

artus[®] WNV LC RT-PCR-kit-håndbog



Kvantitativ in vitro-diagnostik

Til brug sammen med *LightCycler[®]*-instrumentet

December 2014 – Version 1



4509063, 4509065



1046924DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1046924DA



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 højkvalitetsprodukter 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.

Indholdsfortegnelse

1. Indhold.....	5
2. Opbevaring	5
3. Andre påkrævede materialer og enheder	6
4. Almene forsigtighedsregler.....	6
5. Patogeninformation	6
6. Princippet bag realtids-PCR.....	7
7. Produktbeskrivelse	7
8. Protokol	8
8.1 RNA-isolation	8
8.2 Intern kontrol	9
8.3 Kvantitering	10
8.4 Klargøring af PCR	11
8.5 Programmering af <i>LightCycler</i> -instrumentet.....	15
9. Dataanalyse	18
10. Fejlfinding	21
11. Specifikationer.....	23
11.1 Analysefølsomhed.....	23
11.2 Specificitet	24
11.3 Præcision	26
11.4 Robusthed	28
11.5 Reproducerbarhed	28
11.6 Diagnostisk evaluering	28
12. Begrænsninger af produktets anvendelse	28
13. Sikkerhedsoplysninger.....	29

14. Kvalitetskontrol	29
15. Litteratur.....	29
16. Symbolforklaring.....	30

artus WNV LC RT-PCR-kit

Til brug sammen med *LightCycler*-instrumentet.

1. Indhold

	Mærkning og indhold	Art.nr. 4509063 24 reaktioner
Blåt	WNV LC Master	2 x 12 reaktioner
Rødt	WNV LC/TM QS 1 ^a 4 x 10 ⁴ kopier/μl	1 x 200 μl
Rødt	WNV LC/TM QS 2 ^a 4 x 10 ⁵ kopier/μl	1 x 200 μl
Rødt	WNV LC/TM QS 3 ^a 4 x 10 ⁶ kopier/μl	1 x 200 μl
Rødt	WNV LC/TM QS 4 ^a 4 x 10 ⁷ kopier/μl	1 x 200 μl
Grønt	WNV LC IC ^a	1 x 1000 μl
Hvidt	Vand (PCR-kvalitet)	1 x 1000 μl

^a QS = Kvantiteringsstandard
IC = Intern Kontrol

2. Opbevaring

Komponenterne i *artus* WNV LC RT-PCR-kittet skal opbevares ved –15 °C til –30 °C og er stabile indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten. Gentagne optøninger og nedfrysninger (>2 x) bør undgås, da det kan reducere følsomheden. Hvis reagenserne kun bruges forbigående, skal de fryses i alikvotter. Må ikke opbevares ved +4 °C i mere end fem timer.

3. Andre påkrævede materialer og enheder

- Pudderfri engangshandsker
- RNA-isolationskit (se **8.1 RNA-isolation**)
- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespidser med filtre
- Vortex-mixer
- Bordcentrifuge med rotor til 2 ml reagensglas
- *Farvekomensationssæt* (kat. Nr. 2 158 850) til installation af en *Crosstalk Color Compensation*-fil
- *LightCycler*-kapillærer (20 µl)
- *LightCycler* Cooling Block
- *LightCycler*-instrument
- *LightCycler* Capping Tool

4. Almene forsigtighedsregler

Brugeren skal altid være opmærksom på følgende:

- Brug sterile pipettespidser med filtre.
- Positive materialer (prøver, kontroller og amplikoner) skal opbevares og ekstraheres særskilt fra alle andre reagenser og skal tilsættes reagensmixet på et rumligt adskilt anlæg.
- Optø alle komponenter grundigt ved stuetemperatur, før en analyse påbegyndes.
- Når komponenterne er optøet, blandes de og centrifugeres kort.
- Arbejd hurtigt, og hold PCR-reagenserne på is eller i *LightCycler* Cooling Block.

5. Patogeninformation

Vestnilvirus (WNV) er medlem af familien Flaviviridae (genus *Flavivirus*). Inficerede myg bider og inficerer sædvanligvis vilde fugle — den primære vært for virusset — men Vestnilvirus smitter også heste og andre pattedyr. 80 % af alle inficerede mennesker får ikke nogen WNV-relaterede symptomer. WNV-

infektioner hos ældre, børn eller immunsupprimerede personer kan i sjældne tilfælde føre til dødelig encefalitis eller myocarditis.

6. Princippet bag realtids-PCR

Patogendiagnose 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 (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivelse

artus WNV LC RT-PCR-kittet er et brugsklart system til detektion af WNV-RNA ved hjælp af polymerasekædereaktion (PCR) i *LightCycler*-instrumentet. *WNV LC Master* indeholder reagenser og enzymer til revers transkription og specifik amplifikation af en 72 bp-region af WNV LC Master-genomet og til direkte detektion af det specifikke amplikon i fluorimeterkanalen F1 af *LightCycler*-instrumentet. Desuden indeholder *artus* WNV LC RT-PCR-kittet et ekstra heterologt amplifikationssystem til identifikation af mulig PCR-hæmning. Dette detekteres som en *intern kontrol* (IC) i fluorimeterkanal F3. Detektionsgrænsen for den analytiske WNV RT-PCR (se **11.1 Analysefølsomhed**) bliver derved ikke reduceret. Der medfølger eksterne positive kontroller (*WNV LC/TM QS 1 – 4*), som bruges til kvantificering af smitstoffet. Der er flere informationer i afsnit **8.3 Kvantitering**.

8. Protokol

8.1 RNA-isolation

Der er forskellige producenter, der tilbyder RNA-isolationskit. De prøvemængder, der skal bruges til RNA-isolationsprocedure, afhænger af den anvendte protokol. Tilsæt den anbefalede prøvemængde til oprensningen og udfør RNA-isoleringen efter producentens forskrift. Den følgende isoleringskit anbefales:

Prøvemateriale	Nukleinsyre-isolationskit	Katalognummer	Producent	Bærer-RNA
Serum, plasma, CSF	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	inklusive

- Brugen af **bærer-RNA** er afgørende for ekstraktionseffektiviteten og dermed også DNA-/RNA-udbyttet. Vi anbefaler følgende procedure, der afviger fra ekstraktionskittets brugervejledning, for at øge stabiliteten af den bærer-RNA, der leveres sammen med QIAamp Viral RNA Mini-kittet:
 - a. Resuspender den lyofyliserede bærer-RNA, før ekstraktionskittet bruges første gang, i 310 µl Buffer AE eller Buffer AVE (elueringsbuffer, endelig koncentration på 1 µg/µl – brug ikke lysisbuffer). Opdel denne bærer-RNA-opløsning i flere alikvoter, der svarer til dine behov, og opbevar dem ved –20 °C. Undgå gentagen optøning (> 2 x) af en bærer-RNA-alikvot.
 - b. Før hver ekstraktion påbegyndes, skal der klargøres en blanding af lysisbuffer og bærer-RNA (og *Intern kontrol*, hvor det er relevant, se **8.2 Intern kontrol**) frisk i henhold til følgende pipetteringsplan:

Antal prøver	1	12
Buffer AVL	560 µl	6720 µl
Bærer-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Totalt volumen	565,6 µl	6787,2 µl
Volumen pr. ekstraktion	560 µl	560 µl hver

- c. Brug straks den frisk klargjorte lysisbuffer til ekstraktion. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.

- Når der bruges isolationsprotokoller med **ethanol**-holdige vaskebuffer, skal der udføres et ekstra centrifugeringstrin (3 minutter ved 13.000 o./min.) før eluering for at fjerne eventuelle rester af ethanol. Dette forhindrer mulig hæmning af PCR.
- *artus* WNV LC RT-PCR-kittet bør ikke bruges sammen med **phenol**-baserede isolationsmetoder.

Vigtigt: Den *interne kontrol* i *artus* WNV LC RT-PCR-kittet kan bruges direkte i isolationsproceduren (se **8.2 Intern kontrol**).

8.2 Intern kontrol

Der medfølger en *intern kontrol* (*WNV LC IC*). Dette giver brugeren mulighed for **både at kontrollere RNA-isolationsproceduren og kontrollere for mulig PCR-hæmning** (se Fig. 1). Til denne anvendelse skal den *interne kontrol* tilsættes til isolationen i et forhold på 0,1 µl pr. 1 µl elueringsvolumen. Ved brug af QUIAmp Viral RNA Mini-kittet elueres RNA'et f.eks. i 60 µl Buffer AVE. Derfor bør 6 µl af den *interne kontrol* tilsættes initialt. Hvis du eluerer i f.eks. 50 µl, skal det tilsvarende volumen på 5 µl anvendes. Den anvendte mængde *intern kontrol* afhænger **kun** af elueringsvolumen. Bemærk, at den *interne kontrol* skal tilsættes blandingen af lysisbuffer og prøvemateriale. Den *interne kontrol* kan også tilsættes direkte til lysisbufferen. Du kan også vælge at tilsætte bærer-RNA sammen med den *interne kontrol* til lysisbufferen (se **8.1 RNA-isolation**). Det skal dog bemærkes, at blandingen af *intern kontrol* og lysisbuffer/bærer-RNA skal klargøres frisk og bruges straks (opbevaring af blandingen ved stuetemperatur eller i køleskab i blot nogle få timer kan medføre fejl i den *interne kontrol* og ringere ekstraktionseffektivitet). **Undlad** at tilsætte den *interne kontrol* direkte til prøvematerialet.

Alternativt kan den *interne kontrol* anvendes **udelukkende til kontrol af en mulig PCR-inhibition** (se Fig. 2). Til denne anvendelse tilsættes pr. testblanding 0,5 µl af den *interne kontrol* direkte til 15 µl *WNV LC Master*. Til hver PCR-reaktion skal der bruges 15 µl af den Master-blanding, der er

produceret som beskrevet herover, * og tilsættes 5 µl af den oprensede prøve. Ved udførelsen af en kørsel med flere prøver er det nødvendigt at øge de krævede mængder af *WNV LC Master* og den *interne kontrol* svarende til prøvetallet (se **8.4 Klargøring af PCR**).

8.3 Kvantitering

De vedlagte *kvantiteringsstandarder* (*WNV LC/TM QS 1-4*) behandles som tidligere oprensede prøver, og der bruges samme volumen (5 µl). Ved generering af en standardkurve på *LightCycler*-instrumentet bør alle fire *kvantiteringsstandarder* bruges og defineres i *Sample Loading Screen* (Standardindlæsningsskærmen) som standarder med de specificerede koncentrationer (se *LightCycler Brugervejledning*, version 3.5, kapitel B, 2.4. Sample Data Entry (Indtastning af prøvedata)). Den standardkurve, der genereres som beskrevet herover, kan også bruges til efterfølgende kørsler, hvis mindst én standard af en given koncentration bruges i den aktuelle kørsel. Til dette formål skal den tidligere genererede standardkurve importeres (se *LightCycler Brugervejledning*, Version 3.5, kapitel B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve (Kvantitering med en eksternt standardkurve)). Denne kvantiteringsmetode kan dog medføre afvigelser i resultaterne på grund af variabilitet mellem forskellige PCR-kørsler.

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:

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

Det initiale prøvevolumen bør principielt altid indsættes i ovenstående formel. Det skal tages i betragtning, når prøvevolumen ændres før

* Den volumenforøgelse, der skyldes tilsætning af den *interne kontrol*, ignoreres ved klarlægning af PCR-analysen. Detektionssystemets følsomhed påvirkes ikke.

nukleinsyreekstraktionen (f.eks. reduktion af volumen ved centrifugering eller øgning af volumen ved tilsætning af det nødvendige volumen til isolationen).

Vigtigt: Der findes retningslinjer for den kvantitative analyse af *artus* systemer på *LightCycler*-instrumentet på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** (Teknisk note til kvantitering på *LightCycler*-instrumentet)).

8.4 Klargøring af PCR

Sørg for, at Cooling Block samt kapillæradapterne (tilhører til *LightCycler*-instrumentet) er forkølet til +4 °C. Anbring det ønskede antal *LightCycler*-kapillærer i adapterne i Cooling Block. Sørg for, at mindst én *kvantiteringsstandard* samt mindst én negativ kontrol (*vand*, *PCR-kvalitet*) er med i hver PCR-kørsel. Til udarbejdelse af en standardkurve anvendes pr. PCR-kørsel alle vedlagte *kvantiteringsstandarde* (*WNV LC/TM QS 1–4*). Før hver brug skal alle reagenser tøs helt op, blandes (ved gentagen op- og nedpipettering eller ved at vende røret flere gange) og centrifugeres kortvarigt.

Hvis det ønskes at bruge den *interne kontrol til at overvåge RNA-isolationsproceduren og kontrollere for mulig PCR-hæmning* er den allerede blevet tilsat isolationen (se **8.2 Intern kontrol**). Brug i så fald følgende pipetteringsplan (se den skematiske oversigt i Fig. 1):

	Antal prøver	1	12
1. Klargøring af Master-blanding	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Totalt volumen	15 µl	180 µl
2. Klargøring af PCR-analyse	Master-blanding	15 µl	a 15 µl
	Prøve	5 µl	a 5 µl
	Totalt volumen	20 µl	a 20 µl

Hvis det ønskes at bruge den *interne kontrol til udelukkende at kontrollere for mulig PCR-hæmning* skal den tilsættes direkte til *WNV LC Master*. Brug i så fald følgende pipetteringsplan (se den skematiske oversigt i Fig. 2):

	Antal prøver	1	12
1. Klargøring af Master-blanding	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Totalt volumen	15,5 µl*	186 µl
2. Klargøring af PCR-analyse	Master-blanding	15 µl	a 15 µl
	Prøve	5 µl	a 5 µl
	Totalt volumen	20 µl	a 20 µl

Pipetter 15 µl af Master-blandingen i hvert kapillærs plastbeholder. Tilsæt derefter 5 µl af det eluerede prøve-RNA. Der skal tilsvarende bruges 5 µl af mindst én af *kvantiteringsstandarderne (WNV LC/TM 1-4)* som positiv kontrol og 5 µl vand (*vand, PCR-kvalitet*) som negativ kontrol. Luk kapillærerne. For at overføre blandingen fra plastbeholderne til kapillæren skal adapterne med kapillærerne centrifugeres i en bordcentrifuge i 10 sekunder ved maks. 400 x g (2.000 o./min.).

* Den volumenforøgelse, der skyldes tilsætning af den *interne kontrol*, ignoreres ved klargøring af PCR-analysen. Detektionssystemets følsomhed påvirkes ikke.

Tilsætning af den *interne kontrol* til oprensningsproceduren

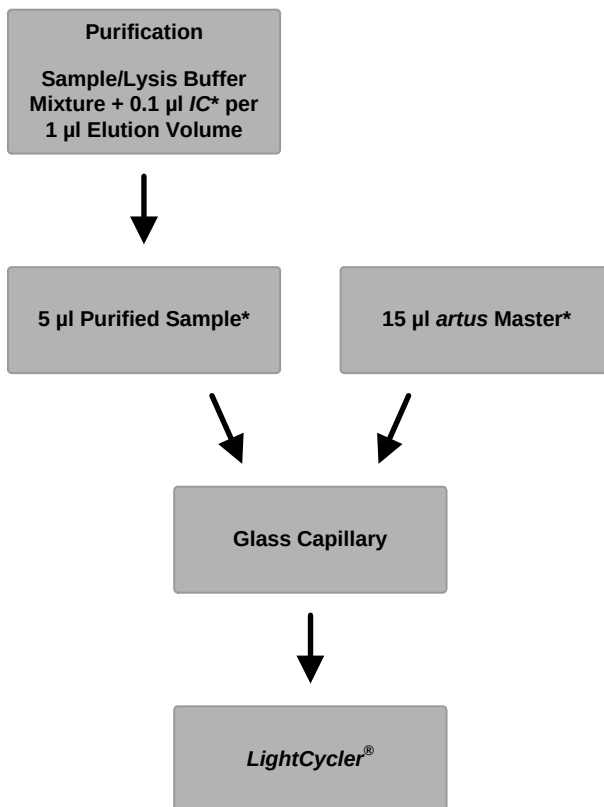


Fig. 1: Skematisk arbejdsgang ved kontrol af både oprensningsprocedure og PCR-hæmning.

*Sørg for, at opløsningerne er tørt helt op, blandet godt og centrifugeret kortvarigt.

Tilsætning af den interne kontrol til artus Master

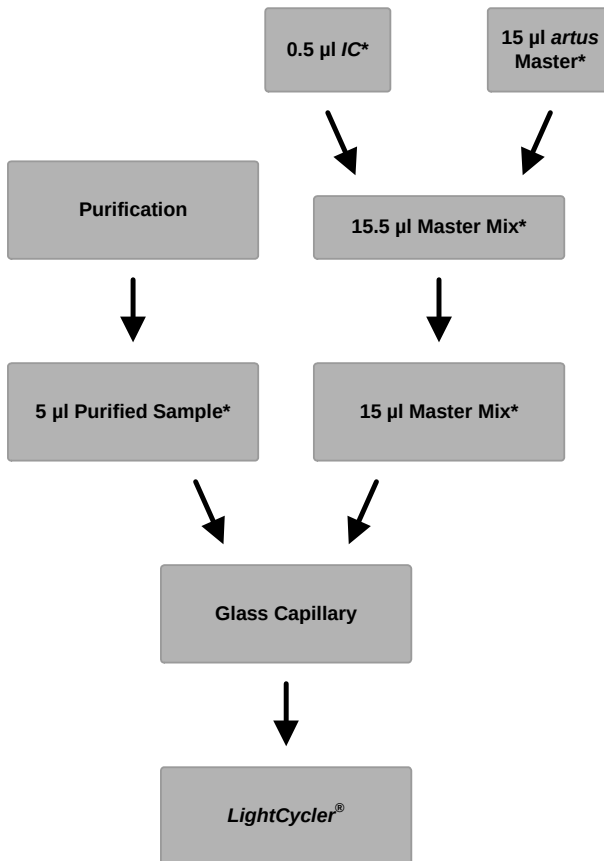


Fig. 2: Skematisk arbejdsgang ved kontrol af PCR-hæmning.

*Sørg for, at opløsningerne er tørt helt op, blandet godt og centrifugeret kortvarigt.

8.5 Programmering af *LightCycler*-instrumentet

Ved detektion af WNV RNA skal der oprettes en temperaturprofil på *LightCycler*-instrumentet i henhold til følgende fire trin (se Fig. 3-6).

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Revers transkription af RNA | Fig. 3 |
| B. | Initial aktivering af Hot Start Enzyme | Fig. 4 |
| C. | Amplifikation af cDNA'et | Fig. 5 |
| D. | Afkøling | Fig. 6 |

Vær særlig opmærksom på indstillingerne af *Analysis Mode* (Analysetilstand), *Cycle Program Data* (Cyklusprogramdata) og *Temperature Targets* (Temperaturmål). I illustrationerne er disse indstillinger indrammet med en fed, sort streg. Læs mere om programmering af *LightCycler*-instrumentet i *LightCycler Brugervejledning*.

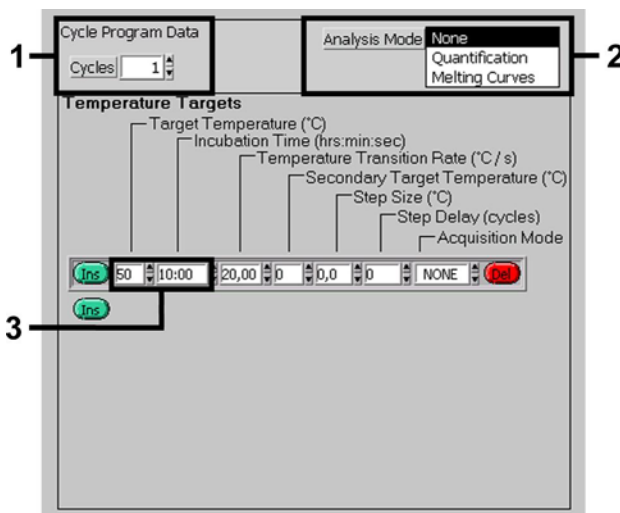


Fig. 3: Revers transkription af RNA.

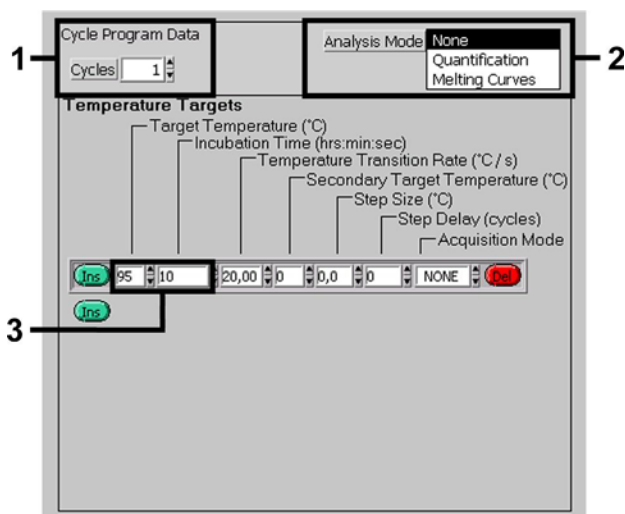


Fig. 4: Initial aktivering af Hot Start Enzyme.

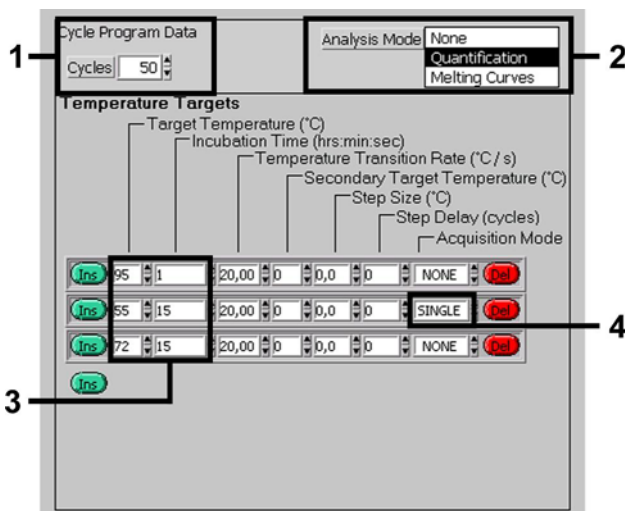


Fig. 5: Amplifikation af cDNA'et.

The image shows a software interface for setting a PCR cycle program. It includes sections for 'Cycle Program Data' and 'Temperature Targets'. Callout 1 points to the 'Cycles' field (set to 1). Callout 2 points to the 'Analysis Mode' dropdown menu (set to 'None'). Callout 3 points to the 'Inc' button next to the 'Target Temperature' field (set to 40°C).

Cycle Program Data		Analysis Mode	
Cycles	1	Analysis Mode	None
		Quantification	
		Melting Curves	

Temperature Targets

- Target Temperature (°C): 40
- Incubation Time (hrs:min:sec): 30
- Temperature Transition Rate (°C / s): 20,00
- Secondary Target Temperature (°C): 0
- Step Size (°C): 0,0
- Step Delay (cycles): 0
- Acquisition Mode: NONE

Buttons: Inc (green), Del (red)

Fig. 6: Afkøling.

9. Dataanalyse

I flerfarveanalyser forekommer der forstyrrelser mellem fluorimeterkanaler. *LightCycler*-instrumentets software indeholder en fil ved navn *Color Compensation File* (Farvekompensationsfil), der kompenserer for disse forstyrrelser. Åbn denne fil før, under eller efter PCR-kørslen ved at aktivere knappen *Choose CCC File* (Vælg CCC-fil) eller *Select CC Data* (Vælg CC-data). Hvis der ikke er installeret en *Color Compensation File*, skal filen genereres som beskrevet i *LightCycler Brugervejledningen*. Når *Color Compensation File* er aktiveret, vises der separate signaler i fluorimeterkanal F1, F2 og F3. Ved analyse af de PCR-resultater, der er opnået med *artus WNV LC RT-PCR*-kittet, vælges hhv. indstillinger af fluorescensvisning F1 for den analytiske WNV RT-PCR og F3/Back-F1^{*} for den *interne kontrol* RT-PCR. Ved analysen af kvantitative kørsler skal man følge anvisningerne i **8.3 Kvantitering** og i **Technical Note for quantitation on the *LightCycler*** (Teknisk note om kvantitering på *LightCycler*) på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Følgende resultater er mulige:

1. Et signal detekteres i fluorimeterkanal F1.

Resultatet af analysen er positiv: Prøven indeholder WNV-RNA.

I så tilfælde er detektion af et signal i kanalen F3/Back-F1 unødvendigt, idet høje initiale koncentrationer af WNV-RNA (positivt signal i F1-kanalen) kan medføre reduceret eller manglende fluorescenssignal af den *interne kontrol* i F3/Back-F1-kanalen (konkurrence).

2. Der detekteres intet signal i fluorimeterkanal F1. Samtidig vises et signal fra den *interne kontrol* i F3/Back-F1-kanalen.

I prøven kan der ikke påvises WNV-RNA. Den kan betragtes som negativ.

^{*} Når der anvendes ældre softwareversioner (version 3.3 og ældre) er visningsindstillingen F3/Back-F1 ikke til rådighed. I dette tilfælde skal du vælge F3/F1.

Ved negativ WNV RT-PCR udelukker det detekterede *intern Kontrol*-signal muligheden for en PCR-inhibition.

3. Der detekteres intet signal i F1- eller i F3/Back-F1-kanalen.

Der kan ikke udledes nogen diagnose.

Information vedrørende fejlkilder og deres løsning kan findes i **10. Fejlfinding**.

Eksempler på positive og negative PCR-reaktioner er givet i Fig. 7 og Fig. 8.

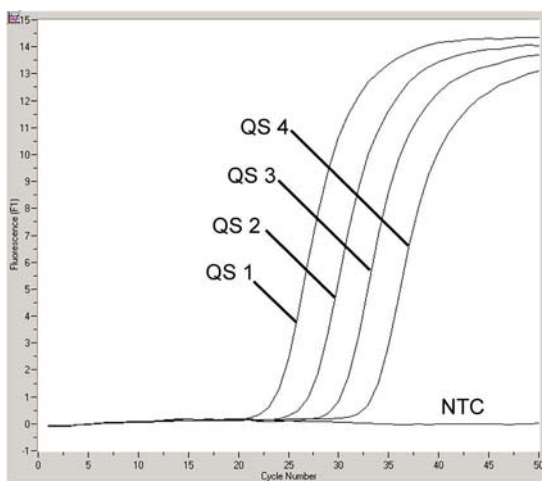


Fig. 7: Detektion af *kvantiteringsstandarder* (WNV LC/TM QS 1-4) i fluorimeterkanal F1. NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol)

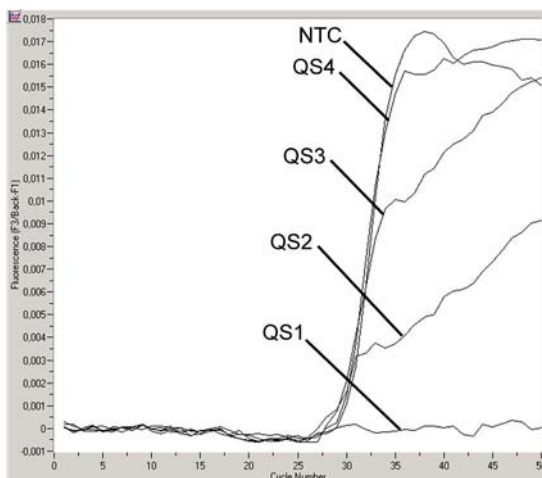


Fig. 8: Detektion af den *interne kontrol* (IC) i fluorimeterkanalen F3/Back-F1 med samtidig amplifikation af *kvantiteringsstandarder* (WNV LC/TM QS 1-4). NTC: Ingen skabelonkontrol (negativ kontrol)

10. Fejlfinding

Intet signal med positive kontroller (WNV LC/TM QS 1-4) i fluorimeterkanalen F1:

- Den valgte fluorimeterkanal for PCR-dataanalyse stemmer ikke overens med protokollen.
 - Ved dataanalyse vælges fluorimeterkanalen F1 til analytisk WNV RT-PCR og fluorimeterkanalen F3/Back-F1 til den *interne kontrol*-PCR.
- Ukorrekt programmering af temperaturprofilen for *LightCycler*-instrumentet
 - Sammenlign temperaturprofilen med protokollen (se **8.5 Programmering af *LightCycler*-instrumentet**).
- Ukorrekt konfiguration af PCR-reaktionen.
 - Kontrollér dine arbejdsstrin ved hjælp af pipetteringsplanen (se **8.4 Klargøring af PCR**), og gentag PCR, hvis det er nødvendigt.
- Opbevaringsbetingelserne for et eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i **2. Opbevaring** eller *artus* WNV LC RT-PCR-kittet er udløbet.
 - Kontrollér opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit.

Svagt eller intet signal fra den *interne kontrol* i fluorimeterkanalen F3/Back-F1 og samtidigt fravær af signal i kanalen F1:

- PCR-betingelserne stemmer ikke overens med protokollen.
 - Kontrollér betingelserne (se foroven), og gentag i givent tilfælde PCR'en med korrigerede indstillinger.
- PCR blev hæmmet.
 - Sørg for at bruge en anbefalet isolationsmetode (se **8.1 RNA-isolation**), og overhold producentens anvisninger nøje.
 - Sørg for, at det anbefalede ekstra centrifugeringstrin er udført under RNA-isolationen før eluering for at fjerne evt. rester af ethanol (se **8.1 RNA-isolation**).
- Der foreligger tab af RNA forårsaget af oprensningen.
 - Hvis den *interne kontrol* er tilsat til ekstraktionen, kan et manglende signal fra den *interne kontrol* være tegn på tab af RNA under

ekstraktionen. Sørg for at bruge en anbefalet isolationsmetode (se **8.1 RNA-isolation**), og overhold producentens anvisninger nøje.

- Opbevaringsbetingelserne for et eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i **2. Opbevaring** eller *artus* WNV LC RT-PCR-kittet er udløbet.
 - Kontrollér opbevaringsbetingelserne og reagensernes udløbsdato (se kitmærkaten), og brug om nødvendigt et nyt kit.

Signaler med de negative kontroller i fluorimeterkanalen F1 af det analytiske PCR.

- Der er sket en kontamination under klargøring af PCR.
 - Gentag PCR'en med ubrugte reagenser i replikater.
 - Luk om muligt PCR-rørene direkte efter tilsætning af den prøve, der skal testes.
 - De positive kontroller skal ubetinget pipetteres sidst.
 - Sørg for, at arbejdspladsen og instrumenterne dekontamineres jævnlgt.
- Der forekom en kontamination under ekstraktion.
 - Gentag oprensningen og PCR'en for de prøver der skal undersøges under anvendelse af ubrugte reagenser.
 - Sørg for, at arbejdspladsen og instrumenterne dekontamineres jævnlgt.

Kontakt vores tekniske service, hvis De har yderligere spørgsmål eller får problemer.

11. Specifikationer

11.1 Analysefølsomhed

For at bestemme analysefølsomheden for *artus* WNV LC RT-PCR-kittet blev en standardfortyndingsserie fra 40 til nominelt 0,01265 in vitro-transkriberede RNA-kopier pr. mikroliter af WNV-amplikonnet opstillet og analyseret med *artus* WNV LC RT-PCR-kittet. Testene blev udført på tre forskellige dage med otte replikater. Resultaterne blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. En grafisk illustration af probitanalysen er vist i figur Fig. 9. Detektionsgrænsen for *artus* WNV LC RT-PCR-kittet er 2,4 kopier/ μ l ($p = 0,05$). Det vil sige, at der er 95 % sandsynlighed for, at 2,4 kopier/ml vil blive detekteret.

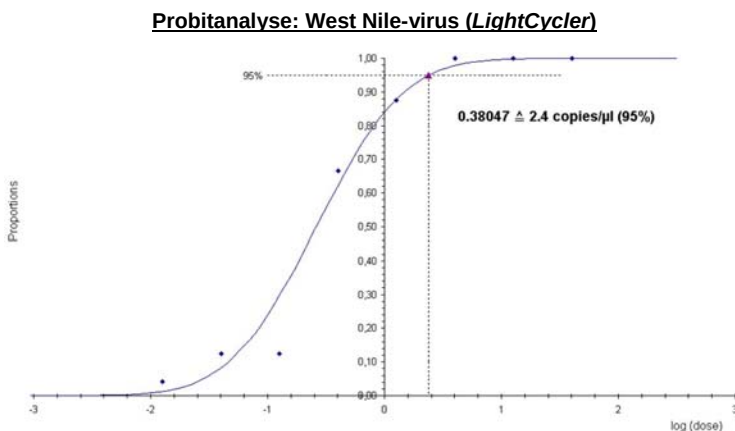


Fig. 9: Analysefølsomhed for *artus* WNV LC RT-PCR-kittet.

11.2 Specificitet

Specificiteten af *artus* WNV LC RT-PCR-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, med sekvenssammenligningsanalyse. Detekterbarheden for alle relevante WNV-stammerer således sikret ved databasejustering.

Desuden er genom-DNA's indflydelse på detektionen af WNV-positive prøver testet. Det er vist, at store mængder genom-DNA i en PCR-kørsel kan hæmme PCR-reaktionen. *artus* WNV LC RT-PCR-kittet bør derfor kun bruges sammen med cellefattige prøvematerialer.

Desuden blev specificiteten valideret med 30 forskellige WNV-negative plasma- og cerebrospinalvæskeprøver. Disse genererede ikke nogen signaler med WNV-specifikke primere og prober, som indgår i *WNV LC Master*.

For at bestemme *artus* WNV LC RT-PCR-kittets specificitet er den kontrolgruppe, der er nævnt i følgende tabel (se Tabel 1), testet for krydsreaktivitet. Ingen af de testede patogener har været reaktive.

Tabel 1: Testning af kittets specificitet med potentielt krydsreaktive patogener.

Kontrolgruppe	WNV (F1)	Intern kontrol (F3/Back-F1)
St. Louis-encefalitisvirus	–	+
Japansk encefalitisvirus	–	+
Gul feber virus	–	+
Dengue-virus type 1	–	+
Dengue-virus type 2	–	+
Dengue-virus type 3	–	+
Dengue-virus type 4	–	+
Montana myotis leukoencefalitisvirus	–	+
Modoc-virus	–	+
Humant herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Humant herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Humant herpesvirus 3 (Varicella-zoster virus)	–	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	–	+
Humant immundefektvirus	–	+
Enterovirus 71	–	+
Coxsackievirus A7	–	+
Coxsackievirus A24	–	+
Coxsackievirus B3	–	+
Echovirus 30	–	+
Hepatitis A-virus	–	+
Hepatitis B-virus	–	+
Hepatitis C-virus	–	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	–	+
<i>Listeria welshmerii</i>	–	+
<i>Listeria ivanovii</i>	–	+

11.3 Præcision

Præcisionsdata for *artus* WNV LC RT-PCR-kittet tillader bestemmelse af totalvariansen (samlet spredning) af testsystemet. Totalvariansen 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.

Disse præcisionsdata blev bestemt for *artus* WNV LC RT-PCR-kittet på baggrund af *kvantiteringsstandarden* med den laveste koncentration (QS 4; 40 kopier/μl). Testning blev udført med otte replikater. Præcisionsdata blev beregnet på basis af Ct-værdierne af amplifikationskurverne (Ct: tærskelcyklus, se Tabel 2). Desuden blev præcisionsdata for kvantitative resultater i kopier/μl beregnet ved hjælp af de tilsvarende Ct værdier (se Tabel 3). Baseret på disse resultater er den samlede statistiske spredning af enhver given prøve med den nævnte koncentration 0,79 % (CT) eller 10,12 % (koncentration) for detektion af den *interne kontrol* 4,28 % (Ct). Disse værdier er baseret på den samlede mængde af alle enkelte værdier for de bestemte variabiliteter.

Tabel 2: Præcisionsdata på basis af Ct-værdierne.

	Standardafvigelse	Varians	Variations-koefficient [%]
Variabilitet inden for analysen: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Variabilitet inden for analysen: <i>Intern kontrol</i>	0,14	0,02	0,46
Variabilitet mellem analyser: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Variabilitet mellem analyser: <i>Intern kontrol</i>	0,32	0,10	1,09
Variabilitet mellem batches: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Variabilitet mellem batches: <i>Intern kontrol</i>	1,28	1,63	4,62
Total varians: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,26	0,07	0,79
Total varians: <i>Intern kontrol</i>	1,23	1,51	4,28

Tabel 3: Præcisionsdata på basis af de kvantitative resultater (i kopier/µl).

	Standardafvigelse	Varians	Variations-koefficient [%]
Variabilitet inden for analysen: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Variabilitet mellem analyser: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Variabilitet mellem batches: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,53	6,40	6,31
Total varians: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	4,07	16,56	10,12

11.4 Robusthed

Verificeringen af robustheden muliggør bestemmelse af den samlede fejlrate for *artus* WNV LC RT-RGQ-kittet. Hertil blev benyttet 30 WNV negative plasma- og cerebrospinalvæskeprøver blandet med hver 7,2 kopier/ μ l elueringsvolumen Vestnilvirus fuldlængde-RNA (tredobbelt koncentration af den analytiske sensitivitetsgrænse). Efter ekstraktion ved hjælp af QIAamp Viral RNA Mini-kittet (se **8.1 RNA-isolation**) blev disse prøver analyseret med *artus* WNV LC RT-PCR-kittet. Fejlraten for WNV udgjorde for alle prøver 0 %. Robustheden af den *interne kontrol* blev yderligere kontrolleret gennem oprensningen og analysen af 30 WNV negative plasma- og cerebrospinalprøver. Den samlede fejlrate var 0 %. Der observeredes ingen hæmninger. Robustheden af *artus* WNV LC RT-PCR-kittet er $\geq$ dermed 99 %.

11.5 Reproducerbarhed

Der findes ingen opdaterede interne laboratorietest til realtids-PCR-detektion af Vestnilvirus-RNA. Reproducerbarhedsdata indsamles i eksterne validerings- og betastudier og ved sammenligning med andre produkter i diagnostiske studier (se **11.6 Diagnostisk evaluering**).

11.6 Diagnostisk evaluering

artus WNV LC RT-PCR-kittet gennemgår i øjeblikket en række evaluerende studier.

12. Begrænsninger af produktets anvendelse

- Alle reagenser må kun anvendes til in vitro-diagnostik.
- Produktet må kun anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.
- Det er absolut nødvendigt, at protokollen overholdes nøje, 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 underkvantering eller manglende evne til at detektere tilstedeværelsen af virusset i disse tilfælde. Analysedesignets gyldighed og ydeevne revideres med jævne mellemrum.

13. Sikkerhedsoplysninger

Når der arbejdes med kemikalier, skal der altid bæres egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller. 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 findes, læses og udskrives.

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

14. Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENS totale kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *artus* WNV LC RT-PCR-kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

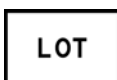
15. Litteratur

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

16. Symbolforklaring



Anvendes inden



Batchkode



Producent



Katalognummer



Materialenummer



Håndbog



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Komponenter



Indeholder



Nummer



Globalt handelsvarenummer



<N>

Indholdet er tilstrækkeligt til <N> tests



Temperaturbegrænsning



Læs brugervejledningen

QS

Kvantiteringsstandard

IC

Intern kontrol

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

artus WNV LC RT-PCR-kit-håndbog

Varemærker og fraskrivelser

QIAGEN®, QIAamp®, artus® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Diagnostics).

Ved købet af dette produkt erhverver brugeren tilladelse til at bruge det til udførelse af diagnostiske serviceydelser til human in vitro-diagnostik. Derved gives intet generelt patent eller nogen anden tilladelse af nogen art ud over denne specifikke brugsret.

KØBET AF DETTE PRODUKT GIVER KØBEREN RETTIGHEDER I HENHOLD TIL ET ELLER FLERE PATENTNUMRE I USA, 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 AND 6,245,514, OG DERES MODSTYKKER I ANDRE LANDE TIL UDELUKKENDE AT BRUGE DETTE PRODUKT TIL LEVERING AF IN VITRO-DIAGNOSTISK SERVICE TIL MENNESKER OG DYR. DERVED GIVES INTET GENERELT PATENT ELLER NOGEN ANDEN TILLADELSE AF NOGEN ART UD OVER DENNE SPECIFIKKE BRUGSRET.

Aftale om begrænset licens

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af artus WNV LC RT-PCR-kittet accepterer følgende vilkår:

1. artus WNV LC RT-PCR-kittet må kun bruges i overensstemmelse med artus WNV LC RT-PCR-kit-hYndbogen, 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 artus WNV LC RT-PCR-kit-hYndbogen 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.

QIAamp Viral RNA Mini Kit

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

© 2007-2014 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)

1046924DA 148051765



Sample & Assay Technologies