for en gyldig standardkurve

Kontrollparameter	Gyldig verdi
Helning	-3,743/-2,765
PCR-effektivitet	85 %/130 %
Forklart varians (R^2)	>0,98

Ugyldig kvantitativ kjøring

En kvantitativ kjøring er ugyldig hvis kjøringen ikke er fullført eller hvis en av kontrollbetingelsene for en gyldig kvantitativ kjøring ikke er oppfylt.

Ved en ugyldig kvantitativ kjøring må du gjenta PCR eller ekstraher DNA fra originalprøvene på nytt hvis det ikke finnes mer DNA.

Kvalitativ analyse

En tolkning av sammendrag av resultater vises i tabell 6.

Tabell 6. Tolkning av sammendrag av resultater

Prøve-ID	Deteksjonskanal		Tolkning av resultater
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIV	POSITIV*	HAdV-spesifikt DNA detektert.
B	NEGATIV	POSITIV	HAdV-spesifikt DNA ikke detektert. Prøven inneholder ikke påviselige mengder av HAdV-spesifikt DNA.
C	NEGATIV	NEGATIV	PCR-hemming eller reagensfeil. Gjenta prosedyren ved bruk av originalprøven eller samle inn og test en ny prøve.

* Deteksjon av den interne kontrollen i Cycling Yellow-deteksjonskanalen er ikke påkrevd for positive resultater i Cycling Green-deteksjonskanalen. En høy HAdV-belastning i prøven kan føre til reduserte eller fraværende intern kontroll-signaler.

Kvantitativ analyse

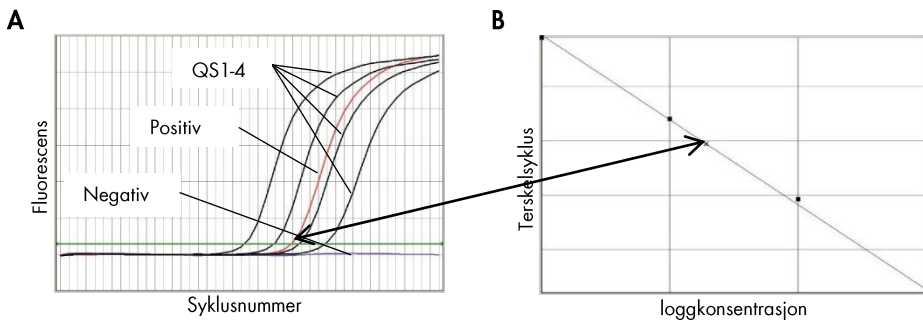
artus HAdV RG PCR Kit inneholder 4 kvantifiseringsstandarder (QS). For å generere en standardkurve for kvantitativ analyse må disse defineres som standarder med passende konsentrasjoner (se tabell 1, side 11). En standardkurve for kvantitative analyser kan genereres ved bruk av standarder med kjente konsentrasjoner.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = Terskelsyklus
- m = Helning
- N_0 = Innledende konsentrasjon
- b = Skjæringspunkt

Konsentrasjonene av positive prøver med ukjent konsentrasjon kan utledes fra standardkurven (figur 9).

$$N_0 = 10^{(C_t - b)/m}$$



Figur 9. Kvantifiseringsstandarder, en positiv og en negativ prøve vist i (A) et forsterkningsplott og (B) standardkurveanalyser.

Merk: Konsentrasjonen av prøven vises i kopier/ μ l og viser til konsentrasjonen av virus-DNA i eluatet.

Bruk følgende formel for å bestemme virusbelastningen til originalprøven.

$$\text{Virusbelastning (prøve)} \quad [\text{kopier/ml}] \quad = \quad \frac{\text{Volum (eluat)} \quad [\mu\text{l}] \times \text{virusbelastning (eluat)} \quad [\text{kopier}/\mu\text{l}]}{\text{Prøveinnmating} \quad [\text{ml}]}$$

Begrensninger

- Dette produktet skal kun brukes av personell med spesiell anvisning og opplæring i teknikkene for real-time PCR og *in vitro*-diagnostiske prosedyrer.
- God laboratoriepraksis er avgjørende for riktig ytelse av analysen.

- Vær ekstremt forsiktig for å bevare renheten til komponentene i sett- og reaksjonsoppsettene. Overvåk alle reagenser nøye for urenheter og kontaminasjon. Kasser alle reagenser med mistenkt kontaminasjon.
- Egnede prosedyrer for prøvetaking, -transport, -oppbevaring og -behandling er påkrevd for optimal ytelse av denne analysen.
- Bruk ikke denne analysen direkte på prøven. Utfør relevante prosedyrer for nukleinsyreekstraksjon før bruk av denne analysen.
- Tilstedeværelsen av PCR-hemmere kan forårsake falskt negative eller ugyldige resultater.
- Potensielle mutasjoner med målregioner av HAdV-genomet dekt av primerne og/eller probene brukt i settet kan føre til at patogenene ikke påvises.
- I likhet med alle diagnostiske tester må resultatene oppnådd med *artus* HAdV RG PCR Kit tolkes med hensyn til alle kliniske funn og laboratoriefunn.

Kvalitetskontroll

Hvert parti med *artus* HAdV RG PCR Kit testes mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Ytelseegenskaper

Siden det ikke finnes en internasjonal standard for adenovirus, ble kvantitativ ytelseevaluering av *artus* HAdV RG PCR Kit ble utført ved bruk av genomisk dnA fra et karakterisert HAdV3-isolat (art B).

For kvalitativ ytelseevaluering ble genomisk DNA for adenovirusart A–F analysert ved bruk av *artus* HAdV RG PCR Kit. Genomisk DNA ble hentet inn fra ATCC® (American Type Culture Collection) og fra karakteriserte cellekulturisolater. For analysering av art G (serotype HAdV-52) ble det brukt et plasmid som inneholdt tilsvarende målsekvens (tabell 7).

Tabell 7. Adenovirusarter og serotyper analysert med *artus* HAdV RG PCR Kit

HAdV-art	HAdV-serotype	Kilde	Resultat med <i>artus</i> HAdV RG PCR Kit
Art A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Positiv
	HAdV-31	Karakterisert isolat fra cellekultur	Positiv
	HAdV-18	Plasmid	Positiv
Art B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Positiv
	HAdV-7	Plasmid	Positiv
Art B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Positiv
	HAdV-11	Karakterisert isolat fra cellekultur	Positiv
	HAdV-55	Plasmid	Positiv
Art C	HAdV-1	ATCC-VR-1	Positiv
	HAdV-2	Plasmid	Positiv
	HAdV-5	ATCC-VR-5D	Positiv
	HAdV-6	Karakterisert isolat fra cellekultur	Positiv
Art D	HAdV-37	ATCC-VR-929D	Positiv
	HAdV-19	Plasmid	Positiv
Art E	HAdV-4	ATCC-VR-1572D	Positiv
Art F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Positiv
Art G	HAdV-52	Plasmid	Positiv

Analytisk sensitivitet

Den analytiske sensitiviteten til *artus* HAdV RG PCR Kit er definert som konsentrasjonen (kopier per μ l av eluatet) for HAdV-spesifikt DNA som kan detekteres med en positivitetsrate på ≥ 95 %. Den analytiske sensitiviteten ble bestemt ved å analysere en fortyningsserie med kvantifisert genomisk adenovirus-DNA (gruppe B, undertype 3) (tabell 8).

Tabell 8. PCR-resultater brukt til å beregne den analytiske sensitiviteten til *artus* HAdV RG PCR Kit

Innmatingskonsentrasjon (kopier/ μ l)	Antall replikater	Antall positive	Treffrate (%)	Intern kontroll
31,6	18	18	100	Gyldig
10,0	18	18	100	Gyldig
3,2	18	18	100	Gyldig
1,0	18	18	100	Gyldig
0,3	18	12	67	Gyldig
0,1	18	7	39	Gyldig
0,03	18	3	17	Gyldig
0,01	18	1	6	Gyldig
0,003	18	0	0	Gyldig

Den analytiske sensitiviteten til *artus* HAdV RG PCR Kit, bestemt ved bruk av probitanalyse, til deteksjon av HAdV-spesifikt DNA er 1,07 kopier/ μ l [95 % konfidensintervall [CI]: 0,58–2,99 kopier/ μ l].

Analytisk spesifisitet

Den analytiske spesifisiteten til *artus* HAdV RG PCR Kit sikrer av nøye utvalg av oligonukleotidene (primere og prober). Oligonukleotidene kontrolleres ved bruk av sekvenssammenligningsanalyse i forhold til offentlig tilgjengelige sekvenser for å sikre at alle relevante adenovirus-genotyper detekteres.

Den analytiske spesifisiteten til *artus* HAdV RG PCR Kit ble evaluert ved å teste et panel av genomisk DNA/RNA ekstrahert fra andre patogener som forårsaker lignende symptomer som adenovirusinfeksjoner og ved å teste humant genomisk DNA (tabell 9).

Tabell 9. Organismer testet for å demonstrere den analytiske spesifisiteten til *artus* HAdV RG PCR Kit

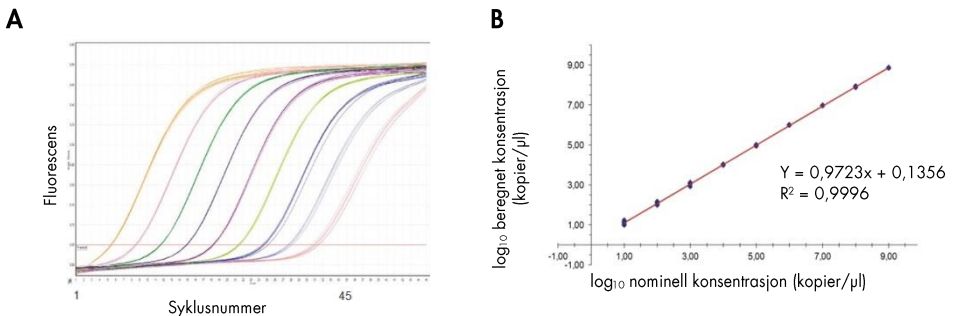
Organisme	Deteksjonskanal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
Humant genomisk DNA	Negativ	Gyldig
Varicella-Zoster-virus	Negativ	Gyldig
Herpes simplex-virus 1	Negativ	Gyldig
Herpes simplex-virus 2	Negativ	Gyldig
Epstein-Barr-virus	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 6 (A, B)	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 7	Negativ	Gyldig
Cytomegalovirus	Negativ	Gyldig
BK-virus	Negativ	Gyldig
JC-virus	Negativ	Gyldig
Simian-virus 40	Negativ	Gyldig
Hepatitt A-virus	Negativ	Gyldig
Hepatitt B-virus	Negativ	Gyldig
Hepatitt C-virus	Negativ	Gyldig
Humant immunsviktivirus 1	Negativ	Gyldig
Parvovirus B19	Negativ	Gyldig
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Negativ	Gyldig
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativ	Gyldig
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativ	Gyldig
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativ	Gyldig
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negativ	Gyldig
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativ	Gyldig

Organisme	Deteksjonskanal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativ	Gyldig
Coronavirus	Negativ	Gyldig
Influenzavirus A (inkl. H1N1-2009), B	Negativ	Gyldig
Respiratorisk syncytialvirus A, B	Negativ	Gyldig
Parainfluenzavirus 1–4	Negativ	Gyldig
Humant metapneumovirus	Negativ	Gyldig
Rhinovirus	Negativ	Gyldig

artus HAdV RG PCR Kit kryssreagerte ikke med noen av de spesifiserte organismene.

Lineært område

Det lineære området til *artus* HAdV RG PCR Kit ble evaluert ved å analysere en logaritmisk fortyningsserie med kvantifisert genomisk HAdV-2-DNA (art C) ved bruk av konsentrasjoner fra 1×10^9 til 0,1 kopier/l. Seks replikater per fortyning ble analysert.



Figur 10. Forsterkningskurve (A) og lineær regresjonsanalyse (B) av en fortyningsserie av genomisk DNA fra HAdV-2 (art C).

Det lineære området for *artus* HAdV RG PCR Kit strekker seg over et intervall på minst 8 størrelsesordener for HAdV-spesifikt DNA.

Presisjon

Presisjonen til *artus* HAdV RG PCR Kit ble bestemt av intra-analysevariabilitet (variabilitet innen ett eksperiment), inter-analysevariabilitet (variabilitet mellom ulike eksperimenter) og inter-partivariabilitet (variabilitet mellom ulike produksjonspartier).

Variabilitetsdata uttrykkes med hensyn til standardavvik og variasjonskoeffisient. Disse data er basert på kvantifiseringsanalyse av definerte konsentrasjoner av genomisk HAdV-DNA og på terskelsyklus (C_T)-verdier med hensyn til den interne kontrollen (henholdsvis tabell 10 og 11). Minst 6 replikater per prøve ble analysert for intra-analyse-, inter-analyse- og inter-partivariabilitet. Total varians ble beregnet ved å kombinere de 3 analysene.

Tabell 10. Presisjonsdata for det HAdV-DNA-spesifikke deteksjonssystemet for *artus* HAdV RG PCR Kit

HAdV-spesifikt system	Gjennomsnittlig kons. (kopier/ μ l)	Standardavvik	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	26,88	4,87	18,13
Inter-analysevariabilitet	35,11	8,65	24,63
Inter-partivariabilitet	27,39	4,65	16,97
Total varians	32,37	8,44	26,09

Tabell 11. Presisjonsdata for den interne kontrollen for *artus* HAdV RG PCR Kit

Intern kontroll	Gjennomsnittlig terskelsyklus (C_T)	Standardavvik	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	21,97	0,15	0,67
Inter-analysevariabilitet	22,12	0,19	0,87
Inter-partivariabilitet	22,05	0,25	1,12
Total varians	22,02	0,22	0,99

Diagnostisk evaluering

Den diagnostiske sensitiviteten og spesifisiteten til *artus* HAdV RG PCR Kit evalueres ved jevne mellomrom ved å analysere referanseprøver og diagnostiske prøver tidligere analysert med referansemetoder (dvs., intern PCR, DFA, "shell vial"-kultur, elektronmikroskopi, Luminex®-teknologi). Så langt er 223 prøver ekstrahert fra celleprøver, nasofaryngeale aspirater, bronkialsekreter, avføringsprøver, urinprøver, plasma- eller øyep prøver tatt med vannpinne samlet inn i ulike laboratorier testet for å bestemme den diagnostiske sensitiviteten og spesifisiteten til *artus* HAdV RG PCR Kit. Av disse 223 prøvene ble 50 forutsett å være HAdV-positive og 173 ble forutsett å være HAdV-negative ved bruk av referansemetoder (tabell 12). Fire prøver testet positive for HAdV (C_T-verdi 35,2, 36,8, 40,0 og 37,9) med *artus* HAdV RG PCR Kit som tidligere testet negativt med en intern PCR-test. Alle 50 prøver forutsett å inneholde HAdV-DNA ble bekreftet som HAdV-positive ved bruk av analyse med *artus* HAdV RG PCR Kit.

Tabell 12. Diagnostisk evaluering av *artus* HAdV-6 RG PCR Kit

		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
		NEGATIV	POSITIV
Referansemetode	NEGATIV	169	4*
	POSITIV	0	50

* C_t-verdi: 35,2, 36,8, 40,0 og 37,9.

Repeterbarhet







Spesifisiteten, sensitiviteten og nøyaktigheten for kvantifiseringen av *artus* HAdV RG PCR Kit ble evaluert ved å analysere etablerte ferdighetspaneler for adenovirus. For å sikre repeterbarhet av *artus* HAdV RG PCR Kit evalueres spesifisitet og sensitivitet ved å analysere etablerte ferdighetspaneler for adenovirus samt karakteriserte diagnostiske prøver ved jevne mellomrom.

Tabell 13. Resultater fra analyseringen av et ferdighetspanel for HAdV (QCMD) ved bruk av *artus* HAdV RG PCR Kit

Prøve-ID	Ferdighetspanel		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	Prøveinnhold	Forventet kons. (kopier/ml)	Resultat	Intern kontroll
14-01	HAdV-1	2.793	Positiv	Gyldig
14-02	HAdV-1	13.213	Positiv	Gyldig
14-03	HAdV-1	2.793	Positiv	Gyldig
14-04	HAdV-1	4.093	Positiv	Gyldig
14-05	HAdV-4	2.032	Positiv	Gyldig
14-06	HAdV-4	21.281	Positiv	Gyldig
14-07	Negativ	0	Negativ	Gyldig
14-08	HAdV-14	426.580	Positiv	Gyldig
14-09	HAdV-5	241	Positiv	Gyldig
14-10	HAdV-5	1.820	Positiv	Gyldig

Symboler

Symbolene i følgende tabell er benyttet i denne bruksanvisningen.

Symbol	Symboldefinisjon
 96	Inneholder tilstrekkelig for 96 tester
	Medisinsk enhet til <i>in vitro</i> -diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer
	Temperaturbegrensning
	Produsent

Symbol

Symboldefinisjon



Brukes innen



Materialnummer



GTIN-artikkelnummer



Se bruksanvisningen

Feilsøkingeveiledning

Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk www.qiagen.com).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	For 96 reaksjoner: Master A, Master B, 4 kvantifiseringsstandarder, intern kontroll, H ₂ O (vann av PCR-kvalitet) x5;	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	For 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinase K, reagenser, buffere, prøvetakingsrør (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	For 250 DNA-klargjøringer: 250 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinase K, reagenser, buffere, prøvetakingsrør (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9002022

Produkt	Innhold	Katalognr.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 3-års garanti på deler og utføring; og 3 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 2-års garanti på deler og utføring; og 2 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9001570

Produkt	Innhold	Katalognr.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) inkludert bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 3-års garanti på deler og utføring; og 3 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) inkludert bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 2-års garanti på deler og utføring; og 2 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød), inkludert bærbar datamaskin, programvare, tilbehør: inkluderer 1-årig garanti for deler og utføring, installasjon og opplæring	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød), inkludert bærbar datamaskin, programvare, tilbehør: inkluderer 1-årig garanti for deler og utføring, installasjon og opplæring ikke inkludert	9001590

Produkt	Innhold	Katalognr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strimler med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strimler med 4 rør og lokk til 10.000 reaksjoner	981106

Begrenset lisensavtale for *artus* HAdV RG PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet skal kun brukes i samsvar med protokollene som følger med produktet, og denne håndboken, og kun med komponentene som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine opphavsrettslige produkter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som følger med produktet, denne håndboken, og ytterligere protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Enkelt av disse tilleggsprotokollene er laget av QIAGENbrukere for QIAGENbrukere. Disse protokollene har ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN gir ingen garantier for disse eller lovnader om at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruken av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, med unntak av tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og dets komponenter er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN fraskriver seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, med unntak av de som er tydelig uttrykt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i å ikke gjøre eller la andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbudene i denne begrensede lisensavtalen ved en hvilken som helst domstol, og skal få tilbakebetalt alle sine saksomkostninger, inkludert advokatkostnader, i forbindelse med håndheving av denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter knyttet til settet og/eller dets komponenter.

Du finner oppdaterte lisensvilkår på www.qiagen.com.

Innkjøpet av dette produktet gjør det mulig for kjøperen å bruke det til å utføre diagnostiktjenester for human *in vitro*diagnostikk. Ingen generell patent eller annen lisens av noe annet slag enn denne spesifikke bruksrettigheten fra kjøpet garanteres.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *artus*[®], Rotor-Gene[®] [QIAGEN Group]; ATCC[®] (American Type Culture Collection Corporation); FAM[™], JOE[™] (Life Technologies Corporation); Luminex[®] (Luminex Corporation).

HB-2010-001

© 2015 altona Diagnostics GmbH, med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettsted www.qiagen.com

