

Handbok för *artus*[®] WNV LC RT-PCR-kit



Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med *LightCycler*[®]-instrumentet

December 2014 – Version 1



4509063, 4509065



1046924SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R3

MAT

1046924SV



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN skapar standarder inom:

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- automatisering av provtagnings- och analystekniker

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på www.qiagen.com.

Innehåll

1. Innehåll	5
2. Förvaring	5
3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer	6
4. Allmänna försiktighetsåtgärder	6
5. Information om patogener	6
6. Principen för realtids-PCR	7
7. Produktbeskrivning	7
8. Protokoll	8
8.1 RNA-isolering	8
8.2 Intern kontroll.....	9
8.3 Kvantifiering.....	10
8.4 Förberedelse av PCR.....	11
8.5 Programmering av <i>LightCycler</i> -instrumentet.....	15
9. Dataanalys	18
10. Felsökning	21
11. Specifikationer	23
11.1 Analytisk sensitivitet	23
11.2 Specificitet	24
11.3 Precision.....	26
11.4 Robusthet	28
11.5 Reproducerbarhet	28
11.6 Diagnostisk utvärdering.....	28
12. Begränsningar för produktanvändning	28

13. Säkerhetsinformation	29
14. Kvalitetskontroll	29
15. Litteraturhänvisningar	29
16. Symbolförklaring	30

artus WNV LC RT-PCR-kit

För användning med *LightCycler*-instrumentet.

1. Innehåll

	Märkning och innehåll	Art. nr 4509063 24 reaktioner
Blå	WNV LC Master	2 x 12 reaktioner
Röd	WNV LC/TM QS 1 ^a 4 x 10 ⁴ kopior/μl	1 x 200 μl
Röd	WNV LC/TM QS 2 ^a 4 x 10 ³ kopior/μl	1 x 200 μl
Röd	WNV LC/TM QS 3 ^a 4 x 10 ² kopior/μl	1 x 200 μl
Röd	WNV LC/TM QS 4 ^a 4 x 10 ¹ kopior/μl	1 x 200 μl
Grön	WNV LC IC ^c	1 x 1000 μl
Vit	Vatten (PCR-kvalitet)	1 x 1000 μl

- ^a QS = Kvantifieringsstandard
IC = Intern kontroll

2. Förvaring

Komponenterna i *artus* WNV LC RT-PCR-kitet måste förvaras vid -15 °C till -30 °C och är stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik upprepade tining och frysning (> 2 x), eftersom det kan minska sensitiviteten. Reagenser som inte används regelbundet bör därför frysas i alikvoter. Om det är nödvändigt kan komponenterna förvaras vid +4 °C i högst fem timmar.

3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer

- Puderfria laboratoriehandskar
- RNA-isoleringskit (se 8.1 RNA-isolering)
- Pipetter (justerbara)
- Sterila pipettspetsar med filter
- Vortexblandare
- Bordscentrifug med rotor för 2 ml reaktionsrör
- *Color Compensation Set* (färgkompensationsset) (kat. nr 2 158 850) för installationen av en *Crosstalk Color Compensation*-fil
- *LightCycler*-kapillärer (20 µl)
- *LightCycler*-kylblock
- *LightCycler*-instrument
- *LightCycler*förslutningsverktyg

4. Allmänna försiktighetsåtgärder

Tänk alltid på följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Förvara och extrahera positiva material (prover, kontroller och amplikoner) separerade från alla andra reagenser och tillsätt dem till reaktionsblandningen på en separat plats.
- Tina alla komponenter fullständigt i rumstemperatur innan testet påbörjas.
- Blanda komponenterna väl och centrifugera en kort stund.
- Arbeta snabbt på is eller i *LightCycler*-kylblocket.

5. Information om patogener

West Nile-virus (WNV) är en medlem av familjen Flaviviridae (släktet *Flavivirus*). Infekterade myggor brukar oftast sticka och infektera vilda fåglar – den primära värden för viruset – men WNV kan även infektera hästar och andra däggdjur. 80 % av alla infekterade människor uppvisar inga WNV-

relaterade symtom. WNV-infektioner hos äldre personer, barn och patienter med nedsatt immunförsvar kan i sällsynta fall leda till dödlig encefalit eller myokardit.

6. Principen för realtids-PCR

Vid diagnostik med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR) amplifieras specifika regioner av patogengenomet. Vid realtids-PCR detekteras den amplifierade produkten via fluorescerande färgämnen. Dessa är i regel bundna till oligonukleotidprober, som binder specifikt till den amplifierade produkten. Genom övervakning av fluorescensintensiteterna under PCR-körningen (det vill säga i realtid) kan man upptäcka och kvantifiera den ackumulerande produkten utan att behöva öppna reaktionsrören på nytt efter PCR-körningen (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivning

*artus*WNV LC RT-PCR-kitet består av ett bruksfärdigt system för detektionen av WNV-RNA med användning av polymeraskedjereaktion (PCR) i *LightCycler*-instrumentet. *WNV LC Master* innehåller reagenser och enzymer för den omvända transkriptionen och den specifika amplifieringen av en 72 bp-region av WNV-genomet, och för direkt detektering av den specifika amplikonen i fluorometerkanalen F1 i *LightCycler*-instrumentet. Dessutom innehåller *artus* WNV LC RT-PCR-kitet ett andra heterologt amplifieringssystem för att identifiera eventuell PCR-inhibition. Detta detekteras som en *intern kontroll* (IC) i fluorometerkanal F3. Detektionsgränsen för analytisk WNV RT-PCR (se 11.1 Analytisk sensitivitet) minskas inte. Externa positiva kontroller (*WNV LC/TM QS 1–4*) medföljer, med vars hjälp en bestämning av patogenbelastningen kan utföras. Du kan läsa mer om detta i stycket 8.3 Kvantifiering.

8. Protokoll

8.1 RNA-isolering

Olika tillverkare erbjuder RNA-isoleringskit. Provmängder för RNA-isoleringsproceduren beror på vilket protokoll som används. Utför RNA-isoleringen enligt tillverkarens anvisningar. Följande isoleringskit rekommenderas:

Provmaterial	Isoleringskit	Katalognummer	Tillverkare	Bärr-RNA
Serum, plasma, CSF	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	ingår

- Tillsatsen av **bärr-RNA** är avgörande för isoleringens effektivitet och därmed för utvinningen av DNA/RNA. För att öka stabiliteten för bärr-RNA som medföljer QIAamp Viral RNA Mini Kit, rekommenderar vi följande procedur som avviker från användarhandboken till extraktionskitet:
 - a. Återsuspendera frystorkat bärr-RNA före den första användningen av extraktionskitet i 310 µl AE-buffert eller AVE-buffert (elueringsbuffert, slutlig koncentration 1 µg/µl, använd inte lyseringsbuffert). Dela upp denna lösning av bärr-RNA i ett antal alikvoter som är tillräckliga för dina behov och förvara dessa vid -20 °C. Undvik upprepad upptining (> 2 x) av en alikvot med bärr-RNA.
 - b. Innan du påbörjar varje extraktion ska en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärr-RNA (och *intern kontroll* om tillämpligt, se **8.2**Intern kontroll) beredas färskt enligt följande pipetteringsschema:

Antal prover	1	12
AVL-buffert	560 µl	6720 µl
Bärr-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Total volym	565,6 µl	6787,2 µl
Volym per extraktion	560 µl	vardera 560 µl

- c. Använd den färska beredda lyseringsbufferten omedelbart för extraktion. Förvaring av blandningen är inte möjlig!

- Isoleringen innehåller **etanol**-haltiga tvättbuffertar. För att avlägsna eventuella etanolrester ska innan eluering ytterligare ett centrifugeringssteg utföras (tre minuter, 13 000 rpm). Detta förhindrar en eventuell PCR-inhibering.
- *artus* WNV LC RT-PCR-kitet ska inte användas med **fenol**baserade isoleringsmetoder.

Viktigt: Den *interna kontrollen* för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet kan användas direkt i isoleringsförfarandet (se **8.2** Intern kontroll).

8.2 Intern kontroll

En *intern kontroll* (*WNV LC IC*) medföljer. Detta gör att användaren **både kan kontrollera RNA-isoleringsförfarandet och kontrollera om det finns en möjlig inhibering av PCR** (se Fig. 1). Om du vill använda den *interna kontrollen* tillsätter du den till isoleringen i ett förhållande på 0,1 µl per 1 µl elueringsvolym. Till exempel, vid användning av QIAamp Viral RNA Mini Kit elueras RNA i 60 µl AVE-buffert. Därför ska 6 µl av den *interna kontrollen* tillsättas initialt. Om du eluerar i t.ex. 50 µl, så ska du använda den motsvarande volymen 5 µl. Mängden använd *intern kontroll* beror **enbart** på elueringsvolymen. Observera att den *interna kontrollen* ska tillsättas till blandningen av lyseringsbuffert och provmaterial. Alternativt kan den *interna kontrollen* tillsättas direkt till lyseringsbufferten. Du kan även tillsätta bärar-RNA tillsammans med den *interna kontrollen* till lyseringsbufferten (se **8.1** RNA-isolering). Observera dock att blandningen av *intern kontroll*/bärar-RNA och lyseringsbuffert måste beredas färskt och användas omedelbart (förvaring av blandningen vid rumstemperatur eller i kylskåp under bara några timmar kan leda till utebliven funktion av den *interna kontrollen* och en minskad extraktionseffektivitet). Tillsätt **inte** den *interna kontrollen* direkt till provmaterialet!

Alternativt kan den *interna kontrollen* användas **enbart för att kontrollera om det finns en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 0,5 µl

intern kontroll per reaktion direkt till 15 µl *WNV LC Master*. Använd för varje PCR-reaktion 15 µl Master Mix som har framställts enligt beskrivningen ovan^{*} och tillsätt 5 µl av det isolerade provet. Om du förbereder en PCR-körning för flera prover ska du öka volymen av *WNV LC Master* och den *interna kontrollen* i enlighet med antalet prover (se **8.4** Förberedelse av PCR).

8.3 Kvantifiering

De medföljande *kvantifieringsstandarderna* (*WNV LC/TM QS 1–4*) behandlas som tidigare renade prover och samma volym används (5 µl). För att du ska kunna generera en standardkurva i *LightCycler*-instrumentet, måste alla fyra *kvantifieringsstandarder* användas och definieras på skärmen *Sample Loading* (Provladdning) som standarder med de specificerade koncentrationerna (se *användarhandboken till LightCycler*, version 3.5, kapitel B, 2.4. Sample Data Entry [inmatning av provdata]). Standardkurvan som genereras som ovan kan även användas för efterföljande körningar om minst en standard för **en** given koncentration används i den aktuella körningen. För detta syfte måste den tidigare genererade standardkurvan importeras (se *användarhandboken till LightCycler*, version 3.5, kapitel B, 4.2.5. Quantitation with an External Standard Curve [kvantifiering med en extern standardkurva]). Denna kvantifieringsmetod kan emellertid leda till resultatavvikelser på grund av variabiliteten mellan olika PCR-körningar.

Obs! *Kvantifieringsstandarderna* definieras som kopior/µl. Följande ekvation måste användas för att omvandla de fastställda värdena med hjälp av standardkurvan till kopior/ml provmaterial:

$$\text{Resultat (kopior/ml)} = \frac{\text{Resultat (kopior/}\mu\text{l)} \times \text{elueringsvolym (}\mu\text{l)}}{\text{Provvolum (ml)}}$$

Observera att som princip ska den initiala provvolymen skrivas in i ekvationen ovan. Detta måste beaktas när provvolymen har förändrats före extraktionen

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

av nukleinsyra (till exempel reducering av volymen genom centrifugering eller ökning av volymen genom påfyllning till den volym som krävs för isoleringen).

Viktigt: Det finns en riktlinje för den kvantitativa analysen av *artus*-system i *LightCycler*-instrumentet på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument**).

8.4 Förberedelse av PCR

Se till att både kylblocket och kapilläradaptorna (tillbehör till *LightCycler*-instrumentet) är kylta till +4 °C. Placera önskat antal *LightCycler*-kapillärer i adaptorna i kylblocket. Säkerställ att minst en *kvantifieringsstandard* såväl som en negativ kontroll (*vatten, PCR-kvalitet*) ingår i varje PCR-körning. För att skapa en standardkurva använder du alla de levererade *kvantifieringsstandarderna (WNV LC/TM QS 1–4)* för varje PCR-körning. Före varje användning måste alla reagenser tinas helt, blandas (pipettera upprepade gånger upp och ned eller vänd röret flera gånger) och centrifugeras kortvarigt.

Om du vill använda den *interna kontrollen för att övervaka RNA-isoleringsproceduren och kontrollera eventuell PCR-inhibering*, är den redan tillsatt till isoleringen (se 8.2 Intern kontroll). Använd i så fall följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 1):

	Antal prover	1	12
1. Beredning av Master Mix	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Total volym	15 µl	180 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	vardera 15 µl
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

Om du vill använda den *interna kontrollen enbart för att kontrollera eventuell PCR-inhibering*, måste den tillsättas direkt till *WNV LC Master*. Använd i så fall följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 2):

	Antal prover	1	12
1. Beredning av Master Mix	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Total volym	15,5 µl*	186 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	vardera 15 µl
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

Pipettera 15 µl av masterblandningen i plastbehållaren i varje kapillär. Tillsätt sedan 5 µl av eluerad prov-RNA. På motsvarande sätt måste 5 µl av minst en av *kvantifieringsstandarderna (WNV LC/TM QS 1–4)* användas som en positiv kontroll och 5 µl vatten (*vatten, PCR-kvalitet*) som en negativ kontroll. Tillslut kapillärerna. För att överföra blandningen från plastbehållaren till kapillären centrifugerar du adaptrarna som innehåller kapillärerna i en bordscentrifug i tio sekunder vid högst 400 x g (2 000 rpm).

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

Tillsats av den *interna kontrollen* till reningsproceduren

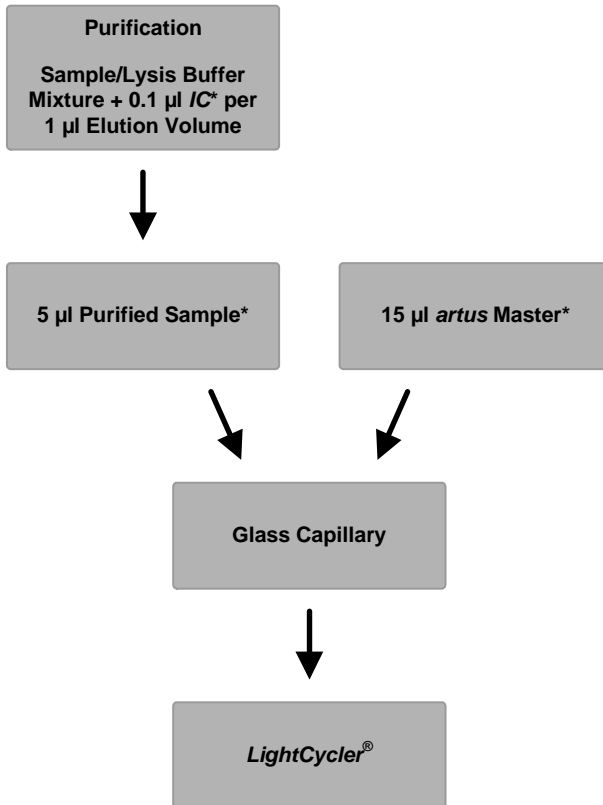


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av rening och PCR-inhibering.

*Se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kort stund.

Tillsats av den *interna kontrollen* till *artus* Master

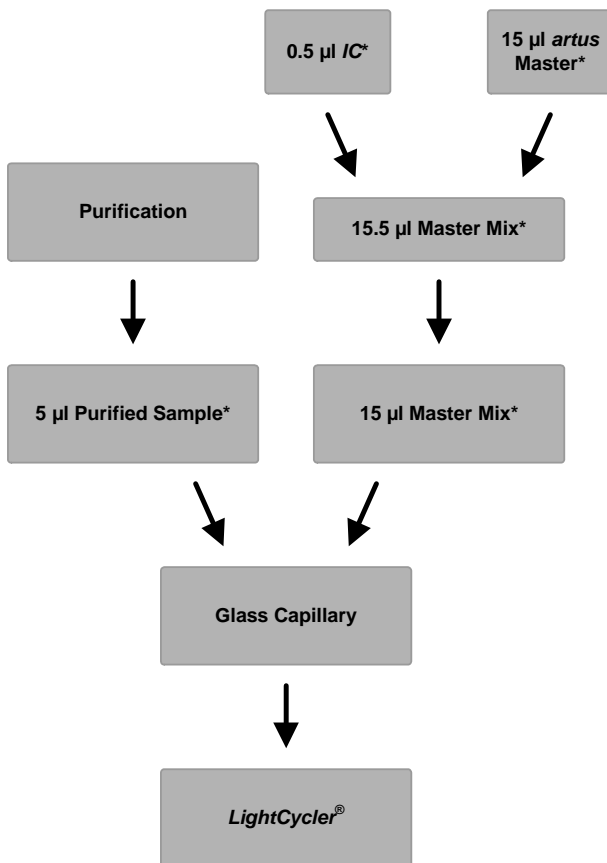


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av PCR-inhibering.

*Se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kort stund.

8.5 Programmering av *LightCycler*-instrumentet

För detektionen av WNV-RNA skapar du en temperaturprofil i *LightCycler*-instrumentet enligt följande tre steg (se Fig. 3–6).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Omvänd transkription av RNA | Fig. 3 |
| B. | Initial aktivering av Hot Start-enzymet | Fig. 4 |
| C. | Amplifiering av cDNA | Fig. 5 |
| D. | Avkylning | Fig. 6 |

Var särskilt uppmärksam på inställningarna för *Analysis Mode* (Analysläge), *Cycle Program Data* (Cykelprogramdata) och *Temperature Targets* (Temperaturmål). I illustrationerna är dessa inställningar inramade i svart fet stil. Det finns mer information om programmering av *LightCycler*-instrumentet i *användarhandboken till LightCycler*.

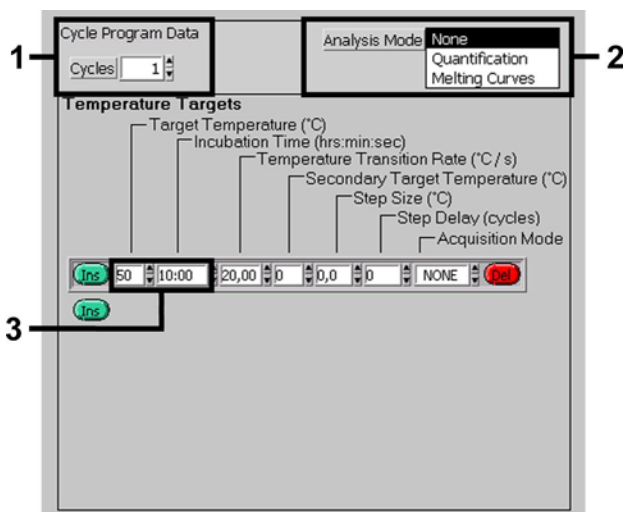


Fig. 3: Omvänd transkription av RNA.

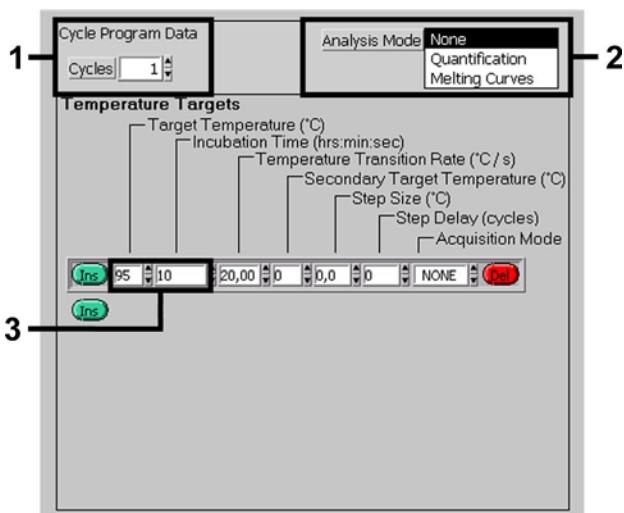


Fig. 4: Initial aktivering av Hot Start-enzymet.

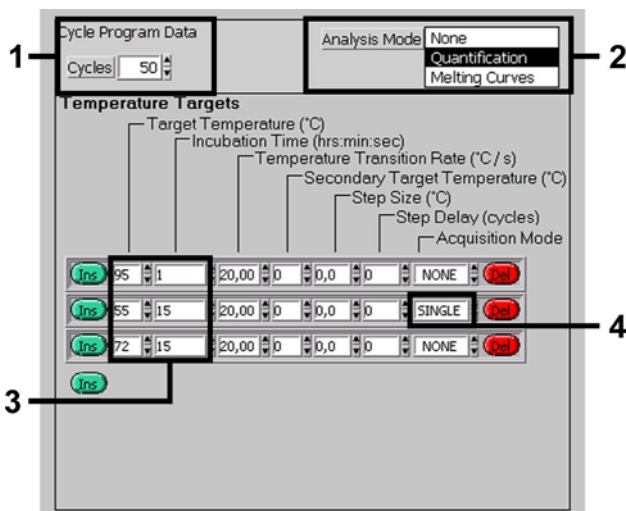


Fig. 5: Amplifiering av cDNA.

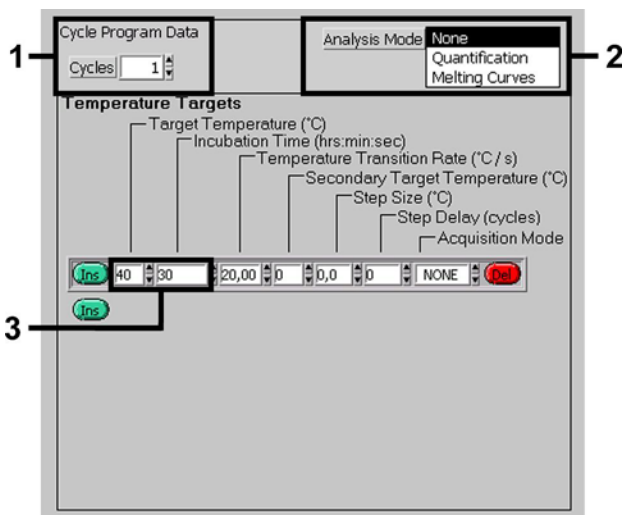


Fig. 6: Avkyllning.

9. Dataanalys

I flerfärgsanalyser uppkommer interferenser mellan fluorometerkanaler. I programvaran till *LightCycler*-instrumentet finns en fil som benämns *Color Compensation File*, vilken kompenserar för dessa interferenser. Öppna den här filen före, under eller efter PCR-körningen genom att aktivera filen *Choose CCC File* (Välj CCC-fil) eller knappen *Select CC Data* (Välj CC-data). Om ingen *Color Compensation File* är installerad genererar du filen enligt anvisningarna i *användarhandboken till LightCycler*. När *Color Compensation File* har aktiverats, visas separata signaler i fluorometerkanal F1, F2 och F3. För analys av PCR-resultaten som erhållits med *artus WNV LC RT-PCR*-kitet väljer du fluorescensvisningsalternativ F1 för analytisk WNV RT-PCR respektive F3/Back-F1^{*} för *intern kontroll* RT-PCR. För analysen av kvantitativa körningar följer du anvisningarna som lämnas i **8.3 Kvantifiering** och i **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** (Teknisk anm. för kvantifiering i *LightCycler*-instrumentet) på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Följande resultat kan förekomma:

1. En signal detekteras i fluorometerkanal F1.

Analysresultatet är positivt: Provet innehåller WNV-RNA.

I det här fallet är detektionen av en signal i kanalen F3/Back-F1 umbärlig, eftersom höga inledande koncentrationer av WNV-RNA (positiv signal i kanalen F1) kan leda till en reducerad eller frånvarande fluorescenssignal för den *interna kontrollen* i kanalen F3/Back-F1 (konkurrens).

2. I fluorometerkanal F1 detekteras ingen signal. På samma gång syns en signal från den *interna kontrollen* i kanalen F3/Back-F1.

Inget WNV-RNA kan påvisas i provet. Det kan därför anses som negativt.

^{*} När du använder äldre versioner av programvaran (version 3.3 och äldre) är inte visningsalternativet F3/Back-F1 tillgängligt. Då väljer du F3/F1.

Vid negativ WNV RT-PCR utesluter detektionen av signalen från den *interna kontrollen* möjligheten av en PCR-inhibering.

3. Ingen signal detekteras i F1 eller i F3/Back-F1-kanalen.

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

Information om felkällor och deras lösning finns i **10. Felsökning**.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner ges i Fig. 7 och Fig. 8.

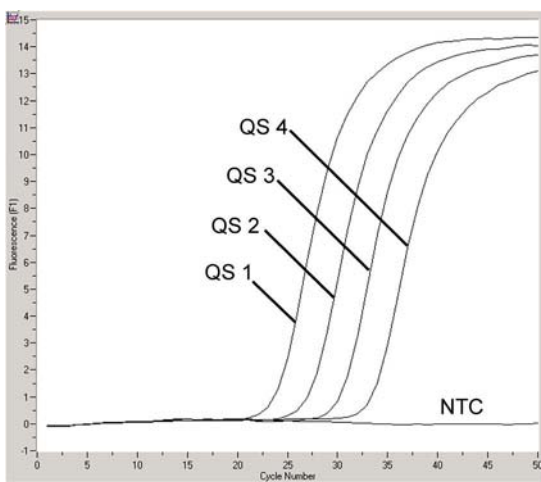


Fig. 7: Detektion av *kvantifieringsstandarderna* (WNV LC/TM QS 1–4) i fluorometerkanal F1. NTC: kontroll utan mall (negativ kontroll).

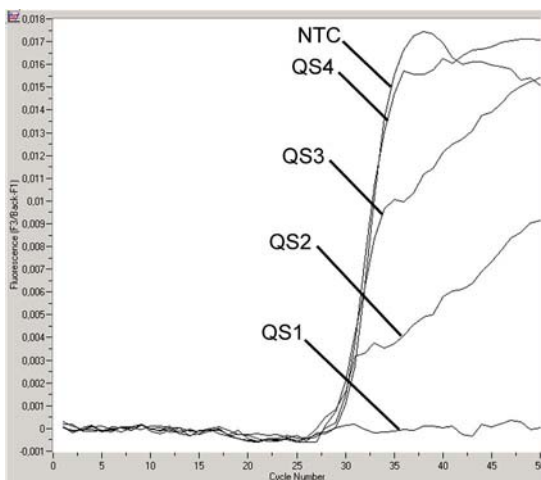


Fig. 8: Detektion av den *interna kontrollen* (IC) i fluorometerkanal F3/Back-F1 med simultan amplifiering av *kvantifieringsstandarder* (WNV LC/TM QS 1–4). NTC: kontroll utan mall (negativ kontroll).

10. Felsökning

Ingen signal med positiva kontroller (*WNV LC/TM QS 1–4*) i fluorometerkanal F1:

- Den valda fluorometerkanalen för PCR-dataanalys stämmer inte överens med protokollet.
 - För dataanalys väljer du fluorometerkanal F1 för analytisk WNV RT-PCR och fluorometerkanal F3/Back-F1 för PCR för den *interna kontrollen*.
- Felaktig programmering av temperaturprofilen för *LightCycler*-instrumentet.
 - Jämför temperaturprofilen med protokollet (se **8.5 Programmering av *LightCycler*-instrumentet**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
 - Kontrollera dina arbetssteg med användning av pipetteringsschemat (se **8.4 Förberedelse av PCR**) och upprepa PCR vid behov.
- Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med anvisningarna som gavs i **2. Förvaring** eller utgångsdatumet för *artus WNV LC RT-PCR*-kitet hade passerats.
 - Kontrollera både förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se etikett på kitet) för reagenserna och använd vid behov ett nytt kit.

Svag eller obefintlig signal för den *interna kontrollen* i fluorometerkanal F3/Back-F1 och samtidigt frånvaro av signal i kanalen F1:

- PCR-villkoren motsvarar inte protokollet.
 - Kontrollera villkoren för PCR (se ovan) och upprepa reaktionen med korrekt inställningar vid behov.
- PCR har inhiberats.
 - Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 RNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar exakt.
 - Säkerställ att det rekommenderade extra centrifugeringssteget under RNA-isolering har utförts innan eluering sker för att avlägsna eventuella etanolrester (se **8.1 RNA-isolering**).

- RNA förlorades under extraktion.
 - Om den *interna kontrollen* hade tillsatts i extraktionen kan en frånvarande signal för den *interna kontrollen* tyda på att RNA gått förlorad under extraktionen. Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 RNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar exakt.
- Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med anvisningarna som gavs i **2**. Förvaring eller utgångsdatumet för *artus WNV LC RT-PCR-kitet* hade passerats.
 - Kontrollera både förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se etikett på kitet) för reagenserna och använd vid behov ett nytt kit.

Signaler med de negativa kontrollerna i fluorometerkanal F1 för den analytiska PCR.

- En kontamination föreligger under PCR-förberedelserna.
 - Upprepa PCR med nya reagenser i replikat.
 - Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas.
 - Pipettera alltid de positiva kontrollerna sist.
 - Kontrollera med jämna mellanrum att arbetsytan och instrumenten är dekontaminerade.
- En kontamination uppstod under extraktion.
 - Upprepa extraktionen och PCR-analysen för det prov som ska testas med nya reagenser.
 - Kontrollera med jämna mellanrum att arbetsytan och instrumenten är dekontaminerade.

Om du skulle ha ytterligare frågor eller om andra problem uppträder, ber vi dig kontakta vår tekniska service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

För att bestämma den analytiska sensitiviteten för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet, har en standardspädningsserie förberetts från 40 till nominellt 0,01265 av in vitro-transkriberade RNA-kopior per mikroliter av WNV-amplikonet och analyserats med *artus* WNV LC RT-PCR-kitet. Testningen utfördes på tre olika dagar på åtta replikat. Resultaten har tagits fram med hjälp av en probitanalys. En grafisk bild av probitanalysen visas i Fig. 9. Detektionsgränsen för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet är 2,4 kopior/ μ l ($p = 0,05$). Detta innebär att det finns en 95-procentig sannolikhet att 2,4 kopior/ml kommer att detekteras.

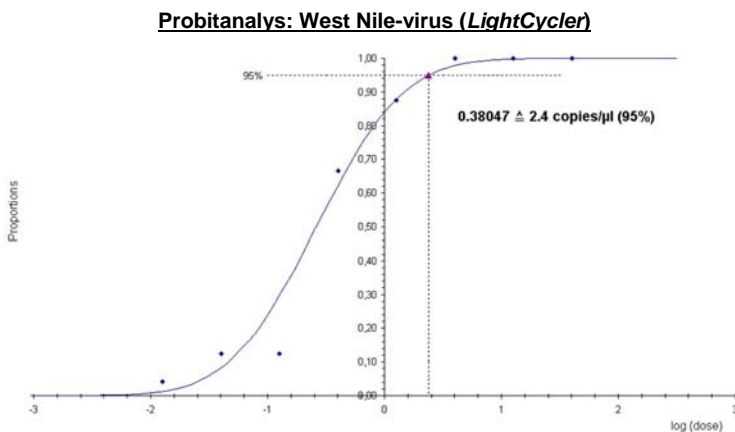


Fig. 9: Analytisk sensitivitet för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet.

11.2 Specificitet

Specificiteten för *artus WNV LC RT-PCR-kitet* garanteras först och främst genom valet av primrar och prober, samt genom valet av strikta reaktionsvillkor. Primrarna och proberna kontrollerades beträffande eventuella homologier i alla sekvenser som publicerats i genbanker genom sekvensjämförande analys. En databasjustering säkerställer alltså att alla relevanta WNV-stammar kan detekteras.

Dessutom har man testat påverkan av genomiskt DNA på detektionen av WNV-positiva prover. Det har visat sig att stora mängder genomiskt DNA i en PCR-körning kan inhibera PCR-reaktionen. Därför ska *artus WNV LC RT-PCR-kitet* endast användas med provmaterial som är fattiga på celler.

Dessutom utvärderades specificiteten med 30 olika WNV-negativa prover av plasma och cerebrospinalvätska. Dessa genererade inte några signaler med de WNV-specifika primrar och prober som ingår i *WNV LC Master*.

För att bestämma specificiteten för *artus WNV LC RT-PCR-kitet* har kontrollgruppen som listats i följande tabell (se Tabell 1) testats för korsreaktivitet. Ingen av de testade patogenerna var reaktiv.

Tabell 1: Kitets specificitetstest med eventuella korsreaktiva patogener.

Kontrollgrupp	WNV (F1)	Intern kontroll (F3/Back-F1)
St. Louis-encefalitvirus	–	+
Japanskt encefalitvirus	–	+
Gula febern-virus	–	+
Dengue-virus typ 1	–	+
Dengue-virus typ 2	–	+
Dengue-virus typ 3	–	+
Dengue-virus typ 4	–	+
Montana myotis leukoencefalitvirus	–	+
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 immunbristvirus	–	+
Enterovirus 71	–	+
Coxsackievirus A7	–	+
Coxsackievirus A24	–	+
Coxsackievirus B3	–	+
Echovirus 30	–	+
Hepatit A-virus	–	+
Hepatit B-virus	–	+
Hepatit C-virus	–	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	–	+
<i>Listeria welshmerii</i>	–	+
<i>Listeria ivanovii</i>	–	+

11.3 Precision

Precisionsdata för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet tillåter bestämningen av totalvariansen för analysen. Den totala variansen består av **intraanalysvariabilitet** (variabilitet för flera provresultat med samma koncentration inom ett experiment), **interanalysvariabilitet** (variabilitet för flera analysresultat som genererats på olika instrument av samma typ av olika operatörer inom ett laboratorium) och **interbatchvariabilitet** (variabilitet för flera analysresultat med användning av olika batcher). Data som erhöles användes för att bestämma standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten för patogenspecifik PCR och för PCR av den *interna kontrollen*.

Precisionsdata för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet har samlats in med hjälp av *kvantifieringsstandard* för den lägsta koncentrationen (QS 4; 40 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes med åtta replikat. Precisionsdata beräknades med utgångspunkt från Ct-värdena för amplifieringskurvorna (Ct: tröskelcykel, se Tabell 2). Dessutom fastställdes precisionsdata för kvantitativa resultat i kopior/ μ l med användning av motsvarande Ct-värden (se Tabell 3). Baserat på dessa resultat är den totala statistiska spridningen för ett av de givna proven med nämnd koncentration 0,79 % (Ct) eller 10,12 % (konc.), för detektionen av den *interna kontrollen* 4,28 % (Ct). Dessa värden baseras på summan av alla enskilda bestämda variabiliteter.

Tabell 2: Precisionsdata baserade på Ct-värdena.

	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient [%]
Intraanalysvariabilitet: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Intraanalysvariabilitet: <i>Intern kontroll</i>	0,14	0,02	0,46
Interanalysvariabilitet: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Interanalysvariabilitet: <i>Intern kontroll</i>	0,32	0,10	1,09
Interbatchvariabilitet: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Interbatchvariabilitet: <i>Intern kontroll</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 kontroll</i>	1,23	1,51	4,28

Tabell 3: Precisionsdata baserade på kvantitativa resultat (i kopior/ μ l).

	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient [%]
Intraanalysvariabilitet: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Interanalysvariabilitet: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Interbatchvariabilitet: <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 Robusthet

Genom verifiering av robustheten går det att fastställa den totala felfrekvensen för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet. 30 WNV-negativa prover av plasma och cerebrospinalvätska fick en tillsats av 7,2 kopior/ml elueringsvolym av fullängd-RNA av West Nile-virus (tredubbel koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen). Efter extraktion med användning av QIAamp Viral RNA Mini Kit (se 8.1 RNA-isolering) analyserades dessa prover med *artus* WNV LC RT-PCR-kitet. Felfrekvensen för WNV var 0 % för alla proven. Den *interna kontrollens* robusthet prövades dessutom genom rening och analys av 30 WNV-negativa prover av plasma och cerebrospinalvätska. Den totala felfrekvensen var 0 %. Inhibering kunde inte iakttas. Robustheten för *artus* WNV LC RT-PCR-kitet är alltså ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhet

Det finns inga aktuella tester att tillgå från olika laboratorier för detektionen av West Nile-virus-RNA med realtids-PCR. Reproducerbarhetsdata kommer att samlas in i externa validerings- och beta-sidostudier och jämföras med andra produkter i diagnostiska studier (se 11.6 Diagnostisk utvärdering).

11.6 Diagnostisk utvärdering

För närvarande genomgår *artus* WNV LC RT-PCR-kitet en serie utvärderingsstudier.

12. Begränsningar för produktanvändning

- Samtliga reagenser är endast avsedda att användas för in vitro-diagnostik.
- Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i in vitro-diagnostiska förfaranden.
- Användarhandboken måste följas strikt för att uppnå optimala resultat för PCR.

- Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på asken och på etiketterna för alla komponenter. Använd inte utgångna komponenter.
- Även om det i sällsynta fall kan uppkomma mutationer inom virusgenomets i hög grad bevarade områden, vilka täcks av satsens primrar och/eller prob, kan dessa kvantifieras i underkant eller kan befintligheten av virus i dessa fall missas att upptäckas. Därför granskas analysens giltighet och prestanda med jämna mellanrum.

13. Säkerhetsinformation

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i lämpligt säkerhetsdatablad (SDS). Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN®.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

14. Kvalitetskontroll

I enlighet med QIAGEN:s totala kvalitetshanteringssystem testas varje lot av *artus* WNV LC RT-PCR-kit mot förutbestämda specifikationer för att garantera enhetlig produktkvalitet.

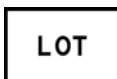
15. Litteraturhänvisningar

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

16. Symbolförklaring



Utgångsdatum



Lotnummer



Tillverkare



Katalognummer



Materialnummer



Handbok



Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik



Komponenter



Innehåller



Antal



GTIN-artikelnummer (Global Trade Item Number)



<N>

Innehållet räcker för <N> tester



Temperaturbegränsning



Se bruksanvisningen

QS

Kvantifieringsstandard

IC

Intern kontroll

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

artus WNV LC RT-PCR Kit

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

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

KÖPET AV DENNA PRODUKT GER KÖPAREN RÄTT ATT UNDER ETT ELLER FLERA AV DE AMERIKANSKA PATENTNUMREN 6 174 670, 7 160 998, 6 569 627 OCH 6 245 514 OCH DERAS UTLÄNDSKA MOTSVARIGHETER ANVÄNDA DENNA PRODUKT ENBART FÖR ATT TILLHANDAHÅLLA TJÄNSTER INOM IN VITRO-DIAGNOSTIK FÖR MÄNNISKOR OCH DJUR. INGET ALLMÄNT PATENT ELLER ANNAN LICENS AV NÅGOT SLAG FÖRUTOM DENNA SPECIFIKA ANVÄNDARRÄTT I OCH MED INKÖPET BEVILJAS HÄRIGENOM.

Begränsat licensavtal

Användningen av denna produkt innebär att inköparen eller användaren av artus WNV LC RT-PCR-kitet samtycker till följande villkor:

1. artus WNV LC RT-PCR-kitet får endast användas i enlighet med handboken till artus WNV LC RT-PCR-kit och med de komponenter som ingår i kitet. QIAGEN beviljar inget tillstånd enligt något av dess immaterialrätt att använda eller inkorporera de ingående komponenterna i detta kit med någon komponent som inte ingår i detta kit förutom enligt beskrivning i handboken till artus WNV LC RT-PCR-kitet och ytterligare protokoll som finns tillgängliga på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN fransäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

QIAamp Viral RNA Mini Kit

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. QIAGEN-kithandböcker och användarhandböcker finns att tillgå på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk support eller från lokal återförsäljare.

© 2007-2014 QIAGEN, med ensamrätt.

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)

1046924SV 148051765



Sample & Assay Technologies