

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Handbok



24 (Katalog nr. 4511263)

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning tillsammans med
artus[™] 3000 och *Rotor-Gene*[®] 3000

Version 1



4511263



1046936SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046936SV



QIAGEN Sample & 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 bestämmer normerna vid:

- 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.

Innehållsförteckning

1. Innehåll.....	5
2. Förvaring.....	5
3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer.....	6
4. Allmänna försiktighetsåtgärder.....	6
5. Information om patogener.....	7
6. Principen för realtids-PCR.....	8
7. Produktbeskrivning.....	8
8. Protokoll.....	9
8.1 Föranalys: Provtagning samt förvaring och transport av prover.....	9
8.2 RNA-isolering.....	10
8.3 Internkontroll.....	12
8.4 Kvantifiering.....	13
8.5 Förberedelse av PCR.....	14
8.6 Programmering av <i>artus 3000</i> resp. <i>Rotor-Gene 3000</i>	18
9. Tolkning av resultat.....	22
10. Felsökning.....	24
11. Specifikationer.....	26
11.1 Analytisk sensitivitet.....	26
11.2 Specificitet.....	27
11.3 Precision.....	28
11.4 Robusthet.....	29
11.5 Reproducerbarhet.....	30

11.6 Diagnostisk utvärdering.....	30
12. Särskild information om produktanvändning.....	30
13. Säkerhetsinformation	30
14. Kvalitetskontroll	30
15. Referenser.....	31
16. Symbolförklaring	31

artus SARS RG RT-PCR Kit

För användning tillsammans med *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000**.

1. Innehåll

	Benämning och innehåll	Art. nr. 4511263 24 Reaktionen
Blå	SARS-CoV RG Master	2 x 12 rxns
Röd	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Röd	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Röd	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Röd	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Grön	SARS-CoV LC/RG/TMIC ^{xx}	1 x 1.000 μl
Vit	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

QS = Kvantifieringsstandard

IC = Internkontroll

2. Förvaring

Komponenterna hos *artus SARS RG RT-PCR Kit* ska förvaras vid -30 till -15 °C och är hållbara till det datum som anges på etiketten. Undvik upprepade tining och frysning (> 2 x), eftersom det minskar sensitiviteten. Reagenser som inte används regelbundet bör därför frysas i portioner. Om det är nödvändigt kan komponenterna förvaras vid +4°C i högst fem timmar.

* *artus SARS RG RT-PCR Kit* kan också användas tillsammans med *Rotor-Gene™ 2000*.

3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer

- Puderfria laboratoriehandskar
- RNA-isoleringskit (se 8.2 RNA-isolering)
- Pipetter (inställbara)
- Sterila pipettspetsar med filter
- Vortex-blandare
- Bordscentrifug med rotor för 2 ml rör
- *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*
- 0,1 ml PCR-rör för användning av 72-brunnars rotor (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699982; 0.1 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: ST-1001)
- Alternativt: 0,2 ml PCR-rör för användning av 36-brunnars rotor (t. ex. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699983 0,2 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: SE-1003F)
- Kylblock (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, Cat.No.: 3001-008/3001-009)

4. Allmänna försiktighetsåtgärder

Tänk alltid på följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Positivt material (prover, kontroller, amplikon) ska förvaras, isoleras och tillsättas till reaktionen i utrymme som är skilt från övriga reagenser.
- Tina alla komponenter fullständigt i rumstemperatur innan testet påbörjas.
- Blanda komponenterna väl och centrifugera en kort stund.
- Arbeta snabbt på is eller i kylblock (72/96 well loading block).

5. Information om patogener

Coronavirus tillhör familjen *Coronaviridae* och är stora, höljeförsedda positiv-sträng-RNA-virus som orsakar högvirulenta sjukdomar hos människor och husdjur. Två hittills kända humana Coronavirus svarar för en tredjedel av de normala förkylningssjukdomarna och nosokomiala infektionerna av de övre luftvägarna hos för tidigt födda barn.

En ny medlem i Coronavirus-familjen anses orsaka svårt akut respiratorisk sjukdom ("Severe Acute Respiratory Syndrome", SARS). En del av den polymerasa-genen hos SARS-Coronavirus (SARS-CoV) identifierades med hjälp av PCR hos en patient genom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin i Hamburg och samarbetande laboratorier. Med utgångspunkt från detta test utvecklades ett kommersiellt Realtids-RT-PCR-system för direkt påvisande av SARS-CoV. PCR kan detektera genetiskt material i SARS-CoV i olika prover (blod, luftvägssekret eller vävnad).

Utvärdering av testresultat

Viktigt: Följ de officiella anvisningarna från Världshälsorganisationen (WHO), mer information finns att läsa på följande internetadress: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Positiva testresultat: Ett positivt SARS-CoV-test tyder på att en SARS-CoV-infektion föreligger, även om patienten inte visar några SARS-symptom.

Negativa testresultat: Ett negativt SARS-CoV-test innebär inte att patienten inte har SARS. Orsakerna till ett negativt testresultat hos en SARS-patient kan vara:

- Vid tidpunkten för provtagningen befann sig viruset inte i provmaterialet (det är ännu oklart i vilket stadium som SARS-CoV är bevisbar i ett bestämt provmaterial).
- Patienten visar SARS-enliga symptom, som är orsakade av en annan sjukdomsalstrare.

6. Principen för realtids-PCR

Vid diagnostik med hjälp av polymeras-kedjereaktion (PCR) amplifieras specifika regioner av patogengenomet. Vid realtids-PCR sker detektion med hjälp av fluoroforer. Dessa är i regel bundna till oligonukleotidprober, som binder specifikt till PCR-amplikon. Genom detektion av fluorescensintensiteten under realtids-PCR-förloppet kan produkterna påvisas och kvantifieras utan att provrören behöver öppnas efteråt (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivning

artus SARS RG RT-PCR Kit är ett bruksfärdigt system för påvisning av SARS-CoV-RNA med polymeras-kedjereaktion (PCR) i *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*. *SARS-CoV RG Master* innehåller reagenser och enzymer för omvänd transkription och specifik amplifiering av ett 92 bp långt fragment i SARS-CoV-genomet samt för omedelbar detektion av amplikon i fluorescenskanal Cycling A.FAM på *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*. Dessutom innehåller *artus SARS RG RT-PCR Kit* ett andra heterologt amplifieringssystem för detektion av en eventuell PCR-inhibering. Detta detekteras som *Internkontroll (IC)* i fluorescenskanal Cycling A.JOE. Därvid minskas inte detektionsgränsen för analytisk SARS-CoV RT-PCR (se

11.1 Analytisk sensitivitet). Externa positiva kontroller (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*) medföljer, med vars hjälp en bestämning av patogenbelastningen kan utföras. Du kan läsa mer om detta i stycket

8.4 Kvantifiering.

8. Protokoll

8.1 Föranalys: Provtagning samt förvaring och transport av prover

Obs! Alla prover ska behandlas som potentiellt smittfarliga.

Viktigt: Av de data som hittills föreligger framgår att sputum är det provmaterial som bäst lämpar sig för SARS-CoV-detektion. Vi rekommenderar därför att detta material används med *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

Den interna valideringen av *artus* SARS RG RT-PCR Kit utfördes med serumprover. Andra provmaterial som till exempel BAL, nasofaryngealspolning, utstryk, lungvävnad och sputum har ännu inte fullständigt validerats. Endast rekommenderade RNA-isoleringskit (se **8.2 RNA-isolering**) bör användas för provförberedelsen.

För vissa provmaterial måste särskilda föreskrifter för provtagning, förvaring och transport följas.

Obs! Information om de officiella riktlinjerna från WHO kan erhållas på följande webbplats: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Provtagning

Vid provtagning för utstryk ska följande material användas:

Använd endast provtagningspinnar med Dacron[®] - eller Rayon-toppar på skaft av plast. Provtagningspinnar med skaft av trä eller aluminium får inte användas.

8.1.2 Förvaring av prover

Testresultatet kan påverkas om proverna rutinmässigt blir frysta eller förvaras under en längre tid.

Förvaring av prover sker vid 2 - 8°C. (När proverna skall skickas till ett laboratorium för undersökning, ska de så snart som möjligt efter provtagningen försändas i överensstämmelse med föreskrifterna för transport av SARS-CoV.)

Utstryksprover som inte testas direkt efter ankomst bör förvaras vid 2 - 8°C och bearbetas inom ett dygn. Utstryksprover som inte kan bearbetas inom en dag efter provtagning, måste förvaras vid -20°C eller kallare och testas inom 30 dagar efter datum för provtagning.

8.1.3 Provtransport

Utstryksprover måste transporteras kyllda.

Om utstryksprover måste sändas till ett laboratorium, ska de sändas så snart som möjligt efter provtagning enligt laboratoriets föreskrifter för transport under kyning. Proverna ska sändas i enlighet med gällande lokala- och statliga föreskrifter för transport av potentiellt smittsamma ämnen*.

8.2 RNA-isolering

Kit för RNA-isolering kan erhållas från olika tillverkare. Följ tillverkarens protokoll och tillsätt angiven provmängd till isoleringen samt utför RNA-isoleringen enligt anvisningarna. Följande isoleringskit rekommenderas:

Provmaterial	Isoleringskit	Katalog-nummer	Tillverkare	Bärar RNA
Sputum, serum, BAL, nasofaryngeal-spolning,	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	Ingår
Lungvävnad	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	Ingår ej

* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

Vid användning av sputum som provmaterial, beakta följande hänvisning: För provberedning blandas provet i ett provrör till lika delar med en 0,9 % NaCl-lösning, som innehåller 1 % N-Acetylcystein (Sigma Cat. No. A8199) (t. ex. 300 μ l sputum + 300 μ l NaCl-blandning). Efter 30 minuter inkubationstid i rumstemperatur tillsätts 140 μ l av lyssatsen för efterföljande RNA-isolering med QIAamp Viral RNA Mini Kit. Följ därefter tillverkarens protokollangivelser.

- Tillsatsen av **bärrar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA/RNA. För att uppnå en högre stabilitet av det bärrar-RNA som medföljer QIAamp Viral RNA Mini Kit, rekommenderar vi följande tillvägagångssätt, vilket frångår angivelserna i isoleringskitets handbok:
 - a. Innan första användningen av isoleringskitet resuspendera de frystorkade bärrar-RNA i 310 μ l eluerings buffert som ingår i kitet (slutkoncentration 1 μ g/ μ l, använd ingen lyseringsbuffert) och portionera denna bärrar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C. Undvik upprepade tining (> 2 x) av en bärrar-RNA-alikvot.
 - b. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärrar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.3 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert AVL	560 μ l	6.720 μ l
Bärrar-RNA (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Total volym	565,6 μl	6.787,2 μl
Volym per extraktion	560 μl	vardera 560 μl

- c. Tillsätt den färskt tillredda blandningen av lyseringsbuffert och bärrar-RNA direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.
- Om isoleringar med **etanolhaltiga** tvättbuffertar används, ska innan eluering ytterligare ett centrifugeringssteg (tre minuter, 13.000 rpm)

utföras så att eventuella etanolrester avlägsnas. Detta förhindrar eventuella PCR-inhiberinger.

- *artus* SARS RG RT-PCR Kit är inte lämpligt för isoleringsförfarande baserade på **fenol**.

Viktigt: *Internkontrollen* för *artus* SARS RG RT-PCR Kit kan tillsättas direkt i isoleringen (se **8.3 Internkontroll**).

8.3 Internkontroll

En *Internkontroll* (SARS-CoV LC/RG/TM IC) medföljer. Med *Internkontrollen* kan du kontrollera **både isoleringen av RNA och en eventuell inhibering av PCR** (se Fig. 1). Om du vill använda *Internkontrollen*, tillsätter du den till isoleringen i ett förhållande på 0,1 μ l per 1 μ l elueringsvolym. Om du till exempel använder QIAamp Viral RNA Mini Kit och eluerar RNA i 60 μ l AVE-buffert, så använder du 6 μ l av *Internkontrollen*. Om du t. ex. eluerar i 50 μ l, så använder du motsvarande 5 μ l. Mängden använd *Internkontroll* beror **enbart** på elueringsvolymen. *Internkontroll* och bärar-RNA (se **8.2 RNA-isolering**) får endast tillsättas till

- blandning av lyseringsbuffert och provmaterial eller
- direkt till lyseringsbufferten.

Internkontroll får inte tillsättas direkt till provmaterialet. Beakta att vid tillsättning till lyseringsbufferten blandningen av *Internkontroll*, lyseringsbuffert/bärar-RNA då måste vara färskt tillredd och användas direkt (förvaras blandningen i rumstemperatur eller i kylskåp kan detta redan efter några timmar leda till bortfall av *Internkontrollen*, och till en minskning av isoleringsefficienten). Pipettera **inte** *Internkontroll* och bärar-RNA direkt till provmaterialet.

Alternativt kan *Internkontroll* användas **enbart för kontroll av en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 1 μ l *Internkontroll* per reaktion

direkt till 15 μ l SARS-CoV RG Master. För varje PCR-reaktion används 15 μ l av den så tillverkade Master Mixen* varefter 10 μ l av det renade provet tillsätts. Om du förbereder en körning för flera prover, ökar du den erforderliga mängden SARS-CoV RG Master och Internkontroll motsvarande antalet prover (se 8.5 Förberedelse av PCR).

8.4 Kvantifiering

De medföljande Kvantifieringsstandarderna (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) har blivit kalibrerade med standarderna hos Robert-Koch-institutet, Berlin. Dessa behandlas på samma sätt som ett redan isolerat prov och används i samma volym (10 μ l). Ta fram en standardkurva på artus 3000 resp. Rotor-Gene 3000 genom att använda samtliga fyra medföljande Kvantifieringsstandarder, definiera dem som standarder i menyfönstret *Edit Samples* och skriv in den angivna koncentrationen (se *artus 3000 Software Manual* resp. *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*). Denna standardkurva kan även användas för efterföljande kvantifieringar, om minst en standard av en definierad koncentration medtas vid den aktuella testomgången. Den tidigare framtagna standardkurvan måste då importeras (se *artus 3000 Software Manual* resp. *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*). Tänk dock på att det vid denna form av kvantifiering kan förekomma resultatavvikelser till följd av variabilitet mellan PCR-omgångarna.

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av Internkontroll ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

Obs!: *Kvantifieringsstandarderna* anges som kopior/ μ l. Vid omräkning av de värden som tagits fram med hjälp av standardkurvan i kopior/ml provmaterial används följande formel:

$$\text{Resultat (kopior/ml)} = \frac{\text{resultat (kopior/\mu l)} \times \text{elueringsvolymen (\mu l)}}{\text{provvolymen (ml)}}$$

Tänk på att den ursprungliga provvolymen skall användas i den ovanstående formeln. Detta är att beakta när provvolymen för nukleinsyreisoleringen ändrats (t. ex. minskning genom centrifugering eller ökning genom påfyllnad för att nå den volym som krävs för isolering).

Viktigt: Riktlinjer för tolkning av kvantitativa resultat för *artus*-systemen på *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000* finns på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/ (Technical Note for quantitation on the *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*).

8.5 Förberedelse av PCR

Kontrollera att kylblocket (tillbehör till *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*) är kylt till ca +4°C. Placera det antal PCR-reaktionsrör som behövs för det önskade antalet reaktioner. Observera att minst en *Kvantifieringsstandard* samt en negativ kontroll (*Water, PCR grade*) ska medtas vid varje PCR-körning. För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* användas. Innan testet påbörjas ska alla reagenser tinas fullständigt i rumstemperatur och blandas väl (pipetteras upp och ned flera gånger eller blandas genom att invertera röret upprepade gånger) och därefter kort centrifugeras.

Om du med *Internkontrollen* vill kontrollera **både isoleringen av RNA och en**

eventuell inhibering av PCR, ska du tillsätta *Internkontroll* redan vid isoleringen (se **8.3 Internkontroll**). Använd i så fall följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 1):

		Antal prover	
		1	12
1. Beredning av Master Mix	SARS-CoV RG Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TMIC	0 μ l	0 μ l
	Total volym	15 μl	180 μl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 μ l	vardera 15 μ l
	Prov	10 μ l	vardera 10 μ l
	Total volym	25 μl	vardera 25 μl

Om du vill använda *Internkontroll* enbart för kontroll av en PCR-inhibering, ska du tillsätta den direkt till SARS-CoV RG Master. I så fall använder du följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 2):

		Antal prover	
		1	12
1. Beredning av Master Mix	SARS-CoV RG Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TMIC	1 μ l	12 μ l
	Total volym	16 μl*	192 μl*
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 μ l*	vardera 15 μ l*
	Prov	10 μ l	vardera 10 μ l
	Total volym	25 μl	vardera 25 μl

Pipettera i varje PCR-reaktionsrör 15 μ l av Master Mix. Tillsätt därefter 10 μ l eluat från RNA-isoleringen och blanda väl genom att pipettera upp och ned flera gånger. På motsvarande sätt måste 10 μ l av minst en av *Kvantifieringsstandarderna* (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) tillsättas som positiv kontroll och 10 μ l vatten (*Water, PCR grade*) som negativ kontroll. Förslut PCR-reaktionsrören. Beakta att en *Locking Ring* (tillbehör till *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*) sätts på rotorn så att reaktionsrören inte kan öppnas av misstag under körningen.

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av *Internkontroll* ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

Tillsats av Internkontroll till isolering

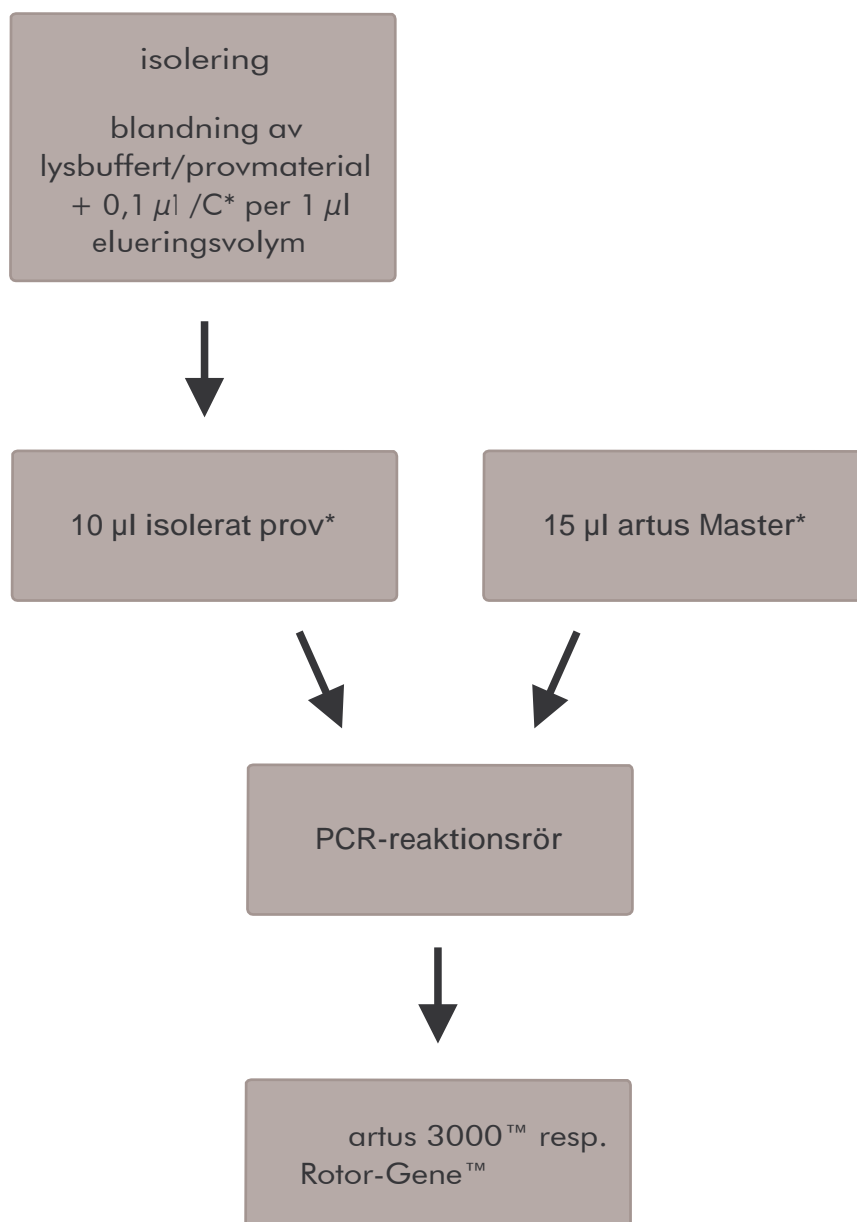


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlöpp för kontroll av isolering och PCR-inhibering.

*

Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund.

Tillsats av Internkontroll till artus Master

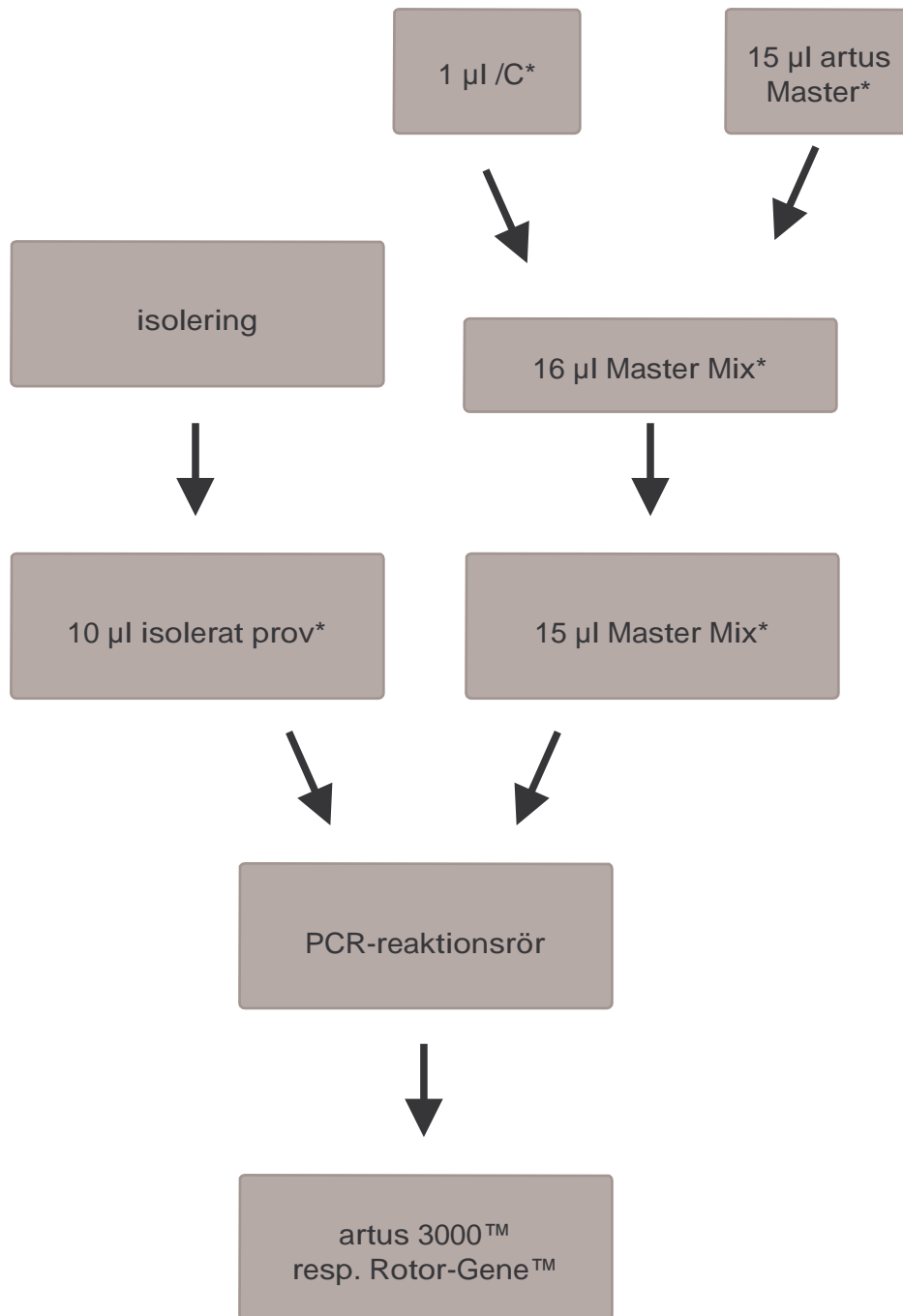


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av PCR-inhibering.

*

Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund.

8.6 Programmering av *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000*

För detektion av SARS-CoV-RNA programmeras en temperaturprofil på *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000* enligt dessa sex steg (se Fig. 3 - 8).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Inställning av allmänna PCR-parametrar | Fig. 3 |
| B. | Omvänd transkription av RNA | Fig. 4 |
| C. | Initiell aktivering av Hot Start-enzymet | Fig. 5 |
| D. | Amplifiering av cDNA | Fig. 6 |
| E. | Inställning av fluorescenskanalernas sensitivitet | Fig. 7 |
| F. | Start av <i>artus 3000</i> - resp. <i>Rotor-Gene3000</i> -körningen | Fig. 8 |

Alla uppgifter hänför sig till *artus 3000*--programversion 5.0.69 resp. *Rotor-Gene*-programversion 4.6.94. Ytterligare information om programmering av *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000* finns i *artus 3000 Software Manual* resp. *Rotor-Gene Manual*, version 4.6. Dessa inställningar markeras i figurerna med en svart ram.

Överför först PCR-reaktionsvolymen i menyfönstret *New Experiment Wizard* (se Fig. 3).

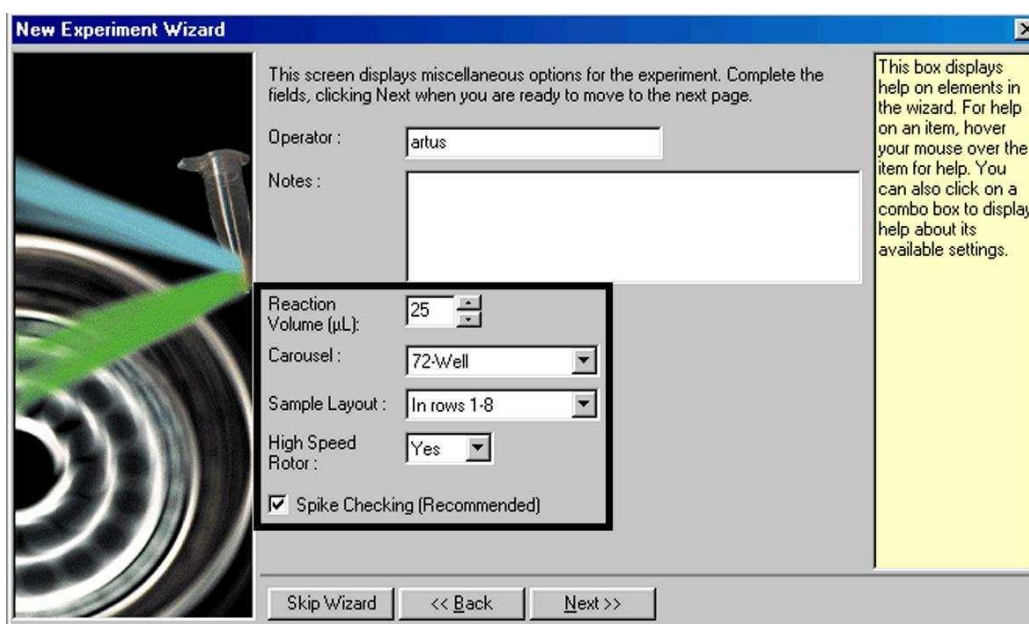


Fig. 3: Inställning av allmänna PCR-parametrar.

Temperaturprofilen programmeras genom att funktionen *Edit* aktiveras i nästa *New Experiment Wizard*-menyfönster (se Fig. 4, 5 och 6).

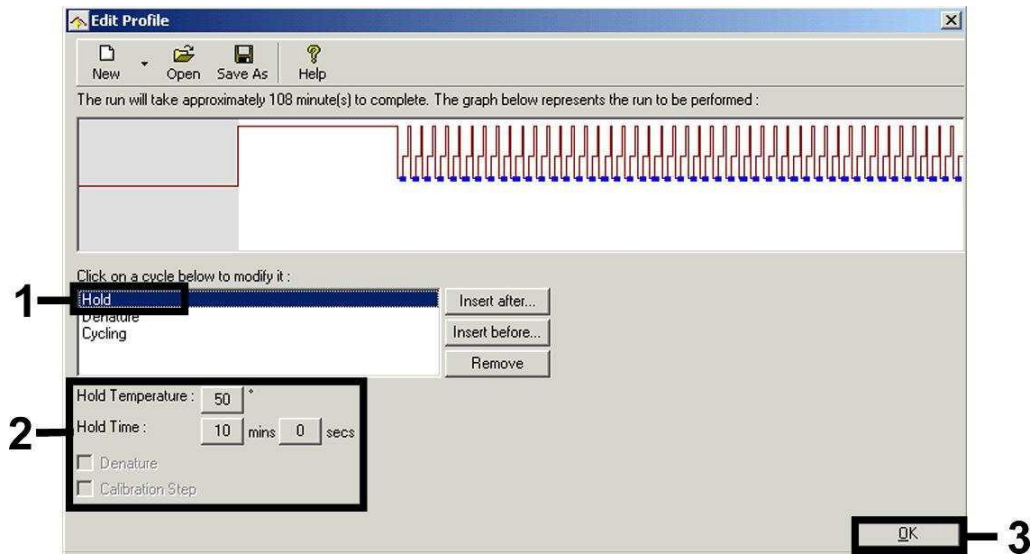


Fig. 4: Omvänd transkription av RNA.

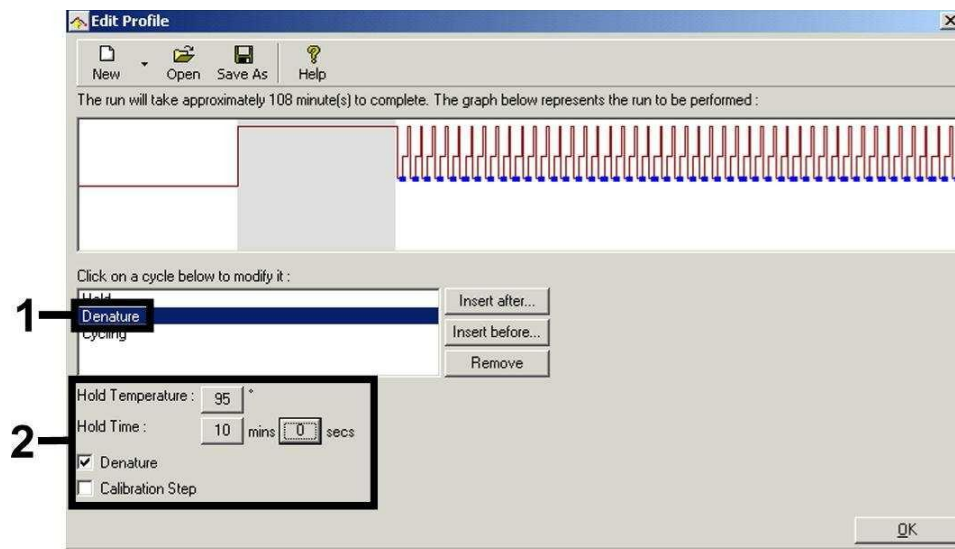


Fig. 5: Initiell aktivering av Hot Start-enzymet.

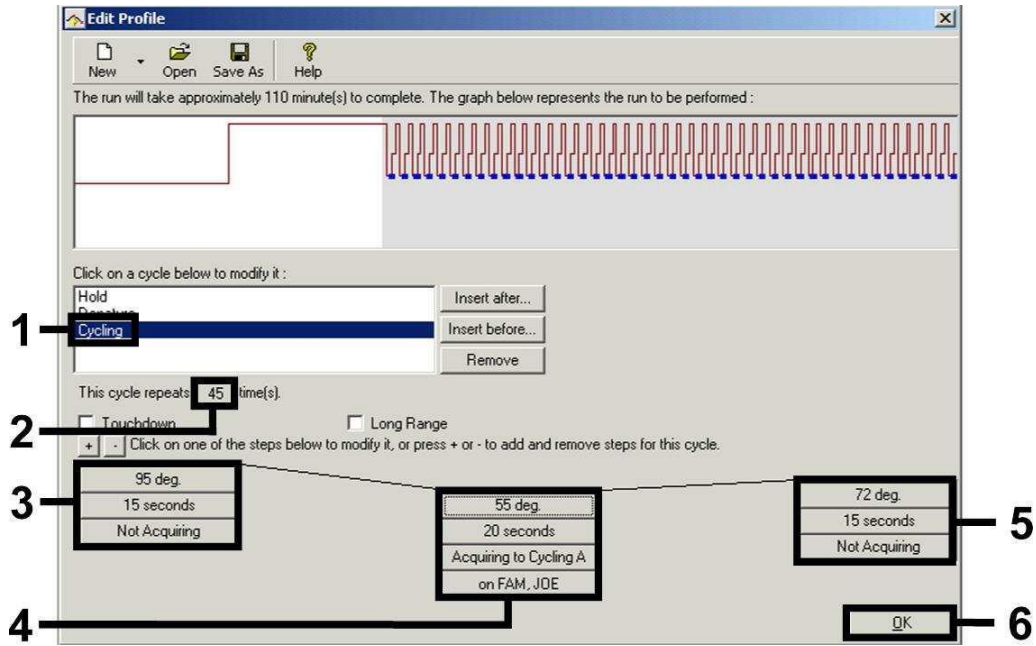


Fig. 6: Amplifiering av cDNA.

Motsvarande fluorescensintensiteten i PCR-behållarna måste fluorescenskanalernas mätområde bestämmas. Denna inställning görs i menyfönstret *Auto Gain Calibration Setup* (aktiveras i menyfönstret *New Experiment Wizard* under *Calibrate*). Ställ in kalibreringstemperaturen på amplifieringsprogrammets annealing-temperatur (se Fig. 7).

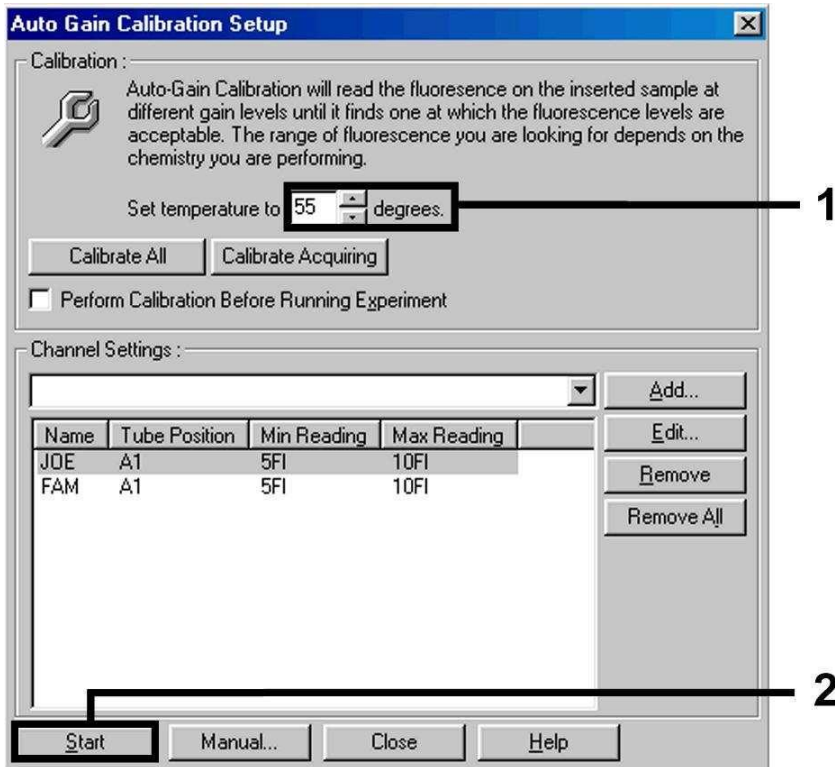


Fig. 7: Inställning av fluoescenskanalernas sensitivitet.

De Gain-värden som tagits fram genom kanalkalibreringen sparas automatiskt och visas i programmeringens sista menyfönster (se Fig. 8).

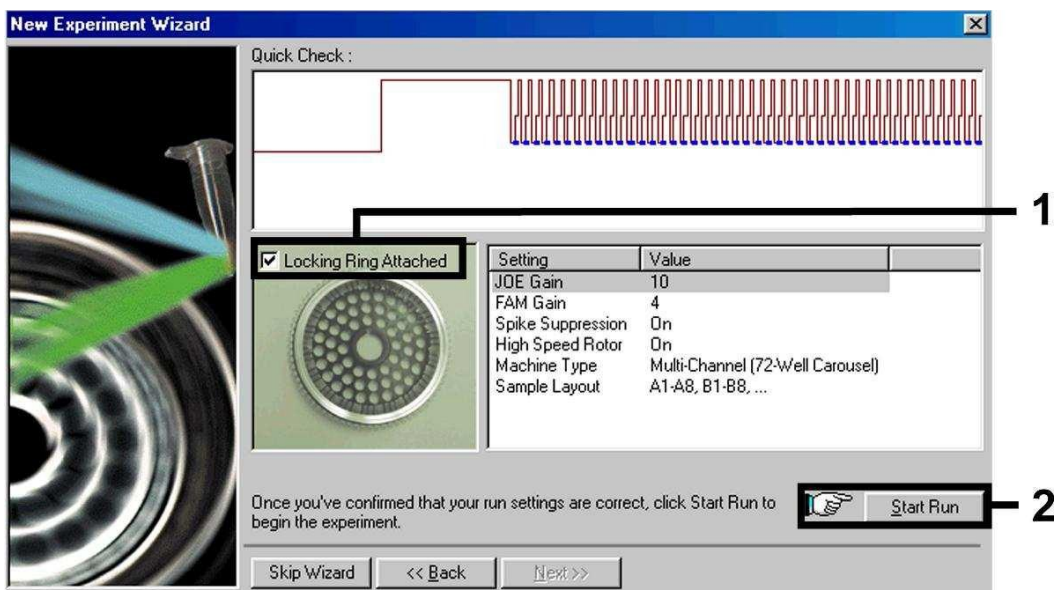


Fig. 8: Start av artus 3000- resp. Rotor-Gene 3000-körningen.

9. Tolkning av resultat

Resultaten tolkas med *artus 3000-* resp. *Rotor-Gene*-programmet enligt tillverkarens anvisningar (*artus 3000 Software Manual* resp. *Rotor-Gene Manual*, version 4.6).

Följande resultat kan förekomma:

1. En signal detekteras i fluorescenskanal Cycling A.FAM.

Analysresultatet är positivt: Provet innehåller SARS-CoV-RNA.

I detta fall är detektion av en signal i kanalen Cycling A.JOE oväsentlig, eftersom höga initiala koncentrationer av SARS-CoV-RNA (positiv signal i kanalen Cycling A.FAM) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för *Internkontrollen* i kanal Cycling A.JOE (konkurrens).

2. I fluorescenskanal Cycling A.FAM detekteras ingen signal, utan endast i kanalen Cycling A.JOE (*Internkontrollens* signal).

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

Vid negativ SARS-CoV-RT-PCR utesluter detektionen av *Internkontroll*-signalen möjligheten av en RT-PCR-inhibering.

3. Ingen signal detekteras vare sig i kanal Cycling A.FAM eller i kanal Cycling A.JOE.

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

Information om felkällor och hur dessa åtgärdas finns i **10. Felsökning**.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner finns i Fig. 9 och Fig. 10.

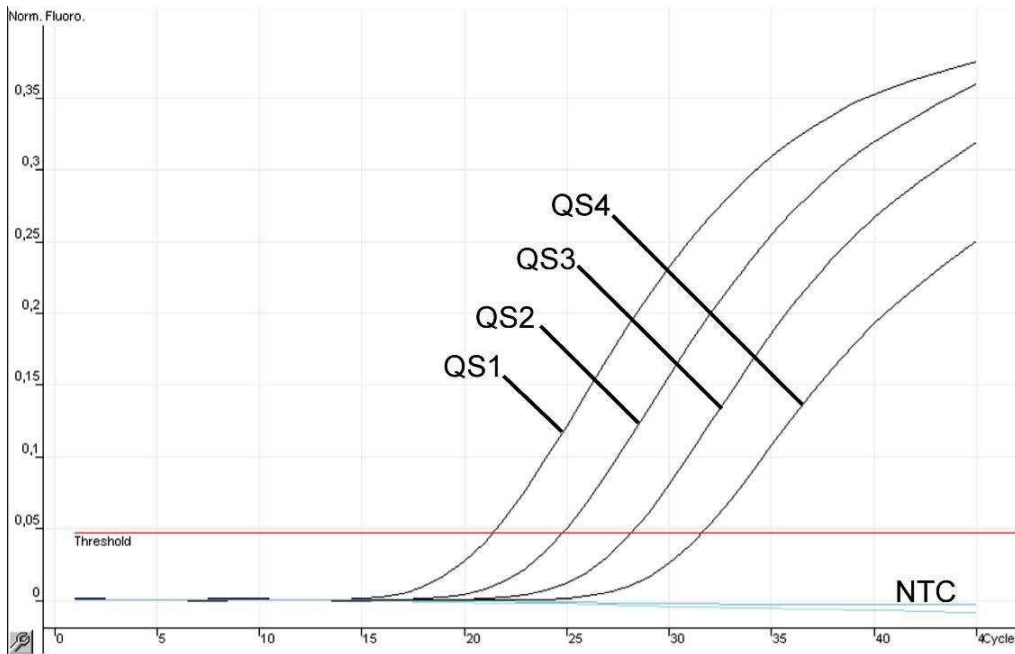


Fig. 9: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) i fluorescenskanal Cycling A.FAM. NTC: non-template control. (Negativ kontroll)

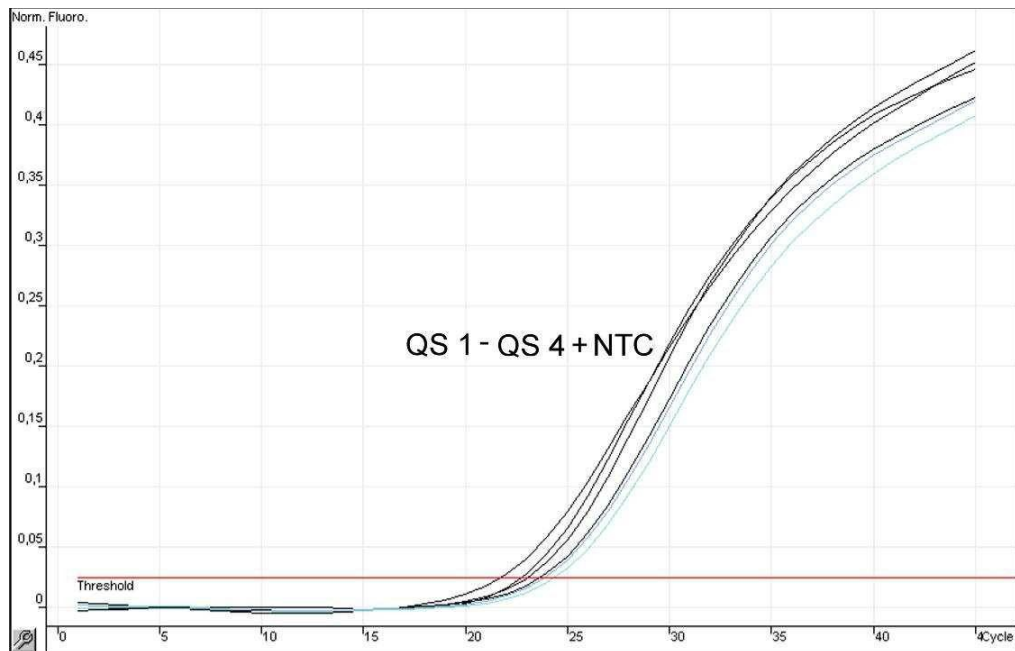


Fig. 10: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorescenskanal Cycling A.JOE med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control. (Negativ kontroll)

10. Felsökning

Ingen signal för de positiva kontrollerna (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) i

fluorescenskanal Cycling A.FAM:

- Valet av fluorescenskanal vid analysen av PCR-data motsvarar inte angivelserna i protokollet.
 - ❖ Välj för analysen av data fluorescenskanal Cycling A. FAM för analytisk SARS-CoV RT-PCR och fluorescenskanal Cycling A.JOE för RT-PCR av *Internkontrollen*.
- Programmeringen av temperaturprofilen för *artus 3000* resp. *Rotor-Gene 3000* är felaktig.
 - ❖ Jämför temperaturprofilen med angivelserna i protokollet (se **8.6 Programmering av artus 3000 resp. Rotor-Gene 3000**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontrollera arbetsstegen med hjälp av pipetteringsschemat (se **8.5 Förberedelse av PCR**) och upprepa, om nödvändigt, PCR.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus SARS RG RT-PCR Kit* har löpt ut.
 - ❖ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Svag eller utebliven signal för *Internkontrollen* i fluorescenskanal Cycling

A.JOE vid samtidig frånvaro av signal i kanal Cycling A.FAM:

- PCR-förhållandena motsvarar inte protokollet.
 - ❖ Kontrollera PCR-förhållandena (se ovan) och upprepa, om nödvändigt, PCR med korrigerade inställningar.
- PCR har inhiberats.
 - ❖ Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.2 RNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar exakt.

- ◆ Förvisa dig om att hos DNA-isoleringen det rekommenderade extra centrifugeringssteget för fullständigt avlägsnande av etanol-rester genomfördes innan elueringen (se **8.2 RNA-isolering**).
- Det förekommer RNA-förluster orsakade av reningsförfarandet.
 - ◆ Har *Internkontrollen* tillsatts för isolering kan en utebliven signal för *Internkontrollen* betyda att det föreligger RNA-förluster orsakade av reningsförfarandet. Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.2 RNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus SARS RG RT-PCR Kit* har löpt ut.
 - ◆ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Signal hos de negativ kontrollerna i fluorescenskanal Cycling A.FAM i analytisk RT-PCR.

- En kontamination föreligger under PCR förberedelserna.
 - ◆ Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.
 - ◆ Förslut de enskilda PCR-reaktionsrören om möjligt direkt efter tillsats av de undersökta proverna.
 - ◆ Pipettera alltid positiv kontrollen sist.
 - ◆ Försäkra dig om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.
- En kontamination orsakad av isoleringen föreligger.
 - ◆ Upprepa isoleringen och PCR av de undersökta proverna med hjälp av oanvända reagenser.
 - ◆ Försäkra dig om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.

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 bestämning av den analytiska sensitiviteten hos *artus SARS RG RT-PCR Kit* bereddes en standard-spädningsserie från 10 till nominellt 0,003 *in vitro*-transkriberade RNA-kopior per μl av SARS-CoV-amplikon som analyserades med hjälp av *artus SARS RG RT-PCR Kit*. Undersökningarna genomfördes tre olika dagar i form av åttafaldiga bestämningar. Resultatet har tagits fram med hjälp av en probit-analys. Den grafiska utvärderingen framgår i Fig. 11. Den analytiska detektionsgränsen för *artus SARS RG RT-PCR Kit* ligger således på 0,5 kopior/ μl ($p = 0,05$). Detta innebär att vid 95 % konfidens 0,5 kopior/ μl kan detekteras.

Probit-analys: SARS-Coronavirus (*artus 3000/Rotor-Gene 3000*)

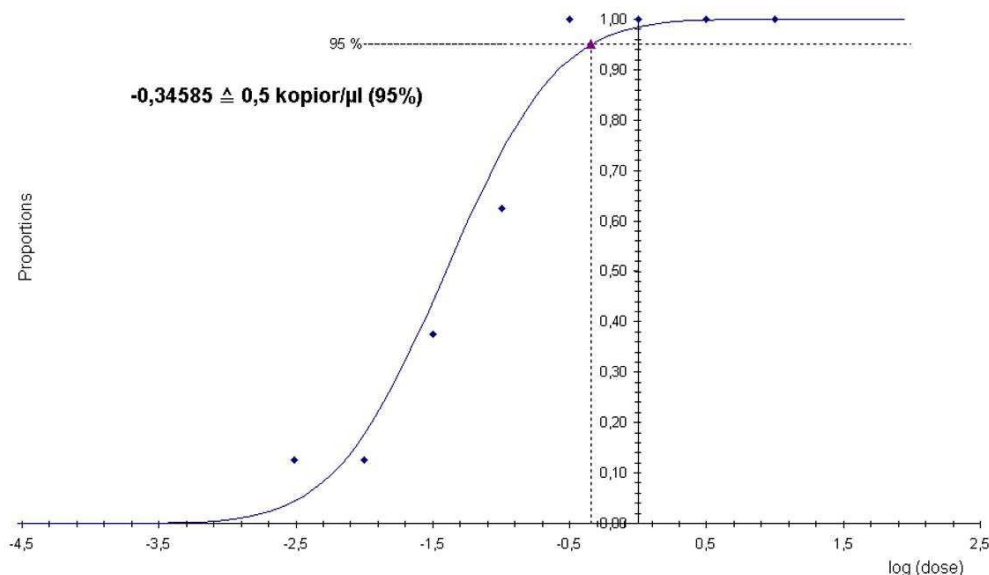


Fig. 11: Analytisk sensitivitet för *artus SARS RG RT-PCR Kit*.

11.2 Specificitet

Specificiteten för *artus* SARS RG RT-PCR Kit garanteras i första hand genom val av primers och prober samt val av stringenta reaktionsförhållanden. Primers och prober kontrolleras med en sekvensjämförelse-analys med avseende på eventuella homologier mot alla i genbanker publicerade sekvenser. På så sätt kontrolleras även att alla relevanta sub- och genotyper detekteras.

Valideringen av specificiteten genomfördes även på 30 olika SARS-CoV negativa serumprover, vilka inte genererade någon signal med de SARS-CoV specifika primers och prober som är integrerade i *SARS-CoV RG Master*.

För bestämning av specificiteten hos *artus* SARS RG RT-PCR Kit undersöktes den i Tabell 1 angivna kontrollgruppen med avseende på korsreaktivitet. Ingen av de testade patogenerna var reaktiv.

Tabell 1: Kitets specificitetstest med eventuella korsreaktiva patogener.

Kontrollgrupp	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Internkontroll (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV 212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

11.3 Precision

Precisionsdatan för *artus* SARS RG RT-PCR Kit tillåter framtagandet av totalvariansen (total variabilitet) av testsystemet. Denna totalvarians består av **Intra-Assay-variabilitet** (variabilitet mellan prover av samma koncentration inom en undersökningsomgång), **Inter-Assay-variabilitet** (variabilitet av analysresultat genererade på olika instrument av samma typ och av olika användare inom ett laboratorium) och **Inter-Batch-variabilitet** (variabilitet av analysresultat vid användning av olika batcher). Därvid förmedlas standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten, såväl för det patogen-specifika som för PCR av *Internkontrollen*.

Dessa data togs fram för *artus* SARS RG RT-PCR Kit med hjälp av *Kvantifieringsstandarden* med den lägsta koncentrationen (QS 4; 10 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes i form av åttafaldiga bestämningar. Utvärderingen av resultaten gjordes med amplifikationskurvornas Ct-värden (Ct: *threshold cycle*, Tabell 2). Således utgör den totala spridningen hos ett godtyckligt prov med den benämnda koncentrationen 1,66 %, för detektion av *Internkontrollen* 1,28 %. Dessa värden baserar på summan av alla enskilda bestämda variabiliteter.

Tabell 2: Precisionsdata baserade på Ct-värdena.

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Intra-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,40	0,15	1,67
Inter-Assay-variabilitet: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Inter-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	1,13	1,28	4,53
Inter-Batch-variabilitet: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69
Inter-Batch-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,94	0,63	3,62
Totalvarians: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,51	0,26	1,66
Totalvarians: <i>Internkontroll</i>	1,13	1,28	1,28

11.4 Robusthet

Undersökningen av robustheten tjänar syftet att förmedla den totala felfrekvensen för *artus SARS RG RT-PCR Kit*. För detta ändamål blandades 30 SARS-CoV negativa serumprover med vardera 1,5 kopior/ μ l elueringsvolymen SARS-CoV-kontroll-RNA (trefaldig koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen), isolerades med QIAamp Viral RNA Mini Kit (se **8.2 RNA-isolering**) och analyserades med *artus SARS RG RT-PCR Kit*. Felfrekvensen för SARS-CoV var 0 % för alla prover. *Internkontrollens* robusthet prövades dessutom genom isolering och analys av vardera 30 SARS-CoV negativa serumprover. Felfrekvensen var 0 %. Inhibering kunde inte iakttas. Robustheten för *artus SARS RG RT-PCR Kit* är således ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhet

Data för reproducerbarhet har insamlats för regelbunden utvärdering av prestanda för *artus* SARS RG RT-PCR Kit samt för jämförelse av prestanda med andra produkter, vilket uppfylls genom deltagande i provningsjämförelser.

11.6 Diagnostisk utvärdering

artus SARS RG RT-PCR Kit utvärderas för närvarande i ett flertal studier.

12. Särskild information om produktanvändning

- Samtliga reagenser är endast avsedda att användas för in vitro-diagnostik.
- Utförandet bör ske av personal som fått särskild undervisning och utbildning i in vitro-diagnostik-förfarandet.
- För att erhålla optimala PCR-resultat är det mycket viktigt att protokollet följs exakt.
- Beakta utgångsdatumet som finns på de enskilda komponenternas förpackningar och etiketter. Utgångna reagenser får inte användas.

13. Säkerhetsinformation

Säkerhetsinformation för *artus* SARS RG RT-PCR Kit hittar du i tillhörande säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). Detta hittar du som kompaktoch användarvänlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitetskontroll

Enligt QIAGENs certifierade kvalitets-management-system ISO 9001 och ISO 13485 testades varje tillverkningsbatch *artus* SARS RG RT-PCR Kit mot fastlagda specifikationer, för att garantera en enhetlig produktkvalitet.

15. Referenser

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

16. Symbolförklaring



Används före



Tillverkningssatsnummer



Tillverkare



Beställningsnummer



Materialnummer



Handbok



Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik



Etanol



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



<N>

Innehållet räcker för <N> test



Temperaturintervall

QS

Kvantifieringsstandard

IC

Internkontroll

artus SARS RG RT PCR Kit

Varumärken och friskrivningar

QIAGEN[®], QIAamp[®], artus[®], *Rotor-Gene*[®] (QIAGEN Group); Dacron[®] (Invista, Inc.).

Registrerade namn, varumärken osv. som nämns i detta dokument, även de som inte är specifikt märkta som sådana anses inte oskyddade enligt lag.

artus SARS RG RT-PCR är ett CE-märkt diagnostiskt kit i enlighet med EU-direktivet för in vitro-diagnostik 98/79/EG. Kan inte erhållas i alla länder.

QIAamp Kit är endast avsedda för allmän laboratorieanvändning. Anvisningar och beskrivningar skall inte användas som underlag för diagnos, prevention eller behandling av sjukdom.

Vid inköp av artus PCR Kit beviljas en begränsad licens för användning vid polymeras-kedjereaktion (PCR) inom human och veterinärmedicinsk in vitro-diagnostik tillsammans med en termocykel, vars användning i samband med automatiserad PCR inkluderar en up-front betalning. Denna innefattar en avgift till Applied Biosystems eller erläggs i samband med inköp av t.ex. en auktoriserad termocykel. PCR förfarandet är skyddat av utländska motsvarigheter till U.S. patent nummer 5,219,727 och 5,322,770 och 5,210,015 och 5,176,995 och 6,040,166 och 6,197,563 och 5,994,056 och 6,171,785 och 5,487,972 och 5,804,375 och 5,407,800 och 5,310,652 och 5,994,056 ägda av F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, alla rättigheter förbehålles.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

