

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Håndbog



24 (katalog nr. 4511263)

Kvantitativ in vitro diagnostik

Til anvendelse med artus[™] 3000 og med Rotor-Gene[®] 3000

Version 1



4511263



1046936DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046936DA



QIAGEN prøve- og analyse-teknologier

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyse-teknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vore avancerede højkvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder i:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nucleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyse-teknologier

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se www.qiagen.com.

Indholdsfortegnelse

1. Indhold	5
2. Opbevaring	5
3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter	6
4. Almindelige sikkerhedsregler.....	6
5. Information om smittefare	7
6. Princip for Real-Time PCR.....	8
7. Produktbeskrivelse	8
8. Protokol.....	10
8.1 Før analysen: Udtagning, opbevaring og transport af prøver.....	10
8.2 RNA-isolering	11
8.3 Intern kontrol.....	13
8.4 Kvantificering.....	15
8.5 Forberedelse af PCR.....	16
8.6 Programmering af <i>artus 3000</i> hhv. <i>Rotor-Gene 3000</i>	20
9. Analyse	22
10. Fejlkilder	25
11. Specifikationer.....	27
11.1 Analytisk sensitivitet.....	27
11.2 Specificitet	28
11.3 Præcision.....	29
11.4 Robusthed	30
11.5 Reproducerbarhed.....	30

11.6 Diagnostisk evaluering.....	30
12. Særlige anvisninger til brug af produktet.....	31
13. Sikkerhedsinformationer	31
14. Kvalitetskontrol	31
15. Litteratur	31
16. Symbolforklaring	32

artus SARS RG RT-PCR Kit

Til anvendelse med artus 3000 hhv. med Rotor-Gene 3000*.

1. Indhold

	Påskrift og indhold	Art. Nr. 4511263 24 reaktioner
Blå	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 reaktioner
Rød	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Rød	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Rød	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Rød	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Grøn	SARS-CoV LC/RG/TMIC ^{xx}	1 x 1.000 μl
Hvid	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

^{xx}QS = Kvantificeringsstandard
IC = Intern Kontrol

2. Opbevaring

artus SARS RG RT-PCR Kit opbevares ved -30 til -15 °C og er holdbart indtil datoen, der er angivet på etiketten. Gentagen optøning og nedfrysning (> 2°C) bør undgås, da sensitiviteten derved forringes. Ved regelmæssig brug skal reagenserne derfor aliquoteres. Hvis det er nødvendigt at opbevare kittet ved +4°C, må dette tidsrum ikke vare længere end fem timer

* artus ParvoB19 RG PCR Kit kan også anvendes sammen med Rotor-Gene™ 2000.

3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter

- Pudderfri engangs laboratoriehandsker
- RNA-isoleringskit (se **8.2 RNA-isolering**)
- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespidser med filter
- Vortex-mixer
- Bordcentrifuge med rotor til 2 ml-reaktionsbeholdere
- *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*
- *artus 3000* software-version 5.0.69 hhv. *Rotor-Gene™* software-version 4.6.94 eller højere
- 0,1 ml PCR-reaktionsbeholdere til anvendelse for 72-well-rotors (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-reaktionsbeholdere til anvendelse for 36-well-rotors (f.eks. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: SE-1003F)
- Køleblok (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. Almindelige sikkerhedsregler

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Brug sterile pipettespidser med filter.
- Positivt materiale (prøver, kontroller, amplifikater) skal opbevares, oprenses og tilsættes reaktionsblandingen i et separat rum, adskilt fra de øvrige reagenser.
- Optø alle komponenter fuldstændigt ved stuetemperatur, inden testen startes.
- Bland komponenterne grundigt og centrifuger kort.

- Der bør arbejdes hurtigt på is eller i køleblokken (72/96 well loading block).

5. Information om smittefare

Coronavirus tilhører *coronaviridae*-familien og er store indkapslede positiv-strengede-RNA-virus, som forårsager højvirulente sygdomme hos mennesker og husdyr. To hidtil kendte humane coronavirus er ansvarlige for en tredjedel af de normale forkølelssygdomme og nosokomielle infektioner i de øvre luftveje hos for tidligt fødte børn.

Et medlem af coronavirus-familien regnes som årsag til det alvorlige, akutte åndedrætssyndrom („Severe Acute Respiratory Syndrome“, SARS). En del af polymerase-genet af SARS-coronavirus (SARS-CoV) blev, hos en patient via PCR, identificeret af Bernhard-Nocht-instituttet for tropemedicin i Hamborg og af samarbejdende laboratorier. På basis af denne test blev der udviklet et kommercielt Real-Time RT-PCR-system til direkte påvisning af SARS-CoV. PCR'en kan detektere genetisk materiale fra SARS-CoV i forskellige prøver (blod, luftvejs-sekreter eller væv).

Analyse af testresultaterne

Vigtigt: Følg de officielle anvisninger fra World Health Organisation (WHO). Disse kan læses efter på følgende hjemmeside: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Positive testresultater: En positiv SARS-CoV-test tyder på, at der foreligger en SARS-CoV-infektion, selv om patienten ikke viser nogle SARS-symptomer.

Negative testresultater: En negativ SARS-CoV-test udelukker ikke, at patienten er inficeret med SARS. Grundene til et negativt testresultat selvom der er SARS-symptomer, kan være:

- På tidspunktet til prøvetagningen var viruset ikke i prøvematerialet (det er for tiden uklart, i hvilket stadium af SARS-CoV-pathogenesen viruset

kan påvises i bestemte prøvematerialer).

- Patienten viser SARS lignende symptomer, der forårsages af et andet virus.

6. Princip for Real-Time PCR

Ved patogen diagnostik ved hjælp af polymerase kædereaktion (eng. Polymerase Chain Reaction = PCR) bliver specifikke områder af smitstofgenomet amplificeret. Detektionen foregår via Real-Time PCR ved hjælp af fluorescensfarver. Disse er som regel koblet til oligonukleotid-prober, som binder specifikt til PCR-produktet. Detektionen af fluorescensintensiteten i Real-Time PCR-kørslen gør det muligt at påvise og kvantificere produkterne, uden at skulle åbne prøverørene igen efter PCR-kørslen (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivelse

artus SARS RG RT-PCR Kit er et brugsklart system til påvisning af SARS-CoV-RNA ved hjælp af polymerase kædereaktion (PCR) i *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*. *SARS-CoV RG/TM Master* indeholder reagenser og enzymer til den reverse transkription og den specifikke amplifikation af en 92 bp lang sekvens af SARS-CoV-genomet og til umiddelbar detektion af amplifikatet i fluorescens-kanal Cycling A.FAM til *artus 3000* (*artus*) hhv. *Rotor-Gene 3000*. Derudover indeholder *artus SARS RG RT-PCR Kit* et heterologt amplifikationssystem, som bruges til detektion af en eventuel PCR-inhibition. Denne bliver påvist som *Intern Kontrol (IC)* i fluorescens-kanalen Cycling A.JOE. Derved bliver detektionsgrænsen af den analytiske SARS-CoV RT-PCR (se 11.1 **Analytisk sensitivitet**) ikke nedsat. Der vedlægges eksterne positivkontroller (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*), som bruges til bestemmelsen af smitstoffet. Læs dertil afsnittet **8.4 Kvantificering**.

8. Protokol

8.1 Før analysen: Udtagning, opbevaring og transport af prøver

Bemærk: Alle prøver skal behandles som potentielt smittefarlige.

Vigtigt: Hidtil foreliggende data viser, at spyt er det bedst egnede prøvemateriale til detektion af SARS-CoV. Vi anbefaler derfor, at dette materiale anvendes med *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

Den interne validering af *artus* SARS RG RT-PCR Kit blev gennemført med serumprøver. Andre prøvematerialer som spyt, BAL, skylning af næsesvælg, podninger og lungevæv er stadig ikke helt valideret. De bedes udelukkende anvende de anbefalede RNA-isolerings-kits (se **8.2 RNA-isolering**) til forberedelsen af prøverne.

Ved bestemte prøvematerialer er det yderst vigtigt at følge særlige forskrifter til udtagning, opbevaring og transport.

Bemærk: Følg også de officielle henvisninger fra WHO på den følgende hjemmeside: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Udtagning af prøver

For at udtage prøver benyttes venligst følgende materialer:

Brug kun pødepinde med Dacron[®]-, eller Rayon-spidsen på skafter af kunststof. **Brug ingen pødepinde med træ- eller aluminiumskaft.**

8.1.2 Opbevaring af prøver

Testeffekten kan blive negativt påvirket af rutinemæssig nedfrysning eller længere opbevaring af prøverne.

Prøverne opbevares ved 2 - 8°C. (Hvis podningsprøverne skal sendes til et

undersøgelseslaboratorium, skal de forsendes så hurtig som mulig i overensstemmelse med laboratorieforskrifterne vedrørende transport af SARS-CoV.)

Podningsprøver, som ikke testes lige efter indlevering til laboratoriet, skal opbevares ved 2 - 8°C og forarbejdes inden for syv dage. Podningsprøver, som ikke kan behandles inden for syv dage efter udtagningen, skal opbevares ved -20°C eller koldere og testes inden for 30 dage efter udtagningsdatoen.

8.1.3 Transport af prøver

Podningsprøver skal transporteres kølet.

Hvis podningsprøverne skal sendes til et undersøgelseslaboratorium, skal de forsendes kølet og så hurtig som mulig i overensstemmelse med laboratorieforskrifterne vedrørende transport. Prøverne skal transporteres efter de gyldige lokale og statslige forskrifter vedrørende transport af sygdomsfremkaldende stoffer*.

8.2 RNA-isolering

RNA-isoleringskits tilbydes af forskellige producenter. Tilsæt den anbefalede prøvemængde til oprensningen og udfør RNA-isoleringen efter producentens forskrift. Følgende isoleringskits anbefales:

Prøvemateriale	Oprensningskit	Katalog-nummer	Producent	Carrier-RNA
Spyt, serum, BAL, nasofaryngeal skylning,	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	indeholdt
Lungevæv	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	ikke indeholdt

Læg mærke til følgende anvisninger ved anvendelse af spyt som prøvemateriale: Til prøvebearbejdningen blandes prøven i en reaktionsbeholder

i lige dele med en 0,9 % NaCl-opløsning, som indeholder 1 % N-Acetylcystein (Sigma kat. nr. A 8199) f.eks.: 300 µl spyt + 300 µl Na-Cl-blanding. Efter en inkubation af blandingen ved stuetemperatur i 30 minutter tilsættes 140 µl af lysatet til den efterfølgende RNA-oprensning med QIAamp Viral RNA Mini Kit og yderligere følges nøje producentens protokolangivelser.

- Anvendelsen af **carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. For at få en højere stabilitet hos den i QIAamp Viral RNA Mini Kit vedlagte carrier-RNA, anbefaler vi følgende fremgangsmåde, som afviger fra angivelserne i håndbogen til isoleringskittet:

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

- a. Resuspender den lyophiliserede carrier-RNA før den første brug af isoleringskittet i 310 μl af elueringsbufferen, som er indeholdt i kittet (slutkoncentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, anvend ikke lysisbuffer), og lav af carrier-RNA-løsningen et for Deres egne krav passende antal aliquoter, som skal opbevares ved -20°C . Undgå gentagen optøning (>2 x) af carrier-RNA-aliquoten.
- b. Før begyndelsen af enhver oprensning skal blandingen af lysisbuffer og carrier-RNA (og i givent tilfælde *Intern Kontrol*, se 8.3 **Intern Kontrol**) fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer AVL	560 μl	6.720 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Samlet volumen	565,6 μl	6.787,2 μl
Volumen for oprensningen	560 μl	for hver 560 μl

- c. Den frisk fremstillede blanding af lysisbuffer og carrier-RNA skal tilsættes oprensningen med det samme. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.
- Bruger man en oprensningsprotokol med **ethanolholdige** vaskebuffer, anbefales det, at man udfører et ekstra centrifugeringstrin (tre minutter, 13.000 rpm) for at fjerne ethanolrester. Dette forhindrer eventuelle PCR-inhibitioner.
 - *artus* SARS RG RT-PCR Kit er ikke egnet til oprensningsmetoder, som arbejder på basis af **phenol**.
- Vigtigt:** Den *Interne Kontrol* til *artus* SARS RG RT-PCR Kit kan anvendes direkte i oprensningen (se 8.3 **Intern Kontrol**).

8.3 Intern kontrol

Der vedlægges en *Intern Kontrol* (SARS-CoV LC/RG/TM IC). Med denne er det muligt at kontrollere **både oprensningen og en mulig inhibition af PCR**(se Fig.

1). Til denne anvendelse tilsættes den *Interne Kontrol* i et forhold der svarer til 0,1 μl pr. 1 μl elueringsvolumen til oprensningen. Hvis De for eksempel anvender QIAamp Viral RNA Mini Kit og eluerer RNA i 60 μl AVE-buffer, skal der tilsættes 6 μl af den *Interne Kontrol*. Hvis De f.eks. eluerer i 50 μl , skal tilsvarende tilsættes 5 μl . Mængden af den anvendte *Interne Kontrol* er **kun** afhængig af elueringsvolumenet. Den *Interne Kontrol* og carrier-RNA (se **8.2 RNA-isolering**) må kun tilsættes

- blandingen af lysisbuffer og prøvemateriale eller
- direkte til lysisbufferen.

Den *Interne Kontrol* må ikke tilsættes direkte til prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for, at blandingen af den *Interne Kontrol* og lysisbuffer/carrier-RNA forberedes frisk og tilsættes med et samme (at opbevare blandingen ved stuetemperatur eller i køleskabet kan allerede efter få timer føre til fravær af den *Interne Kontrol* og til en reduceret oprensningseffektivitet). Pipetter den *Interne Kontrol* og carrier-RNA **ikke** direkte i prøvematerialet.

Alternativt kan den *Interne Kontrol* **udelukkende** anvendes til kontrol af en mulig PCR-inhibition (se Fig. 2). Tilsæt hertil pr. testblanding 1 μl af den *Interne Kontrol* direkte til 15 μl SARS-CoV RG/TM Master. Brug til hver PCR-reaktion 15 μl af den således fremstillede Master Mix*, og tilsæt derefter 10 μl af den oprensede prøve. Ved udførelsen af en kørsel med flere prøver, er det nødvendigt at øge de krævede mængder af SARS-CoV RG/TM Master og af den *Intern Kontrol* tilsvarende til prøvetallet (se **8.5 Forberedelse af PCR**).

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af tilsætning af *Intern Kontrol*, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

8.4 Kvantificering

De vedlagte *Kvantificeringsstandarder (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen (10 µl). Til udarbejdelsen af en standardkurve tilsættes alle fire vedlagte *Kvantificeringsstandarder* i *artus 3000* (*artus*) hhv. *Rotor-Gene 3000*. Definer disse som standarder i *Edit Samples*, og indtast de angivne koncentrationer (se *artus 3000 Software Manual* hhv. *Rotor-Gene Manual*, version 4.6). Denne standardkurve kan derudover anvendes til senere kvantificeringer, hvis mindst en standard af en defineret koncentration medføres i den aktuelle kørsel. Dertil er det nødvendigt at importere den tidligere udarbejdede standardkurve (se *artus 3000 Software Manual* hhv. *Rotor-Gene Manual*, version 4.6). Der kan opstå afvigelser i resultatet på grund af variationen mellem PCR-kørslerne ved denne form for kvantificering.

Bemærk: Kvantificeringsstandarderne er defineret som kopier/µl. Til omregning af værdierne, der er udarbejdet på baggrund af standardkurven til kopier/ml prøvemateriale, skal følgende formel anvendes:

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

Bemærk, at der principielt skal tilsættes det oprindelige prøvevolumen i den ovennævnte formel. Dette skal tages i betragtning, hvis prøvevolumenet blev forandret før nukleinsyre-oprensningen (f.eks. at den blev indsnævret ved centrifugering eller forhøjet ved at den blev fyldt op det volumen, som kræves for oprensningen).

Vigtigt: For simplificering af den kvantitative analyse med *artus*-systemer på *artus 3000* hhv. på *Rotor-Gene 3000* instrumentet findes under www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX en vejledning (**Technical Note for quantitation on the *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000***).

8.5 Forberedelse af PCR

Sørg for at køleblokken (tilbehør til *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*) er kølet ned til cirka +4°C. Indsæt det nødvendige antal PCR-reaktionsbeholdere til de planlagte reaktioner. Bemærk, at hver PCR-kørsel kræver mindst en *Kvantificeringsstandard* samt en negativ kontrol (*Water, PCR grade*). Til udarbejdelse af en standardkurve anvendes pr. PCR-kørsel alle vedlagte *Kvantificeringsstandarder (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 – 4)*. Alle reagenser skal, inden testen startes, tões helt op ved stuetemperatur, blandes godt (ved gentagen pipettering eller ved at invertere reaktionsbeholderen flere gange) og centrifugeres kort.

For tilfældet, at De **både** vil kontrollere **oprensningen af RNA og en mulig inhibition af PCR**, skal den *Interne Kontrol* tilsættes oprensningen i forvejen (se **8.3 Intern Kontrol**). Brug dertil følgende pipetteringskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 1):

	Antal prøver	1	12
1. Opsætning af Master Mix	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	0 µl	0 µl
	Samlet volumen	15 µl	180 µl
2. Opsætning af PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	for hver 15 µl
	Prøve	10 µl	for hver 10 µl
	Samlet volumen	25 µl	for hver 25 µl

Hvis De **udelukkende** vil anvende *Intern Kontrol* til kontrol af PCR- inhibition, skal den tilsættes direkte til SARS-CoV RG/TM Master. Brug dertil følgende pipetteringskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 2):

	Antal prøver	1	12
1. Opsætning af Master Mix	SARS-CoV-RG/TM-Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	1 μ l	12 μ l
	Samlet volumen	16 μ l*	192 μ l*
2. Opsætning af PCR-reaktion	Master Mix	15 μ l*	for hver 15 μ l*
	Prøve	10 μ l	for hver 10 μ l
	Samlet volumen	25 μ l	for hver 25 μ l

Pipetter 15 μ l af Master Mix i hver PCR-reaktionsbeholder. Derefter tilsættes 10 μ l af eluatet fra RNA-isoleringen. Sørg for, at opløsningen blandes grundigt ved at afpipettere og opsuge den flere gange. Tilsvarende skal der tilsættes 10 μ l af mindst en af *Kvantificeringsstandarderne* (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) som positiv kontrol, og som negativ kontrol tilsættes 10 μ l vand (*Water, PCR grade*). Luk PCR-reaktionsbeholderne. Sørg for, at der sættes en *Locking Ring* (tilhører til *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*) på rotoren, for at forhindre en uforsættelig åbning af reaktionsbeholderne under kørslen.

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af tilsætning af *Intern Kontrol*, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

Tilsætning af Intern Kontrol til oprensningen

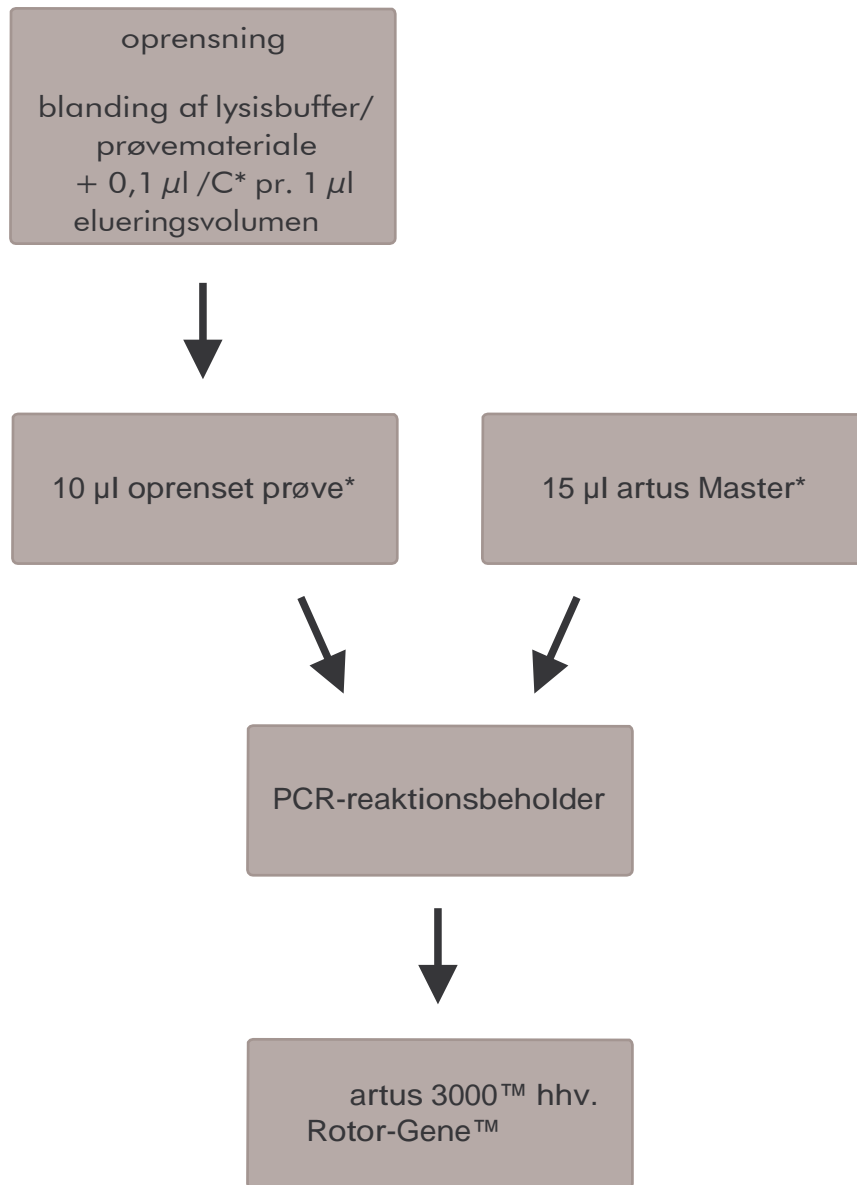


Fig. 1: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af oprensning og PCR-inhibition.

*Det er yderst vigtigt at sørge for, at de anvendte opløsninger er fuldstændigt optøet, blandet godt og centrifugeret kort.

Tilsætning af Intern Kontrol til artus Master

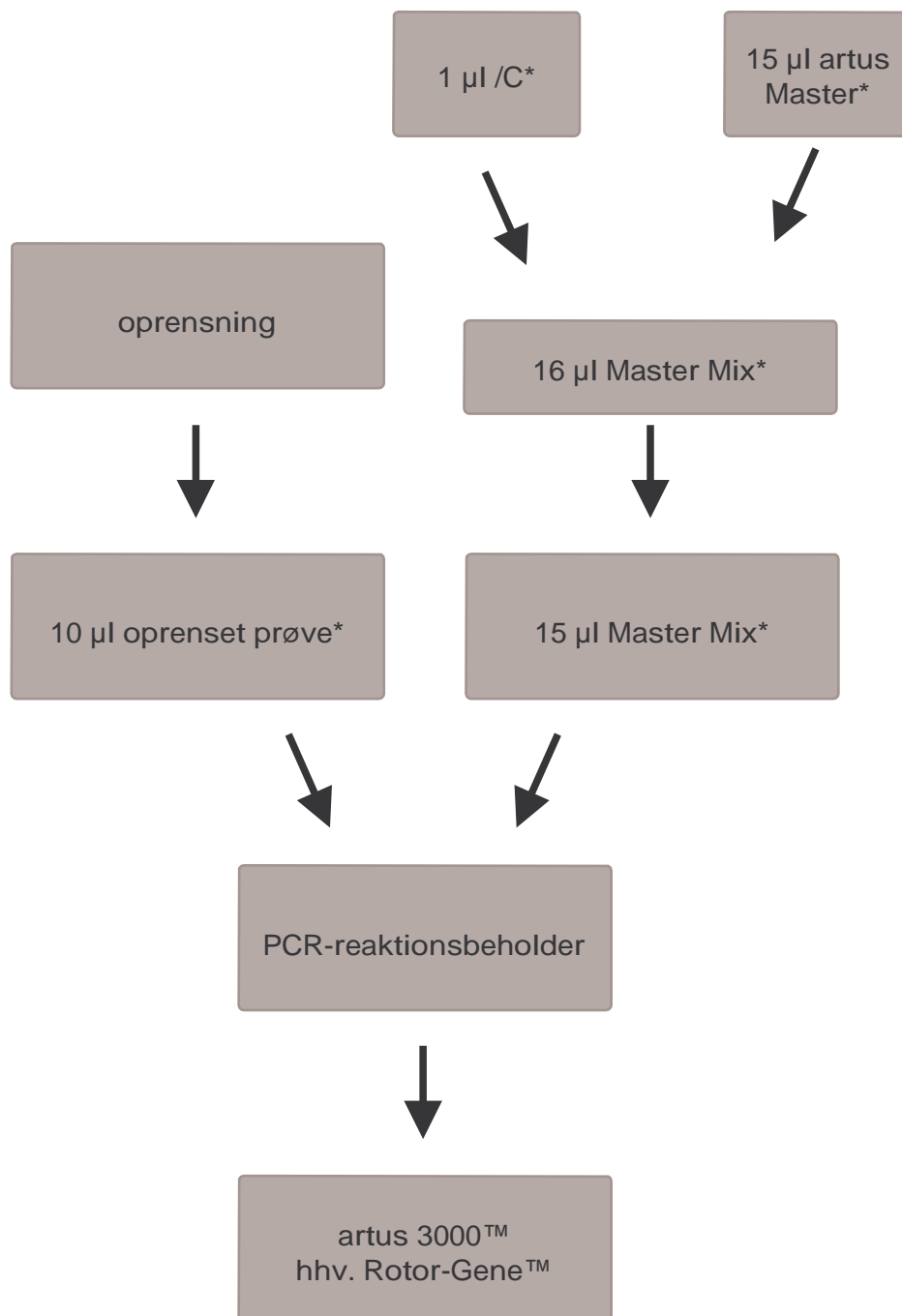


Fig. 2: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af PCR-inhibition.

*Det er yderst vigtigt at sørge for, at de anvendte opløsninger er fuldstændigt optøet, blandet godt og centrifugeret kort.

8.6 Programmering af *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*

Til detektion af SARS-CoV-RNA udarbejder De på Deres *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000* en temperaturprofil i henhold til de følgende seks arbejdsstrin i Fig. 3 - 8:

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Indstilling af generelle PCR-parametre | Fig. 3 |
| B. | Revers transkription af RNA | Fig. 4 |
| C. | Initial aktivering af Hot Start-enzymet | Fig. 5 |
| D. | Amplifikation af cDNA | Fig. 6 |
| E. | Indstilling af sensitivitet for fluorescens-kanaler | Fig. 7 |
| F. | Start af <i>artus 3000</i> [™] hhv. <i>Rotor-Gene</i> [™] 3000-kørslen | Fig. 8 |

Alle angivelser refererer til *artus 3000*-software-version 5.0.69 hhv. *Rotor-Gene*-software-version 4.6.94. Enkeltheder til programmeringen af *artus 3000*[™] hhv. *Rotor-Gene 3000* kan findes i *Rotor-Gene Manual*, version 4.6. Af hensyn til overskueligheden er disse indstillinger fremhævet med sorte rammer i figurerne.

Overfør PCR-reaktionsvolumenet til menuvinduet *New Experiment Wizard* (se Fig. 3).

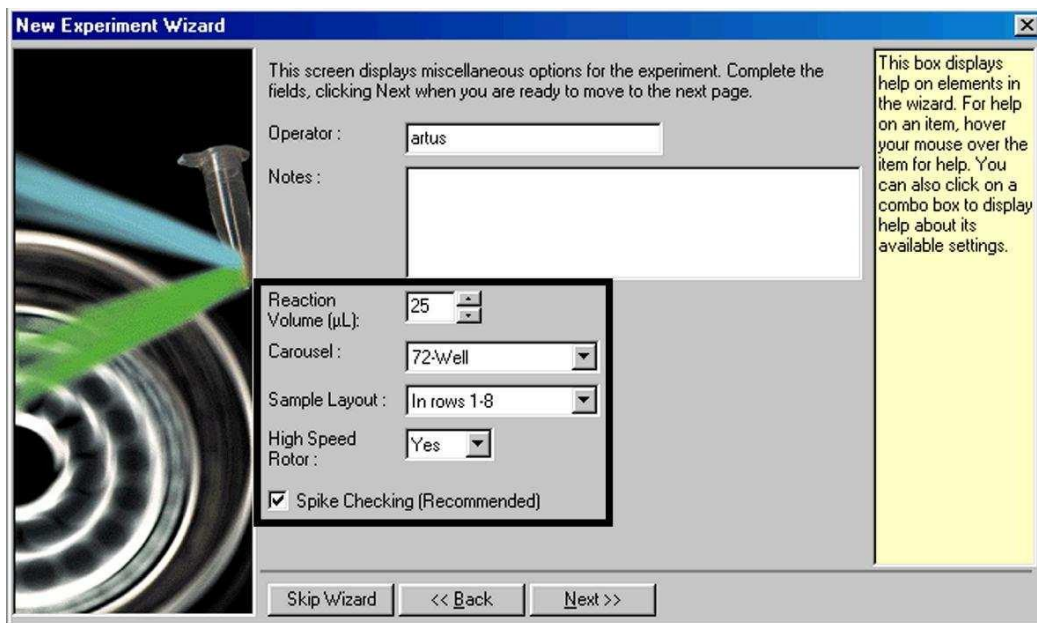


Fig. 3: Indstilling af generelle PCR-parametre.

Programmeringen af temperaturprofilen foretages gennem aktivering af funktionen *Edit* i det næste *New Experiment Wizard*-menuvindue (se Fig. 4, 5 og 6).

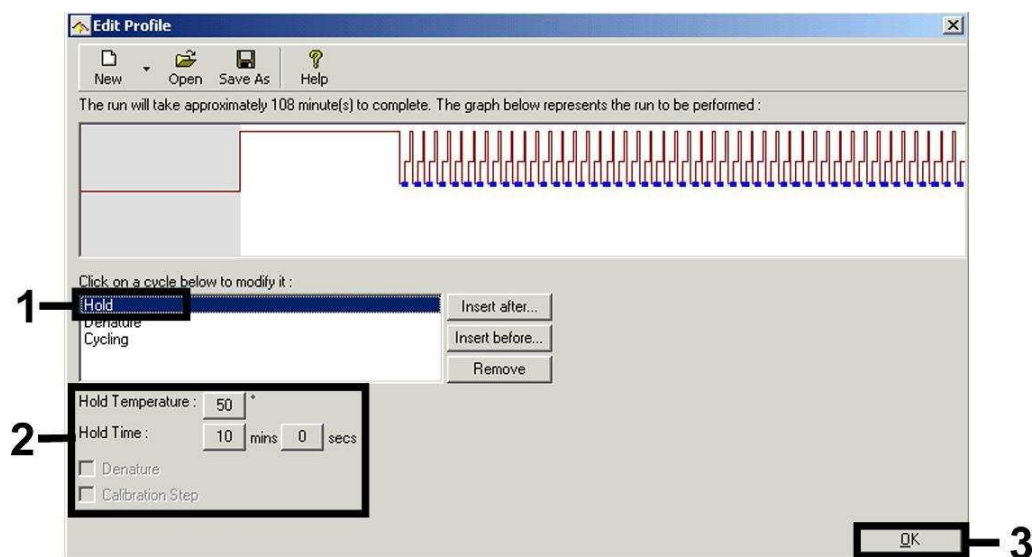


Fig. 4: Revers transkription af RNA.

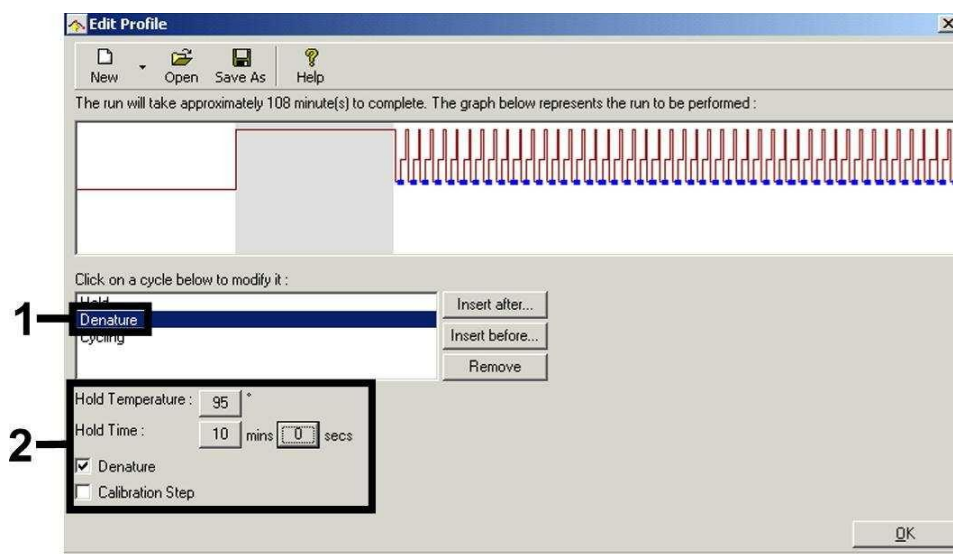


Fig. 5: Initial aktivering af Hot Start-enzymet.

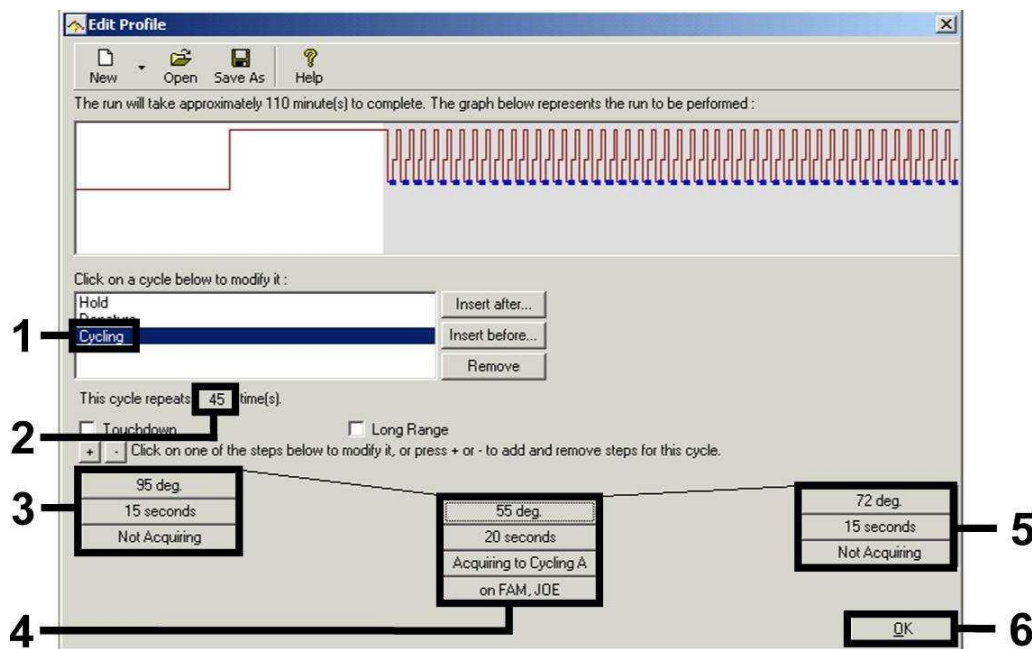


Fig. 6: Amplifikation af cDNA.

Tilsvarende til fluorescens-intensiteten i PCR-opsætningerne skal måleområdet for fluorescens-kanalerne bestemmes. Denne indstilling foretages i menuvinduet *Auto Gain Calibration Setup* (aktivering i menuvinduet *New Experiment Wizard* under *Calibrate*). Indstil kalibrerings-

temperaturen på annealing-temperaturen af amplifikations-programmet (se også Fig. 7).

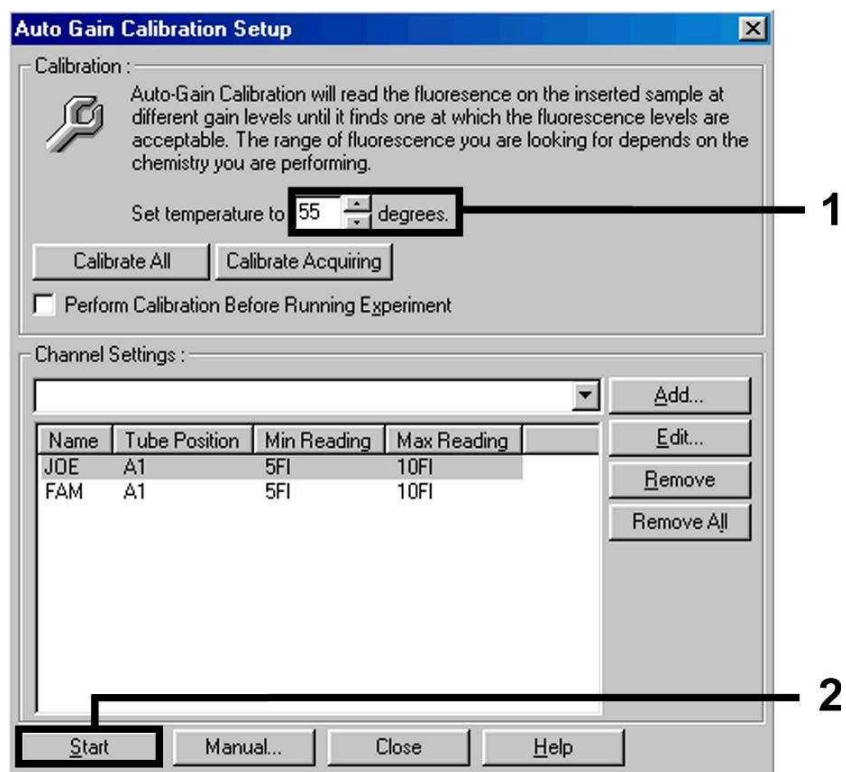


Fig. 7: Indstilling af sensitivitet for fluorescens-kanaler.

Gain-værdierne, som beregnes igennem kanal-kalibreringen, gemmes automatisk og er opført i det sidste menuvindue af programmeringen (se Fig. 8).

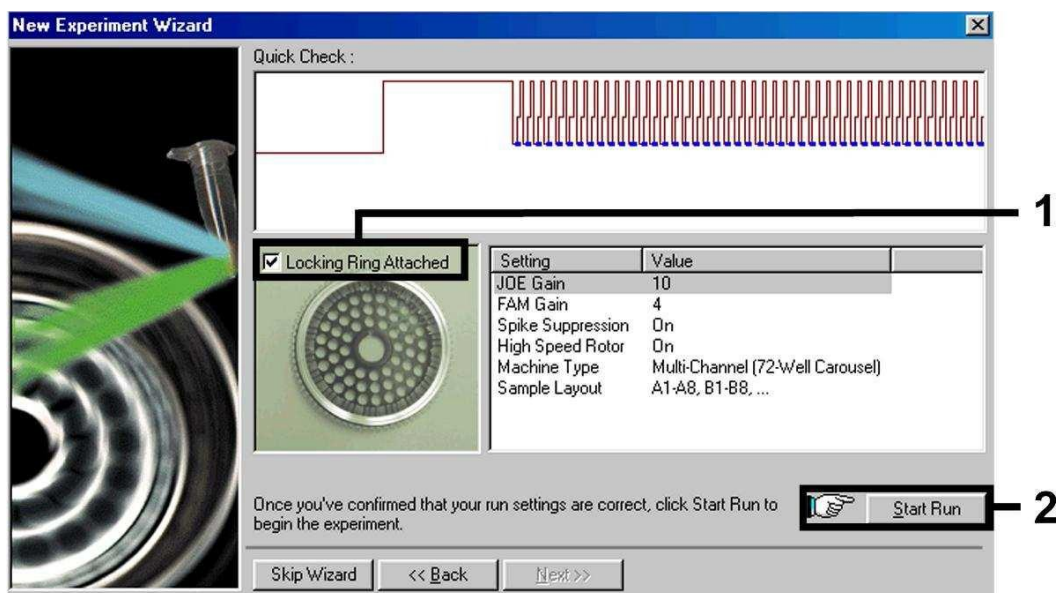


Fig. 8: Start af *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*-kørslen.

9. Analyse

Analysen foretages med *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene*-software efter producentens anvisninger (se *artus 3000Software Manual* hhv. *Rotor-Gene Manual*, version 4.6).

Følgende resultater er mulige:

1. I fluorescens-kanalen Cycling A.FAM detekteres et signal.

Analysens resultat er positivt: Prøven indeholder SARS-CoV-RNA.

I dette tilfælde er detektion af et signal i kanalen Cycling A.JOE uvæsentlig, da høje udgangskoncentrationer af SARS-CoV-RNA (positivt signal i kanalen Cycling A.FAM) kan føre til et reduceret og tilmed helt udeblivende fluorescens-signal af den *Intern Kontrol* i kanalen Cycling A.JOE (konkurrence).

2. I fluorescens-kanalen Cycling A.FAM detekteres der ikke noget signal,

men kun i kanalen Cycling A.JOE (signal for den *Interne Kontrol*).

I prøven kan der ikke påvises SARS-CoV-RNA. Den kan således betragtes som negativ.

Ved negativ SARS-CoV RT-PCR udelukker det detekterede *Intern Kontrol*-signal muligheden for en RT-PCR-inhibition.

3. Hverken i kanalen Cycling A.FAM eller i kanalen Cycling A.JOE detekteres der et signal.

Et diagnostisk udsagn er ikke muligt.

Information om fejlkilder og afhjælpning er angivet under **10. Fejlkilder**.

Eksempler på positive og negative PCR-reaktioner er angivet i Fig. 9 og Fig.

10.

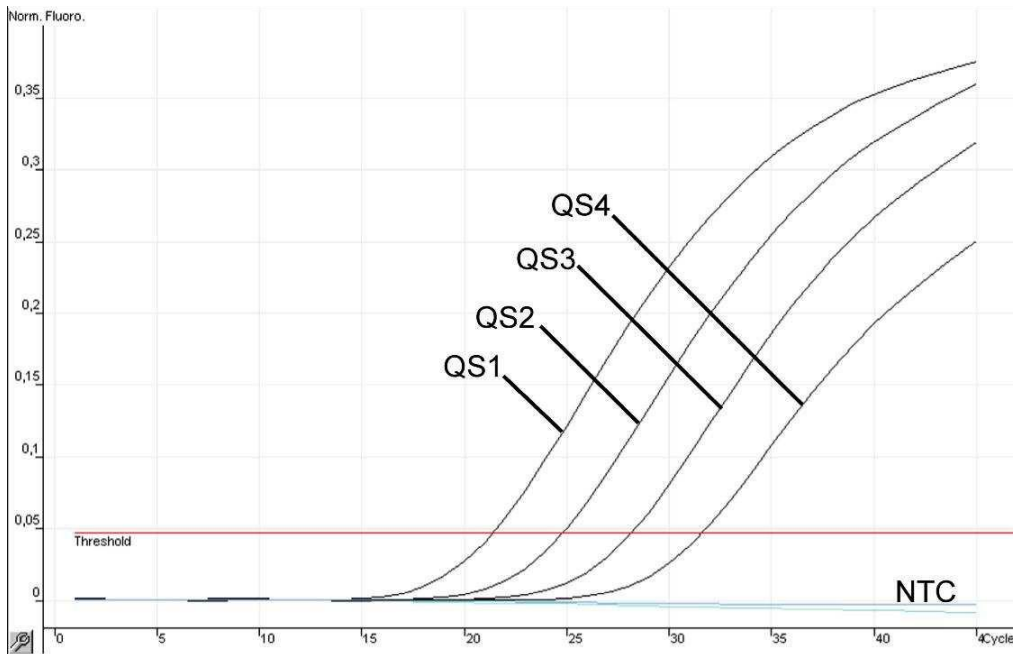


Fig. 9: Detektion af *Kvantificeringsstandarder (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* i fluorescens-kanalen Cycling A.FAM. NTC: non-template control (negativkontrol).

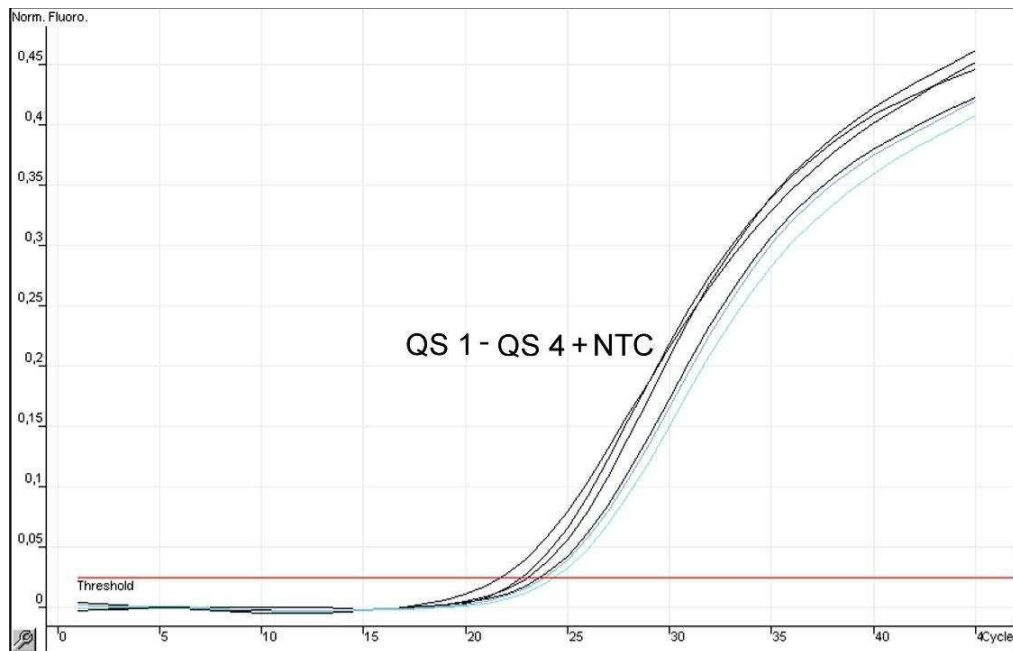


Fig. 10: Detektion af *Intern Kontrol (IC)* i fluorescens-kanalen Cycling A.JOE ved samtidig amplifikation af *Kvantificeringsstandarder (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)*. NTC: non-template control (negativkontrol).

10. Fejlkilder

Intet signal ved positivkontrollerne (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) i

fluorescenskanalen Cycling A.FAM:

- Valget af fluorescenskanalen ved PCR-data-analysen svarer ikke til angivelserne i protokollen.
 - ❖ Vælg for data-analysen fluorescenskanalen Cycling A.FAM for den analytiske SARS-CoV RT-PCR og fluorescenskanalen Cycling A.JOE for den *Interne Kontrol*.
- Fejl i programmeringen af temperaturprofilen for *artus 3000* hhv. *Rotor-Gene 3000*.
 - ❖ Sammenlign temperaturprofilen med angivelserne i protokollen (se **8.6 Programmering af artus 3000** hhv. **Rotor-Gene 3000**).
- Fejl i sammensætningen af PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontroller Deres arbejdsrin ved hjælp af pipetteringsskemaet (se **8.5 Forberedelse af PCR**) og gentag i givent tilfælde PCR'en.
- Betingelserne for opbevaring for en eller flere af kittets komponenter svarede ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus SARS RG RT-PCR Kit* blev overtrådt.
 - ❖ Kontroller venligst både betingelserne for opbevaring og holdbarhedsdatoen (se på kit-etiketten) af reagenserne og anvend i givent tilfælde et nyt kit.

Svagt eller fraværende signal fra den *Interne Kontrol* i fluorescenskanalen

Cycling A.JOE og samtidig fravær af et signal i kanalen Cycling A.FAM:

- PCR-betingelserne svarer ikke til protokollen.
 - ❖ Kontroller betingelserne (se foroven) og gentag i givent tilfælde PCR'en med korrigerede indstillinger.
- PCR'en er blevet inhiberet.
 - ❖ Sørg for, at De anvender en af os anbefalet oprensingsmetode (se **8.2 RNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.

- ❖ Kontroller, at der ved RNA-oprensningen, før gennemførelsen af elueringen, blev gennemført det anbefalede centrifugeringstrin til den fuldstændige fjernelse af ethanol-rester (se **8.2 RNA-isolering**).
- Der foreligger tab af RNA forårsaget af oprensningen.
 - ❖ Hvis den *Interne Kontrol* blev tilsat oprensningen, kan fravær af signalet fra den *Interne Kontrol* betyde, at der foreligger tab af RNA forårsaget af oprensningen. Sørg for, at De anvender en af os anbefalet oprensningsmetode (se **8.2 RNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.
- Betingelserne for opbevaring af en eller flere af kittets komponenter svarer ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus SARS RG RT-PCR Kit* blev overtrådt.
 - ❖ Kontroller venligst både betingelserne for opbevaring og holdbarhedsdatoen (se på kit-etiketten) af reagenserne og anvend i givent tilfælde et nyt kit.

Signaler ved negativkontrollerne i fluorescenskanalen Cycling A.FAM af den analytiske PCR:

- Der foreligger en kontamination ved forberedelserne af PCR'en.
 - ❖ Gentag PCR'en med ubrugte reagenser i replikater.
 - ❖ Luk, hvis muligt, hvert af de enkelte PCR-beholdere direkte efter tilsætningen af den prøve der skal undersøges.
 - ❖ Pipetter principielt positiv-kontrollerne sidst.
 - ❖ Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne dekontamineres regelmæssigt.
- Der foreligger en kontamination medført igennem oprensningen.
 - ❖ Gentag oprensningen og PCR'en for de prøver der skal undersøges under anvendelse af ubrugte reagenser.
 - ❖ Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.

Hvis der skulle opstå yderligere spørgsmål eller problemer, kontakt venligst vores tekniske service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* SARS RG RT-PCR Kit blev der udarbejdet en standard-fortyndingsrække af 10 til nominelt 0,003 *in vitro* transkriberede RNA-kopier per μl af SARS-CoV-amplifikatet. Denne blev derefter analyseret med *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Undersøgelserne blev udført på tre forskellige dage med otte replikater. Resultatet blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. Dens grafiske analyse er vist i Fig. 11. Detektionsgrænsen for *artus* SARS RG RT-PCR Kit ligger således ved 0,5 kopier/ μl ($p = 0,05$). Det betyder, at 0,5 kopier/ μl kan detekteres med 95 % sandsynlighed.

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

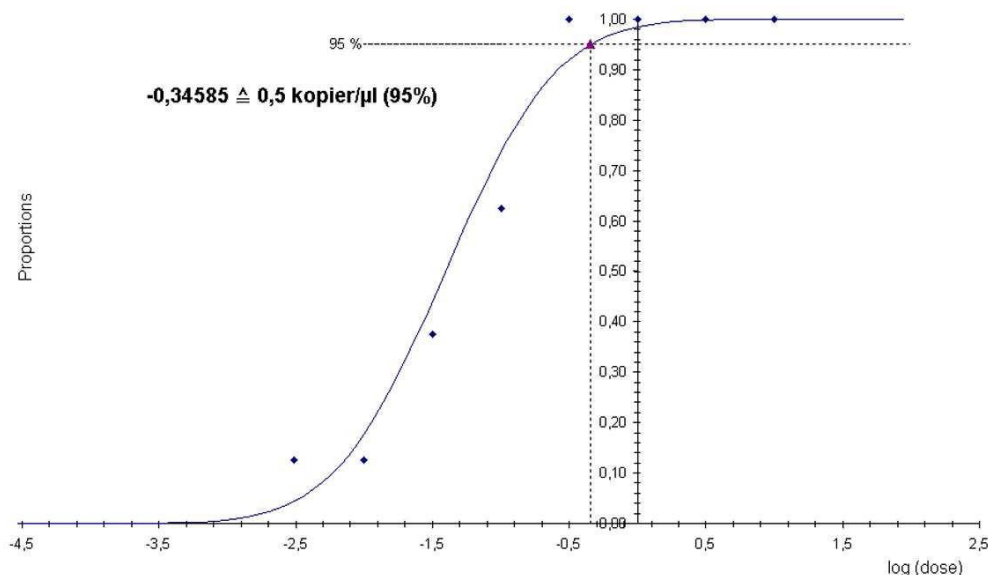


Fig. 11: Analytisk sensitivitet for *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

11.2 Specificitet

Specificiteten for *artus* SARS RG RT-PCR Kit sikres først og fremmest igennem udvalget af primere og prober samt ved valget af stringente reaktionsbetingelser. Primerne og proberne blev kontrolleret for eventuelle homologier til alle i genbanker publicerede sekvenser ved hjælp af en sekvenssammenlignings-analyse. Detekterbarheden for alle relevante sub- og genotyper kontrolleres herved.

Specificitetens validering blev derudover foretaget på 30 forskellige SARS-CoV negative serumprøver, som ikke genererede et signal med de i SARS-CoV RG/TM Master integrerede SARS-CoV specifikke primere og prober.

Til bestemmelse af specificiteten for *artus* SARS RG RT-PCR Kit blev den i Tabel 1 angivne kontrolgruppe undersøgt for krydsreaktivitet. Ingen af de testede smitstoffer var reaktive.

Tabel 1: Specificitetstest af kittet med potentielle krydsreaktive smitstoffer.

Kontrolgruppe	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Intern Kontrol (Cycling A IOE)
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 CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

11.3 Præcision

Præcisionsdata for *artus SARS RG RT-PCR Kit* tillader en bestemmelse af totalvariansen (samlet spredning) af testsystemet. Denne totalvarians består af **Intra-assay variationen** (spredning af prøver med samme koncentration inden for en forsøgsopsætning), af **Inter-assay variationen** (spredning der forekommer pga. forskellige personer inden for et laboratorium, der udfører analysen på forskellige apparater af samme type) og af **Inter-lot variationen** (spredning ved benyttelse af forskellige lots). Via dette bliver såvel standardafvigelsen, variansen og variationskoefficienten for både den smitstof-specifikke- og *Intern Kontrol-PCR*'en beregnet.

Disse præcisionsdata blev bestemt for *artus SARS RG RT-PCR Kit* på baggrund af *Kvantificeringsstandard* med den laveste koncentration (QS 4; 10 kopier/ μ l). Undersøgelserne blev udført med otte replikater. Resultaterne af præcisionsdataene blev beregnet på baggrund af amplifikationskurvens Ct-værdier (Ct: *threshold cycle*, se Tabel 2). Således omfatter den samlede variation af en prøve med den oplyste koncentration 1,66 %, til påvisningen af den *Interne Kontrol* 1,28 % (Ct). Disse værdier baserer på helheden af alle enkeltværdiernes konstaterede variationer.

Tabel 2: Præcisionsdata på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,40	0,15	1,67
Inter-assay variation: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	1,13	1,28	4,53
Inter-lot variation: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69

Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,94	0,63	3,62
Totalvarians: SARS-CoV LC/RG/TM QS4	0,51	0,26	1,66
Totalvarians: <i>Intern Kontrol</i>	1,13	1,28	1,28

11.4 Robusthed

Kontrol af robustheden bruges til bestemmelse af den samlede udskillelsesrate for *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Hertil blev 30 SARS-CoV negative serumprøver blandet med hver 1,5 kopier/ μ l elueringsvolumen SARS-CoV-kontrol-RNA (tredobbelt koncentration af den analytiske sensitivitetsgrænse). Efter oprensning med QIAamp Viral RNA Mini Kit (se **8.2 RNA-isolering**) blev disse prøver analyseret med *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Udskillelsesraten for SARS-CoV udgjorde for alle prøver 0 %. Robustheden for den *Interne Kontrol* blev yderligere kontrolleret igennem oprensning og analyse af 30 SARS-CoV negative serumprøver. Den samlede udskillelsesrate udgjorde 0 %. Inhibitioner blev ikke observeret. Dermed er robustheden for *artus* SARS RG RT-PCR Kit ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhed

Data for reproducerbarheden registreres for at kunne foretage en regelmæssig vurdering af effekten af *artus* SARS RG RT-PCR Kit samt for en sammenligning med effekten af andre produkter. Disse bliver bekræftet ved deltagelse i ringforsøg.

11.6 Diagnostisk evaluering

artus SARS RG RT-PCR Kit evalueres for tiden i flere studier.

12. Særlige anvisninger til brug af produktet

- Alle reagenser må udelukkende anvendes til in vitro-diagnostik.
- Kun personale, der er specielt undervist og uddannet i in vitro-diagnostika-proceduren bør anvende dette udstyr.
- Det er absolut nødvendigt at protokollen overholdes nøje, for at opnå optimale PCR-resultater.
- Forfaldsdatoerne for de enkelte komponenter, der er angivet på emballagen og etiketterne, skal overholdes. Udløbne reagenser må ikke benyttes.

13. Sikkerhedsinformationer

Sikkerhedsinformationer vedrørende *artus* SARS RG RT-PCR Kit findes i de tilsvarende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS). Disse findes som kompakt og brugervenlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.










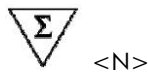

14. Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med det ISO 9001 og ISO 13485-certificerede kvalitetsmanagement-system fra QIAGEN blev ethvert lot af *artus* SARS RG RT-PCR Kit testet imod givne 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

	Holdbar til
	Lotnummer
	Producent
	Katalognummer
	Materialenummer
	Håndbog
	In vitro diagnostik medicinsk produkt
	Ethanol
	Globalt varenummer
	Indholdet er tilstrækkeligt for <N> tests
	Temperaturbegrænsning
QS	<i>Kvantificeringsstandard</i>
IC	<i>Intern Control</i>

artus SARS RT-RG PCR Kit

Mærker og ansvarsfraskrivelse

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

Registrerede navn, varemærker, osv. i dette dokument kan ikke betragtes som juridisk ubeskyttede, selvom de mangler en tilsvarende kendetegnelse.

artus SARS RG RT-PCR Kit er et CE-mærket diagnostisk kit i overensstemmelse med den europæiske retningslinje 98/79/EF om in vitro-diagnostik. Kan ikke fås i alle lande.

QIAamp Kits er til almindelig laboratoriebrug. Produktangivelserne eller fremstillingerne er ikke bestemt til at levere information om diagnose, prævention eller behandling af en sygdom.

Købet af artus PCR Kits indeholder en begrænset licens for deres anvendelse til gennemførelsen af polymerase-kædereaktion-proceduren (PCR) i den humane og veterinære in vitro-diagnostik i forbindelse med en thermocycler, hvis anvendelse i en automatisk gennemført PCR er dækket ved en forudbetalt licensgebyr, som enten betales til Applied Biosystems eller betales ved køb af en autoriseret thermocycler. PCR-proceduren er beskyttet gennem tilsvarende nationale beskyttelsesrettigheder af U.S.-patenterne med numrene 5,219,727 og 5,322,770 og 5,210,015 og 5,176,995 og 6,040,166 og 6,197,563 og 5,994,056 og 6,171,785 og 5,487,972 und 5,804,375 og 5,407,800 og 5,310,652 og 5,994,056 egendom af F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdt

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

