

Oktober 2015

# Handleiding *artus*<sup>®</sup> HadV RG PCR Kit



Versie 1  
Voor gebruik met Rotor-Gene<sup>®</sup> Q  
apparaten

IVD

CE

REF



R1 MAT

4530265

altona Diagnostics GmbH,  
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, DUITSLAND

1096380-NL

Gedistribueerd door QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

Sample to Insight



---

# Inhoudsopgave

Beoogd gebruik.....	4
Samenvatting en uitleg .....	4
Informatie met betrekking tot het pathogeen.....	4
Principe van de procedure.....	6
Meegeleverde materialen .....	7
Inhoud van de kit .....	7
Benodigde maar niet meegeleverde materialen.....	7
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....	8
Waarschuwingen.....	8
Voorzorgsmaatregelen.....	9
Bewaren en hanteren van reagentia .....	10
Componenten van de kit .....	10
Procedure .....	11
DNA-extractie.....	11
Protocol: Detectie van HAdV-specifiek DNA.....	14
Interpretatie van de resultaten .....	25
Validiteit van de run .....	25
Kwalitatieve analyse.....	26
Kwantitatieve analyse .....	27
Beperkingen.....	28
Kwaliteitscontrole.....	29

---

Werkingseigenschappen .....	29
Analytische sensitiviteit .....	31
Analytische specificiteit .....	32
Lineair bereik .....	34
Nauwkeurigheid .....	35
Diagnostische evaluatie.....	37
Reproduceerbaarheid .....	38
Symbolen .....	40
Oplossen van problemen.....	41
Bestelinformatie .....	42

---

# Beoogd gebruik

De *artus*<sup>®</sup> HAdV RG PCR Kit (96) is een *in vitro* diagnostische test op basis van real-time PCR-technologie voor de detectie en kwantificatie van humaan adenovirus (HAdV)-specifiek DNA.

## Samenvatting en uitleg

De *artus* HAdV RG PCR Kit vormt een gebruiksklaar systeem voor de detectie van HAdV-specifiek DNA met behulp van real-time PCR op Rotor-Gene Q-apparaten. De assay omvat een heteroloog amplificatiesysteem (Interne Controle) om eventuele inhibitie van de PCR aan te tonen en de zuiverheid van de reagentia in de kit te bevestigen.

### Informatie met betrekking tot het pathogeen

Humane adenovirussen (HAdV), voor het eerst geïsoleerd in de jaren 50 van de vorige eeuw uit geëxplanteerd adenoïdweefsel, zijn dubbelstrengs, niet-omhulde DNA-virussen van de familie *Adenoviridae* en behoren tot het geslacht *Mastadenovirus*. Ze zijn wereldwijd verspreid zonder seizoensmatig infectiepatroon.

HAdV zijn ingedeeld in 7 typen A–G. Type B is verder onderverdeeld in B1 en B2. Op dit moment zijn er ten minste 56 verschillende serotypen (HAdV-1 tot HAdV-56) beschreven. Adenovirussen veroorzaken een breed scala aan ziektes waaronder verkoudheid, faryngitis, bronchitis, longontsteking, diarree, conjunctivitis (ooginfectie), koorts, cystitis (blaasontsteking of -infectie), uitslagaandoeningen en neurologische aandoeningen.

---

De symptomen van de ziekte die veroorzaakt is door een type adenovirus zijn afhankelijk van het geprefereerde weefseltropisme van het virus. Aandoeningen van de luchtwegen worden bijvoorbeeld vaak veroorzaakt door type B1, C of E, oogaandoeningen door type B, D of E, van gastro-enteritis is bekend dat het over het algemeen geïnduceerd wordt door type A, F of G, terwijl nier- en urineweginfecties vaak in verband worden gebracht met HAdV van het type B2.

De epidemiologische eigenschappen van de adenovirussen variëren afhankelijk van het type. Terwijl sommige humane adenovirussen in delen van de wereld endemisch zijn en de infectie gewoonlijk tijdens de kinderjaren wordt opgelopen, veroorzaken andere typen sporadische infecties en incidentele uitbraken. Alle HAdV worden overgebracht door direct contact, fecaal-orale overdracht en af en toe door overdracht via water.

Hoewel de meerderheid van de HAdV-infecties zelfbeperkend is, zijn er sporadisch ernstige vormen van longontsteking voorgekomen bij verder gezonde personen. Daarnaast kunnen sommige typen persisterende asymptomatische infecties veroorzaken in tonsillen, adenoïden en ingewanden van geïnfecteerde gastheren, en de verspreiding kan maanden tot jaren duren. Reactivering van latente infecties in immunodeficiënte gastheren, zoals ontvangers van een transplantaat, kan leiden tot een levensbedreigende ziekteverspreiding.

HAdV zijn zeer resistent tegen verschillende omgevingsomstandigheden en zeer besmettelijk, waardoor nosocomiale uitbraken van met adenovirus in verband gebrachte ziektes, zoals epidemische keratoconjunctivitis, gemakkelijk kunnen optreden als de juiste praktijken op het gebied van infectiebeheersing en hygiëne niet zorgvuldig worden gevolgd. In sommige landen is rapportage aan de lokale autoriteiten voor sommige gevallen van HAdV-uitbraken verplicht.

---

## Principe van de procedure

De HAdV RG Master A en HAdV RG Master B bevatten reagentia en enzymen voor de specifieke amplificatie van targetgebieden binnen het HAdV-genoom en voor de directe detectie van het specifieke amplicon in het Cycling Green-fluorescentiekanaal van Rotor-Gene Q-apparaten.

Daarnaast bevat de *artus* HAdV RG PCR Kit een heteroloog amplificatiesysteem om potentiële fouten gedurende het assayproces vast te stellen. Dit wordt gemeten als Interne Controle (IC) in het Cycling Yellow-fluorescentiekanaal van Rotor-Gene Q-apparaten.

Probes die specifiek zijn voor HAdV DNA zijn gelabeld met het fluorofoor FAM™. De probe die specifiek is voor de Interne Controle (IC) is gelabeld met het fluorofoor JOE™. Het gebruik van probes die gelabeld zijn met spectraal waarneembare fluoroforen maakt de gelijktijdige detectie en kwantificatie van HAdV DNA alsmede de detectie van de Interne Controle in de desbetreffende kanalen van het Rotor-Gene Q-apparaat mogelijk.

# Meegeleverde materialen

## Inhoud van de kit

<b>artus HAdV RG PCR Kit</b>		<b>(96)</b>
<b>Catalogusnummer</b>		<b>4530265</b>
<b>Aantal reacties</b>		<b>96</b>
Blauw	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Paars	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Groen	HAdV RG IC	1 x 1.000 µl
Rood	HAdV QS*	4 x 250 µl
Wit	H <sub>2</sub> O	1 x 500 µl
	Handleiding	1

\*De artus HAdV RG PCR Kit bevat 4 kwantificatiestandaards (QS1–QS4).

## Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Verzekert u er voor gebruik van dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

### Reagentia

- QIAamp DNA Mini-kit (QIAGEN cat. nr. 51304 of 51306; zie "DNA-extractie", blz. 11)

### Verbruiksartikelen

- 0,1 ml Strip Tubes and Caps (buisjesstrips met doppen), voor gebruik met 72-wells rotor (QIAGEN, cat. nr. 981103 of 981106)

- Nucleasevrije, laag DNA-bindende microcentrifugebuisjes voor het bereiden van mastermix
- Nucleasevrije pipettips met aërosolbarrière

### Uitrusting

- Rotor-Gene Q MDx 5plex-, Rotor-Gene Q 5plex- of Rotor-Gene Q 6plex-apparaat
- Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 of hoger
- Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes (laadblok 72 x 0,1 ml buisjes), aluminium blok voor handmatige reactieopstelling (QIAGEN, cat. nr. 9018901)
- Speciale instelbare pipetten voor samplebereiding
- Speciale instelbare pipetten voor de bereiding van PCR-mastermix
- Speciale instelbare pipetten voor de afgifte van template-DNA
- Vortexmixer
- Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostiek.

Lees alle instructies zorgvuldig door voordat u de test gebruikt.

### Waarschuwingen

Draag wanneer u met chemicaliën werkt altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril.



---

## Voorzorgsmaatregelen

- Het gebruik van dit product is beperkt tot personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de technieken van real-time PCR en in procedures voor in-vitrodiagnostiek.
- Samples moeten altijd als infectueus en/of biologisch gevaarlijk worden behandeld in overeenstemming met veilige laboratoriumpraktijken.
- Draag beschermende, poedervrije wegwerphandschoenen, een laboratoriumjas en oogbescherming wanneer u met samples werkt.
- Voorkom microbiële en nuclease- (DNase/RNase) verontreiniging van de sample en de componenten van de kit.
- Gebruik altijd DNase/RNase-vrije wegwerppipettips met aërosolbarrière.
- Draag altijd beschermende, poedervrije wegwerphandschoenen wanneer u met componenten van de kit werkt.
- Gebruik gescheiden en geïsoleerde werkgebieden voor samplebereiding, reactieopstelling en amplificatie-/detectieactiviteiten. De workflow in het laboratorium moet in één richting verlopen. Draag altijd wegwerphandschoenen in elk gebied, en trek steeds andere handschoenen aan voordat u een ander gebied binnengaat.
- Wijs materialen en apparatuur speciaal toe aan de verschillende werkgebieden en verplaats ze niet van het ene naar het andere gebied.
- Bewaar positief en/of potentieel positief materiaal gescheiden van alle andere componenten van de kit.
- Open de reageerbuisjes/platen na de amplificatie niet om verontreiniging met amplicons te vermijden.
- Extra controles kunnen worden getest volgens de richtlijnen of vereisten van de plaatselijke en/of landelijke voorschriften of accrediterende organisaties.
- Gebruik geen componenten van de kit waarvan de houdbaarheidsdatum verstreken is.
- Gooi sample- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

---

# Bewaren en hanteren van reagentia

## Componenten van de kit

De *artus* HAdV RG PCR Kit wordt verzonden op droogijs. U dient de componenten van de kit bevroren te ontvangen. Als een of meer componenten bij ontvangst niet bevroren zijn, of als er buisjes tijdens de verzending beschadigd zijn geraakt, neem dan contact op met de afdeling Technical Services van QIAGEN voor assistentie. Bewaar alle componenten van de kit na ontvangst bij een temperatuur van  $-30^{\circ}\text{C}$  tot  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Vermijd ontdooien en weer invriezen van Master-reagentia (meer dan twee keer), aangezien dit ertoe kan leiden dat de assay minder goed werkt. Vries de reagentia in aliquots in als het de bedoeling is om ze met tussenpozen te gebruiken. Bewaar reagentia niet langer dan 2 uur bij  $4^{\circ}\text{C}$ . Bescherm HAdV RG Master A en HAdV RG Master B tegen licht.

De *artus* HAdV RG PCR Kit bevat:

- Twee Master-reagentia (HAdV RG Master A en HAdV RG Master B)
- Template Interne Controle (HAdV RG IC)
- Vier kwantificatiestandaards (HAdV QS1–4)
- Water van PCR-kwaliteit ( $\text{H}_2\text{O}$ )

HAdV RG Master A- en HAdV RG Master B-reagentia bevatten alle componenten (buffer, enzymen, primers en probes) voor amplificatie en detectie van HAdV-specifiek DNA en de Interne Controle in één reactie.

De kwantificatiestandaards bevatten gestandaardiseerde concentraties HAdV-specifiek DNA. Deze kunnen afzonderlijk worden gebruikt als positieve controles of samen om een standaardcurve te genereren, die gebruikt kan worden om de

concentratie HAdV-specifiek DNA in de sample te bepalen. De concentraties van de kwantificatiestandaards staan in tabel 1.

**Tabel 1. Concentratie van kwantificatiestandaards**

Kwantificatiestandaard	Concentratie (exempl./ml)
QS1	10.000
QS2	1.000
QS3	100
QS4	10

## Procedure

### DNA-extractie

HAdV-specifieke targetsequenties worden geamplificeerd uit DNA. De prestaties van een assay zijn afhankelijk van de kwaliteit van het template-DNA, zorg er dus voor dat u een samplebereidingskit gebruikt die DNA oplevert dat geschikt is voor gebruik in downstream-PCR.

De QIAamp DNA Mini-kit (QIAGEN, cat. nr. 51304 of 51306) wordt aanbevolen voor DNA-opzuivering voor gebruik met de *artus* HAdV RG PCR Kit. Voer DNA-opzuivering uit volgens de instructies in het *QIAamp DNA Mini Handbook* (Handleiding QIAamp DNA Mini).

Aangezien de wasbuffers in de QIAamp DNA Mini-kit ethanol bevatten, dient u voor de elutie een extra centrifugering te doen. Plaats de QIAamp Mini spinkolom in een nieuw verzamelbuisje van 2 ml en gooi het oude verzamelbuisje met het

---

filtraat weg. Centrifugeer 10 minuten bij ca. 17.000 x g (~13.000 rpm) in een tafelcentrifuge.

**Belangrijk:** Het gebruik van carrier-RNA is cruciaal voor de extractie-efficiëntie en de stabiliteit van het geëxtraheerde nucleïnezuur.

**Belangrijk:** Ethanol is een sterke remmer in real-time PCR. Als in uw samplebereidingskit wasbuffers gebruikt worden die ethanol bevatten, zorg er dan voor dat u vóór de elutie van het nucleïnezuur alle sporen van ethanol heeft verwijderd.

### Interne Controle

De *artus* HAdV RG PCR Kit bevat een heterologe Interne Controle, die ofwel alleen als PCR-inhibitiecontrole ofwel als controle van de samplebereidingsprocedure (nucleïnezuurextractie) en als PCR-inhibitiecontrole kan worden gebruikt.

Als de Interne Controle als PCR-inhibitiecontrole, maar niet als controle voor de samplebereidingsprocedure wordt gebruikt, voeg de Interne Controle dan direct toe aan het mengsel van HAdV RG Master A en HAdV RG Master B, zoals beschreven in stap 2b van het protocol (blz. 15).

Ongeacht welke methode/systeem voor de nucleïnezuurextractie wordt gebruikt, de Interne Controle mag niet direct aan de sample worden toegevoegd. De Interne Controle moet altijd worden toegevoegd aan het mengsel sample/lysebuffer. Het volume Interne Controle dat aan het mengsel sample/lysebuffer moet worden toegevoegd, is alleen afhankelijk van het elutievolume, en bedraagt 10% van het elutievolume. Als u bijvoorbeeld de QIAamp DNA Mini-kit gebruikt, wordt het DNA geëluëerd in 60 µl buffer AE. Zodoende moet u 6 µl Interne Controle toevoegen aan het mengsel sample/lysebuffer van elke sample.

---

**Belangrijk:** Voeg de Interne Controle en het carrier-RNA niet direct toe aan de sample.

---

## Protocol: Detectie van HAdV-specifiek DNA

### Belangrijke punten voordat u begint

- Lees voordat u met de procedure begint “Voorzorgsmaatregelen”, blz. 9.
- Neem de tijd om vertrouwd te raken met de Rotor-Gene Q voordat u start met het protocol. Zie de gebruikershandleiding van het apparaat.
- Zorg ervoor dat per PCR-run ten minste één positieve controle en één negatieve controle (water van PCR-kwaliteit) worden opgenomen.

### Wat u moet doen voordat u begint

- Zorg ervoor dat het koelblok (accessoire van de Rotor-Gene Q) is voorgekoeld op 2–8°C.
- Vóór elk gebruik moeten alle reagentia volledig worden ontdooid, gemengd (door ze herhaaldelijk met een pipet op te zuigen of door ze snel te vortexen) en kort worden gecentrifugeerd.

### Procedure

1. Plaats het gewenste aantal PCR-buisjes in de adapters van het koelblok.
2. Volg stap 2a als u de Interne Controle zowel gebruikt om de DNA-isolatieprocedure te monitoren als op mogelijke PCR-inhibitie te controleren. Volg stap 2b als u de Interne Controle alleen gebruikt om op PCR-inhibitie te controleren.

Gebruik de Interne Controle volgens stap 2b voor alle te analyseren samples, controles en kwantificatiestandaards.

2a. De Interne Controle is al toegevoegd aan de isolatie (zie “Interne Controle”, blz. 12). Bereid in dat geval een mastermix volgens tabel 2.

De reactiemix bevat gewoonlijk alle componenten die nodig zijn voor PCR, behalve de sample.

**Tabel 2. Bereiding van mastermix (Interne Controle gebruikt voor monitoring van DNA-isolatie en controle op PCR-inhibitie)**

Component	1 reactie	12 reacties
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
<b>Totaal volume</b>	20 µl	240 µl

2b. De Interne Controle moet direct aan het mengsel van HAdV RG Master A en HAdV Master B worden toegevoegd. Bereid in dat geval een mastermix volgens tabel 3. De reactiemix bevat alle componenten die nodig zijn voor PCR, behalve de sample.

**Tabel 3. Bereiding van mastermix (Interne Controle alleen gebruikt voor controle op PCR-inhibitie)**

Component	1 reactie	12 reacties
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
<b>Totaal volume</b>	21 µl	252 µl

\* De volumetoename als gevolg van het toevoegen van de Interne Controle wordt bij het voorbereiden van de PCR-assay genegeerd. Dit doet geen afbreuk aan de sensitiviteit van het detectiesysteem.

3. Pipetteer 20 µl mastermix in elk PCR-buisje. Voeg vervolgens 10 µl geëluëerd sample-DNA toe en meng goed door een aantal keer op en neer te pipetteren. Voeg op overeenkomstige wijze 10 µl van een positieve controle of kwantificatiestandaard of 10 µl water (water van PCR-kwaliteit) als negatieve controle toe.

Zorg ervoor dat u per run ten minste één positieve controle en één negatieve controle heeft. Gebruik voor de kwantificatie alle 4 kwantificatiestandaards (QS1–QS4).

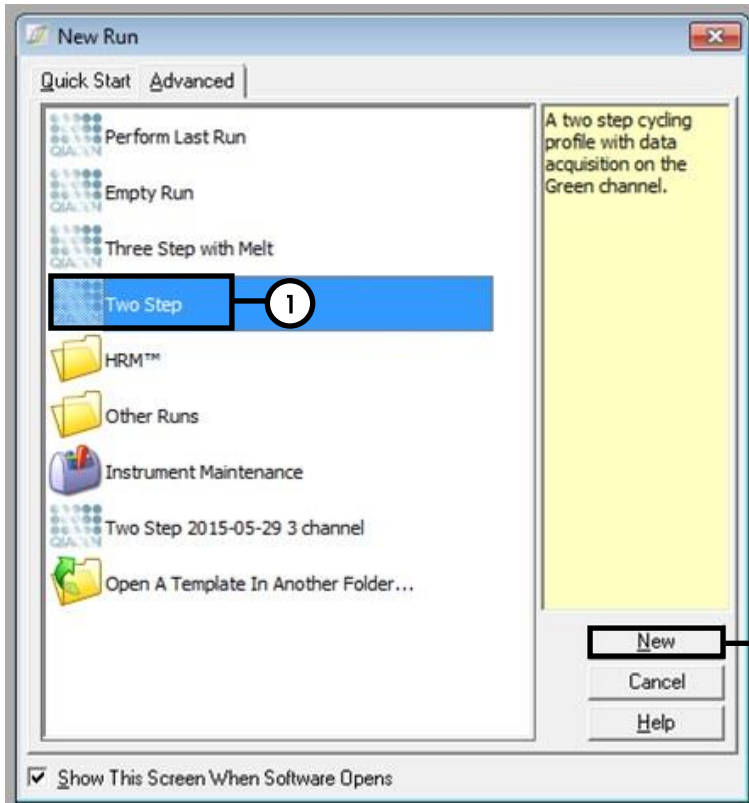
4. Sluit de PCR-buisjes. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (accessoire van het Rotor-Gene Q-apparaat) op de rotor is geplaatst.
5. Volg de onderstaande stappen om een temperatuurprofiel te creëren voor de detectie van HAdV-specifiek DNA.

<b>Instellen van de algemene assayparameters</b>	<b>Afbeelding 1, 2, 3, 4</b>
<b>Eerste activering van het hot-start-enzym</b>	<b>Afbeelding 5</b>
<b>Amplificatie van het DNA</b>	<b>Afbeelding 6</b>
<b>Instellen van de sensitiviteit van het fluorescentiekanal</b>	<b>Afbeelding 7</b>
<b>Starten van de run</b>	<b>Afbeelding 8</b>

Alle specificaties verwijzen naar de Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 en hoger. Meer informatie over het programmeren van Rotor-Gene Q-apparaten vindt u in de gebruiksaanwijzing bij het apparaat. In de illustraties hebben deze instellingen een vet zwart kader.

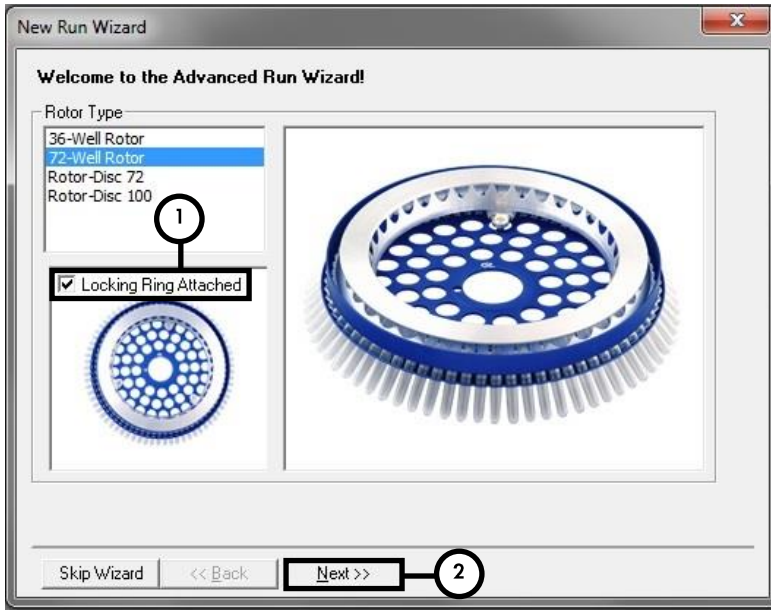
6. Open eerst het dialoogvenster **New Run Wizard** (Wizard nieuwe run) met de versie **Advanced** (Geavanceerd) en selecteer **Two Step** (Twee stappen) (afbeelding 1). Klik op **Next** (Volgende) om verder te gaan.





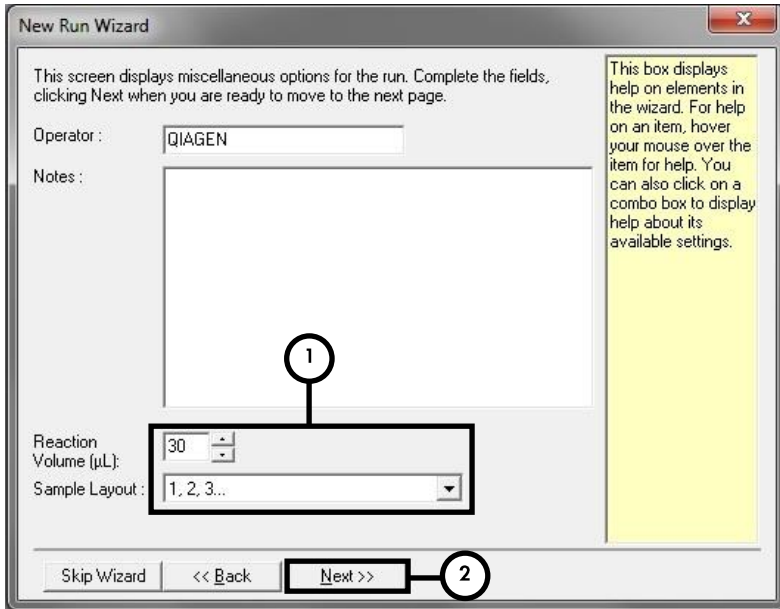
Afbeelding 1. Het dialoogvenster New Run.

7. Vink in het volgende dialoogvenster van de **New Run Wizard** (afbeelding 2) het selectievakje **Locking Ring Attached** (Vergrendelingsring bevestigd) aan en klik op **Next**.



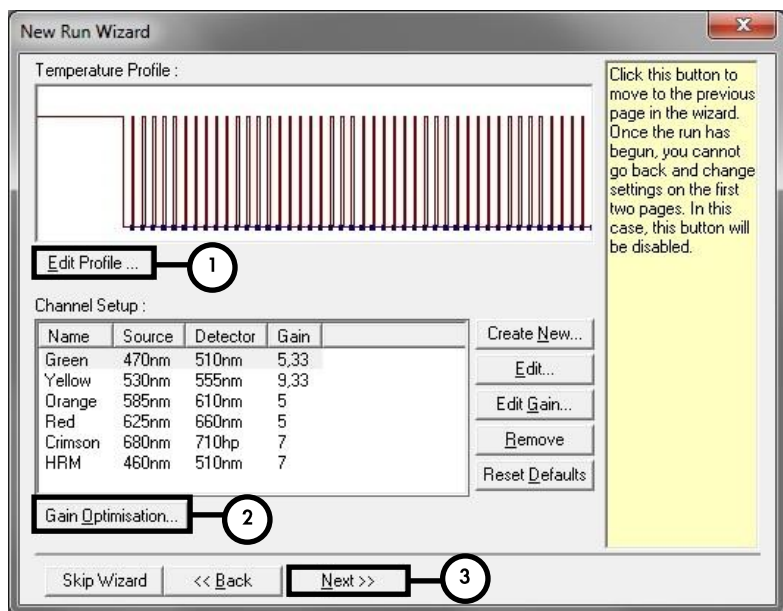
Afbeelding 2. Het dialoogvenster New Run Wizard.

8. Selecteer **30** voor het PCR-reactievolumen en klik op **Next** (afbeelding 3).

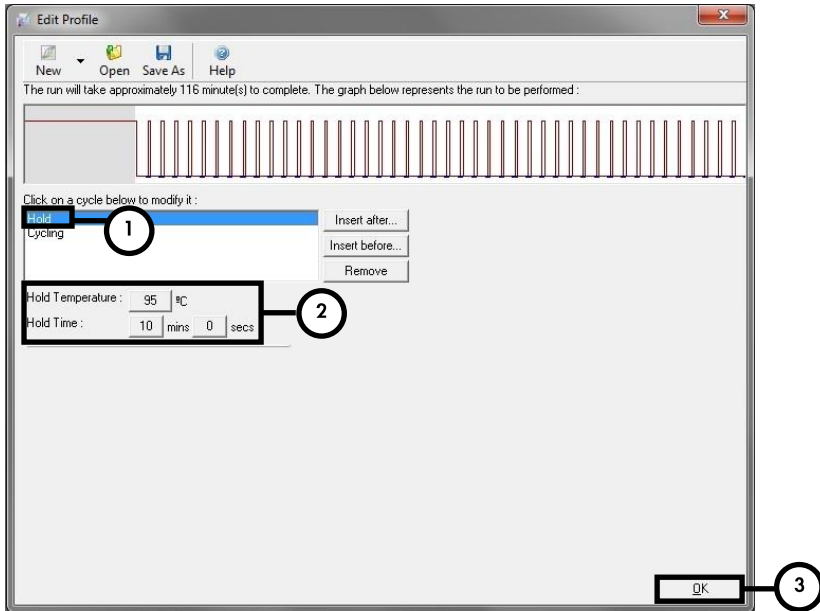


Afbeelding 3. Instellen van de algemene assayparameters.

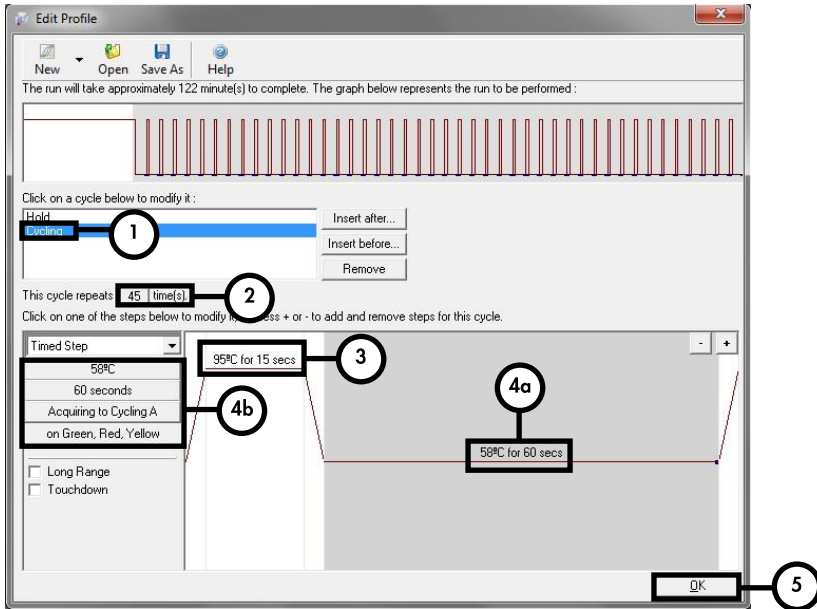
9. Klik op de knop **Edit Profile** (Profiel bewerken) in het volgende dialoogvenster van de **New Run Wizard** (afbeelding 4) en programmeer het temperatuurprofiel zoals getoond in de afbeeldingen 5–6.



Afbeelding 4. Het profiel bewerken.

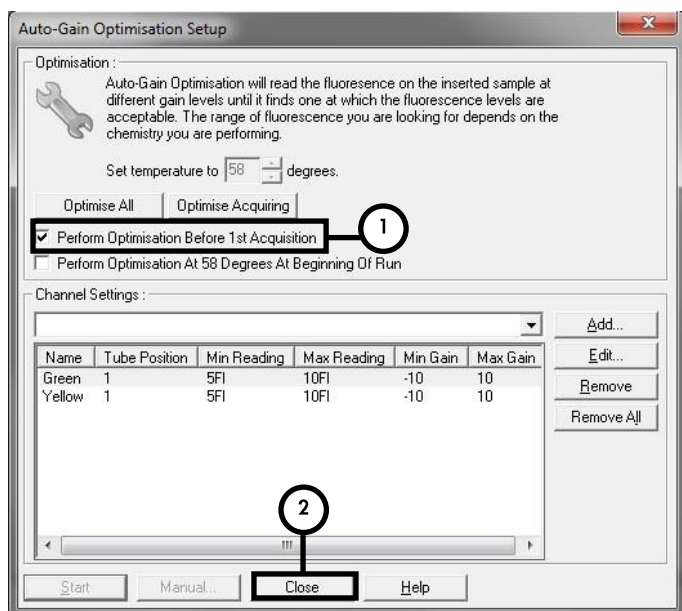


Afbeelding 5. Eerste activering van het hot-start-enzym.



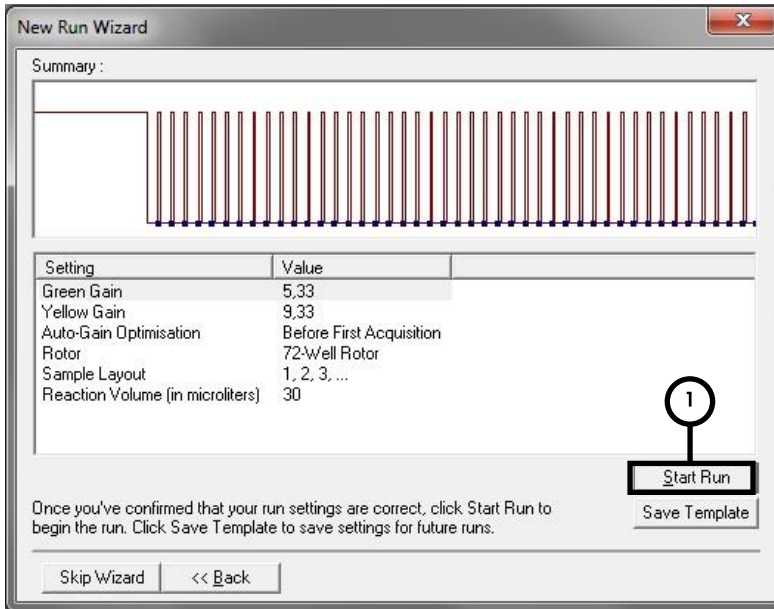
Afbeelding 6. Amplificatie van het DNA.

10. Het detectiebereik van de fluorescentiekanalen moet worden bepaald volgens de fluorescentie-intensiteiten in de PCR-buisjes. Klik op **Gain Optimisation** (Gain-optimalisering) in het dialoogvenster **New Run Wizard** (zie afbeelding 4, stap 2) om het dialoogvenster **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuratie auto-gain-optimalisatie) te openen (afbeelding 7). Vink het selectievakje **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Optimalisatie uitvoeren voor 1e verwerving) aan (afbeelding 7). Zorg ervoor dat beide kanalen (Green en Yellow) geselecteerd zijn voor **Auto-Gain Optimisation** (afbeelding 7). (Zoek de kanalen op in de vervolgkeuzelijst onder **Channel Settings** (Kanaalinstellingen) en klik op **Add** (Toevoegen). Klik op **Close** (Sluiten) in het dialoogvenster **Auto-Gain Optimisation Setup** zodra u klaar bent met de gain-kalibratie.



Afbeelding 7. Instellen van de sensitiviteit van het fluorescentiekanaal.

11. De gain-waarden die bepaald zijn door de kanaalkalibratie worden automatisch opgeslagen en verschijnen in het laatste menuvenster van de programmeringsprocedure (afbeelding 8). Klik op **Start Run** (Run starten).



Afbeelding 8. Starten van de run.

12. Zodra de run voltooid is, analyseert u de gegevens (zie “Interpretatie van de resultaten”, blz. 25).



# Interpretatie van de resultaten

## Validiteit van de run

### Geldige kwalitatieve run

Aan de volgende controlevoorwaarden moet voldaan zijn voordat een kwalitatieve run geldig is (tabel 4).

**Tabel 4. Controlevoorwaarden voor een geldige kwalitatieve run**

Controle-ID	Detectiekanaal	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Positieve controle (QS)	POSITIEF	POSITIEF
Negatieve controle	NEGATIEF	POSITIEF

### Ongeldige kwalitatieve run

Een kwalitatieve run is ongeldig als de run niet is voltooid of als er niet is voldaan aan een van de controlevoorwaarden voor een geldige kwalitatieve run.

In geval van een ongeldige kwalitatieve run herhaalt u de PCR of extraheert u nogmaals DNA uit de originele samples als er geen DNA meer over is.

### Geldige kwantitatieve run

Een kwantitatieve run is geldig als voldaan is aan alle controlevoorwaarden voor een geldige kwalitatieve run (zie bovenstaande tabel 4). Verder moet er voor nauwkeurige kwantificatieresultaten een geldige standaardcurve worden gegenereerd. Voor een geldige kwantitatieve run moet de standaardcurve de volgende controleparameterwaarden hebben (tabel 5).

**Tabel 5. Controleparameters voor een geldige standaardcurve**

<b>Controleparameter</b>	<b>Geldige waarde</b>
Helling	-3,743/-2,765
PCR-efficiëntie	85%/130%
R kwadraat ( $R^2$ )	>0,98

### Ongeldige kwantitatieve run

Een kwantitatieve run is ongeldig als de run niet is voltooid of als er niet is voldaan aan een van de controlevoorwaarden voor een geldige kwantitatieve run.

In geval van een ongeldige kwantitatieve run herhaalt u de PCR of extraheert u nogmaals DNA uit de originele samples als er geen DNA meer over is.

### Kwalitatieve analyse

Een samenvatting van de interpretatie van resultaten is te zien in tabel 6.

**Tabel 6. Samenvatting van de interpretatie van resultaten**

Sample-ID	Detectiekanaal		Interpretatie van de resultaten
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIEF	POSITIEF*	HAdV-specifiek DNA gedetecteerd.
B	NEGATIEF	POSITIEF	HAdV-specifiek DNA niet gedetecteerd. Sample bevat geen detecteerbare hoeveelheden HAdV-specifiek DNA.
C	NEGATIEF	NEGATIEF	PCR-inhibitie of reagensfout. Herhaal procedure met originele sample of neem en test een nieuwe sample.

\* Detectie van de Interne Controle in het Cycling Yellow-detectiekanaal is niet nodig voor positieve resultaten in het Cycling Green-detectiekanaal. Een hoge lading HAdV in de sample kan leiden tot verminderde of afwezige signalen voor de Interne Controle.

## Kwantitatieve analyse

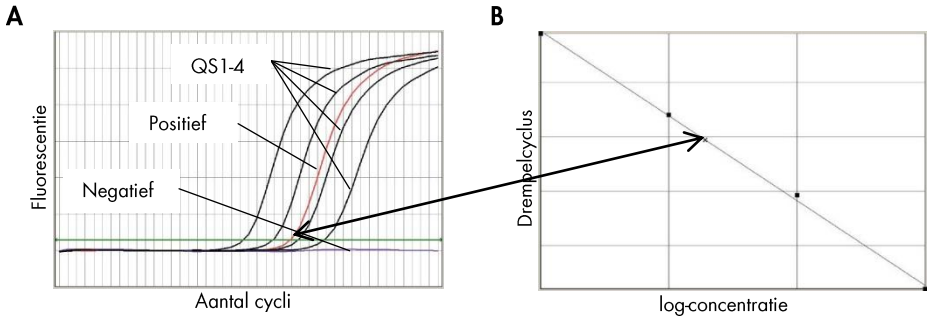
De *artus* HAdV RG PCR Kit bevat 4 kwantificatiestandaards (QS). Om een standaardcurve voor kwantitatieve analyse te genereren moeten deze worden gedefinieerd als standaards met passende concentraties (zie tabel 1, blz. 11). Een standaardcurve voor kwantitatieve analyse kan worden gegenereerd met behulp van standaards met bekende concentraties.

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

- $C_T$  = drempelcyclus
- $m$  = helling
- $N_0$  = aanvankelijke concentratie
- $b$  = afgesneden stuk

De concentraties van positieve samples met een onbekende concentratie kunnen worden ontleend aan de standaardcurve (afbeelding 9).

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



**Afbeelding 9.** Kwantificatiestandaards, een positieve en een negatieve sample met in (A) een amplificatiecurve en (B) standaardcurveanalyse.

**Opmerking:** De concentratie van de sample wordt getoond in exemplaren/ $\mu$ l en verwijst naar de concentratie viraal DNA in het eluaat.

Gebruik de volgende formule om de virale lading van de originele sample te bepalen.

$$\text{Virale lading (sample)} \left[ \frac{\text{exemplaren}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volume (eluaat)} \left[ \mu\text{l} \right] \times \text{virale lading (eluaat)} \left[ \frac{\text{exempl.}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Sampleinput} \left[ \text{ml} \right]}$$

## Beperkingen

- Het gebruik van dit product is beperkt tot personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de technieken van realtime PCR en in procedures voor in-vitrodiagnostiek.
- Goede laboratoriumpraktijken zijn essentieel voor een goede werking van deze assay.

- Ga uiterst zorgvuldig te werk om de componenten van de kit en de reactieopstellingen zuiver te houden. Houd alle reagentia nauwlettend in de gaten op onzuiverheden en verontreiniging. Gooi reagentia waarvan u vermoedt dat ze verontreinigd zijn weg.
- Voor een optimale werking van deze assay is het essentieel dat u voor de samples de juiste afname-, transport-, bewaar- en verwerkingsprocedures volgt.
- Gebruik deze assay niet direct op de sample. Voer de desbetreffende procedures voor nucleïnezuurextractie uit voordat u deze assay gebruikt.
- De aanwezigheid van PCR-remmers kan tot fout-negatieve of ongeldige resultaten leiden.
- Potentiële mutaties binnen de targetgebieden van het HAdV-genoom die door de in de kit gebruikte primers en/of probes worden gedekt, kunnen ertoe leiden dat de aanwezigheid van de pathogenen niet wordt gedetecteerd.
- Zoals bij elke diagnostische test dient u bij de interpretatie van de met de *artus* HAdV RG PCR Kit verkregen resultaten rekening te houden met alle klinische en laboratoriumbevindingen.

## Kwaliteitscontrole

Elk lot van de *artus* HAdV RG PCR Kit wordt getest tegen vooraf vastgestelde specificaties, om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

## Werkingseigenschappen

Aangezien er geen internationale standaard voor adenovirus beschikbaar is, is de beoordeling van de kwantitatieve prestaties van de *artus* HAdV RG PCR Kit gedaan met behulp van genomisch DNA van een gekarakteriseerd HAdV3-isolaat (type B).

Voor de beoordeling van de kwalitatieve prestaties is genomisch DNA van adenovirus type A–F geanalyseerd met behulp van de *artus* HAdV RG PCR Kit.

---

Genomisch DNA is verkregen uit ATCC® (American Type Culture Collection) en uit isolaten van gekarakteriseerde celculturen. Voor de analyse van type G (serotype HAdV-52) is een plasmide gebruikt dat de desbetreffende targetsequentie bevatte (tabel 7).

**Tabel 7. Adenovirus type en serotypen geanalyseerd met de *artus* HAdV RG PCR Kit**

HAdV-type	HAdV-serotype	Bron	Resultaat met de <i>artus</i> HAdV RG PCR Kit
Type A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Positief
	HAdV-31	Gekarakteriseerd isolaat uit celcultuur	Positief
	HAdV-18	Plasmide	Positief
Type B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Positief
	HAdV-7	Plasmide	Positief
Type B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Positief
	HAdV-11	Gekarakteriseerd isolaat uit celcultuur	Positief
	HAdV-55	Plasmide	Positief
Type C	HAdV-1	ATCC-VR-1	Positief
	HAdV-2	Plasmide	Positief
	HAdV-5	ATCC-VR-5D	Positief
	HAdV-6	Gekarakteriseerd isolaat uit celcultuur	Positief
Type D	HAdV-37	ATCC-VR-929D	Positief
	HAdV-19	Plasmide	Positief
Type E	HAdV-4	ATCC-VR-1572D	Positief
Type F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Positief
Type G	HAdV-52	Plasmide	Positief

## Analytische sensitiviteit

De analytische sensitiviteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit wordt gedefinieerd als de concentratie (exemplaren per  $\mu\text{l}$  van het eluaat) HAdV-specifiek DNA die met een positiviteitspercentage van  $\geq 95\%$  gedetecteerd kan worden. De analytische

sensitiviteit is bepaald door middel van analyse van een verdunningsreeks van gekwantificeerd genomisch adenovirus-DNA (groep B, subtype 3) (tabel 8).

**Tabel 8. PCR-resultaten gebruikt voor de berekening van de analytische sensitiviteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit**

Input-concentratie (exempl./ $\mu$ l)	Aantal replica's	Aantal positieven	Hit-rate (%)	Interne Controle
31,6	18	18	100	Geldig
10,0	18	18	100	Geldig
3,2	18	18	100	Geldig
1,0	18	18	100	Geldig
0,3	18	12	67	Geldig
0,1	18	7	39	Geldig
0,03	18	3	17	Geldig
0,01	18	1	6	Geldig
0,003	18	0	0	Geldig

De analytische sensitiviteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit, bepaald door probit-analyse, voor de detectie van HAdV-specifiek DNA is 1,07 exemplaren/ $\mu$ l (95% betrouwbaarheidsinterval [BI]: 0,58–2,99 exemplaren/ $\mu$ l).

## Analytische specificiteit

De analytische specificiteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit wordt gewaarborgd door zorgvuldige selectie van de oligonucleotiden (primers en probes). De oligonucleotiden worden gecontroleerd door sequentievergelijkinganalyse ten opzichte van openbaar verkrijgbare sequenties om er zeker van te zijn dat alle relevante adenovirus-genotypen gedetecteerd worden.



De analytische specificiteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit is beoordeeld door een panel van genomisch DNA/RNA te testen dat geëxtraheerd is uit andere pathogenen die vergelijkbare symptomen als adenovirus-infecties veroorzaken, en door humaan genomisch DNA te testen (tabel 9).

**Tabel 9. Geteste organismen om de analytische specificiteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit aan te tonen**

Organisme	Detectiekanaal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
Humaan genomisch DNA	Negatief	Geldig
Varicella-zoster virus	Negatief	Geldig
Herpes simplex virus 1	Negatief	Geldig
Herpes simplex virus 2	Negatief	Geldig
Epstein-barrvirus	Negatief	Geldig
Humaan herpesvirus 6 (A, B)	Negatief	Geldig
Humaan herpesvirus 7	Negatief	Geldig
Cytomegalovirus	Negatief	Geldig
BK-virus	Negatief	Geldig
JC-virus	Negatief	Geldig
Simianvirus 40	Negatief	Geldig
Hepatitis A virus	Negatief	Geldig
Hepatitis B virus	Negatief	Geldig
Hepatitis C virus	Negatief	Geldig
Humaan immunodeficiëntievirus 1	Negatief	Geldig
Parvovirus B19	Negatief	Geldig
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Negatief	Geldig
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negatief	Geldig

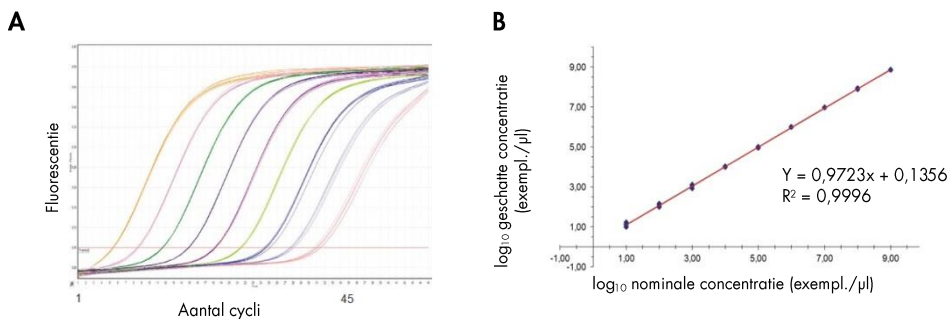
Organisme	Detectiekanaal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negatief	Geldig
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negatief	Geldig
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negatief	Geldig
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negatief	Geldig

Organisme	Detectiekanaal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negatief	Geldig
Coronavirus	Negatief	Geldig
Influenzavirus A (incl. H1N1-2009), B	Negatief	Geldig
Respiratoir syncytieel virus A, B	Negatief	Geldig
Para-influenzavirus 1–4	Negatief	Geldig
Humaan metapneumovirus	Negatief	Geldig
Rinovirus	Negatief	Geldig

De *artus* HAdV RG PCR Kit vertoont met geen van de gespecificeerde organismen kruisreacties.

## Lineair bereik

Het lineaire bereik van de *artus* HAdV RG PCR Kit is beoordeeld door een logaritmische verdunningsreeks van gekwantificeerd genomisch HAdV-2 DNA (type C) te analyseren met gebruik van concentraties die varieerden van  $1 \times 10^9$  tot 0,1 exemplaren/ $\mu$ l. Er werden zes replica's per verdunning geanalyseerd.



**Abbeelding 10. Amplificatiecurve (A) en lineaire regressieanalyse (B) van een verdunningsreeks van gemisch DNA uit HAdV-2 (type C).**

Het lineaire bereik van de *artus* HAdV RG PCR Kit strekt zich uit over een interval van ten minste 8 ordes van grootte voor HAdV-specifiek DNA.

## Nauwkeurigheid

De nauwkeurigheid van de *artus* HAdV RG PCR Kit is bepaald door middel van intra-assay-variabiliteit (variabiliteit binnen één experiment), inter-assay-variabiliteit (variabiliteit tussen verschillende experimenten) en inter-lot-variabiliteit (variabiliteit tussen verschillende productie-lots).

Variabiliteitsgegevens worden uitgedrukt in termen van standaarddeviatie en variatiecoëfficiënt. De gegevens zijn gebaseerd op kwantificatieanalyse van gedefinieerde concentraties gemisch HAdV DNA en op drempelcyclus ( $C_T$ )-

waarden ten opzichte van de Interne Controle (respectievelijk tabel 10 en 11). Voor de intra-assay-, inter-assay- en inter-lot-variabiliteit werden ten minste 6 replica's per sample geanalyseerd. De totale variantie werd berekend door de 3 analyses te combineren.

**Tabel 10. Nauwkeurigheidgegevens voor het HAdV DNA-specifiek detectiesysteem van de *artus* HAdV RG PCR Kit**

<b>HAdV-specifiek systeem</b>	<b>Gemiddelde conc. (exempl./<math>\mu</math>l)</b>	<b>Standaarddeviatie</b>	<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>
Intra-assay variabiliteit	26,88	4,87	18,13
Inter-assay variabiliteit	35,11	8,65	24,63
Inter-lot variabiliteit	27,39	4,65	16,97
Totale variantie	32,37	8,44	26,09

Tabel 11. Nauwkeurighedsgegevens voor de Interne Controle van de *artus* HAdV RG PCR Kit

Interne Controle	Gemiddelde drempelcyclus (C <sub>T</sub> )	Standaarddeviatie	Variatiecoëfficiënt (%)
Intra-assay variabiliteit	21,97	0,15	0,67
Inter-assay variabiliteit	22,12	0,19	0,87
Inter-lot variabiliteit	22,05	0,25	1,12
Totale variantie	22,02	0,22	0,99

## Diagnostische evaluatie

De diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit worden regelmatig beoordeeld door referentie- en diagnostische samples te analyseren die eerder zijn geanalyseerd met referentiemethoden (d.w.z. in-house PCR, DFA, shell vial cultuur, elektronenmicroscopie, Luminex® technologie). Tot dusver zijn 223 samples, verkregen uit uitstrijkjes, nasofaryngeale aspiraten, bronchiale secreties, fecessamples, urinesamples, plasma of ooguitstrijkjes die in verschillende laboratoria zijn verzameld, getest voor het bepalen van de diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de *artus* HAdV RG PCR Kit. Van deze 223 samples werd door referentiemethoden voorspeld dat er 50 HAdV-positief en 173 HAdV-negatief waren (tabel 12). Vier samples werden positief getest op HAdV (C<sub>T</sub>-waarden 35,2, 36,8, 40,0 en 37,9) met de *artus* HAdV RG PCR Kit die daarvoor negatief waren getest met een in-house PCR-test. Alle 50 samples waarvan voorspeld was dat ze HAdV DNA bevatten, werden bevestigd als zijnde HAdV-positief door analyse met de *artus* HAdV RG PCR Kit.

Tabel 12. Diagnostische evaluatie van de *artus* HAdV RG PCR Kit

	<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	NEGATIEF	POSITIEF
Referentiemethode	169	4*
	0	50

\* C<sub>t</sub>-waarden: 35,2, 36,8, 40,0 en 37,9.

## Reproduceerbaarheid

Specificiteit, sensitiviteit en nauwkeurigheid van de kwantificatie van de *artus* HAdV RG PCR Kit zijn beoordeeld door gestaaftde proficiency-panels voor adenovirus te analyseren. Om de reproduceerbaarheid van de *artus* HAdV RG PCR Kit te waarborgen, worden de specificiteit en sensitiviteit beoordeeld door regelmatig gestaaftde proficiency-panels voor adenovirus en gekarakteriseerde diagnostische samples te analyseren.

**Tabel 13. Resultaten van de analyse van een proficiency-panel voor HAdV (QCMD) met de *artus* HAdV RG PCR Kit**

Sample-ID	Proficiency-panel		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	Sample-inhoud	Verwachte conc. (exempl./ml)	Resultaat	Interne Controle
14-01	HAdV-1	2.793	Positief	Geldig
14-02	HAdV-1	13.213	Positief	Geldig
14-03	HAdV-1	2.793	Positief	Geldig
14-04	HAdV-1	4.093	Positief	Geldig
14-05	HAdV-4	2.032	Positief	Geldig
14-06	HAdV-4	21.281	Positief	Geldig
14-07	Negatief	0	Negatief	Geldig
14-08	HAdV-14	426.580	Positief	Geldig
14-09	HAdV-5	241	Positief	Geldig
14-10	HAdV-5	1.820	Positief	Geldig

# Symbolen

De symbolen in de volgende tabel worden in deze gebruiksaanwijzing gebruikt.

## Symbol

## Betekenis van het symbool



96

Inhoud voldoende voor 96 tests



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Lotnummer



Temperatuurlimiet



Fabrikant



## Symbol

## Betekenis van het symbool

---



Houdbaar tot



Materiaalnummer



Global Trade Item Number



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

## Oplossen van problemen

De wetenschappers bij de afdeling Technical Services van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en/of protocollen in deze handleiding of over sample- en assaytechnologieën (ga voor contactgegevens naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Bestelinformatie

Product	Inhoud	Cat. nr.
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	Voor 96 reacties: Master A, Master B, 4 kwantificatiestandaards, Interne Controle, H <sub>2</sub> O (water van PCR-kwaliteit)	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: 50 QIAamp Mini Spin Columns (50 QIAamp Mini spinkolommen), proteïnase K, reagentia, buffers, verzamelbuisjes (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Voor 250 DNA-bereidingen: 250 QIAamp Mini Spin Columns (250 QIAamp Mini spinkolommen), proteïnase K, reagentia, buffers, verzamelbuisjes (2 ml)	51306
<b>Rotor-Gene Q en accessoires</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green, yellow, orange, red, crimson), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002023

---

Rotor-Gene Q MDx 5plex  
Platform

Realtime PCR-cycler met 5 kanalen  
(green, yellow, orange, red, crimson),  
laptopcomputer, software, accessoires:  
inclusief 1 jaar garantie op onderdelen  
en arbeidsloon, exclusief installatie en  
training

9002022

<b>Product</b>	<b>Inhoud</b>	<b>Cat. nr.</b>
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green, yellow, orange, red, crimson), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief Priority Package met software, installatie, training, 3 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, en 3 preventieve onderhoudsbezoeken	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green, yellow, orange, red, crimson), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief Priority Package met software, installatie, training, 2 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, en 2 preventieve onderhoudsbezoeken	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green, yellow, orange, red, crimson), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen (green, yellow, orange, red, crimson), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9001570

Product	Inhoud	Cat. nr.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Realtime PCR-instrument met 6 kanalen (blue, green, yellow, orange, red, crimson), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: inclusief Priority Package met software, installatie, training, 3 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, en 3 preventieve onderhoudsbezoeken	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Realtime PCR-instrument met 6 kanalen (blue, green, yellow, orange, red, crimson), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: inclusief Priority Package met software, installatie, training, 2 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, en 2 preventieve onderhoudsbezoeken	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Realtime PCR-instrument met 6 kanalen (blue, green, yellow, orange, red, crimson), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Realtime PCR-instrument met 6 kanalen (blue, green, yellow, orange, red, crimson), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9001590

Product	Inhoud	Cat. nr.
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes (laadblok 72 x 0,1 ml buisjes)	Aluminium blok voor handmatige reactieopstelling met een eenkanaalspipet in 72 x 0,1 ml buisjes	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106

### **Beperkte licentieovereenkomst voor de artus HAdV RG PCR Kit**

Gebruik van dit product houdt in dat de koper of gebruiker van het product akkoord gaat met de volgende punten:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de bij het product en deze handleiding geleverde protocollen en is uitsluitend voor gebruik met componenten uit de kit. QIAGEN verleent geen licentie onder zijn intellectuele eigendommen om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of te incorporeren met andere componenten die niet in deze kit zijn opgenomen, met uitzondering van toepassingen die zijn beschreven in de bij het product geleverde protocollen, deze handleiding en aanvullende protocollen die beschikbaar zijn via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Sommige van deze aanvullende protocollen zijn verstrekt door QIAGEN-gebruikers, voor QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet uitvoerig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en verstrekt ook geen waarborg dat deze de rechten van derden niet schenden.
2. Buiten de expliciet vermelde licenties verstrekt QIAGEN geen waarborg dat deze kit en/of het gebruik ervan de rechten van derden niet schendt.
3. Voor deze kit en de componenten ervan is een licentie verleend voor eenmalig gebruik. Ze mogen niet worden hergebruikt, bijgewerkt of doorverkocht.
4. QIAGEN wijst specifiek alle andere dan de uitdrukkelijk vermelde, expliciete of impliciete, licenties af.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen, en niemand anders toestaan stappen te ondernemen, die kunnen leiden tot enige handeling die hierboven als verboden is vermeld, of die dergelijke handelingen mogelijk maken. QIAGEN kan naleving van de verboden van deze beperkte licentieovereenkomst bij elke rechtbank afdwingen en zal alle gemaakte kosten van rechbanken en onderzoeken terugvorderen, met inbegrip van honoraria van advocaten, bij elke handeling om naleving van deze beperkte licentieovereenkomst of intellectuele eigendomsrechten met betrekking tot de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Zie voor bijgewerkte licentievoorwaarden [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

De aankoop van dit product geeft de koper het recht om het product te gebruiken voor het uitvoeren van diagnostische diensten voor humane in-vitrodiagnostiek. Hierbij wordt door de aanschaf geen algemeen patent of andere licentie van enige aard verleend anders dan dit specifieke recht van gebruik.

Handelsmerken: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, artus<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection Corporation); FAM<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Luminex<sup>®</sup> (Luminex Corporation).

HB-2010-001

© 2015 altona Diagnostics GmbH, alle rechten voorbehouden.

---

Bestellen [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technische ondersteuning [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)