

Håndbog til *artus*[®] BK Virus RG PCR-kit



24 (katalognr. 4514263)



96 (katalognr. 4514265)

Version 1



Kvantitativ in vitro-diagnostik

Til brug sammen med Rotor-Gene[®] Q-instrumenter



4514263, 4514265



1056823DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden.

TYSKLAND

R4

MAT

1056823DA



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyseteknologier, som gør det muligt at isolere og detektere indholdet af enhver biologisk prøve. Vores avancerede høj kvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder i:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- mikroRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyseteknologier

Det er vores mål sætte Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. Der findes flere oplysninger på www.qiagen.com.

Indhold

Tilsigtet anvendelse	7
Oversigt og forklaring	7
Patogeninformation	7
Funktionsprincip	8
Leverede materialer	8
Kittets indhold	8
Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt	9
Advarsler og forholdsregler	9
Almene forsigtighedsregler	10
Opbevaring og håndtering af reagenser	10
Procedure	11
DNA-isolering	11
Intern kontrol	11
Protokol	
■ PCR og dataanalyse	13
Fortolkning af resultater	19
Kvantificering	19
Resultater	20
Fejlfindingsvejledning	21
Kvalitetskontrol	23
Begrænsninger	23
Ydelsesegenskaber	24
Analysefølsomhed	24
Specificitet	24
Præcision	26
Robusthed	28
Reproducerbarhed	28
Diagnostisk evaluering	28
Referencer	28
Symbols	28
Kontaktoplysninger	29

Tilsigtet anvendelse

artus BK Virus PCR-kit er en in vitro nukleinsyreamplifikationstest til kvantitering af BK-virus-DNA i humant plasma eller human urin. Dette diagnostiske test-kit udnytter polymerasekædereaktionen (PCR) og er konfigureret til brug sammen med Rotor-Gene Q-instrumenter.

Bemærk: *artus* BK Virus RG PCR-kit må ikke anvendes sammen med Rotor-Gene Q 2plex-instrumenterne.

Oversigt og forklaring

artus BK Virus RG PCR-kittet er et brugsklart system til detektion af BK-virus-DNA ved hjælp af polymerasekædereaktion (PCR) på Rotor-Gene Q-instrumenter. BK Virus RG Master indeholder reagenser og enzymer til specifik amplifikation af en 274 bp-region af BK-virusgenomet og til direkte detektion af det specifikke amplikon i fluorescenskanalen Cycling Green af Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000.

Desuden indeholder *artus* BK Virus RG PCR-kittet et ekstra heterologt amplifikationssystem til identifikation af mulig PCR-hæmning. Denne detekteres som en intern kontrol (IC) i fluorescenskanalen Cycling Orange på Rotor-Gene Q MDx eller Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000. Detektionsgrænsen for den analytiske BK Virus PCR (se "Analysefølsomhed", side 24) bliver derved ikke reduceret. Der leveres eksterne positive kontroller (BK Virus RG QS 1–4), som tillader bestemmelse af mængden af viralt DNA. For yderligere information, se "Fortolkning af resultater", side 19.

Patogeninformation

BK-virus (BKV) er et DNA-virus i gruppen polyomavirus. Primær infektion forekommer hovedsageligt i barndommen og er sædvanligvis asymptomatisk. Seroprævalensen hos voksne er op til 90 %. Efter primær infektion forbliver BKV latent i nyreceller og kan reaktiveres under forhold med nedsat immunforsvar, f.eks. transplantation.

BKV-infektion kan korreleres med tubulointerstitiel nefritis og ureterstenose hos nyretransplantatmodtagere samt hæmoragisk cystitis hos modtagere af knoglemarvstransplantat. Det har også været associeret med sygdomsmønstre for vaskulopati, pneumonitis, encefalitis, retinitis og endog multipelt organsvigt.

Vedvarende BKV-replikation på højt niveau er typisk for polyomavirusassocieret nefropati (PVAN) hos nyretransplantationspatienter. Klinisk relevante infektioner er oftest begrænset til immunkompromitterede patienter.

Funktionsprincip

Patogendetektion via polymerasekædereaktion (PCR) er baseret på amplifikation af specifikke områder af patogenets genom. Det amplificerede produkt detekteres i realtids-PCR via fluorescerende farver. Disse er i reglen knyttet til oligonucleotidprober, der bindes specifikt til det amplificerede produkt. Monitorering af fluorescensintensiteterne under PCR-kørslen (dvs. i realtid) muliggør detektion og kvantitering af det akkumulerede produkt, uden at man behøver genåbne reaktionsglassene efter PCR-kørslen.*

Leverede materialer

Kittets indhold

artus BK Virus RG PCR-kit			(24)	(96)
Katalognr.			4514263	4514265
Antal reaktioner			24	96
Blåt	BK Virus RG Master		2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Gult	BK Virus RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	400 µl	400 µl
Rødt	BK Virus RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kopier/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rødt	BK Virus RG QS2 [‡] (1 x 10 ³ kopier/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rødt	BK Virus RG QS3 [‡] (1 x 10 ² kopier/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rødt	BK Virus RG QS4 [‡] (1 x 10 ¹ kopier/µl)	QS	200 µl	200 µl
Grønt	BK Virus RG IC [§]	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Hvidt	Vand (PCR kvalitet)		1000 µl	1000 µl
	Håndbog		1	1

[†] Magnesium-opløsning.

[‡] Kvantiteringsstandard.

[§] Intern kontrol.

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (material safety data sheets, SDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Reagenser

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", side 11)

Forbrugsartikler

- Sterile pipettespidser med filtre
- Striprør og hætter, 0,1 ml til brug med 72-brøndsrotor (katalognr. 981103 eller 981106)
- Alternativt: PCR-rør, 0,2 ml, til brug med 36-brøndsrotor (katalognr. 981005 eller 981008)

Udstyr

- Pipetter (justerbare)*
- Vortex-mixer*
- Bordcentrifuge* med rotor til 2 ml reagensglas
- Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene Instrument*[†] med fluorescenskanaler til Cycling Green og Cycling Orange
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q softwareversion 1.7.94 eller nyere (Rotor-Gene 6000 softwareversion 1.7.65)
- Køleblok (påfyldningsblok 72 x 0,1 ml rør, katalognr. 9018901, eller påfyldningsblok 96 x 0,2 ml rør, katalognr. 9018905)

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, éngangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (SDS) for yderligere information. De findes online i bekvemt og kompakt pdf-format på www.qiagen.com/safety, hvor sikkerhedsdatabladene til hvert QIAGEN®-kit og hver kitkomponent kan læses og udskrives.

Kassér prøve- og analyseaffald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

[†] *artus* BK Virus RG PCR-kittet må ikke anvendes sammen med Rotor-Gene Q 2plex-instrumenterne.

Almene forsigtighedsregler

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Brug sterile pipettespidser med filtre.
- Positivt materiale (prøver, positive kontroller, amplifikater) skal opbevares og oprenses adskilt fra de øvrige reagenser og tilsættes reaktionsblandingen i et separat rum.
- Optø alle komponenter grundigt ved stuetemperatur (15–25 °C), før en analyse påbegyndes.
- Når komponenterne er optøet, blandes de (ved at pipettere op og ned flere gange eller med en pulsvortexblanding) og centrifugeres kort.
- Arbejd hurtigt, og hold PCR-komponenterne på is eller i køleblokken (72/96-brønds påfyldningsblok).

Opbevaring og håndtering af reagenser

Komponenterne i *artus* BK Virus PCR-kittet skal opbevares ved -15 °C til -30 °C og er stabile indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten. Gentagne optøninger og genfrysninger (>2 x) bør undgås, da det kan reducere analysens følsomhed. Ved uregelmæssig brug skal reagenserne derfor aliquoteres. Må ikke opbevares ved 2–8 °C i mere end fem timer.

Procedure

DNA-isolering

EZ1 DSP Virus-kittet (QIAGEN, kat. nr. 62724)* er valideret til viral nukleinsyreoprensning fra humant plasma eller human urin til brug sammen med *artus* BK Virus RG PCR-kittet. Udfør den virale DNA-oprensning i henhold til anvisningerne i *Håndbog til EZ1 DSP Virus Spin-kit* med en startprøvestørrelse på 400 μ l.

Bemærk: *artus* BK Virus RG PCR-kittet må ikke anvendes sammen med phenolbaserede isoleringsmetoder.

Bemærk: Brugen af bærer-RNA er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Tilsæt den passende mængde bærer-RNA til hver oprensning efter anvisningerne i *Håndbog til EZ1 DSP Virus-kit*.

Bemærk: Den interne kontrol til *artus* BK Virus RG PCR-kittet kan bruges direkte i isoleringsproceduren (se "Intern kontrol", side 11).

Bemærk: Vi vil stærkt anbefale at bruge oprensede virale nukleinsyrer til PCR straks efter oprensning ved hjælp af EZ1 DSP Virus-kittet. Eluater kan alternativt opbevares i op til 3 dage ved 4 °C før PCR-analyse.

Intern kontrol

Der vedlægges en intern kontrol (BK Virus RG IC). Dette giver brugeren mulighed for både at kontrollere DNA-isoleringsproceduren og kontrollere for mulig PCR-hæmning. Til denne anvendelse tilsættes den interne kontrol i et forhold, der svarer til 0,1 μ l pr. 1 μ l elueringsvolumen til oprensningen. Ved brug af f.eks. EZ1 DSP Virus-kittet skal der tilsættes 6 μ l af den interne kontrol i starten, hvis de virale nukleinsyrer elueres i 60 μ l elueringsbuffer (AVE).

Bemærk: Den interne kontrol og carrier-RNA (se "DNA-isolering", side 11) bør kun tilsættes blandingen af lysisbuffer og prøvemateriale eller direkte til lysisbufferen.

Den interne kontrol må ikke direkte tilsættes prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for, at blandingen af den interne kontrol og lysisbuffer/bærer-RNA forberedes frisk og tilsættes med det samme (opbevaring af blandingen ved stuetemperatur eller i køleskabet kan allerede efter få timer føre til fravær af den interne kontrol og til en reduceret oprensningseffektivitet).

Bemærk: Pipetter ikke den interne kontrol og carrier-RNA direkte i prøvematerialet.

* EZ1 DSP Virus-kittet fås også som CE-IVD-mærkede EASYartus® BK Virus RG PCR-kit kombineret med artus BK Virus RG PCR-kittet (se bestillingsinformation på side 30). Alternativt kan den interne kontrol anvendes udelukkende til kontrol af en mulig PCR-inhibition. Til denne anvendelse tilsættes den interne kontrol direkte til blandingen af BK Virus RG Master og BK Virus RG Mg-Sol som beskrevet i trin 2b i protokollen (side 14).

Protokol: PCR og dataanalyse

Vigtige anvisninger før start

- Brug tid på at blive fortrolig med Rotor-Gene Q-instrumentet, før protokollen startes. Se brugervejledningen til instrumentet.
- Sørg for, at mindst en kvantiteringsstandard og en negativ kontrol (vand, PCR-kvalitet) er med i hver PCR-kørsel. For at generere en standardkurve bruges alle 4 kvantiteringsstandarder, der medfølger (BK Virus RG QS 1-4), til hver PCR-kørsel.

Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at køleblokken (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er forkølet til 2–8°C.
- Alle reagenser skal, inden testen startes, optøs fuldstændigt ved stuetemperatur, blandes godt (gentagen pipettering eller kort vortexen) og centrifugeres kort.

Procedure

1. Anbring det ønskede antal PCR-rør i køleblokkens adaptere.
2. Hvis De anvender den interne kontrol til at monitorere oprensningen af DNA og til at kontrollere en eventuel inhibition af PCR, følges trin 2a. Hvis De kun anvender den interne kontrol til at kontrollere en inhibition af PCR, følges trin 2b.
- 2a. Den interne kontrol er allerede tilsat oprensningen (se "Intern kontrol", side 11). I dette tilfælde klargøres en Master Mix ifølge tabel 1.

Reaktionsblandingen indeholder typisk alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 1. Klargøring af Master Mix (intern kontrol anvendes til at monitorere DNA-oprensning og kontrollere for hæmning af PCR)

Antal prøver	1	12
BK Virus RG Master	7 µl	84 µl
BK Virus RG Mg-Sol	3 µl	36 µl
BK Virus RG IC	0 µl	0 µl
Totalt volumen	10 µl	120 µl

- 2b. Den interne kontrol skal tilsættes direkte til blandingen af BK Virus RG Master og BK Virus RG Mg-Sol. I dette tilfælde klargøres en Master Mix ifølge tabel 2.**

Reaktionsblandingen indeholder typisk alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 2. Klargøring af Master Mix (intern kontrol anvendes kun til at kontrollere for hæmning af PCR)

Antal prøver	1	12
BK Virus RG Master	7 μ l	84 μ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 μ l	36 μ l
BK Virus RG IC	1,5 μ l	18 μ l
Totalt volumen	11,5 μl*	138 μl*

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af den interne kontrol, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

- 3. Pipetter 10 μ l af Master Mix i hvert PCR-rør. Tilsæt derefter 15 μ l af det eluerede prøve-DNA (se tabel 3). Der skal tilsvarende bruges 15 μ l af mindst én af kvantiteringsstandarderne (BK Virus RG QS 1-4) som positiv kontrol og 15 μ l vand (vand, PCR-kvalitet) som negativ kontrol.**

Tabel 3. Opsætning af PCR-reaktion

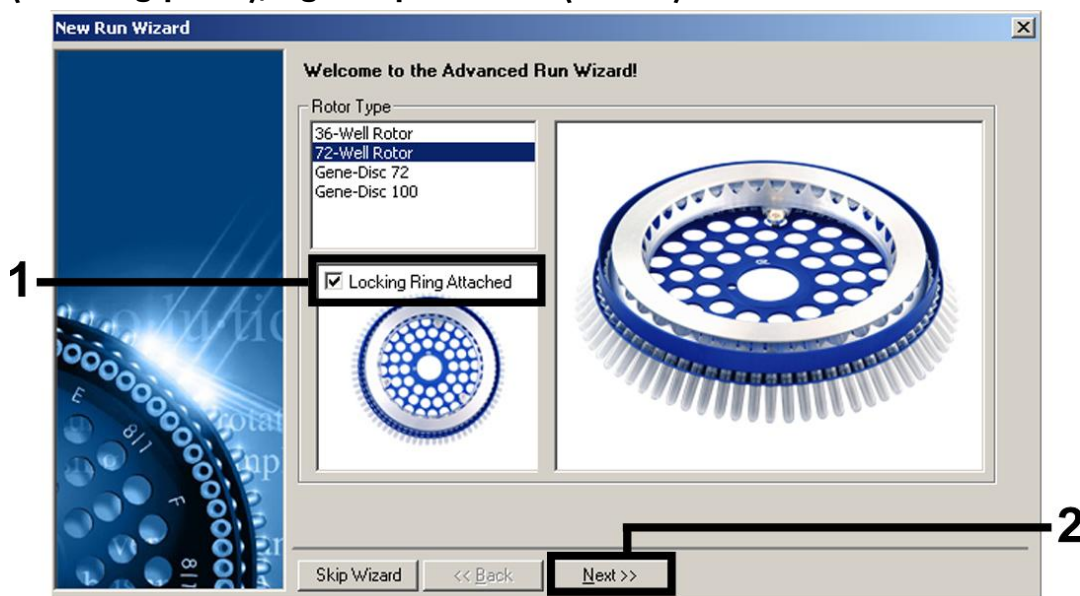
Antal prøver	1	12
Master-blanding	10 μ l	for hver 10 μ l*
Prøve	15 μ l	for hver 15 μ l*
Totalt volumen	25 μl	for hver 25 μl*

- 4. Luk PCR-rørene. Sørg for, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene-instrumentet) er placeret oven på rotoren for at forebygge utilsigtet åbning af rørene under kørslen.**
- 5. For detektion af BK-virus-DNA oprettes en temperaturprofil i henhold til de følgende trin.**

Indstilling af generelle analyseparametre	Figur 1, 2, 3
Indledende aktivering af hot-start enzymet	Figur 4
Amplifikation af DNA'et	Figur 5
Justering af fluorescenskanalens følsomhed	Figur 6
Start af kørsel	Figur 7

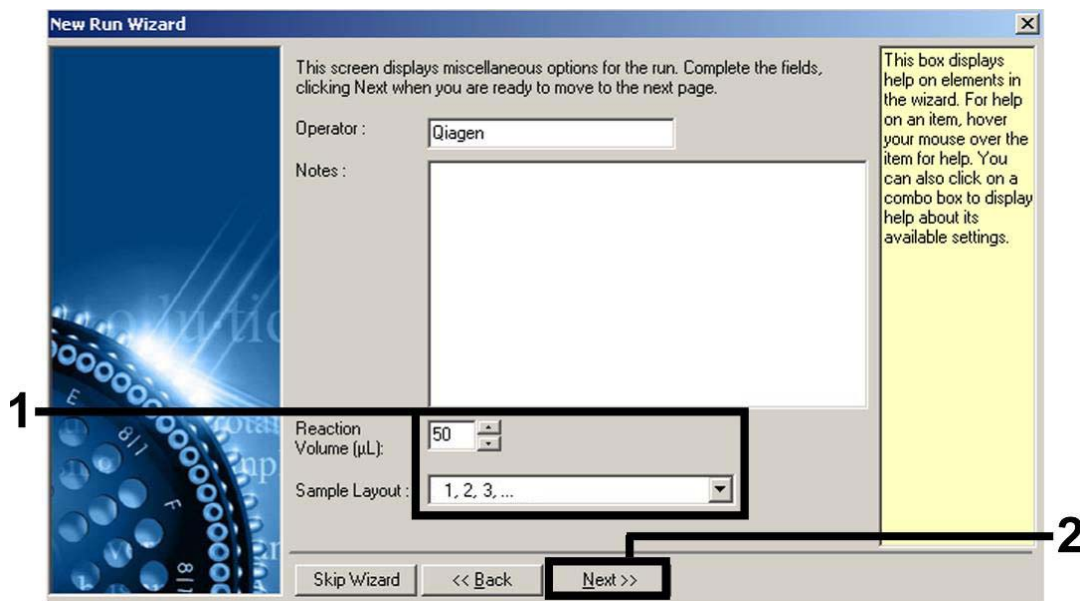
Alle specifikationer henviser til Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q softwareversion 1.7.94 og Rotor-Gene 6000 softwareversion 1.7.65. Yderligere oplysninger om programmering af Rotor-Gene Q-instrumenter kan ses i instrumentets brugervejledning. I illustrationerne er disse indstillinger indrammet med en fed, sort streg. Der er illustrationer til Rotor-Gene Q-instrumenter.

6. Åbn først dialogboksen "New Run Wizard" (Hjælp til ny kørsel) (Figur 1). Marker afkrydsningsfeltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat), og klik på "Next" (Næste).



Figur 1. Dialogboksen "New Run Wizard".

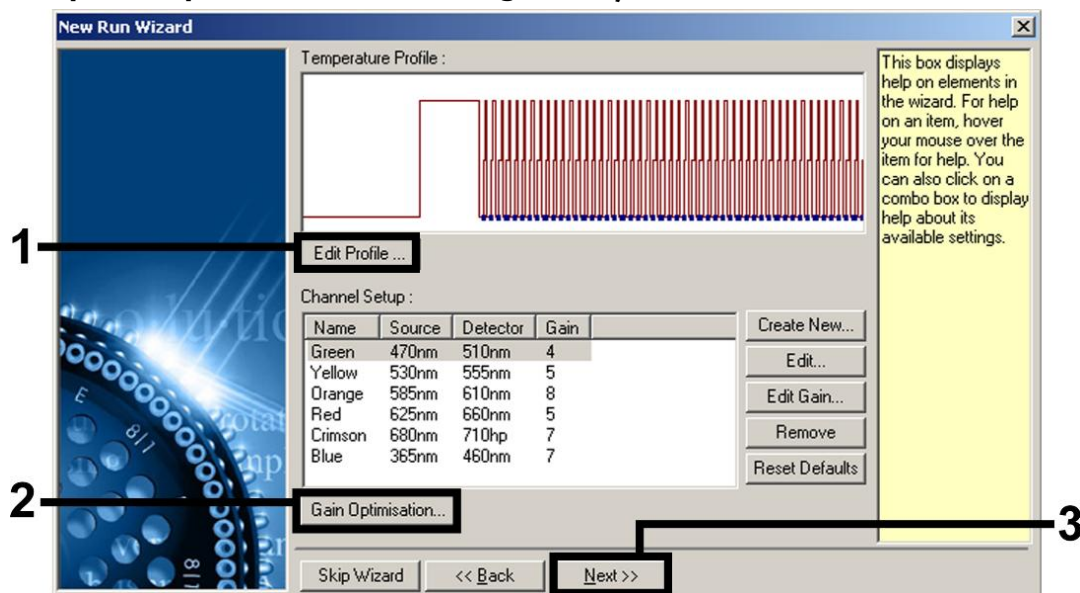
7. Vælg 50 for PCR-reaktionsvolumen, og klik på "Next" (figur 2).



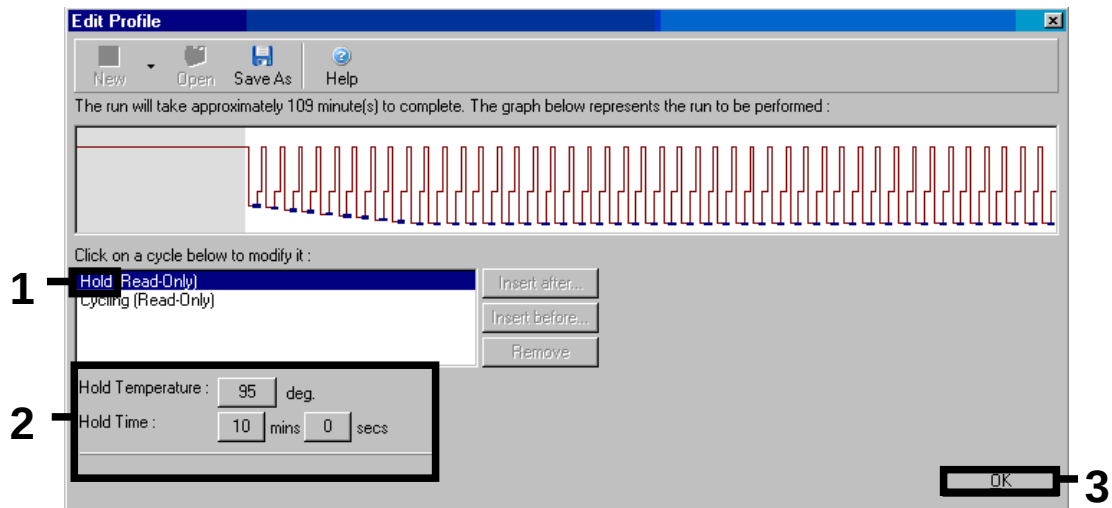
Figur 2. Indstilling af generelle analyseparametre.

Bemærk: Selvom det fysiske reaktionsvolumen er 25 µl, skal du vælge 50 for reaktionsvolumen i Rotor-Gene-softwaren.

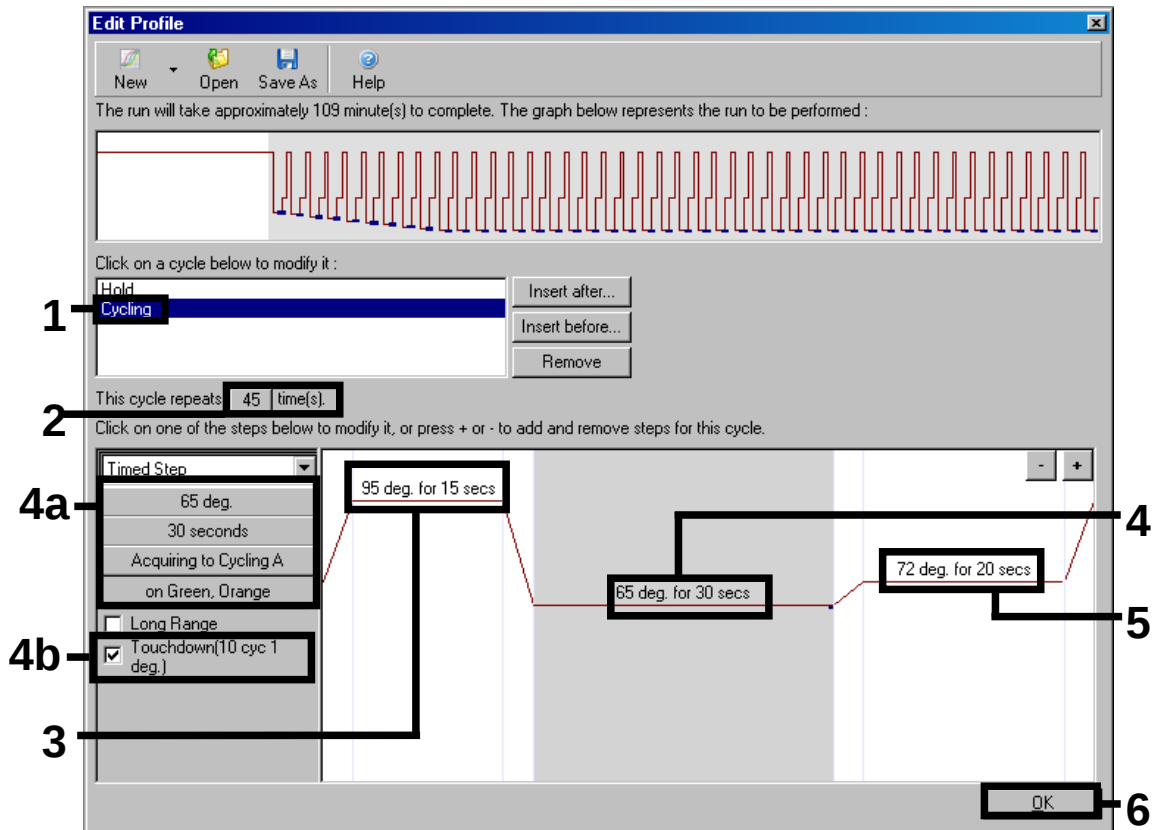
8. Klik på knappen "Edit Profile" (Regiger profil) i den næste dialogboks "New Run Wizard" (Figur 3) og programmer temperaturprofilen som vist i Figur 3-5).



Figur 3. Redigering af profilen.



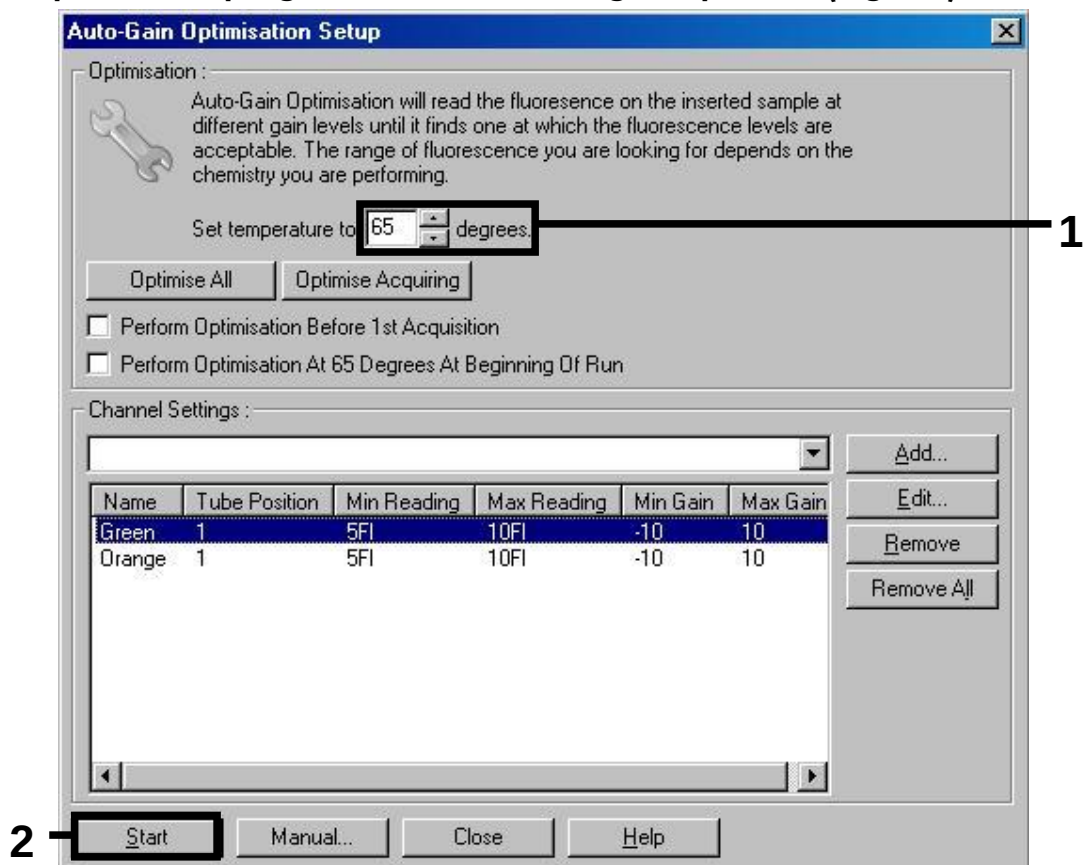
Figur 4. Indledende aktivering af hot-start enzymet.



Figur 5. Amplifikation af DNA'et. Sørg for at aktivere touchdown-funktionen for 10 cyklusser i hærningstrinnet.

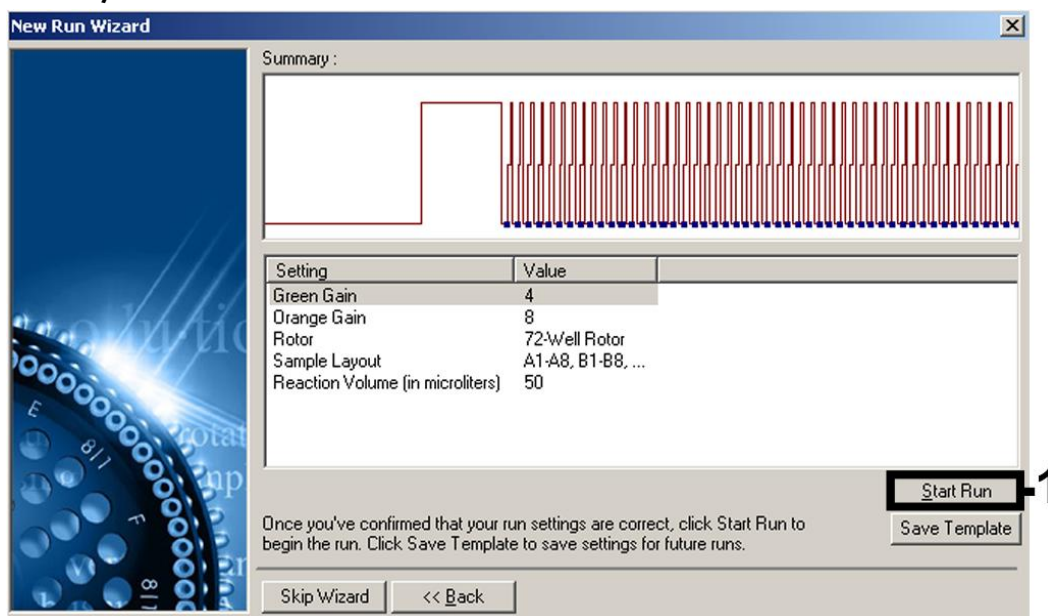
9. **Detektionsområdet for fluorescenskanalerne skal bestemmes i henhold til fluorescensintensiteterne i PCR-rørene. Klik på "Gain-Optimisation" (Gain-optimering) i dialogboksen "New Run Wizard" (se figur 3) for at åbne dialogboksen "Auto-Gain Optimisation Setup" (Opsætning af automatisk gain-optimering). Indstil**

kalibreringstemperaturen til 65 for at matche
amplifikationsprogrammets afhærdningstemperatur (Figur 6).



Figur 6. Justering af fluorescenskanalens følsomhed.

10. Gain-værdierne, der bestemmes af kanalkalibreringen, gemmes automatisk og angives i det sidste menuvindue i programmeringsproceduren (figur 7). Klik på "Start Run" (Start kørsel).



Figur 7. Start kørslen.

Fortolkning af resultater

Kvantificering

De vedlagte kvantiteringsstandarder (BK Virus RG QS 1-4) behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen (15 µl). For at generere en standardkurve på Rotor-Gene Q-instrumenter bør alle 4 kvantiteringsstandarder bruges og defineres i dialogboksen "Edit Samples" (Rediger prøver) som standarder med de specificerede koncentrationer (se instrumentets brugervejledning).

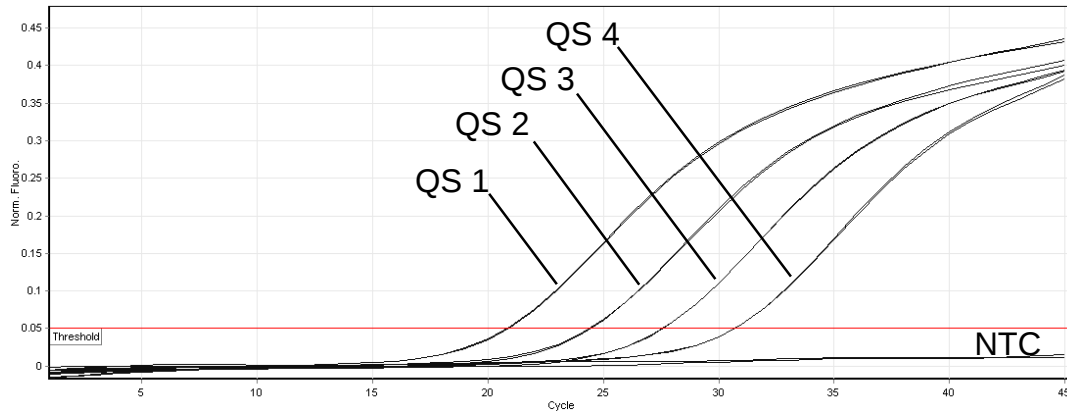
Bemærk: Kvantiteringsstandarderne defineres som kopier/µl. Følgende formel skal anvendes til at omregne de værdier, som er bestemt ved hjælp af standardkurven, til kopier/ml prøvemateriale:

$$\text{Resultat (kopier/ml)} = \frac{\text{Resultat (kopier/}\mu\text{l)} \times \text{elueringsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Prøvevolumen (ml)}}$$

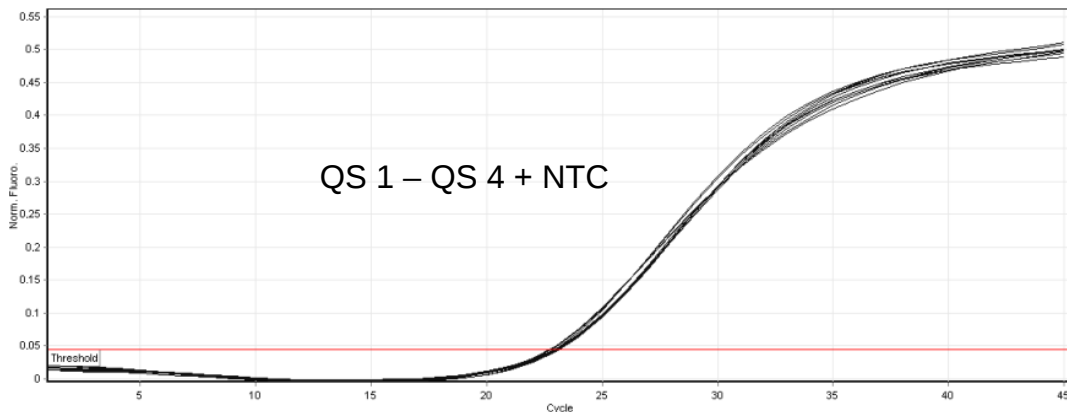
Det initiale prøvevolumen skal altid indsættes i ovenstående formel. Det skal tages i betragtning, når prøvevolumen ændres før nukleinsyreekstraktionen (f.eks. reduktion af volumenet ved centrifugering eller øgning af volumenet ved at tilsætte det nødvendige volumen til isolationen).

Resultater

Eksempler på positive og negative PCR-reaktions er givet i Figur 8 og Figur 9.



Figur 8. Detektion af kvantiteringsstandarderne (BK Virus RG QS 1-4) i fluorescenskanalen Cycling Green. NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol).



Figur 9. Detektion af den interne kontrol (IC) i fluorescenskanalen Cycling Orange med samtidig amplifikation af kvantiteringsstandarderne (BK Virus RG QS 1-4). NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol).

**Der er detekteret et signal i fluorescenskanalen Cycling Green.
Analysens resultat er positivt: Prøven indeholder BK-virus-DNA.**

I dette tilfælde er detektion af et signal i kanalen Cycling Orange unødvendigt, idet høje indledende koncentrationer af BK-virus-DNA (positivt signal i Cycling Green-kanalen) kan medføre reduceret eller manglende fluorescenssignal fra den interne kontrol i Cycling Orange-kanalen (konkurrence).

Der er ikke detekteret noget signal i fluorescenskanalen Cycling Green. Samtidig vises et signal fra den interne kontrol i Cycling Orange-kanalen.

Intet BK-virus-DNA kan detekteres i prøven. Den kan således betragtes som negativ.

I tilfælde af en negativ BK Virus PCR udelukker det detekterede signal af den interne kontrol muligheden for PCR-hæmning.

Intet signal detekteret i Cycling Green eller Cycling Orange-kanalerne. Der kan ikke udledes noget resultat.

Information vedrørende fejlkilder og deres løsning kan findes i Fejlfindingsvejledning herunder.

Fejlfindingsvejledning

I denne fejlfindingsvejledning kan der findes brugbare henvisninger, som kan hjælpe ved løsningen af eventuelle problemer. Der findes desuden flere informationer på siden "Frequently Asked Questions" [Hyppigt stillede spørgsmål] hos vores tekniske supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENS tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Intet signal ved positive kontroller (BK Virus RG QS 1–4) i fluorescenskanalen Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) Den valgte fluorescenskanal for PCR-dataanalyse stemmer ikke overens med protokollen | Ved dataanalyse vælges fluorescenskanalen Cycling Green for analytisk BK Virus-PCR og fluorescenskanalen Cycling Orange for intern kontrol-PCR. |
| b) Ukorrekt programmering af temperaturprofilen for Rotor-Gene-instrument | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen. Se "Protokol: PCR og dataanalyse", side 13. |
| c) Ukorrekt konfiguration af PCR | Kontrollér Deres arbejdsrin ved hjælp af pipetteringsskemaet, og gentag i givet fald PCR'en. Se "Protokol: PCR og dataanalyse", side 13. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|---|--|
| d) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser", (side 10) | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |
| e) <i>artus</i> BK Virus RG PCR-kittet er udløbet | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |

Svagt eller intet signal fra den interne kontrol af en negativ plasmaprøve underkastet oprensning med *artus* BK Virus RG PCR-kittet i fluorescenskanalen Cycling Orange og samtidigt fravær af signal i kanalen Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) PCR-betingelserne stemmer ikke overens med protokollen | Kontroller PCR-betingelserne (se ovenfor), og gentag om nødvendigt PCR med korrigerede indstillinger. |
| b) PCR blev hæmmet | Sørg for, at De bruger den anbefalede isoleringsmetode og følger producentens vejledning nøje. |
| c) DNA gik tabt under ekstraktionen | Hvis den interne kontrol er tilsat til ekstraktionen, kan et manglende signal fra den interne kontrol være tegn på tab af DNA under ekstraktionen. Sørg for, at De bruger den anbefalede isoleringsmetode (se "DNA-isolering", side 11) og følger producentens vejledning nøje. |
| d) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser", (side 10) | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|---|--|
| e) <i>artus</i> BK Virus RG PCR-kittet er udløbet | Kontroller opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit. |
|---|--|

Signaler med de negative kontroller i fluorescenskanalen *Cycling Green* eller i den analytiske PCR

- | | |
|--|--|
| a) Kontamination under klargøring af PCR | <p>Gentag PCR med de nye reagenser i replika.</p> <p>Luk om muligt PCR-rørene umiddelbart efter tilsætning af den prøve, der skal testes.</p> <p>Positiv-kontrollerne skal pipetteres til sidst.</p> <p>Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.</p> |
| b) Der forekom kontamination under ekstraktion | <p>Gentag ekstraktion og PCR for den prøve, der skal testes, med nye reagenser.</p> <p>Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.</p> |

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *artus* BK Virus RG PCR-kittet efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

Produktet må kun anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

Det er nødvendigt nøje at følge brugervejledningen for at opnå optimale PCR-resultater.

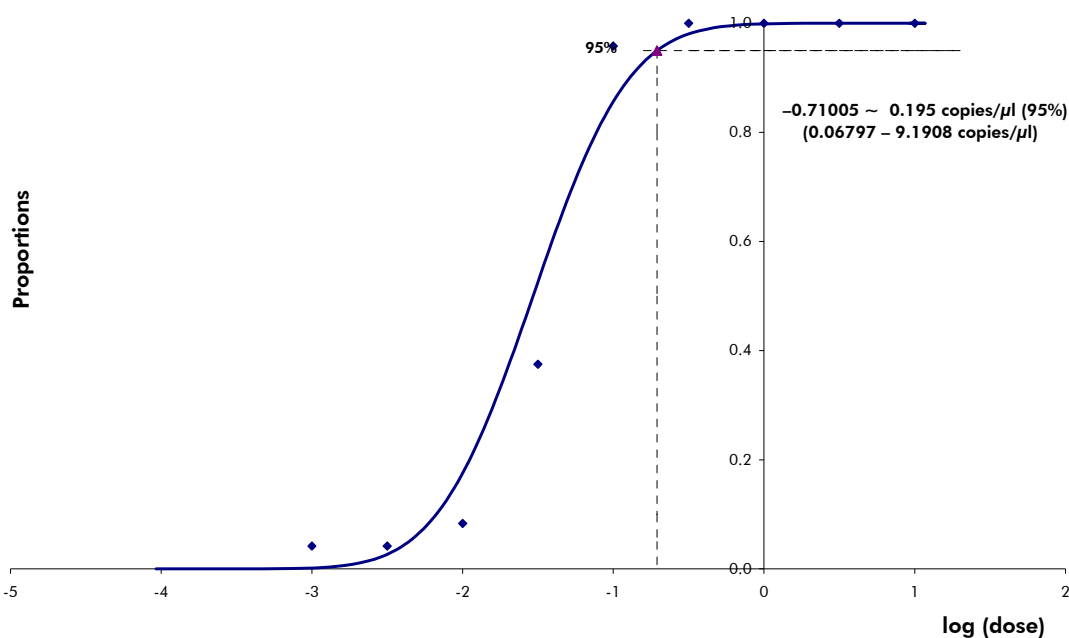
Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug aldrig for gamle komponenter.

Selv om det er sjældent, kan mutationer i de stærkt konserverede områder af det virale genom, der dækkes af kittets primere og/eller probe, resultere i underkvantitering eller manglende evne til at detektere tilstedeværelsen af virusset i disse tilfælde. Analysedesignets gyldighed og ydeevne revideres med jævne mellemrum.

Ydelsesegenskaber

Analysefølsomhed

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* BK Virus RG PCR-kittet blev der udarbejdet en standardfortyndingsrække af 10 til nominelt 0,001 kopieækvivalenter/ μ l. Denne blev derefter analyseret ved hjælp af *artus* BK Virus RG PCR-kittet på Rotor-Gene 6000. Testene blev gennemført på 3 forskellige dage med 8 replikater. Resultatet blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. En grafisk illustration af probitanalysen på Rotor-Gene 6000 er vist i figur 10. Den analytiske detektionsgrænse for *artus* BK Virus RG PCR-kittet i kombination med Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 er 0,195 kopier/ μ l ($p = 0,05$). Det vil sige, at der er 95 % sandsynlighed for, at 0,195 kopier/ μ l vil blive detekteret.



Figur 10. Probit-analyse: BK Virus (Rotor-Gene 6000). Analytisk sensitivitet for *artus* BK Virus RG PCR-kittet på Rotor-Gene 6000.

Specificitet

Specificiteten af *artus* BK Virus RGQ-kittet sikres først og fremmest af valget af primere og prober samt valget af stringente reaktionsbetingelser. Primere og prober blev kontrolleret for mulige homologier med alle sekvenser, der er publiceret i genbanker efter sekvenssammenligningsanalyse. Detektérbarheden for alle relevante stammer er således sikret ved en databasejustering og ved en PCR kørsel på Rotor-Gene instrumenter med følgende stammer (se Tabel 4).

Tabel 4. Test af relevante stammers specificitet

Virus	Stamme	Kilde	BK Virus (Cycling Green)	Intern kontrol (Cycling Orange)
BK-virus	Dunlop	ATCC*	+	+
BK-virus	Gardner	ATCC	+	+
BK-virus	AB269822	Geneart	+	+
BK-virus	S72390	Geneart	+	+

* American Type Culture Collection.

Desuden blev specificiteten valideret med 30 forskellige BK-virusnegative plasmaprøver. Disse genererede ikke nogen signaler med BK-virus-specifikke primere og prober, som indgår i BK Virus RG Master.

En potentiel krydsreaktivitet i *artus* BK Virus RG PCR-kittet blev testet med den kontrolgruppe, der er angivet i tabel 5. Ingen af de testede smitstoffer var reaktive. Der viste sig ingen krydsreaktiviteter ved blandede infektioner.

Tabel 5. Testning af kittets specificitet med potentielt krydsreaktive patogener

Kontrolgruppe	BK-virus (Cycling Green)	Intern kontrol (Cycling Orange)
Cytomegalovirus	–	+
Epstein-Barr-virus	–	+
Humant herpesvirus 1 (herpes simplex-virus 1)	–	+
Humant herpesvirus 2 (herpes simplex-virus 2)	–	+
Humant herpesvirus 3 (varicella-zoster-virus)	–	+
Humant herpesvirus 6	–	+
JC-virus	–	+
Simian-virus 40	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+

Præcision

Præcisionsdata for *artus* BK Virus RG PCR-kittet er indsamlet ved hjælp af Rotor-Gene instrumenter og tillader bestemmelsen af totalvariansen for testsystemet. Den totale varians består af variabilitet inden for analysen (variabiliteten af flere resultater af prøver med samme koncentration inden for et eksperiment), variabiliteten mellem prøverne (variabiliteten af flere resultater af analysen genereret på forskellige instrumenter af samme type af forskellige operatører inden for et laboratorium) og variabiliteten mellem batches (variabiliteten af flere resultater af analysen ved brug af forskellige batches). De opnåede data blev brugt til at bestemme standardafvigelsen, variansen og variationskoefficienten for den patogenspecifikke og den interne kontrol-PCR.

Præcisionsdata for *artus* BK Virus RG PCR-kittet er indsamlet ved hjælp af kvantificeringsstandarderne med den laveste koncentration (QS 4; 1×10^1 kopier/ μ l). Testene blev foretaget med 8 replika. Præcisionsdata blev beregnet på basis af C_T -værdierne af amplifikationskurverne (C_T : tærskelcyklus, se tabel 6). Baseret på disse resultater er den samlede statistiske spredning af enhver given prøve med den nævnte koncentration 2,11 % (C_T) og 3,59 % (C_T)

for detektion af den interne kontrol. Disse værdier er baseret på helheden af enkeltværdierne af alle konstaterede variationer.

Tabel 6. Præcisionsdata på basis af C_T-værdierne

	C_T- værdi	Standardafvigelse	Variationskoefficient (%)
Variabilitet inden for analysen: BK Virus RG QS 4	29,45	0,17	0,56
Variabilitet inden for analysen: Intern kontrol	24,31	0,12	0,49
Variabilitet mellem analyser: BK Virus RG QS 4	29,42	0,25	0,85
Variabilitet mellem analyser: Intern kontrol	23,30	0,77	3,30
Variabilitet mellem batches: BK Virus RG QS 4	30,31	0,64	2,10
Variabilitet mellem batches: Intern kontrol	22,53	0,40	1,78
Total varians: BK Virus RG QS 4	29,80	0,63	2,11
Total varians: Intern kontrol	23,12	0,83	3,59

Robusthed

Verificeringen af robustheden muliggør bestemmelse af den samlede fejlrate for *artus* BK Virus RG PCR-kittet. 30 BK-virusnegative prøver blev tilsat 1 kopi/ μ l elueringsvolumen BK viruskontrol-DNA (cirka fem gange koncentrationen af den analytiske sensitivitetsgrænse). Efter oprensningen med EZ1[®] DSP Virus-kittet (se "DNA-isolering", side 11) blev disse prøver analyseret med *artus* BK Virus RG PCR-kittet. Fejlraten udgjorde for alle 30 prøver 0 %. Desuden blev robustheden af den interne kontrol vurderet ved oprensning og analyse af 30 BK-virus-negative prøver. Den samlede udskillelsesrate udgjorde 0%. Inhibitioner blev ikke observeret. Robustheden af *artus* BK Virus RG PCR-kittet er $\geq$ dermed 99 %.

Reproducerbarhed

Reproducerbarhedsdata muliggør en jævnlig ydelsesvurdering af *artus* BK Virus RG PCR-kittet samt en effektivitetssammenligning med andre produkter. Disse data indhentes ved deltagelse i standardiserede præstationsprogrammer.

Diagnostisk evaluering

artus BK Virus RG PCR-kittet gennemgår i øjeblikket en række evaluerende studier.

Referencer

QIAGEN vedligeholder en stor, ajourført onlinedatabase med videnskabelige publikationer, hvor QIAGENS produkter er anvendt. De avancerede søgefunktioner gør det muligt at finde de artikler, du har brug for, enten med en simpel nøgleordssøgning eller ved at angive applikation, forskningsområde, titel osv.

En fuldstændig referenceliste kan fås ved at besøge QIAGENS referencedatabase online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakte QIAGENS tekniske service eller den lokale forhandler.

Symbols



<N>

Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> tests



Anvendes inden



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt

REF	Katalognummer
LOT	Lot-nummer
MAT	Materialenummer
COMP	Komponenter
CONT	Indeholder
NUM	Nummer
GTIN	Globalt handelsvarenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Læs brugsvejledningen

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, eller du kan henvende dig til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden eller besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
<i>artus</i> BK Virus RG PCR-kit (24)	Til 24 reaktioner: Master, 4 kvantiteringsstandarder, intern kontrol, magnesiumopløsning, vand (PCR-kvalitet)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR-kit (96)	Til 96 reaktioner: Master, 4 kvantiteringsstandarder, intern kontrol, magnesiumopløsning, vand (PCR-kvalitet)	4514265
EASYartus BK Virus RG PCR-kit – til integreret automatiseret prøveoprensning og patogendetektion fuldt i henhold til CE-IVD		
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 1	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer og 24 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 1 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR-kit (24)	EA11423
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 2	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer og 48 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 2 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR-kit (24)	EA11424
EZ1 DSP Virus-kit – til automatiseret, samtidig oprensning af viralt DNA og RNA fra 1-14 prøver af humant plasma, serum eller CSF		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Til 48 virale nukleinsyreklargøringer: Fyldte reagensbeholdere, engangs filterspidsholdere, engangs filterspidser, prøverør, elutionsrør, buffere, bærer-RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtids-PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002022

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtids-PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtids-PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Realtids-PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Realtids-PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion i et standard 8 x 12-array med 96 x 0,2 ml rør	9018905

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tyndvæggede rør til 1000 reaktioner	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tyndvæggede rør til 10.000 reaktioner	981008

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN-kit-håndbog eller -brugervejledning. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENs tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Ved køb af dette produkt må køber anvende det til at udføre diagnostiske tjenester til human in vitro-diagnostik. Der gives ikke hermed noget generelt patent eller anden form for licens end denne specifikke brugsret via købet.

Varemærker: QIAGEN®, *artus*®, EASYartus®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af *artus* BK Virus RG PCR-kittet accepterer følgende vilkår:

1. *artus* BK Virus RG PCR-kittet må kun bruges i overensstemmelse med Håndbog til *artus* BK Virus RG PCR-kittet og kun med de komponenter, der følger med kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkorporere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i Håndbog til *artus* BK Virus RG PCR-kittet og yderligere protokoller, som er tilgængelige på www.qiagen.com.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger, der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret, og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises der til www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

