

2017. március

artus[®] HAdV RG PCR Kit Handbook



96

Első verzió
Rotor-Gene[®] Q készülékkel való
használathoz

IVD

CE

REF



R1 MAT

4530265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, GERMANY

1096380-EN

Distributed by QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

Tartalomjegyzék

Alkalmazási terület	4
Összefoglalás és magyarázat	4
Pathogén információk.....	4
Az eljárás (meghatározása) elve	5
Mellékelt anyagok.....	7
A kit tartalma	7
A felhasználó által biztosítandó anyagok.....	7
Figyelmeztetések és óvintézkedések	8
Figyelmeztetés	8
Óvintézkedések.....	9
Reagensok tárolása és kezelése.....	10
A kit tartalma	10
Az eljárás menete.....	12
DNS kivonás	12
Protokoll: A HAdV-specifikus DNS detektálására.....	14
Eredmények értékelése.....	25
A futás érvényessége.....	25
Kvalitatív analízis	26
Kvantitatív analízis	27
Korlátozások.....	28
Minőség-ellenőrzés	29
Teljesítmény jellemzők	29

Analitikai érzékenység.....	31
Analitikai specifitás	32
Lineáris tartomány.....	34
Pontosság	35
Diagnosztikai értékelés	37
Reprodukálhatóság.....	38
Jelmagyarázat.....	40
Hibaelhárítási útmutató.....	41
Rendelési információk	42

Alkalmazási terület

Az *artus*[®] HAdV RG PCR Kit (96) *in-vitro* diagnosztikai teszt, melynek alapja a real-time PCR technológia, mely alkalmas humán adenovírus (HAdV) specifikus DNS mennyiségi meghatározására.

Összefoglalás és magyarázat

Az *artus* HAdV RG PCR Kit használatkész HAdV-specifikus DNS-t detektáló rendszer, mely valós idejű polimeráz láncreakción (qPCR) alapuló technológiát használ a Rotor-Gene Q készüléken. A vizsgálat magában foglalja a heterológ amplifikációs rendszert (Belső kontroll), hogy meghatározza a lehetséges PCR gátlást és megerősítse a kit reagenseinek integritását.

Pathogén információk

Az először 1950-es években, explantált adenoid (garatmandula) szövetből izolált humán adenovírusok (HAdV), az *Adenoviridae* család és *Mastadenovirus* genus-ba tartozó, burokkal nem rendelkező, dupla szálú DNS vírusai. A vírusfertőzések világszerte előfordulnak mindenféle szezonális eloszlás nélkül.

A HAdV-t 7 speciesbe A–G osztályozzák. A B specieset további alosztályokba – B1 és B2 – sorolják. Legalább 56 különböző szerotípusukat (HAdV-1-től HAdV-56-ig) írták le napjainkig. Az Adenovírusok széles körben okoznak betegségeket, ebbe beletartozik a megfázás, torokgyulladás, hörghurut, tüdőgyulladás, hasmenés, kötőhártya-gyulladás (szem fertőzés), láz, hólyaggyulladás (húgyhólyag gyulladás vagy fertőzés), bőrküítés és neurológiai betegségek.

Az adenovírus species okozta betegség tünetei a vírus szöveti tropizmusától függenek. Például a légúti betegségeket leggyakrabban a B1, C vagy E speciesek okozzák, a szembetegségeket a B, D vagy E speciesek okoznak, gyomor/bélgyulladás általában az A, F, G speciesek váltanak ki, vese-és húgyúti fertőzéseket a HAdV B2 speciesei gyakran váltanak ki.

Az adenovírusok epidemiológiai jellemzőinek változatossága a típusoktól függ. Míg egyes humán adenovírusok a világ részein endémiásak és a fertőzésen általában a gyermekkor alatt esnek át, más típusok szórványos fertőzést okoznak, időnként kitörnek. Minden HAdV közvetlen érintkezés útján terjed, fekális-orális terjedéssel és időnként vízzel történő átvitelrel.

Míg a legtöbb HAdV fertőzés hatása korlátozott, súlyos tüdőgyulladás szórványosan előfordul, az egyébként egészséges emberek körében. Továbbá néhány típusuk tünetmentes fertőzést hozhat létre a mandulákban, garatmandulákban és a fertőzött szervezet béltraktusában, és a vírus ürítése hónapokig, évekig eltarthat. A látens fertőzések újra aktiválódása a legyengült immunrendszerű fertőzöttekben, mint például transzplantált betegekben, életveszélyes állapotot eredményezhet.

A HAdV rendkívül ellenálló különféle környezeti körülményeknek és erősen fertőző, így az adenovírus okozta nozokomiális járványok, mint például a keratokonjunktivitis járvány könnyen előfordulhat, ha a fertőzés-kontrollt és higiéniai gyakorlatot nem megfelelően követik. Egyes országokban a kormányzat helyi szintű jelentései kötelezőek HAdV kitörések esetén.

Az eljárás (meghatározás) elve

A HAdV RG Master A és HAdV RG Master B tartalmazza a reagenseket és az enzimeket a HAdV genom cél régióinak specifikus detektálásához a Rotor-Gene Q készülék "Cycling Green" fluoreszcens csatornájában.

Emellett az *artus* HAdV RG PCR Kit kit tartalmaz egy másodlagos, heterológ amplifikációs rendszert, amellyel felismerhetők a lehetséges hibák a vizsgálati folyamat alatt. Ezt belső kontrollként (IC) a Rotor Gene Q Cycling Yellow/Sárga fluoreszcens csatornája detektálja.

A HAdV specifikus próbánál a DNS FAM™ fluorofórral jelölt. A belső kontrollra (IC) specifikus próba JOE™ fluorofórral van jelölve. A spektrálisan megkülönböztethető fluorofórok használata lehetővé teszi a HAdV specifikus DNS detektálását és kvantifikálását- egyidejűleg a belső kontroll detektálását a Rotor-Gene Q készülék megfelelő csatornáinak beállításával.

Mellékelt anyagok

A kit tartalma

artus HAdV RG PCR Kit		(96)
Katalógusszám		4530265
Reakciók száma		96
Kék	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Lila	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Zöld	HAdV RG IC	1 x 1000 µl
Piros	HAdV QS*	4 x 250 µl
Fehér	H ₂ O	1 x 500 µl
	Kézikönyv	1

*Az artus HAdV RG PCR Kit 4 darab Kvantifikációs standardot (QS1–QS4) tartalmaz.

A felhasználó által biztosítandó anyagok

Használat előtt ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó ajánlásai szerint rendszeresen lettek-e ellenőrizve és kalibrálva.

Reagensek

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN kat.szám 51304 vagy 51306; lásd “DNS kivonás”, **Fehler! Textmarke nicht definiert..** oldal)

Fogyóeszközök

- 0.1 ml Strip csövek és sapkák, melyek használhatók 72 férőhelyes rotorral (QIAGEN, kat.szám 981103 vagy 981106)

- Nukleáz-mentes, alacsony DNS-kötő képességű mikrocentrifuga csövek master mix készítéséhez
- Nukleáz-mentes pipetta hegy aeroszol gátolt szűrővel

Eszközök

- Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex vagy Rotor-Gene Q 6plex készülék
- Rotor-Gene Q szoftver verzió 2.3.1 vagy újabb verzió
- Betöltési blokk 72 x 0,1 ml csövekhez, alumínium blokk kézi reakció beállításhoz (QIAGEN, kat. sz. 9018901)
- Rendszeresített, állítható pipetták mintaelőkészítéshez
- Rendszeresített, állítható pipetták a PCR master mix elkészítéséhez
- Rendszeresített, állítható pipetták a templát DNS szétosztásához
- Vortex keverő
- Asztali centrifuga 2 ml reakció csöveknek megfelelő rotorral

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra.

Olvasson el minden utasítást, mielőtt elkezdi a vizsgálatot.

Figyelmeztetés

A vegyszerekkel végzett munka alatt, mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és védőszemüveget.

Óvintézkedések

- A termék használata korlátozódjon képzett személyre, aki real-time PCR technikákban és in vitro diagnosztikai eljárásokban jártas.
- A mintákat mindig fertőző és / vagy biológiailag veszélyesként kell kezelni és biztonságos laboratóriumi eljárások keretében kell vizsgálni.
- Viseljen eldobható púdermentes kesztyűt, köpenyt és védőszemüveget, amikor a mintákkal dolgozik.
- Kerüljük a minta és a kit összetevőinek mikrobiális és nukleáz (DNáz / RNáz) szennyeződését.
- Mindig DNáz/RNáz-mentes eldobható, szűrővel ellátott pipetta hegyeket használjunk.
- Mindig viseljen eldobható púdermentes kesztyűt, mikor a kit összetevőivel dolgozik.
- Válasszon elválasztott és szegregált munkaterület a minták előkészítéséhez, a reakció beállításhoz, és az amplifikálás/detektálás folyamatához. A munkafolyamatot a laboratóriumban egyirányú módon végezzük el. Mindig viseljen eldobható kesztyűt az egyes területeken, és cserélje őket, mielőtt belép egy másik területre.
- Külön felszereléseket és berendezéseket jelöljön ki a különböző munka-területeken, és ne mozgassa őket egyik helyről a másikra.
- A meglévő pozitív és / vagy potenciálisan pozitív anyagokat elkülönítve kell tárolni a kit összetevőitől.
- Ne nyissa ki a reakció csöveket/plateket az amplifikáció után, hogy elkerülje az egyéb amplikonokkal való szennyeződést.
- További kontrollokat az iránymutatások vagy helyi, állami és/vagy szövetségi vagy akkreditáló szervezetek követelményei alapján kell tesztelni.
- Ne használja a kit összetevőit a lejáratí dátum letelte után.
- A mintát és a vizsgálat hulladékait a helyi biztonsági előírásoknak megfelelően távolítsa el.

Reagensek tárolása és kezelése

A kit tartalma

Az *artus* HAdV RG PCR Kit szállítása szárazjégen történik. A kit összetevőinek fagyasztva kell érkeznie. Ha egy vagy több komponens nem fagyott állapotban van kézhezvételt követően, vagy a csövek szállítást követően sérültek, forduljon segítségért a QIAGEN Műszaki Szolgálatához. Kézhezvételét követően, tárolja az összes összetevőt -30 °C és -15 °C-on.

Kerüljük a Master reagensek ismételt olvasztását, és fagyasztását (több mint két alkalommal), mert ez csökkentheti az assay teljesítményét. A fagyasztott reagenseket alikvótozva kell tárolni, ha szakaszosan kell azokat használni. Ne tárolja a reagenseket 4°C-on több, mint 2 órát. Továbbá, a HAdV RG Master A és HAdV RG Master B reagenseket fénytől elzárva tároljuk.

Az *artus* HAdV RG PCR Kit a következőket tartalmazza:

- Két Master reagens (HAdV RG Master A and HAdV RG Master B)
- Template Belső Kontroll (HAdV RG IC)
- Négy Kvantifikációs standard (HAdV QS1–4)
- PCR-minőségű víz (H₂O)

A HAdV RG Master A és HAdV RG Master B reagensek egyetlen reakcióban tartalmazzák minden összetevőt (puffer, enzimek, primerek és próbák), ami az amplifikációhoz, detektáláshoz és a HAdV-specifikus specifikus DNS elkülönítéséhez szükséges, valamint a Belső kontrollt is.

A Kvantifikációs standardok a HAdV- specifikus DNS-t standardizált koncentrációban tartalmazzák. Ezek egyedileg pozitív kontrollként használhatóak, vagy együtt, standard görbe létrehozásához, melyet a mintában lévő HAdV- specifikus DNS koncentrációjának

meghatározásához lehet használni. A Kvantifikációs standardok koncentrációját az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: Kvantifikációs standardok koncentrációja

Kvantifikációs standard	Koncentráció (kópia/μl)
QS1	10,000
QS2	1000
QS3	100
QS4	10

Az eljárás menete

DNS kivonás

A HAdV- specifikus target szekvenciák amplifikálása DNS-ből történik. A vizsgálat kivitelezése a templát DNS minőségétől is függ, ezért ügyeljen arra, hogy olyan mintaelőkészítő kitet használjon, melynél a kinyert DNS megfelelő a PCR downstream eljáráshoz.

A QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, kat.szám 51304 vagy 51306) ajánlott a DNS tisztítási eljáráshoz az *artus* HAdV RG PCR Kit használatával. A *QIAamp DNA Mini Kézikönyvében* leírtak alapján végezze el a DNS tisztítást.

Mivel a QIAamp DNA Mini Kit mosó pufferei etanol tartalmaznak, ezért az elúció előtti lépésben még egy extra centrifugálási lépést végezzen el. Helyezze a QIAamp DNA Mini spin oszlopokat egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe és a régi gyűjtőcsövet a filtrátummal együtt dobja el. Egy asztali centrifuga segítségével centrifugálja 10 percig körülbelül 17,000 x g (~13,000 rpm)-n.

Fontos: A hordozó (carrier) RNS alkalmazása kritikus az extrakció hatékonyságára és a kinyert nukleinsav stabilitására.

Fontos: A valós idejű PCR reakcióban az etanol erős inhibitornak számít. Amennyiben a mintaelőkészítő kit etanol tartalmú mosópuffereket alkalmaz, ügyeljen arra, hogy az összes etanol maradványt távolítsa el még a nukleinsav elúció előtt.

Belső kontroll

Az *artus* HAdV RG PCR Kit heterológ belső kontrollt tartalmaz, melyet használhatunk a PCR gátlás kontrolljaként vagy a mintaelőkészítési eljárás plusz a PCR gátlás kontrolljaként (nukleinsav kivonás).

Ha a belső kontrollt csupán a PCR gátlás kontrolljaként használjuk, nem pedig a mintaelőkészítési eljárás kontrolljaként, akkor a belső kontrollt közvetlenül a HAdV RG Master A és HAdV RG Master B keverékéhez adjuk, a protokoll 2b lépése alapján (15. oldal).

Függetlenül attól, hogy melyik módszert/rendszert használjuk a nukleinsav extrakcióhoz, a belső kontrollt nem szabad közvetlenül a mintához adni. A belső kontrollt mindig a minta/lízis puffer keverékéhez adjuk. A minta/lízis puffer keverékéhez adott belső kontroll térfogata csupán az elúciós térfogattól függ, és az elúciós térfogat 10%-át teszi ki. Például, ha a QIAamp DNA Mini Kit-et használjuk akkor a DNS-t 60µl Buffer AE (Puffer AE)-ben eluáljuk. Ebből adódóan 6 µl belső kontrollt kell adnunk, minden egyes minta/minta/lízispuffer keverékéhez.

Fontos: Közvetlenül ne adja hozzá a mintához sem a belső kontrollt sem a hordozó RNS-t.

Protokoll: A HAdV-specifikus DNS detektálása

A kezdés előtti fontos lépések

- Mielőtt elkezdené az eljárást olvassa el a “Óvintézkedések” részt, 8. oldal.
- Hagyjon időt magának arra, hogy megismerje a Rotor-Gene Q készüléket mielőtt elkezdené a protokollt. Nézze meg a készülék használati utasítását.
- Győződjön meg róla, hogy a PCR futásonként legalább egy pozitív kontrollt és egy negatív kontrollt (PCR tisztaságú víz) használ.

Teendők a kezdés előtt

- Győződjön meg róla, hogy a hűtőblokk (Rotor-Gene Q készülék tartozéka) előhűtött állapotban van: 2-8°C-on.
- Minden használat előtt az összes reagenst teljesen fel kell olvasztani, össze kell keverni (ismételt fel és le pipetázással vagy gyors vortexeléssel), majd röviden centrifugálni.

A folyamat

1. Helyezze el a kívánt mennyiségű PCR csövet a hűtőblokk adaptereibe.
2. Amennyiben a belső kontrollt a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR inhibíció ellenőrzésére szeretné használni, kövesse a 2a lépést. Ha a belső kontrollt kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésre használná, kövesse a 2b lépésben leírtakat.

A belső kontrollt a 2b lépés alapján használja az összes vizsgálandó mintához, kontrollhoz és a kvantifikációs standardhoz.

2a. A belső kontroll már az izoláláshoz lett adva (lásd “Belső kontroll” 11. oldal).

Ebben az esetben a master mixet a 2. táblázatnak megfelelően készítse el.

A reakció mix a PCR-hez szükséges minden komponenst tartalmazza, kivéve a mintát.

2. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használatával a DNS izolálási eljárás monitorozására és a lehetséges PCR inhibíció ellenőrzésére)

Komponensek	1 reakció	12 reakció
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
Teljes térfogat	20 µl	240 µl

- 2b. A belső kontrollt közvetlenül a HAdV RG Master A és HAdV Master B keverékéhez kell adni. Ebben az esetben a master mixet a 3. táblázatnak megfelelően készítse el. A reakció mix a PCR-hez szükséges minden komponenst tartalmazza, kivéve a mintát.

3. táblázat: Master mix készítése (Belső kontroll használata kizárólag a PCR inhibíció ellenőrzésére)

Komponensek	1 reakció	12 reakció
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
Teljes térfogat	21 µl	252 µl

* A PCR assay előkészítése során a belső kontroll hozzáadásával okozott térfogatnövekedés elhanyagolható. A detektáló rendszer érzékenysége ezáltal nem romlik.

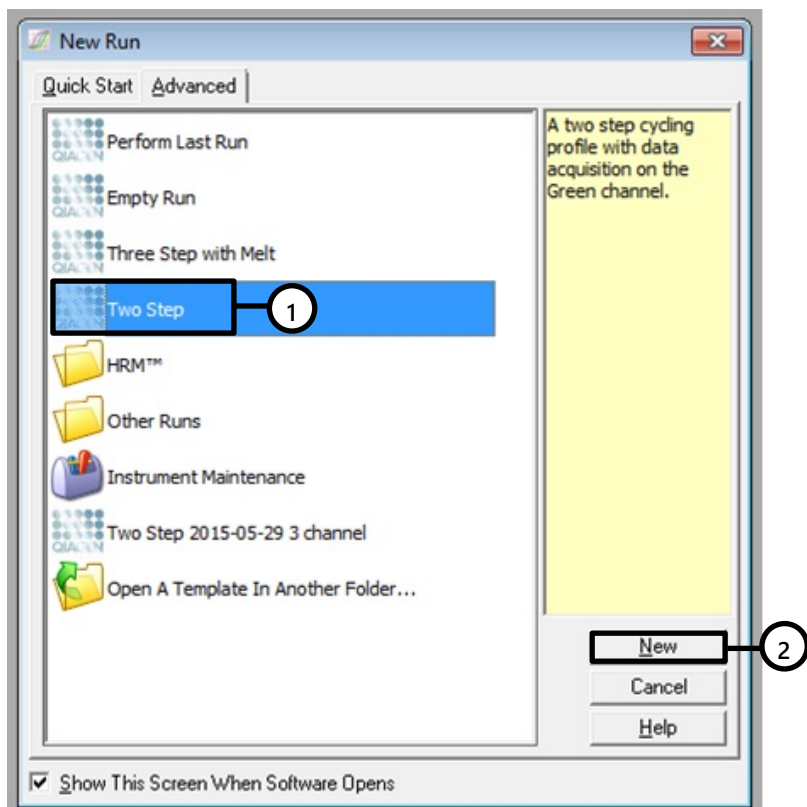
3. Pipettázon 20 µl master mixet minden egyes PCR csőbe. Majd adjon hozzá 10 µl-t a DNS minta eluátumból ismételt fel és le történő pipettázás mellett. Ennek megfelelően adjon a master mixhez 10 µl pozitív kontrollt, kvantifikációs standardot vagy 10 µl H₂O-t (PCR tisztaságú vizet), mint negatív kontrollt.
- Győződjön meg róla, hogy futásonként legalább egy pozitív és egy negatív kontrollt is tartalmaz a rendszer. A kvantifikációhoz használja mind a 4 kvantifikációs standardot (QS1–QS4).
4. Zárja le a PCR csöveket. Győződjön meg róla, hogy a zárógyűrű (a Rotor-Gene Q készülék tartozéka) a rotor tetején helyezkedik el.

5. A HAdV- specifikus DNS detektálására készítsen el egy hőmérséklet profilt az alábbi lépések alapján.

Általános assay paraméterek beállítása	1, 2, 3, 4. ábrák
A hot-start enzim kezdeti aktiválása	5. ábra
DNS amplifikáció	6. ábra
Fluoreszcens csatornák érzékenységének beállítása	7. ábra
A futás indítása	8. ábra

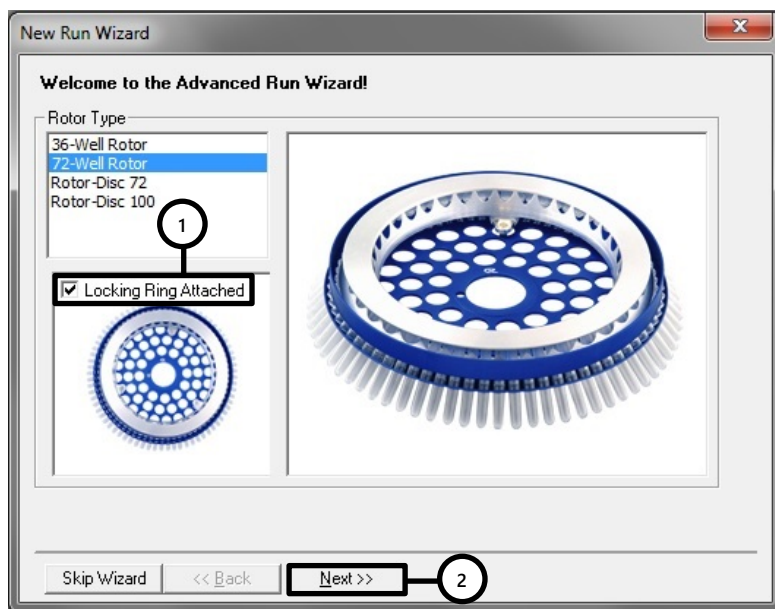
Minden specifikáció a Rotor-Gene Q software 2.3.1-es vagy újabb verzióikhoz ajánlott. További programozási információt a Rotor-Gene készülékhez annak használati útmutatójában talál. Ezeket a beállításokat az illusztrációban vastag, fekete kerettel jelöltük.

6. Először nyissa meg a **“New Run Wizard” Új Futás** párbeszéd ablakot az **Advanced** fül használatával és válassza a **“Two Step” Két lépés opciót** (1. ábra). Kattintson a **“Next” Következő** gombra a folytatáshoz.



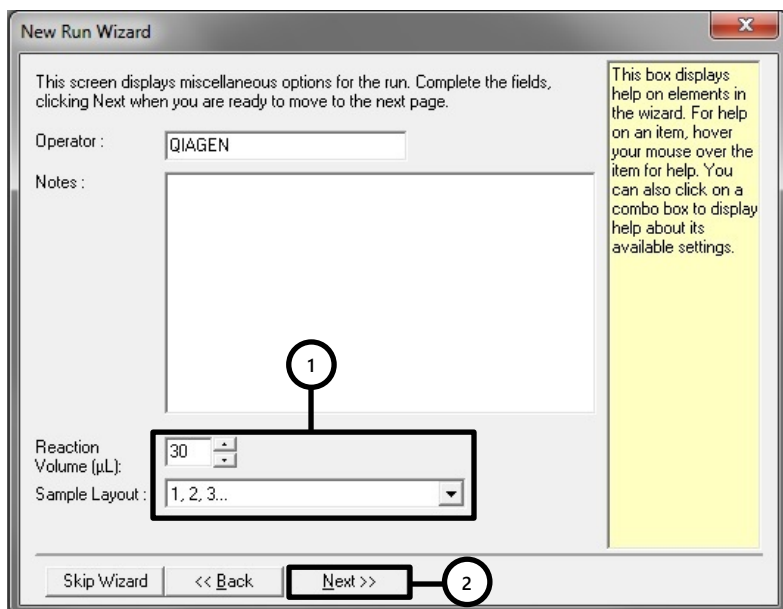
1. ábra: Az új futás párbeszéd ablak.

7. A következőkben **“New Run Wizard” (Új futás varázsló)** párbeszéd ablakban (2. ábra) pipálja be a **“Locking Ring Attached” (Záró gyűrű rögzítve)** sort, majd kattintson a **“Next” Következő** gombra.



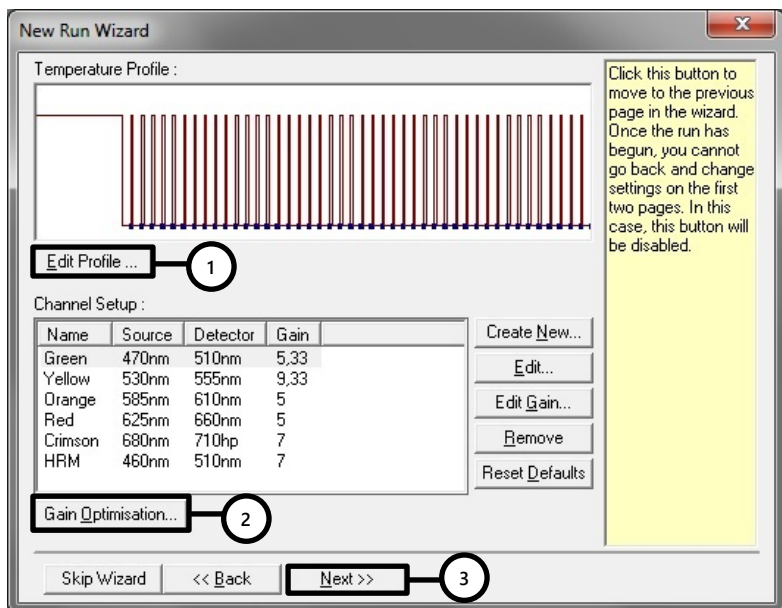
2. ábra: Új futás párbeszéd ablak.

8. Válassza a PCR-hez a **30 (µl)** reakció térfogatot és kattintson a **“Next” (Következő)** gombra (3. ábra).

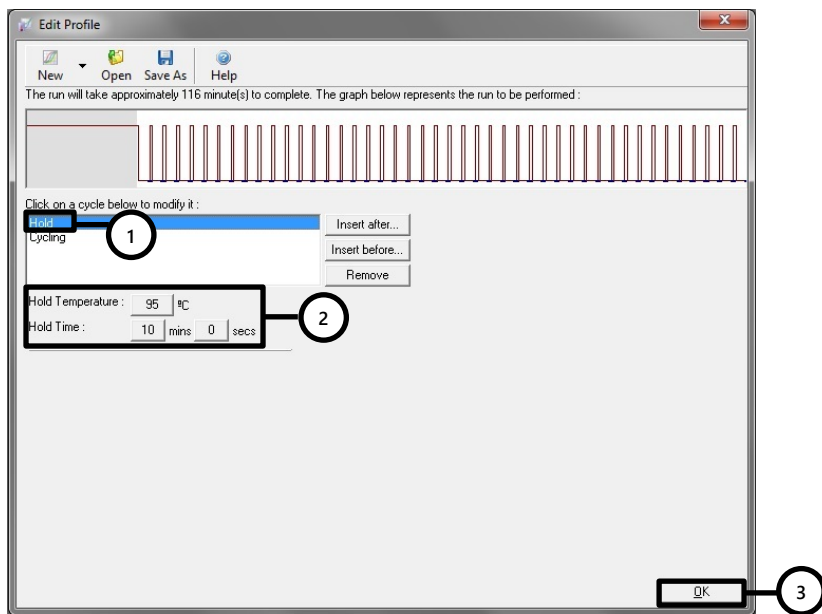


3. ábra: Az általános assay paraméterek beállítása.

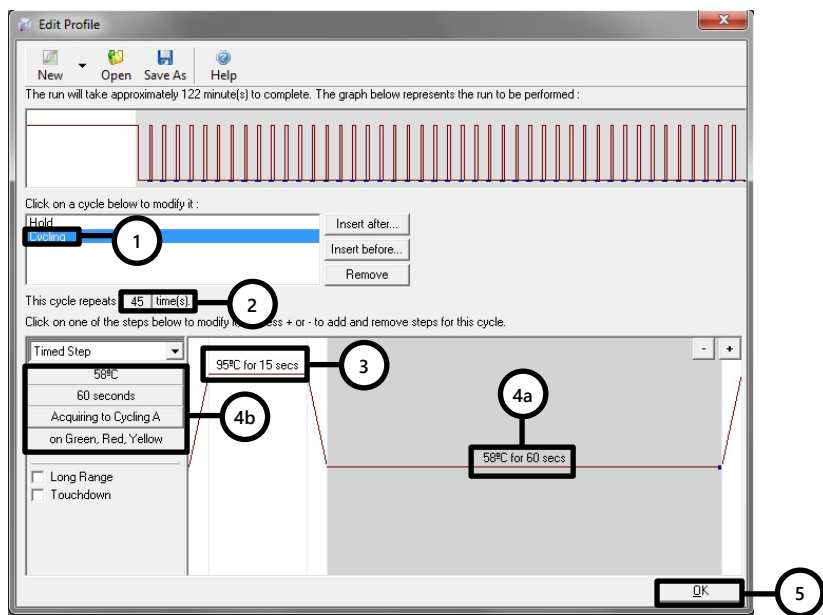
9. Kattintson az **“Edit Profile” (Profil szerkesztése)** gombra a következő **“New Run Wizard” (Új futás varázsló)** párbeszédablakban (4. ábra), és programozza a hőmérsékleti profilt, amint azt az 5-6. ábra mutatja.



4. ábra: Profil szerkesztése.

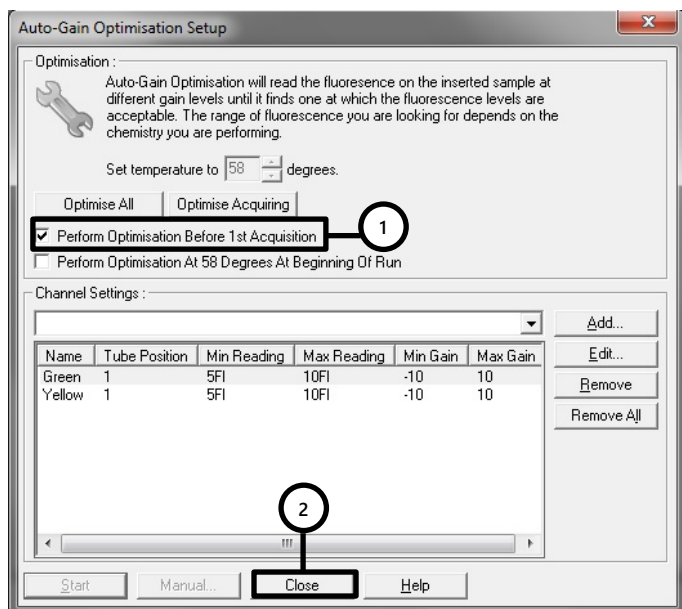


5. ábra: A hot-start enzim kezdeti aktiválása.



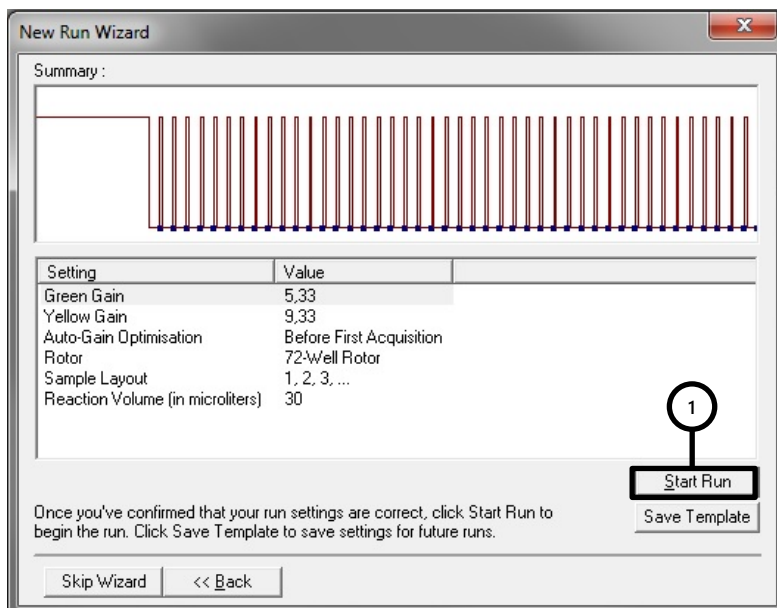
6. ábra: DNS amplifikálás.

10. A fluoreszcens csatornák érzékelési tartományát a PCR-csőekben található fluoreszcencia intenzitása alapján kell meghatározni. Kattintson a **“Gain Optimisation” (Nyereség/erősítés optimalizálás)** gombra a **„New Run Wizard”** párbeszédablakban (lásd 4. ábra, 2. lépés), majd nyissa meg az **“Auto-Gain Optimisation Setup” (Automatikus jelo optimalizálás beállítása)** párbeszédablakot (7. ábra). Jelölje be a **“Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Optimalizálás elvégzése az első jelgyűjtés előtt)** lehetőséget (7. ábra). Ügyeljen arra, hogy mind a két fluoreszcens csatorna **“(Green és Yellow)” (Zöld és Sárga)** ki legyen választva az **“Auto-Gain Optimisation” (Automatikus jelo optimalizálás)** számára (7. ábra). (Keresse ki a csatornákat a legördülő menü **“Channel Settings” (Csatorna beállítások)** alatt és kattintson az **“Add” (Hozzáadás)** gombra. Kattintson az **“Auto-Gain Optimisation Setup” (Automatikus jelo optimalizálás beállítása)** párbeszédablak **“Close” (Bezárás)** gombjára, amikor a jelerősség kalibráció befejeződött.



7. ábra: Fluoreszcens csatornák érzékenységének beállítása.

11. A csatorna kalibrációval meghatározott értékek automatikusan mentésre kerülnek és a programozási eljárás utolsó menü ablakában vannak listázva. (8. ábra). Kattintson a **“Start Run” (Futtatás indítása)** gombra.



8. ábra: Futtatás indítása.

12. A futás befejezése után analizálja az adatokat (lásd "Eredmények értékelése", 25. oldal).

Eredmények értékelése, értelmezése

A futás érvényessége

Érvényes kvalitatív futás

Az Érvényes kvalitatív futáshoz a következő kontroll feltételeknek kell teljesülniük (4. táblázat).

4. táblázat: Kontroll feltételek az érvényes kvalitatív futáshoz

Kontroll ID	Detektáló csatornák	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Pozitív kontroll (QS)	POZITÍV	POZITÍV
Negatív kontroll	NEGATÍV	POZITÍV

Érvénytelen kvalitatív futás

A kvalitatív futás érvénytelen, ha a futás nem fejeződött be vagy ha az érvényes kvalitatív kontroll feltételek közül (lásd fent) valamelyik nem teljesült.

Érvénytelen kvalitatív futás esetén ismétlje meg a PCR-t vagy izoláljon DNS-t az eredeti mintából, amennyiben már nem áll rendelkezésre több DNS.

Érvényes kvalitatív futás

A kvantitatív futás érvényes, amennyiben az összes kontroll feltétel teljesül, mely az érvényes kvalitatív futásra jellemző (lásd 4. táblázat, fent). Továbbá, a pontos mennyiségi meghatározáshoz érvényes standard görbét kell generálni. Egy érvényes kvantitatív futáshoz a standard görbének a következő kontroll paraméter értékekkel kell rendelkeznie. (5. táblázat).

5. táblázat: Érvényes standard görbe kontroll paraméterei

Kontroll paraméter	Érvényes érték
Meredekség	-3.743/-2.765
PCR hatékonyság	85%/130%
R négyzet (R^2)	>0.98

Érvénytelen kvantitatív futás

A kvantitatív futás érvénytelen, ha a futás nem fejeződött be vagy ha az érvényes kvantitatív kontroll feltételek közül valamely nem teljesült.

Érvénytelen kvantitatív futás esetén ismétlje meg a PCR-t vagy izoláljon DNS-t az eredeti mintából, amennyiben már nem áll endelkezésretöbb DNS.

Kvalitatív analízis

Az eredmények értékelésének összegzését a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat: Eredmények értékelésének összegzése

Minta ID	Detektáló csatorna		Eredmény értelmezése
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POZITÍV	POZITÍV *	HAdV-specifikus DNS detektálása.
B	NEGATÍV	POZITÍV	HAdV-specifikus DNS nem detektálható. A minta nem tartalmaz detektálható mennyiségű HAdV-specifikus DNS-t.
C	NEGATÍV	NEGATÍV	PCR inhibítor vagy reagens hiba. Ismételje meg az eljárást az eredeti mintával vagy gyűjtsön és teszteljen új mintát.

* Az "Internal Control" (belső kontroll) detektálása a "Cycling Yellow" (sárga) csatornában nem szükséges, amennyiben a "Cycling Green" (zöld csatorna)-ban van pozitív eredmény. A minta magas HAdV tartalma az "Internal Control" (belső kontroll) jelének csökkenését vagy hiányát okozhatja.

Kvantitatív analízis

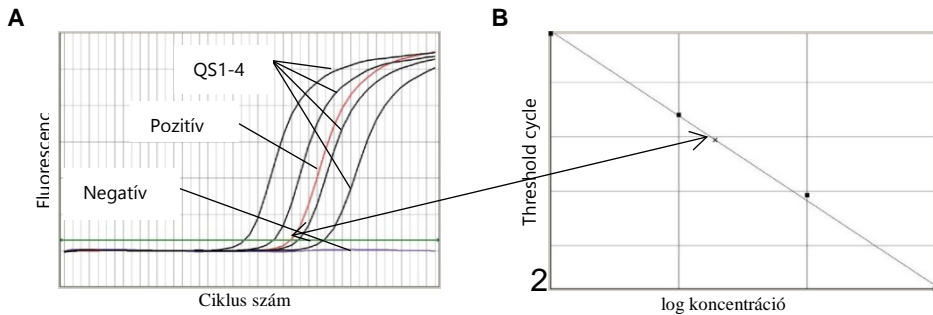
Az *artus* HAdV RG PCR Kit 4 darab "Quantification Standards" (QS) Kvantifikációs standardot tartalmaz. A kvantitatív analízis standard görbéinek létrehozásához ezeket a mintákat, mint standardokat, a megadott koncentrációval együtt kell definiálni (lásd 1. táblázat, "Kvantifikációs standardok koncentrációja" 11. oldal). A kvantitatív analízishez a standard görbét a standardok ismert koncentrációit felhasználva generálhatjuk.

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

- C_T = "Threshold cycle" (Küszöb ciklus)
- m = "Slope" (Meredekség)
- N_0 = "Initial concentration" (Kezdeti koncentráció)
- b = "Intercept" (tengely metszet)

A pozitív ismeretlen minták koncentrációja a standard görbéből származtatható (9. ábra).

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



9. ábra: Kvantifikációs standardok, egy pozitív és egy negatív minta látható az (A) amplifikációs ábrázolásban és a (B) standard görbe analízisben.

Megjegyzés: A minta koncentrációja kópia/μl egységben van megadva és a virális DNS eluátumban lévő koncentrációjára utal.

A következő egyenletet használja az eredeti minta virális tartalmának meghatározásához.

$$\text{Virális tartalom (minta)} \quad \frac{\text{Térfogat (eluátum) } [\mu\text{l}] \times \text{virális tartalom (eluátum) } [\text{kópia}/\mu\text{l}]}{\text{Kiindulási mintamennyiség } [\text{ml}]}$$

[kópia/ml] =

Korlátozások

- A terméket csak az in vitro diagnosztikai eljárások terén képzett és betanított szakemberek használhatják.
- A kiváló laboratóriumi gyakorlat elengedhetetlen a megfelelő teljesítményű vizsgálathoz.

- Fordítson kiemelt figyelmet a kit komponenseinek tisztaságának megóvására és a reakció kivitelezésére. Folyamatosan ellenőrizze a reagenseket az esetleges beszennyeződés elkerülése érdekében. Dobja ki a szennyeződés-gyanús reagenseket.
- Megfelelő mintagyűjtési, szállítási, tárolási és a feldolgozási eljárások szükségesek a vizsgálat optimális működéséhez.
- Ezt az assay-t ne használja közvetlenül a mintán. Az assay kivitelezése előtt végezze el a nukleinsav kivonási eljárást.
- A PCR inhibitorok jelenléte fals negatív vagy érvénytelen eredményeket okozhat.
- A kitben használt primerek és/vagy próbák által lefedett HAdV genom célzott régióiban lévő potenciális mutációk megakadályozhatják a patogének jelenlétének kimutatását.
- Mint minden diagnosztikai vizsgálatnál, az *artus* HAdV RG PCR Kittel kapott eredmények értelmezésekor vegye figyelembe az összes klinikai és laboratóriumi leletet is.

Minőség-ellenőrzés

Az *artus* HAdV RG PCR Kit minden egyes gyártási tételét leellenőrzik, hogy az megfelel-e az előírt paramétereknek, ezzel biztosítják a kit egyenletes és kifogástalan minőségét.

Teljesítmény jellemzők

Az adenovírusnak jelenleg nincs nemzetközileg elérhető standardja, ezért az *artus* HAdV RG PCR Kit specifikus teljesítmény jellemzőit izolált és jellemzett HAdV3 (B species) genomi DNS-ének felhasználásával határozták meg.

A kvalitatív teljesítmény értékeléséhez az adenovírus speciestek (A-F) genomi DNS-eit elemezték az *artus* HAdV RG PCR Kit segítségével. A genomi DNS-t az ATCC® (American

Type Culture Collection) és jellemzett sejt kultúra izolátumok segítségével határozták meg. A G species elemzéséhez (HAdV-52 szerotípus) a megfelelő cél szekvenciát tartalmazó plazmidot használták (7. táblázat).

7. Táblázat: Az adenovírus speciestek és szerotípusaik elemzése az *artus* HAdV RG PCR Kit használatával

HAdV species	HAdV szerotípus	Forrás	Eredmények az <i>artus</i> HAdV RG PCR Kit használatával
Species A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Pozitív
	HAdV-31	Jellemzett sejtenyészet izolátum	Pozitív
	HAdV-18	Plazmid	Pozitív
Species B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Pozitív
	HAdV-7	Plazmid	Pozitív
Species B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Pozitív
	HAdV-11	Jellemzett sejtenyészet izolátum	Pozitív
	HAdV-55	Plazmid	Pozitív
Species C	HAdV-1	ATCC-VR-1	Pozitív
	HAdV-2	Plazmid	Pozitív
	HAdV-5	ATCC-VR-5D	Pozitív
	HAdV-6	Jellemzett sejtenyészet izolátum	Pozitív
Species D	HAdV-37	ATCC-VR-929D	Pozitív
	HAdV-19	Plazmid	Pozitív
Species E	HAdV-4	ATCC-VR-1572D	Pozitív
Species F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Pozitív
Species G	HAdV-52	Plazmid	Pozitív

Analitikai érzékenység

Az *artus* HAdV RG PCR Kit analitikai érzékenységének definíciója az a HAdV specifikus DNS koncentráció (kópia per μ l eluátum), amelyet $\geq 95\%$ -os pozitívítási aránnyal lehet kimutatni. Az analitikai érzékenységet az adenovírus genom DNS (B csoport, 3 altípus) ismert koncentrációjú minta hígítási sorának vizsgálatával határozták meg. (8. táblázat).

8. táblázat: Az *artus* HAdV RG PCR Kit analitikai érzékenységének kiszámításához használt PCR eredmények

Bemért koncentráció (kópia/μl)	Replikátumok száma	Pozitívak száma	Találati arány (%)	Belső kontroll
31.6	18	18	100	Érvényes
10.0	18	18	100	Érvényes
3.2	18	18	100	Érvényes
1.0	18	18	100	Érvényes
0.3	18	12	67	Érvényes
0.1	18	7	39	Érvényes
0.03	18	3	17	Érvényes
0.01	18	1	6	Érvényes
0.003	18	0	0	Érvényes

Az *artus* HAdV RG PCR Kit analitikai érzékenysége, amit probit-elemzéssel határoztak meg a HAdV-specifikus DNS meghatározásához 1.07 kópia/μl (95%-os megbízhatósági intervallum/“confidence interval” [CI]: 0.58–2.99 kópia/μl).

Analitikai specificitás

Az *artus* HAdV RG PCR Kit analitikai specificitását a gondosan válogatott oligonukleotidok biztosítják (primerek és próbák). Az oligonukleotidokat szekvencia-összehasonlítási elemzés során nyilvánosan hozzáférhető szekvenciákkal ellenőrizték, hogy valamennyi releváns adenovírus genotípust detektálhassák.

Az *artus* HAdV RG PCR Kit specificitását, más patogénekből kivont genomi DNS/RNS panel segítségével értékelték, melyek hasonló tüneteket okoznak, mint az adenovírus fertőzés, valamint humán eredetű genomi DNS-el is tesztelték (9. táblázat).

9. táblázat: Tesztelt organismusok az artus HAdV RG PCR Kit analitikai specifikitásának igazolására

Organizmus	Detektáló csatornák	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
Humán genomi DNS	Negatív	Érvényes
Varicella-zoster vírus	Negatív	Érvényes
Herpesz szimplex vírus 1	Negatív	Érvényes
Herpesz szimplex vírus 2	Negatív	Érvényes
Epstein-Barr vírus	Negatív	Érvényes
Humán herpeszvírus 6 (A, B)	Negatív	Érvényes
Humán herpeszvírus 7	Negatív	Érvényes
Cytomegalovírus	Negatív	Érvényes
BK vírus	Negatív	Érvényes
JC vírus	Negatív	Érvényes
Simian vírus 40	Negatív	Érvényes
Hepatitis A vírus	Negatív	Érvényes
Hepatitis B vírus	Negatív	Érvényes
Hepatitis C vírus	Negatív	Érvényes
Humán immunodeficiencia vírus 1	Negatív	Érvényes
Parvovírus B19	Negatív	Érvényes
<i>Escherichia coli (EHEC)</i>	Negatív	Érvényes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negatív	Érvényes
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negatív	Érvényes
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negatív	Érvényes
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negatív	Érvényes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negatív	Érvényes

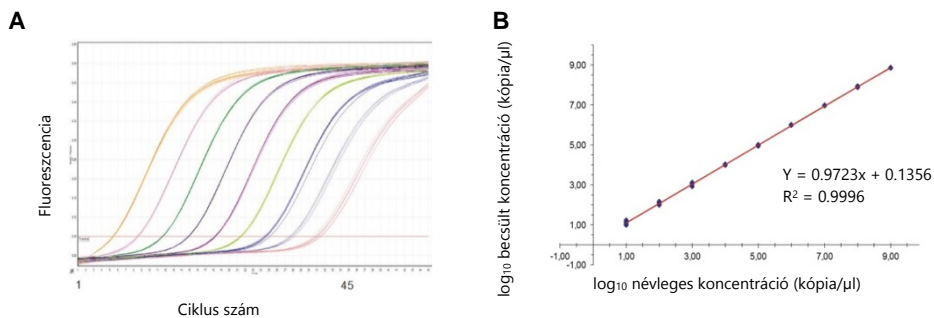
Organizmus	Detektáló csatornák
------------	---------------------

Organizmus	Detektáló csatornák	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negatív	Érvényes
Coronavírus	Negatív	Érvényes
Influenza vírus A (incl. H1N1-2009), B	Negatív	Érvényes
Respiratory syncytial vírus A, B	Negatív	Érvényes
Parainfluenzavírus 1–4	Negatív	Érvényes
Humán metapneumovírus	Negatív	Érvényes
Rhinovírus	Negatív	Érvényes

Az *artus* HAdV RG PCR Kit nem mutatott keresztreaktivitást egyik fent említett organizmussal sem.

Lineáris tartomány

Az *artus* HAdV RG PCR Kit lineáris tartományát a HAdV-2 DNS (C species)-specifikus DNS 1×10^9 -től 0.1 kópia/μl közötti koncentráció tartományban lévő logaritmikus hígítási sorozat elemzésével határozták meg. Hígításonként legalább 6 replikátumot elemeztek.



10. ábra: Amplifikációs görbe (A) és a HAdV-2 genomi DNS (C species) hígítási sorozatának lineáris regressziós analízise (B).

Az *artus* HAdV RG PCR Kit lineáris tartománya legalább 8 nagyságrendre terjed ki a HAdV-specifikus DNS esetében.

Pontosság

Az *artus* HAdV RG PCR Kit teljesítménybeli pontosságát a vizsgálaton belüli variabilitásból (intra-assay variability) (azonos koncentrációjú minták egy kísérletben mért eredményeinek variabilitása), a vizsgálatok közötti variabilitásból (inter-assay variability) (egy laboratóriumon belül különböző, de azonos típusú készüléken, több operátor által végzett vizsálatok eredményeinek variabilitása) és a gyártási tételek közötti variabilitásból (inter-batch variability) (különböző gyártási tételek felhasználásával végzett vizsgálatok eredményeinek variabilitása) határozták meg.

A variabilitási adatokat a standard deviáció, a variancia és a variációs koefficiens alapján fejezték ki. Az adatok a HAdV genomi DNS meghatározott koncentrációinak kvantifikációs vizsgálatain, valamint a küszöbciklus értékein (C_T) alapultak belső kontroll használatával együtt (10. és 11. táblázat). Mintánként legalább 6 replikátumot vizsgáltak mind vizsgálaton belüli variabilitás, vizsgálatok közötti variabilitás és gyártási tételek közötti variabilitás szempontjából. A teljes varianciát a 3 vizsgálat kombinációjából számították.

10. táblázat: Az *artus* HAdV RG PCR Kit HAdV-specifikus DNS kimutatására szolgáló detektáló rendszer pontossági adatai

HAdV-specifikus rendszer	Átlagos konc. (kópia/μl)	Standard devicáció	Variációs koefficiens (%)
Vizsgálaton belüli variabilitás	26.88	4.87	18.13
Vizsgálatok közötti variabilitás	35.11	8.65	24.63
Gyártási tételek közötti variabilitás	27.39	4.65	16.97
Teljes variancia	32.37	8.44	26.09

Table 11. Az *artus* HAdV RG PCR Kit belső kontroll pontossága adatai

Belső kontroll	Átlagos küszöb ciklus (C _T)	Standard deviáció	Variációs koefficiens (%)
Vizsgálaton belüli variabilitás	21.97	0.15	0.67
Vizsgálatok közötti variabilitás	22.12	0.19	0.87
Gyártási tételek közötti variabilitás	22.05	0.25	1.12
Teljes variancia	22.02	0.22	0.99

Diagnosztikai értékelés

Az *artus* HAdV RG PCR Kit diagnosztikai érzékenységét és specificitását rendszeresen értékelik olyan referencia-, és diagnosztikai minták segítségével, melyek előzetesen referencia módszerekkel lettek vizsgálva (i.e., saját- PCR protokoll, DFA, shell vial culture, electron mikroszkópia, Luminex® technológia). Az *artus* HAdV RG PCR Kit diagnosztikai érzékenységének és specificitásának meghatározását eddig különböző laboratóriumokból származó 223 kenetből, nasopharyngeális aspirátumból, hörgőváladékból, székletmintából, vizeletmintából, plazma- vagy szemkenetből gyűjtött mintákkal tesztelték. Ezen 223 mintából a referencia módszerek alapján 50 bizonyult HAdV pozitívnak és 173 HAdV negatívnak (12. táblázat). Az *artus* HAdV RG PCR Kit segítségével 4 HAdV minta pozitív eredményt mutatott (C_T értékek 35.2, 36.8, 40.0 és 37.9), melyek előzőleg saját-PCR protokoll használatával negatívnak mutatkoztak. Az összes minta esetén (50 db), melyekről feltételezték, hogy HAdV-t tartalmaznak, az *artus* HAdV RG PCR Kit-el történő analízis megerősítette a pozitivitást.

12. táblázat: Az *artus* HAdV-6 RG PCR Kit diagnosztikai értékelése

	<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	NEGATÍV	POZITÍV
Referencia módszer	169	4*
	0	50

* C_T értékek: 35.2, 36.8, 40.0 és 37.9.

Reprodukálhatóság

Az *artus* HAdV RG PCR Kit specificitásának, érzékenységének és pontosságának kiértékelését szakmai adenovírus panelek segítségével végezték. Az *artus* HAdV RG PCR Kit reprodukálhatóságát a szakmai adenovírus panelek specificitásának, érzékenységének kiértékelésével, valamint a rendszeres diagnosztikai minták jellemzésével biztosítják.

13. táblázat: A HAdV szakmai panel alapján elemzett eredmények (Quality Control for Molecular Diagnostics, QCMD) az *artus* HAdV RG PCR Kit használatával

Minta azonosító	Szakmai panel		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	Minta tartalma	Várt konc. (kópia/ml)	Eredmények	Belső kontroll
14-01	HAdV-1	2793	Pozitív	Érvényes
14-02	HAdV-1	13,213	Pozitív	Érvényes
14-03	HAdV-1	2793	Pozitív	Érvényes
14-04	HAdV-1	4093	Pozitív	Érvényes
14-05	HAdV-4	2032	Pozitív	Érvényes
14-06	HAdV-4	21,281	Pozitív	Érvényes
14-07	Negatív	0	Negatív	Érvényes
14-08	HAdV-14	426,580	Pozitív	Érvényes
14-09	HAdV-5	241	Pozitív	Érvényes
14-10	HAdV-5	1820	Pozitív	Érvényes

Jelmagyarázat

Az alábbi táblázatban szereplő jeleket használják a felhasználói utasításban.

Jelek

Jelmagyarázat



96

A kit tartalma 96 tesztre elegendő



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz



Katalógusszám



Tételszám



Hőmérséklet-korlátozás



Gyártó

Jelek

Jelmagyarázat



Lejárat



Anyagszám



Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)



Olvassa el a használati utasítást

Hibaelhárítási útmutató

A kutatók a QIAGEN Műszaki Szolgálatnál szívesen válaszolnak különböző kérdésekre és/vagy a kézikönyvben található protokollokra irányuló megkeresésekre, valamint egyéb minta és detektáló technológiákkal kapcsolatos kérdésekre (az elérhetőségekhez, kérjük látogasson el www.qiagen.com weboldalra).

Rendelési információk

Termékek	A kit tartalma	Kat. szám
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	For 96 reactions: Master A, Master B, 4 Quantification Standards, Internal Control, H ₂ O (PCR grade water)	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	For 50 DNA preps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	For 250 DNA preps: 250 QIAamp Mini Spin Columns, Proteinase K, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q and accessories		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cycler with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9002022

Termékek	A kit tartalma	Kat. szám
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Real-time PCR cyclers with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes Priority Package with software, installation, training, 3-year warranty on parts and labor, and 3 preventive maintenance visits	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Real-time PCR cyclers with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes Priority Package with software, installation, training, 2-year warranty on parts and labor, and 2 preventive maintenance visits	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Real-time PCR cyclers with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Real-time PCR cyclers with 5 channels (green, yellow, orange, red, crimson), laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001570

Termékek	A kit tartalma	Kat. szám
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes Priority Package with software, installation, training, 3-year warranty on parts and labor, and 3 preventive maintenance visits	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes Priority Package with software, installation, training, 2-year warranty on parts and labor, and 2 preventive maintenance visits	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Real-time PCR instrument with 6 channels (blue, green, yellow, orange, red, crimson), including laptop computer, software, accessories: includes 1-year warranty on parts and labor, installation and training not included	9001590

Termékek	A kit tartalma	Kat. szám
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminum block for manual reaction setup with a single-channel pipet in 72 x 0.1 ml tubes	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips of 4 tubes and caps for 1000 reactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips of 4 tubes and caps for 10,000 reactions	981106

Korlátozott Licenc megállapodás az *artus* HAdV RG PCR Kithez

Ennek a terméknek a használatával bármely a kit-et beszerző és használó kinyilvánítja beleegyezését a következő feltételekbe:

1. A termék a hozzá adott kézikönyvben szereplő protokollokkal összhangban és csak a készletben található elemekkel együtt használható. A QIAGEN valamennyi szellemi tulajdonjoga alapján nem járul hozzá, hogy felhasználják és beleépítsék a készletben lévő elemeket a készletben nem megtalálható elemekkel, kivéve abban az esetben, ha az szerepel a termékhez biztosított kézikönyvben, protokollokban vagy a www.qiagen.com honlapon található további protokollok valamelyikében. Néhány ezek közül a további protokollok közül a QIAGEN felhasználók által más QIAGEN felhasználók részére bocsátott protokollok. Ezeket a QIAGEN nem vetette alá alapos teszteknek és nem optimalizálta. A QIAGEN sem garanciát sem szavatosságot nem vállal arra, hogy ezek nem sértik harmadik fél jogait.
2. A kifejezett licencen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a készlet és/vagy ennek használata harmadik fél jogait nem sérti
3. A kit és összetevőinek licence csak egyszeri használatra érvényes, nem szabad azt újra felhasználni, felújítani vagy újra értékesíteni.
4. A QIAGEN egyértelműen elutasít minden más (kifejezett vagy hallgatólagosan beleértett) licencet, amelyet külön nem nyilvánított ki.
5. A kit vevője és felhasználója elfogadja, hogy sem ő maga nem teszi és senki másnak sem engedélyez semmilyen lépést, amely a fenti pontokban tiltott cselekményre vezet vagy elősegíti azt. A korlátozott licenc egyezménybe foglalt korlátozásokat a QIAGEN bármely bíróságon keresztül érvényesítheti, továbbá a licenc megszegőjét a nyomozati és bírósági eljárás teljes költségének megtérítésére kötelezheti, beleértve az ügyvédi díjakat is abban az eljárásban, amelynek célja a korlátozott licenc, valamint a kit-hez és összetevőihez kapcsolódó szellemi tulajdonjog betartatása.

A legfrissebb licenc feltételekért látogassa meg a www.qiagen.com honlapot.

Ennek a terméknek a megvásárlása feljogosítja a vevőt a kit humán in vitro diagnosztikai szolgáltatási teljesítményszinten való használatára. A vásárlással megszerzett használati jogon kívül semmilyen általános szabadalmi vagy bármilyen más licenz engedélyre nem jogosít ez a megállapodás.

Védjegyek: 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, minden jog fenntartva.

Rendelés www.qiagen.com/contact | Műszaki Támogatás support.qiagen.com | Weboldal www.qiagen.com