

Oktober 2015

Handbok till *artus*[®] HAdV RG PCR Kit



Version 1
För användning med Rotor-Gene[®] Q
instrument

IVD

CE

REF



R1 MAT

4530265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, TYSKLAND

1096380-SV

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

Innehåll

Användningsområde.....	4
Sammanfattning och förklaring.....	4
Information om patogen.....	4
Princip för proceduren.....	5
Material som medföljer.....	7
Kitinnehåll.....	7
Material som behövs men inte medföljer.....	7
Varningar och försiktighet.....	8
Varningar.....	8
Försiktighetsåtgärder.....	9
Förvaring och hantering av reagens.....	10
Kitkomponenter.....	10
Procedur.....	11
DNA-extrahering.....	11
Protokoll: Detektion av HAdV-specifikt DNA.....	13
Tolkning av resultat.....	24
Gilighetskörning.....	24
Kvalitativ analys.....	25
Kvantitativ analys.....	26
Begränsningar.....	27
Kvalitetskontroll.....	28

Prestandaegenskaper	28
Analytisk sensitivitet	29
Analytisk specificitet.....	30
Linjärt område.....	32
Precision	33
Diagnostisk utvärdering.....	34
Repeterbarhet	35
Symboler	37
Felsökningshandbok.....	38
Beställningsinformation.....	39

Användningsområde

artus[®] HAdV RG PCR Kit (96) är ett *in vitro*-diagnostiskt test baserat på realtidsrealtime PCR-teknik för detektion och kvantifiering av DNA specifikt för humant adenovirus (HAdV).

Sammanfattning och förklaring

artus HAdV RG PCR Kit utgör ett bruksfärdigt system för detektionen av HAdV-specifikt DNA med användning av real-time PCR i Rotor-Gene Q instrument. Analysen inkluderar ett heterogent amplifieringssystem (intern kontroll) för att identifiera eventuell PCR-inhibering och för att bekräfta integriteten för reagensen i kitet.

Information om patogen

Humant adenovirus (HAdV), som isolerades första gången på 1950-talet från explanterad adenoid vävnad, är dubbelsträngade DNA-virus utan hölje i familjen *Adenoviridae* som tillhör släktet *Mastadenovirus*. De har en global spridning utan säsongsmönster för infektion.

HAdV är indelat i 7 arter, A–G. Art B är vidare indelat i B1 och B2. Hittills har minst 56 olika serotyper (HAdV-1 till HAdV-56) beskrivits. Adenovirus orsakar flera sjukdomar inklusive förkylningar, faryngit, bronkit, pneumoni, diarré, konjunktivit (ögoninfektion), feber, cystit (inflammation eller infektion i urinblåsan), utslag och neurologisk sjukdom.

Symtomen på sjukdom orsakad av en art av adenovirus beror på vilken vävnadstropism viruset föredrar. Sjukdomar i andningsvägarna orsakas t.ex. ofta av arterna B1, C eller E, ögonsjukdom av arterna B, D, och det är känt att gastroenterit i allmänhet orsakas av arterna A, F eller G, medan infektioner i njurar och urinvägar ofta är förknippade med HAdV av arten B2.

Adenovirusets epidemiologiska egenskaper varierar beroende på typ. Medan vissa humana adenovirus är endemiska i vissa delar av världen och infektion ofta förvärvas under barndomen, orsakar andra typer sporadiska infektioner och tillfälliga utbrott. All HAdV överförs via direktkontakt, feka-oral överföring och ibland via vattenburen överföring.

Medan de flesta HAdV-infektioner är självbegränsande har allvarlig pneumoni uppstått sporadiskt hos annars friska personer. Dessutom kan vissa typer leda till ihållande asymtomatiska infektioner i tonsiller, polyper och tarmar hos infekterade värdar, och spridning kan förekomma i månader eller år. Reaktivering av latent infektion hos immunsupprimerade värdar, t.ex. transplantationsmottagare, kan leda till en livhotande disseminerad sjukdom.

HAdV är mycket resistent mot olika miljöförhållanden och mycket smittsamt, och nosokomiala utbrott av sjukdom som associeras med adenovirus, t.ex. epidemisk keratokonjunktivit, kan lätt uppstå om god infektionskontroll och hygienpraxis inte efterföljs noggrant. I vissa länder är obligatorisk rapportering till myndigheterna obligatorisk för vissa fall av HAdV-utbrott.

Princip för proceduren

HAdV RG Master A och HAdV RG Master B innehåller reagenser och enzymer för den specifika amplifieringen av målregioner i HAdV-genomet, och för direkt detektion av den specifika amplikonen i fluorescenskanalerna Cycling Green på Rotor-Gene Q instrument.

Dessutom innehåller *artus* HAdV RG PCR Kit ett heterologt amplifieringssystem för detektion av eventuella fel under analysen. Dessa detekteras som en intern kontroll (IC) i fluorescenskanalen Cycling Yellow i Rotor-Gene Q instrument.

Proben som är specifik för HAdV DNA är märkt med fluoroforen FAM™. Proben som är specifik för den interna kontrollen (IC) är märkt med fluoroforen JOE™. Användning av

prober märkta med spektralt urskiljbara fluoroforer möjliggör simultan detektion och kvantifiering av HAdV DNA samt detektion av den interna kontrollen i motsvarande kanaler i Rotor-Gene Q instrument.

Material som medföljer

Kitinnehåll

artus HAdV RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4530265
Antal reaktioner		96
Blå	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Purpur	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Grön	HAdV RG IC (intern kontroll)	1 x 1.000 µl
Röd	HAdV QS (kvalitetsstandard)*	4 x 250 µl
Vit	H ₂ O	1 x 500 µl
	Handbok	1

*artus HAdV RG PCR Kit innehåller 4 kvantifieringsstandarder (QS1–QS4).

Material som behövs men inte medföljer

Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer före användning.

Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAamp DNA Mini-kit) (QIAGEN kat. nr 51304 eller 51306; se "DNA-extrahering", sidan 11)

Förbrukningsartiklar

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (strip-rör och lock) för användning med 72-well rotor (72-brunnars rotor) (QIAGEN, kat.nr 981103 eller 981106)
- Nukleasfria, mikrocentrifugrör med låg DNA-bindning för beredning av masterblandningar.
- Nukleasfria pipettspetsar med aerosolbarriärer.

Utrustning

- Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex eller Rotor-Gene Q 6plex instrument
- Rotor-Gene Q programversion 2.3.1 eller högre
- Loading block (laddningsblock) 72 x 0,1 ml rör, aluminium block for manual reaction setup (aluminiumblock för manuell reaktionsinställning) (QIAGEN, kat.nr 9018901)
- Justerbara pipetter avsedda för provberedning
- Justerbara pipetter avsedda för beredning av PCR masterblandning
- Justerbara pipetter avsedda för dispensering av DNA-templat
- Vortexblandare
- Bänkcentrifug med rotor för 2 ml-reaktionsrör

Varningar och försiktighet

För *in vitro*-diagnostisk användning.

Läs alla anvisningar noga innan du använder testet.

Varningar

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Försiktighetsåtgärder

- Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i teknikerna för real-time PCR och *in vitro*-diagnostiska förfaranden.
- Prover ska alltid hanteras som smittsamma och/eller biologiskt farliga i enlighet med säkra laboratorieförfaranden.
- Använd puderfria engångshandskar, en laboratorierock och skyddsglasögon vid hantering av prover.
- Förhindra mikrobiell och nukleas (DNase/RNase) kontaminering av proverna och komponenterna i kitet.
- Använd alltid engångspipettspetsar med aerosolbarriärer fria från DNase/RNase.
- Använd alltid puderfria engångshandskar vid hantering av kitkomponenter.
- Använd separata och åtskilda arbetsområden för beredning av prover, reaktionsinställning och amplifiering/detektion. Arbetsflödet på laboratoriet ska ske i en riktning. Använd alltid engångshandskar i varje område, och byt ut dem innan du går vidare till nästa område.
- Material och utrustning ska vara avsedda för de olika arbetsområdena och inte flyttas från ett område till ett annat.
- Förvara positivt och/eller potentiellt positivt material separat från alla andra komponenter i kitet.
- Öppna inte reaktionsrör/-plattor efter amplifiering för att förhindra kontaminering med amplikoner.
- Ytterligare kontroller kan testas enligt riktlinjerna eller kraven i lokala eller nationella regelverk eller från ackrediteringsorganisationer.
- Använd inte komponenter i kitet efter utgångsdatum.
- Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Förvaring och hantering av reagens

Kitkomponenter

**artus* HAdV RG PCR-kitet transporteras på kolsyresnö. Komponenterna i kitet ska vara frysta vid mottagandet. Om en eller flera komponenter inte är frysta vid mottagandet, eller om rören har äventyrats under transporten ska du kontakta QIAGEN:s tekniska service för hjälp. Vid mottagandet ska alla kitkomponenter förvaras vid $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Undvik upprepad tining och frysning av masterreagenser (mer än två gånger) eftersom detta kan minska analysens prestanda. Frys reagenserna i alikvoter om de ska användas då och då. Förvara inte reagenser vid $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i längre än 2 timmar. HAdV RG Master A och HAdV RG Master B är ljuskänsliga.

artus HAdV RG PCR Kit inkluderar:

- Två masterreagenser (HAdV RG Master A och HAdV RG Master B)
- Mall för intern kontroll (HAdV RG IC)
- Fyra kvantifieringsstandarder (HAdV QS1–4)
- Vatten (H_2O), PCR-kvalitet

Reagenserna HAdV RG Master A och HAdV RG Master B innehåller alla komponenter (buffert, enzymer, primrar och prober) för amplifiering och detektion av HAdV-specifikt DNA och den interna kontrollen i en enda reaktion.

Kvantifieringsstandarderna innehåller standardiserade koncentrationer av HAdV-specifikt DNA. Dessa kan användas separat som positiva kontroller eller tillsammans för att skapa en standardkurva som kan användas för att fastställa koncentrationen av HAdV-specifikt DNA i provet. Koncentrationerna av kvantifieringsstandarderna visas i tabell 1.

Tabell 1. Kvantifieringsstandardernas koncentration

Kvantifieringsstandard	Koncentration (kopior/ μ l)
QS1	10.000
QS2	1.000
QS3	100
QS4	10

Procedur

DNA-extrahering

De specifika målsekvenserna för HAdV är amplifierade från DNA. Eftersom analysprestanda är beroende av kvaliteten på DNA-templaten, kontrollera att du använder ett provberedningskit som ger DNA som är lämpligt att använda vid nedströms PCR.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAamp DNA Mini-kit) (QIAGEN, kat. nr 51304 eller 51306) rekommenderas för DNA-rening för användning med *artus* HAdV RG PCR Kit. Utför DNA-reningen enligt anvisningarna i *QIAamp DNA Mini Handbook* (Handbok till *QIAamp DNA Mini*) (engelska).

Eftersom tvättbufferten i QIAamp DNA Mini Kit innehåller etanol ska ett ytterligare centrifugeringssteg utföras före eluering. Placera QIAamp Mini spinkolonn i ett nytt 2 ml provrör och kasta det gamla provröret med filtratet. Centrifugera i 10 minuter vid cirka 17.000 x g (~13.000 varv/min) i en bänkcentrifug.

Viktigt! Användningen av bärar-RNA är viktig för extraktionseffektiviteten och stabiliteten hos den extraherade nukleinsyran.

Viktigt! Etanol är en stark hämmare vid real-time PCR. Om ditt provberedningskit använder tvättbuffert som innehåller etanol, kontrollera att du tar bort alla spår av etanol före eluering av nukleinsyran.

Intern kontroll

artus HAdV RG PCRKit innehåller en heterolog intern kontroll, som antingen kan användas som en PRC-inhiberingskontroll eller som en kontroll av provberedningsförfarandet (extrahering av nukleinsyra) och som en PCR-inhiberingskontroll.

Om den interna kontrollen används som en PCR-inhiberingskontroll, men inte som en kontroll för provberedningsförfarandet, tillsätt den interna kontrollen direkt till blandningen av HAdV RG Master A och HAdV RG Master B, enligt beskrivningen i steg 2b i protokollet (sidan 14).

Oavsett vilken metod/system som används för extrahering av nukleinsyra får den interna kontrollen inte tillsättas direkt till provet. Den interna kontrollen ska alltid tillsättas direkt till blandningen av prov/lyseringsbuffert. Volymen på den interna kontroll som ska tillsättas till blandningen prov/lyseringsbuffert beror bara på elueringvolymen och motsvarar 10 % av elueringvolymen. Till exempel vid användning av QIAamp DNA Mini Kit elueras DNA i 60 µl buffert AE. Tillsätt därför 6 µl intern kontroll till blandningen prov/lyseringsbuffert för varje prov.

Viktigt! Tillsätt inte den interna kontrollen och bärar-RNA direkt till provet.

Protokoll: Detektion av HAdV-specifikt DNA

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar förfarandet läser du "Försiktighetsåtgärder", sidan 9.
- Ta dig tid att bekanta dig med Rotor-Gene Q instrument innan du startar protokollet. Se instrumentets användarhandbok.
- Säkerställ att minst en positiv kontroll och en negativ kontroll (vatten, PCR-kvalitet) ingår i varje PCR-körning.

Saker som ska utföras före start

- Säkerställ att kylblocket (tillhör till Rotor-Gene Q instrument) är förkylt till 2–8 °C.
- Före varje användning måste alla reagenser tinas helt, blandas (pipettera upprepade gånger upp och ned eller vortex-blanda snabbt) och centrifugeras under kort tid.

Procedur

1. Placera önskat antal PCR-rör i kylblockets adaptrar.
2. Om du använder den interna kontrollen för att övervaka DNA-isoleringen och kontrollera eventuell PCR-inhibering, följ steg 2a. Om du använder den interna kontrollen uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering, följ steg 2b.

Använd den interna kontrollen enligt steg 2b för alla prov, kontroller och kvantifieringsstandarder som ska analyseras.

- 2a. Den interna kontrollen har redan tillsatts till isolatet (se "Intern kontroll", sidan 12). I detta fall ska du bereda en masterblandning enligt tabell 2.

Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 2. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används för att övervaka DNA-isolering och kontrollera PCR-inhibering)

Komponent	1 reaktion	12 reaktioner
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
Total volym	20 µl	240 µl

- 2b. Den interna kontrollen måste tillsättas direkt till blandningen av HAdV RG Master A och HAdV Master B. I detta fall, bered en masterblandning enligt tabell 3. Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 3. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering)

Komponent	1 reaktion	12 reaktioner
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
Total volym	21 µl	252 µl

* Volymökningen som orsakas av tillsats av den interna kontrollen är försumbar vid förberedelse av PCR-analysen. Detektionssystemets sensitivitet försämras inte.

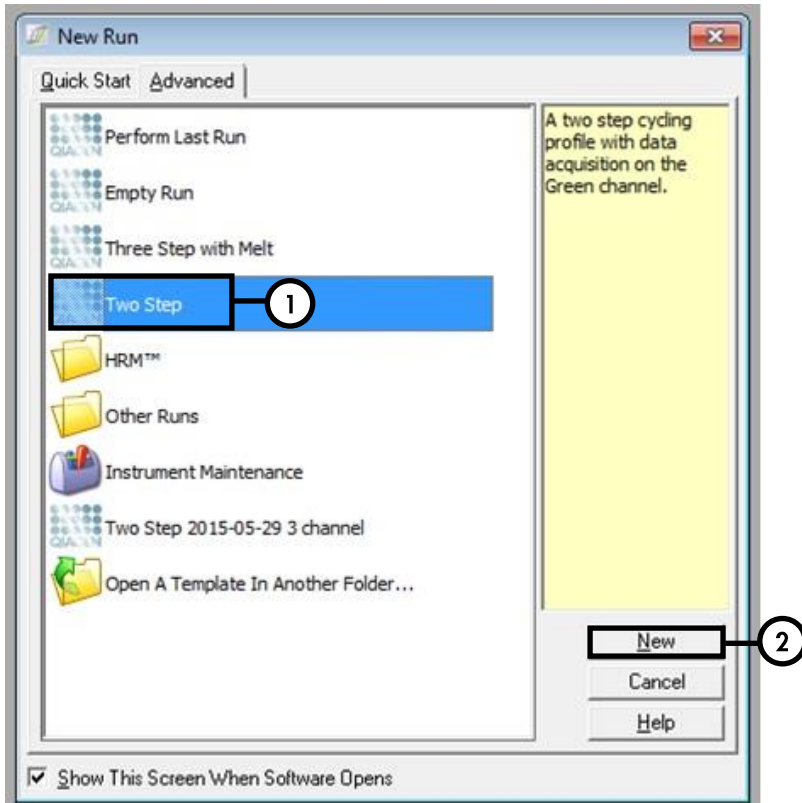
3. Pipettera 20 µl av masterblandningen i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 10 µl eluerat prov-DNA och blanda väl genom pipettering upp och ned flera gånger. Tillsätt på motsvarande sätt 10 µl positiv kontroll eller kvantifieringsstandard eller 10 µl vatten (PCR-kvalitet) som en negativ kontroll.
- Säkerställ att minst en positiv kontroll och en negativ kontroll ingår i varje körning. Använd alla 4 kvantifieringsstandarder (QS1–QS4) för kvantifiering.
4. Stäng PCR-rören. Kontrollera att låsringen (tillbehör till Rotor-Gene Q instrument) är placerad överst på rotorn.

5. Skapa en temperaturprofil för detektion av HAdV-specifikt DNA genom att utföra följande steg.

Inställning av allmänna analysparametrar	Figur 1, 2, 3, 4
Första aktivering av enzym med varmstart	Figur 5
DNA-amplifiering	Figur 6
Justering av fluorescenskanalsensitiviteten	Figur 7
Start av körningen	Figur 8

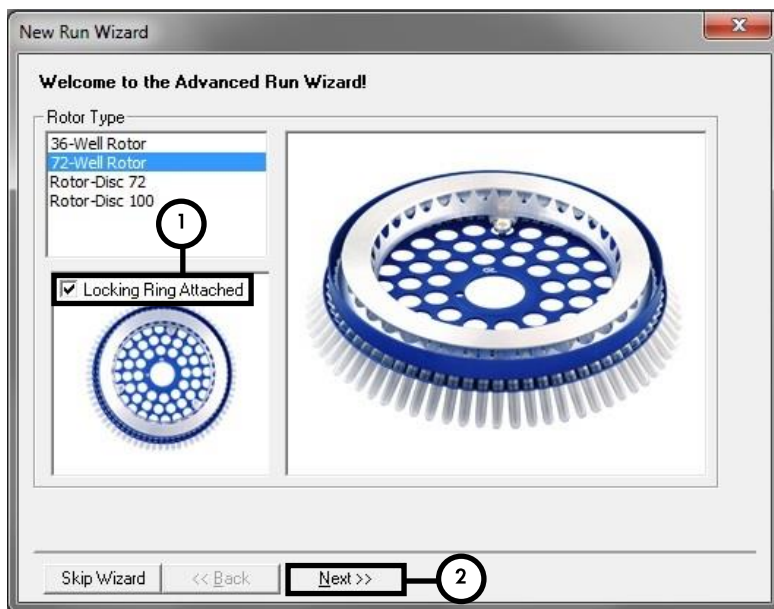
Alla specifikationer hänför sig till Rotor-Gene Q, programversion 2.3.1 och högre. Mer information om hur du programmerar Rotor-Gene Q instrument hittar du i användarhandboken till instrumentet. I illustrationerna är dessa inställningar inramade i svart fet stil.

6. Öppna först dialogrutan **New Run Wizard** (Ny körning av guide) med versionen **Advanced** (Avancerad) och välj **Two Step** (Två steg) (figur 1). Klicka på **"Next"** (Nästa) för att fortsätta.



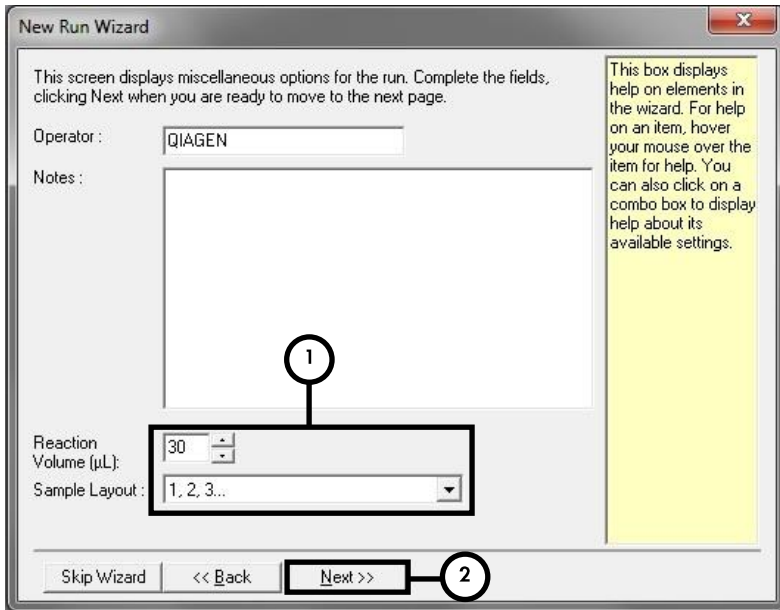
Figur 1. Dialogrutan "New Run" (ny körning).

7. Markera rutan **Locking Ring Attached** (Låsring ansluten) och klicka på **Next** i nästa dialogruta, **New Run Wizard** (figur 2).



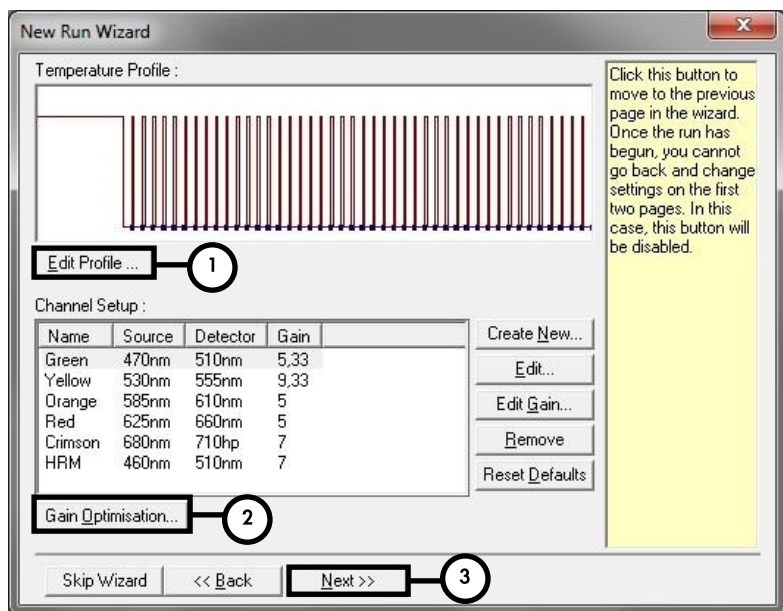
Figur 2. Dialogrutan "New Run Wizard".

8. Välj **30** för PCR-reaktionsvolymen och klicka på **Next** (figur 3).

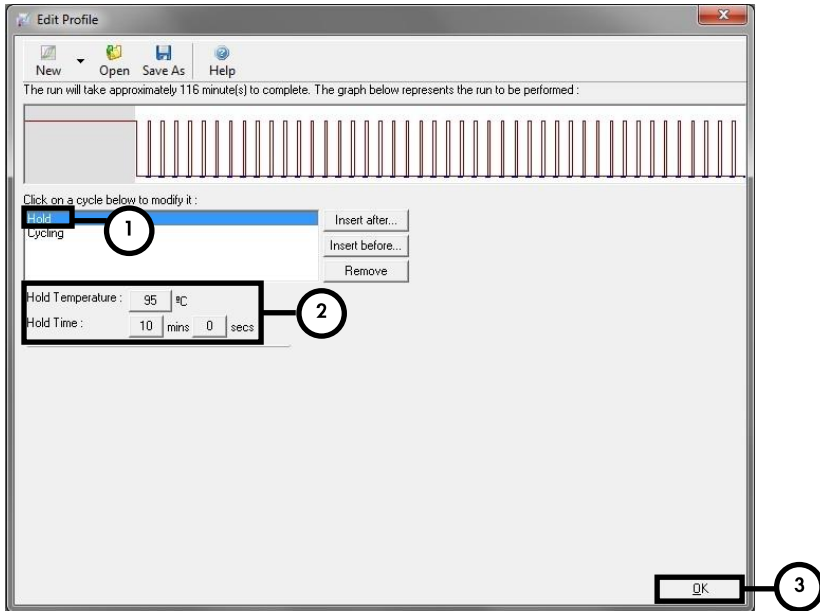


Figur 3. Inställning av allmänna analysparametrar.

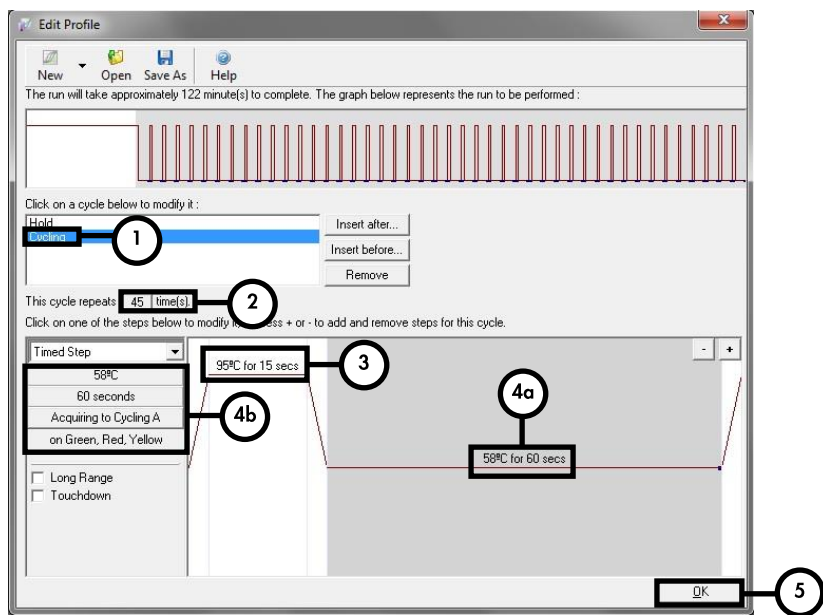
9. Klicka på knappen **Edit Profile** (Redigera profil) i nästa dialogruta **New Run Wizard**, (figur 4), och programmera temperaturprofilen enligt bild i figur 5-6.



Figur 4. Redigering av profilen.

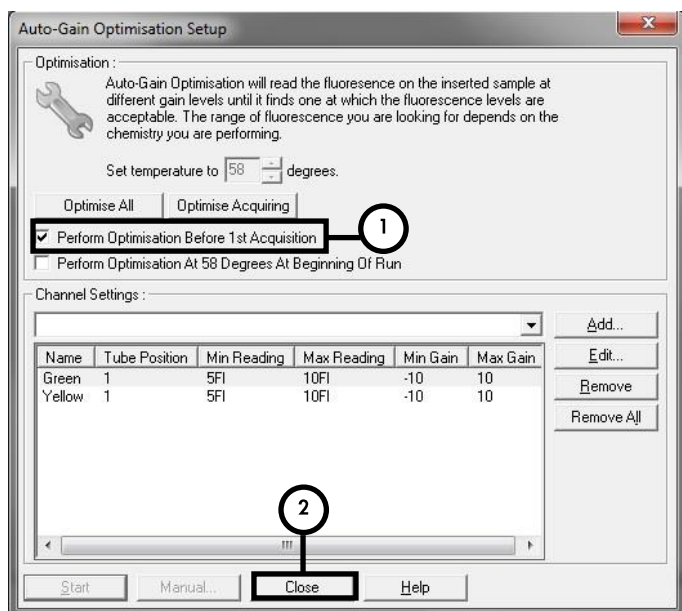


Figur 5. Första aktivering av enzym med varmstart.



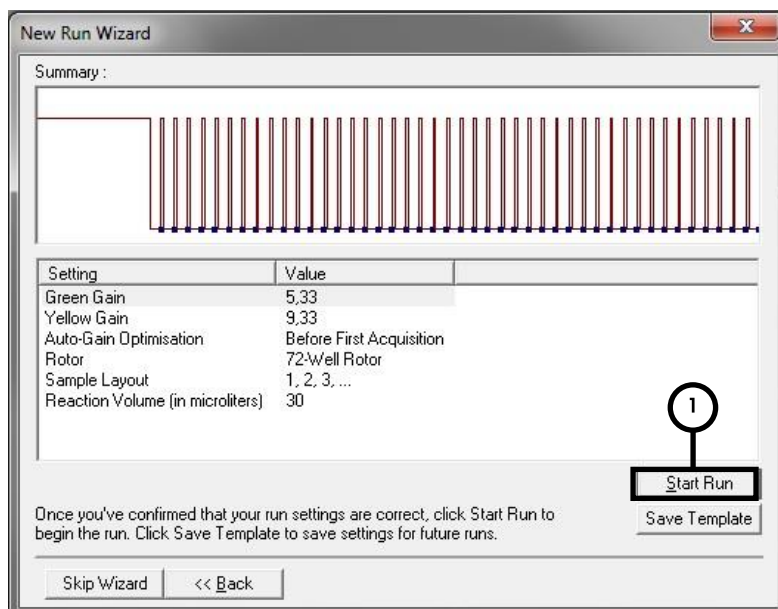
Figur 6. DNA-amplifiering.

10. Detektionsintervallet för fluorescenskanalerna måste fastställas enligt fluorescensintensiteterna i PCR-rören. Klicka på **Gain Optimisation** (Optimering av förstärkning) i dialogrutan **New Run Wizard** (se figur 4, steg 2) för att öppna dialogrutan **Auto-Gain Optimisation Setup** (Inställningar av automatisk optimeringsvinst) (figur 7). Markera rutan **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utför optimering före 1:a förvärv) (figur 7). Kontrollera att alla tre kanaler (grön och gul) är markerade för **Auto-Gain Optimisation** (figur 7). (Hitta kanalerna i den nedrullningsbara menyn under **Channel Settings** (Kanalinställningar) och klicka på **Add** (Tillsätt).) Klicka på **Close** (Stäng) i dialogrutan **Auto-Gain Optimisation Setup** när förstärkningskalibreringen är avslutad.



Figur 7. Justering av fluorescenskanalsensitiviteten.

11. De förstärkningsvärden som fastställs av kanalkalibreringen sparas automatiskt och anges i det sista menyfönstret i programmeringsproceduren (figur 8). Klicka på **Start Run** (Starta körning).



Figur 8. Start av körningen.

12. När körningen är slutförd analyserar du uppgifterna (se Tolkning av resultat", sidan 24).

Tolkning av resultat

Gilighetskörning

Giltig kvalitativ körning

Följande kontrollvillkor måste vara uppfyllda för att en kvalitativ körning ska vara giltig (tabell 4).

Tabell 4. Kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning

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

Ogiltig kvalitativ körning

En kvalitativ körning är ogiltig om körningen inte har avslutats eller om något kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning inte är uppfyllt.

Om en kvalitativ körning är ogiltig, upprepa PCR eller extrahera DNA från originalprovet igen om det inte finns något DNA kvar.

Giltig kvantitativ körning

En kvantitativ körning är giltig om alla kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning är uppfyllda (se tabell 4 ovan). Dessutom måste en giltig standardkurva skapas för korrekta kvantifieringsresultat. För en giltig kvantitativ körning måste standardkurvan ha följande kontrollparametervärden (tabell 5).

Tabell 5. Kontrollparametrar för en giltig standardkurva

Kontrollparameter	Giltigt värde
Lutning	-3,743/-2,765
PCR-effektivitet	85 %/130 %
R i kvadrat (R^2)	>0,98

Ogiltig kvantitativ körning

En kvantitativ körning är ogiltig om körningen inte har avslutats eller om något kontrollvillkor för en giltig kvantitativ körning inte är uppfyllt.

Om en kvantitativ körning är ogiltig, upprepa PCR eller extrahera DNA från originalprovet igen om det inte finns något DNA kvar.

Kvalitativ analys

En sammanfattning av resultattolkningen visas i tabell 6.

Tabell 6. Summering av resultatolkning

Prov-ID	Detektionskanal		Tolkning av resultat
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIV	POSITIV*	HAdV-specifikt DNA detekterat.
B	NEGATIV	POSITIV	HAdV-specifikt DNA inte detekterat. Provet innehåller inte detekterbara mängder HAdV-specifikt DNA.
C	NEGATIV	NEGATIV	PCR-hämning eller reagensfel. Upprepa förfarandet med originalprov eller ta ett nytt prov och testa det.

* Detektion av den interna kontrollen i kanalen Cycling Yellow behövs inte för positiva resultat i detektionkanalen Cycling Green. En hög HAdV-belastning i provet kan leda till minskade eller uteblivna interna kontrollsignaler.

Kvantitativ analys

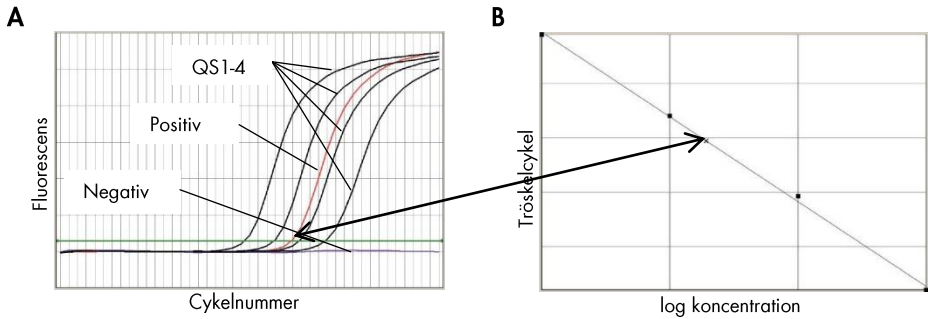
artus HAdV RG PCR Kit innehåller 4 kvantifieringsstandarder (QS). För att skapa en standardkurva för kvantitativ analys måste dessa definieras som standarder med lämpliga koncentrationer (se tabell 1, sidan 11). En standardkurva för kvantitativ analys kan skapas med hjälp av standarder för kända koncentrationer.

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

- C_T = Tröskelcykel
- m = Lutning
- N_0 = Initial koncentration
- b = Skärning

Koncentrationerna för positiva prov med okänd koncentration kan hämtas från standardkurvan (figur 9).

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



Figur 9. Kvantifieringsstandarder, ett positivt och ett negativt prov som visas i (A) en amplifieringskurva och (B) analys av standardkurva

Obs! Provets koncentration visas i kopior/ μ l och avser koncentrationen av virus-DNA i eluatet.

Använd följande formel för att fastställa virusbelastningen i originalprovet.

$$\text{Virusbelastning (prov) [kopior/ml]} = \frac{\text{Volym (eluat) } [\mu\text{l}] \times \text{virusbelastning (eluat) [kopior}/\mu\text{l}]}{\text{Provinmatning [ml]}}$$

Begränsningar

- Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i teknikerna för realtime PCR och *in vitro*-diagnostiska förfaranden.
- God laboratoriepraxis är viktig för korrekt analysprestanda.

- Var extremt noggrann för att bevara renheten hos komponenterna i kitet och reaktionsinställningarna. Kontrollera alla reagenser noggrant för föroreningar och kontaminering. Kassera alla reagens som misstänks vara kontaminerade.
- Korrekt provtagning, transport, förvaring och bearbetningsförfarande krävs för optimal prestanda hos den här analysen.
- Använd inte den här analysen direkt på provet. Utför lämplig extrahering av nukleinsyra innan analysen används.
- Förekomsten av PCR-hämmare kan leda till falska negativa eller ogiltiga resultat.
- Potentiella mutationer inom målregionerna för HAdV-genomet som täcks av kitets primrar och/eller prober kan leda till att det inte går att detektera förekomsten av patogenerna.
- I likhet med alla diagnostiska tester ska resultaten som erhålls med *artus* HAdV RG PCR Kit tolkas genom att ta alla kliniska resultat och laboratorieresultat i beaktande.

Kvalitetskontroll

Varje lot av *artus* HAdV RG PCR Kit har testats mot förutbestämda specifikationer för att garantera följdriktig produktkvalitet.

Prestandaegenskaper

Eftersom det inte finns någon internationell standard för adenovirus utfördes kvantitativ prestandautvärdering för *artus* HAdV RG PCR Kit med genomiskt DNA från ett typiskt HAdV3-isolat (art B).

För utvärdering av kvalitativ prestanda analyserades genomiskt DNA för adenovirusarterna A–F med *artus* HAdV RG PCR Kit. Genomiskt DNA erhöles från ATCC® (American Type Culture Collection) och från typiska cellodlingsisolat. För analys av art G (serotyp HAdV-52) användes en plasmid som innehöll överensstämmande målsekvens (tabell 7).

Tabell 7. Adenovirusarter och serotyper analyserade med *artus* HAdV RG PCR Kit

HAdV-arter	HAdV-serotyp	Källa	Resultat med <i>artus</i> HAdV RG PCR Kit
Art A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Positiv
	HAdV-31	Typiska isolat från cellodling	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	Typiska isolat från cellodling	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	Typiska isolat från cellodling	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 analytiska sensitiviteten hos *artus* HAdV RG PCR-kitet är definierad som koncentrationen (kopior per μl i eluatet) av HAdV-specifikt DNA som kan detekteras med en sannolikhet på $\geq 95\%$. Den analytiska sensitiviteten fastställdes med analys av en spädningsserie av kvantifierat genomiskt adenovirus-DNA (grupp B, subtyp 3) (tabell 8).

Tabell 8. PCR-resultat som använts för att beräkna den analytiska sensitiviteten för *artus* HAdV RG PCR Kit

Inmatningskoncentration (kopior/ μ l)	Antal replikat	Antal positiva	Träffar (%)	Intern kontroll
31,6	18	18	100	Giltig
10,0	18	18	100	Giltig
3,2	18	18	100	Giltig
1,0	18	18	100	Giltig
0,3	18	12	67	Giltig
0,1	18	7	39	Giltig
0,03	18	3	17	Giltig
0,01	18	1	6	Giltig
0,003	18	0	0	Giltig

Den analytiska sensitiviteten för *artus* HAdV RG PCR Kit, fastställd med probitanalys, för detektion av HAdV-specifikt DNA är 1,07 kopior/ μ l [95 % konfidensintervall (KI): 0,58–2,99 kopior/ μ l].

Analytisk specificitet

Den analytiska specificiteten för *artus* HAdV RG PCR Kit garanteras genom noggrant urval av oligonukleotiderna (primrar och prober). Oligonukleotiderna kontrolleras genom sekvensjämförelseanalys mot officiellt tillgängliga sekvenser för att säkerställa att alla genotyper av adenovirus detekteras.

Dessutom har specificiteten för *artus* HAdV RG PCR Kit utvärderats med test av en panel av genomiskt DNA/RNA extraherat från andra patogener som orsakar liknande symtom som adenovirusinfektioner och genom test av humant genomiskt DNA (tabell 9).

Tabell 9. Organismer testade för att visa den analytiska specificiteten för *artus* HAdV RG PCR Kit

Organism	Detektionskanal	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
Humant genom-DNA	Negativ	Giltig
Varicella-Zoster-virus	Negativ	Giltig
Herpes simplex-virus 1	Negativ	Giltig
Herpes simplex-virus 2	Negativ	Giltig
Epstein-Barr-virus	Negativ	Giltig
Humant herpesvirus 6 (A, B)	Negativ	Giltig
Humant herpesvirus 7	Negativ	Giltig
Cytomegalovirus	Negativ	Giltig
BK-virus	Negativ	Giltig
JC-virus	Negativ	Giltig
Simianvirus 40	Negativ	Giltig
Hepatit A-virus	Negativ	Giltig
Hepatit B-virus	Negativ	Giltig
Hepatit C-virus	Negativ	Giltig
Humant immunbristvirus 1	Negativ	Giltig
Parvovirus B19	Negativ	Giltig
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Negativ	Giltig
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativ	Giltig
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativ	Giltig
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativ	Giltig
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negativ	Giltig
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativ	Giltig

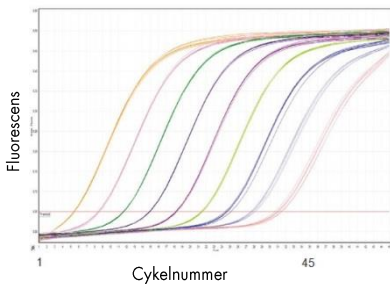
Organism	Detektionskanal	
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativ	Giltig
Coronavirus	Negativ	Giltig
Influenzavirus A (inkl. H1N1-2009), B	Negativ	Giltig
Respiratoriskt syncytialvirus typ A, B	Negativ	Giltig
Parainfluenzavirus 1–4	Negativ	Giltig
Humant metapneumovirus	Negativ	Giltig
Rhinovirus	Negativ	Giltig

artus HAdV RG PCR Kit korsreagerade inte med någon av de specificerade organismerna.

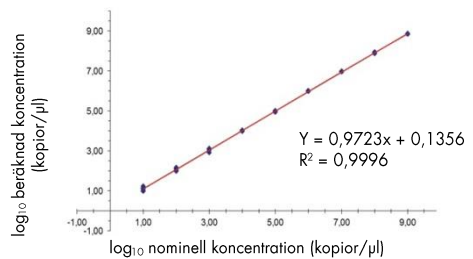
Linjärt område

Det linjära området för *artus* HAdV RG PCR Kit fastställdes genom analys av en logaritmisk spädningsserie av kvantifierad genomiskt HAdV-2-DNA (serie C) med koncentrationer mellan 1×10^9 och 0,1 kopia/ μ l. Sex replikat per spädning analyserades.

A



B



Figur 10. Amplifieringskurva (A) och linjär regressionsanalys (B) för en spädningsserie av (A) genomiskt DNA från HAdV-2 (art C).

Det linjära intervallet för *artus* HAdV RG PCR Kit omfattar ett intervall av minst storleksordning 8 för HAdV-specifikt DNA.

Precision

Precisionen för *artus* HAdV RG PCR Kit fastställdes med intraanalysvariabilitet (variabilitet inom ett försök), interanalysvariabilitet (variabilitet mellan olika försök) och interlotvariabilitet (variabilitet mellan olika produktionsloter).

Variabilitetsdata uttrycks som standardavvikelse och variationskoefficient. Data är baserade på kvantifieringsanalys av definierade koncentrationer av genomiskt HAdV DNA och på värden för tröskelcykel (C_T) uttryckta som intern kontroll (tabell 10 respektive 11). Minst 6 replikat per prov analyserades för intraanalys-, interanalys- och interlotvariabilitet. Total varians beräknades genom att kombinera de 3 analyserna.

Tabell 10. Precisionsdata för det HAdV-DNA-specifika detektionssystemet för *artus* HAdV RG PCR Kit

HAdV-specifikt system	Genomsnittlig konc. (kopior/ μ l)	Standardavvikelse	Variationskoefficient (%)
Intraanalysvariabilitet	26,88	4,87	18,13
Interanalysvariabilitet	35,11	8,65	24,63
interlotvariabilitet	27,39	4,65	16,97
Total varians	32,37	8,44	26,09

Tabell 11. Precisionsdata för den interna kontrollen för *artus* HAdV RG PCR Kit

Intern kontroll	Genomsnittlig tröskelcykel (C _T)	Standardavvikelse	Variationskoefficient (%)
Intraanalysvariabilitet	21,97	0,15	0,67
Interanalysvariabilitet	22,12	0,19	0,87
interlotvariabilitet	22,05	0,25	1,12
Total varians	22,02	0,22	0,99

Diagnostisk utvärdering

Den diagnostiska sensitiviteten och specificiteten för *artus* HAdV DNA Kit utvärderas regelbundet genom analys av referensprov och diagnostiska prov som tidigare analyserats med referensmetoder (dvs. intern (in-house) PCR, DFA, odling i plaströr, elektronmikroskopi, Luminex®-teknik). Hittills har 223 prover från utstryk (smear), nasofaryngealinspirat, bronkialsekret, avföringsprover, plasma eller ögonprov (smear) som samlats in från olika laboratorier testats för att fastställa den diagnostiska sensitiviteten och specificiteten för *artus* HAdV RG PCR Kit. Av dessa 223 prov förutspåddes 50 vara HAdV-positiva och 173 förutspåddes vara HAdV-negativa med referensmetoder (tabell 12). Fyra prover testade positivt för HAdV (C_T-värden 35,2, 36,8, 40,0 och 37,9) med *artus* HAdV RG PCR Kit. Dessa hade tidigare testats negativa med ett internt (in-house) PCR-test. Alla 50 prover som förutspåddes innehålla HAdV-DNA bekräftades vara HAdV-positiva vid analys med *artus* HAdV RG PCR Kit.

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

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

* C_t-värden: 35,2, 36,8, 40,0 och 37,9.

Repetierbarhet

Specificitet, sensitivitet och noggrannhet för *artus* HAdV-6 RG PCR Kit utvärderades genom analys av fastställda kvalitetspaneler för adenovirus. För att säkerställa repeterbarhet för *artus* HAdV-6 RG PCR Kit utvärderades specificitet och sensitivitet genom analys av fastställda kvalitetspaneler för adenovirus samt typiska diagnostiska prover regelbundet.

Tabell 13. Resultat av analysen av en kvalitetspanel för HAdV (QCMD) med *artus* HAdV RG PCR Kit

Prov-ID	Kvalitetspanel		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	Provinnehåll	Förväntad konc. (kopior/ml)	Resultat	Intern kontroll
14-01	HAdV-1	2.793	Positiv	Giltig
14-02	HAdV-1	13.213	Positiv	Giltig
14-03	HAdV-1	2.793	Positiv	Giltig
14-04	HAdV-1	4.093	Positiv	Giltig
14-05	HAdV-4	2.032	Positiv	Giltig
14-06	HAdV-4	21.281	Positiv	Giltig
14-07	Negativt	0	Negativ	Giltig
14-08	HAdV-14	426.580	Positiv	Giltig
14-09	HAdV-5	241	Positiv	Giltig
14-10	HAdV-5	1.820	Positiv	Giltig

Symboler

Symbolerna i följande tabell används i denna bruksanvisning.

Symbol	Symboldefinition
 96	Räcker till 96 tester
	Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare

Symbol

Symboldefinition



Utgångsdatum



Materialnummer



GTIN-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Se bruksanvisningen

Felsökningshandbok

Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	För 96 reaktioner: Master A, Master B, 4 kvantifieringsstandarder, intern kontroll, vatten [PCR-kvalitet]]	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	För 50 DNA-preparat: 50 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinas K, reagenser, buffertar, provrör (2 ml))	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	För 250 DNA-preparat: 250 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinas K, reagenser, buffertar, provrör (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002022

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 3 års garanti på reservdelar och arbete och 3 förebyggande underhållsbesök	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 2 års garanti på reservdelar och arbete och 2 förebyggande underhållsbesök	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Plattform	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9001570

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 3 års garanti på reservdelar och arbete och 3 förebyggande underhållsbesök	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 2 års garanti på reservdelar och arbete och 2 förebyggande underhållsbesök	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9001590

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor för fyra rör och lock för 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor för 4 rör och lock för 10.000 reaktioner)	981106

Begränsat licensavtal för *artus* HAdV RG PCR Kit

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får enbart användas i enlighet med protokollen som medföljer produkten och denna handbok och får enbart användas tillsammans med komponenter som ingår i kitet. QIAGEN beviljar ingen licens under någon av företagets immateriella tillgångar för användning eller inkorporering av de medföljande komponenterna i denna sats med/i komponenter som inte ingår i denna sats, förutom vad som beskrivs i protokollen som medföljer denna produkt, denna handbok och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av dessa ytterligare protokoll har tillhandahållits av QIAGEN-användare för QIAGEN-användare. Dessa protokoll är inte noggrant testade eller optimerade av QIAGEN. QIAGEN lämnar ingen garanti för dem och garanterar heller inte att de inte utgör ett intrång på rättigheter för tredje part.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN frånsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

I och med inköpet av denna produkt kan personen använda den för diagnostiska tjänster för human *in vitro*-diagnostik. Inget allmänt patent eller annan licens av något slag förutom denna specifika användarrätt i och med inköpet beviljas härigenom.

Varumärken: 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 ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/contact | Teknisk serve support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com

