



Handbok till *artus*[®] BK-virus RG PCR-kit

 24 (katalognr 4514263)
 96 (katalognr 4514265)

Version 1



Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene[®] Q-instrument



4514263, 4514265



1056823SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden

TYSKLAND

R4

MAT

1056823SV



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

Användningsområde	7
Sammanfattning och förklaring	7
Information om patogen	7
Princip för proceduren	8
Material som medföljer	8
Kitinnehåll	8
Material som behövs men inte medföljer	9
Varningar och försiktighet	9
Allmänna försiktighetsåtgärder	10
Förvaring och hantering av reagens	10
Procedur	11
DNA-isolering	11
Intern kontroll	11
Protokoll	
■ PCR och dataanalys	13
Tolkning av resultat	20
Kvantifiering	20
Resultat	21
Felsökningshandbok	22
Kvalitetskontroll	24
Begränsningar	24
Prestandaegenskaper	24
Analytisk sensitivitet	24
Specificitet	25
Precision	27
Robusthet	28
Reproducerbarhet	29
Diagnostisk utvärdering	29
Litteraturhänvisningar	29
Symboler	29
Kontaktinformation	30

Användningsområde

artus BK-virus PCR-kitet är ett in vitro-nukleinsyraamplifieringstest för kvantifiering av BK-virus-DNA i human plasma eller urin. För detta diagnostiska testkit används polymeraskedjereaktion (PCR) och kitet är konfigurerat för användning med Rotor-Gene Q-instrument.

Obs! *artus* BK-virus RG PCR-kitet kan inte användas med Rotor-Gene Q 2plex-instrument.

Sammanfattning och förklaring

artus BK-virus RG PCR-kitet utgör ett bruksfärdigt system för detektionen av BK-virus-DNA med användning av polymeraskedjereaktion (PCR) i Rotor-Gene Q-instrument. BK-virus RG Master innehåller reagenser och enzymer för den specifika amplifieringen av en 274 bp-region av BK-virusgenomet, och för direkt detektion av den specifika amplikonen i fluorescenskanalen Cycling Green i Rotor-Gene MDx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000.

Dessutom innehåller *artus* BK-virus RG PCR-kitet ett andra heterologt amplifieringssystem för att identifiera eventuell PCR-inhibition. Denna detekteras som en intern kontroll (IC) i fluorescenskanalen Cycling Orange i Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q eller Rotor-Gene 6000. Detektionsgränsen för analytisk BK-virus-PCR (se "Analytisk sensitivitet", sida 24) minskas inte. Externa positiva kontroller (BK-virus RG QS 1–4) medföljer, vilka gör det möjligt att fastställa andelen virus-DNA. Mer information: se "Tolkning av resultat", sidan 20.

Information om patogen

BK-virus (BKV) är ett DNA-virus som tillhör gruppen polyomavirus. Primär infektion sker främst under barndomen och ger oftast inga symtom. Seroprevalensen hos vuxna är upp till 90 %. Efter primär infektion ligger BKV kvar latent i njurceller och kan reaktiveras om patientens immunförsvar försvagas, t.ex. vid en transplantation.

BKV-infektion kan korreleras med tubulointerstitiell nefrit och uretärstenos hos mottagare av njurtransplantat liksom hemorragisk cystit hos mottagare av benmärgstransplantat. Den har även associerats med sjukdomsmönster för vaskulopati, pneumonit, encefalit, retinit och även multiorgansvikt.


Persistent hög nivå av BKV-replikation är det typiska kännetecknet på polyomavirus-associerad nefropati (PAN) hos njurtransplantationspatienter. Kliniskt relevanta infektioner är oftast begränsade till individer med nedsatt immunförsvar.

Princip för proceduren

Patogen detektion med polymeraskedjereaktion (PCR) baseras på ampliferingen av specifika regioner i den patogena organismens genom. I realtids-PCR detekteras den amplifierade produkten via fluorescerande färgämnen. Dessa är vanligtvis kopplade till sökfragment av oligonukleotider, vilka binder specifikt till den amplifierade produkten. Om du övervakar fluorescensintensiteterna under PCR-körningen (det vill säga i realtid) kan du upptäcka och kvantifiera den ackumulerande produkten utan att behöva öppna reaktionsrören på nytt efter PCR-körningen.*

Material som medföljer

Kitinnehåll

artus BK Virus RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalognr		4514263	4514265
Antal reaktioner		24	96
Blå	BK Virus RG Master	2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Gul	BK Virus RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol 400 µl	400 µl
Röd	BK Virus RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kopior/µl)	QS 200 µl	200 µl
Röd	BK Virus RG QS2 [‡] (1 x 10 ³ kopior/µl)	QS 200 µl	200 µl
Röd	BK Virus RG QS3 [‡] (1 x 10 ² kopior/µl)	QS 200 µl	200 µl
Röd	BK Virus RG QS4 [‡] (1 x 10 ¹ kopior/µl)	QS 200 µl	200 µl
Grön	BK Virus RG IC [§]	IC 1 000 µl	2 x 1 000 µl
Vit	Vatten (PCR-kvalitet)	1 000 µl	1 000 µl
	Handbok	 1	1

[†] Magnesiumlösning.

[‡] Kvantifieringsstandard.

[§] Intern kontroll.

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

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Reagenser

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

Förbrukningsartiklar

- Sterila pipettspetsar med filter
- Strip-rör och lock, 0,1 ml, för användning med 72-brunnars rotor (kat.nr 981103 eller 981106)
- Alternativt: PCR-rör, 0,2 ml, för användning med 36-brunnars rotor (kat.nr 981005 eller 981008)

Utrustning

- Pipetter (justerbara)*
- Vortexblandare*
- Bänkcentrifug* med rotor för 2 ml-reaktionsrör
- Rotor-Gene Q MDx-, Rotor-Gene Q- eller Rotor-Gene-instrument*† med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Orange
- Rotor-Gene Q MDx-/Rotor-Gene Q-programvaruversion 1.7.94 eller senare (Rotor-Gene 6000-programvaruversion 1.7.65)
- Kylblock (laddningsblock 72 x 0,1 ml rör, kat.nr 9018901, eller laddningsblock 96 x 0,2 ml rör, kat.nr 9018905)

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

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.

* Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer.

† *artus* BK-virus RG PCR-kitet kan inte användas med Rotor-Gene Q 2plex-instrument.

Allmänna försiktighetsåtgärder

Användaren ska alltid vara uppmärksam om följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Förvara och extrahera positiva material (prover, positiva kontroller och amplikoner) separerade från alla andra reagenser och tillsätt dem till reaktionsblandningen på en separat plats.
- Tina alla komponenter noggrant vid rumstemperatur (15–25 °C) innan du startar en analys.
- När komponenterna är tinade blandar du dem (pipettera upprepade gånger upp och ned eller genom pulsvortexblandning) och centrifugera kortvarigt.
- Arbeta snabbt och förvara komponenter på is eller i kylblocket (72/96-brunnars laddningsblock).

Förvaring och hantering av reagens

Komponenterna i *artus* BK-virus-PCR-kitet måste förvaras vid –15 °C till –30 °C och är stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Upprepad tining och frysning (>2 x) ska undvikas, eftersom detta kan minska analysens sensitivitet. Om reagenserna endast ska användas periodvis ska de frysas ned i alikvoter. Förvaring vid 2–8 °C ska inte överskrida 5 timmar.

Procedur

DNA-isolering

EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat. nr 62724)* har utvärderats för virus-DNA-rening från human plasma eller urin, för användning med *artus* BK-virus RG PCR-kitet. Utför virus-DNA-reningen enligt anvisningarna i handboken till *EZ1 DSP Virus Kit*. med en initial provvolym på 400 μ l.

Obs! *artus* BK-virus RG PCR-kitet ska inte användas med fenolbaserade isoleringsmetoder.

Obs! Användningen av bärar-RNA är nödvändig för extraktionseffektiviteten och följaktligen för DNA/RNA-utbytet. Tillsätt den lämpliga mängden bärar-RNA till varje extraktion enligt anvisningarna i handboken till *EZ1 DSP Virus Kit*.

Obs! Den interna kontrollen för *artus* BK-virus RG PCR-kitet kan användas direkt i isoleringsförfarandet (se "Intern kontroll", sidan 11).

Obs! Vi rekommenderar starkt att de renade virusnukleinsyrorna används för PCR omedelbart efter extraktion med användning av EZ1 DSP-virus-kitet. Alternativt kan eluat lagras i upp till 3 dagar vid 4 °C innan PCR-analys.

Intern kontroll

En intern kontroll (BK Virus RG IC) medföljer. Detta gör att användaren både kan kontrollera DNA-isoleringsförfarandet och kontrollera om det finns en möjlig inhibering av PCR. För denna användning tillsätter man den interna kontrollen till isolatet i förhållandet 0,1 μ l per 1 μ l elueringsvolym. Till exempel, om man vid användning av EZ1 DSP Virus-kitet eluerar virusnukleinsyrorna i 60 μ l elueringsbuffert (AVE), så ska 6 μ l av den interna kontrollen användas initialt.

Obs! Den interna kontrollen och bärar-RNA (se "DNA-isolering", sidan 11) ska endast tillsättas blandningen av lyseringsbuffert och provmaterial eller direkt till lyseringsbufferten.

Den interna kontrollen får inte tillsättas direkt till provmaterialet. Om den tillsätts till lyseringsbufferten ska man observera att blandningen av intern kontroll och lyseringsbuffert-bärar-RNA måste beredas färsk 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).

Obs! Tillsätt inte den interna kontrollen och bärar-RNA direkt till provmaterialet.

* EZ1 DSP-virus-kitet är även tillgängligt som CE-IVD-märkt EASYartus® BK Virus RG PCR Kit, i kombination med *artus* BK-virus RG PCR-kitet (se sidan 31 för beställningsinformation). Den interna kontrollen kan även användas uteslutande för att kontrollera eventuell PCR-inhibering. För denna användning ska man tillsätta den interna kontrollen direkt till blandningen av BK Virus RG Master och BK Virus RG Mg-Sol, enligt beskrivning i steg 2b i protokollet (sidan 14).

Protokoll: PCR och dataanalys

Viktigt att tänka på före start

- Ta dig tid och bekanta dig med Rotor-Gene Q-instrumentet innan du startar protokollet. Se instrumentets användarhandbok.
- 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 4 kvantifieringsstandarderna som levererats (BK-virus RG QS 1–4) för varje PCR-körning.

Saker som ska utföras före start

- Säkerställ att kylblocket (tillbehör till Rotor-Gene Q-instrumentet) är förkylt till 2–8 °C.
- Före varje användning måste alla reagenser tinas helt, blandas (pipettera upprepade gånger upp och ned eller vortex-blanda snabbt) och centrifugeras under kort tid.

Procedur

- 1. Placera önskat antal PCR-rör i kylblockets adaptrar.**
- 2. Om du använder den interna kontrollen för att övervaka DNA-isoleringen och kontrollera eventuell PCR-inhibering, följ steg 2a. Om du använder den interna kontrollen uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering, följ steg 2b.**
- 2a. Den interna kontrollen har redan tillsatts till isolatet (se "Intern kontroll", sidan 11). I detta fall ska du bereda en masterblandning enligt tabell 1.**

Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 1. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används för att övervaka DNA-isolering och kontrollera PCR-inhibering)

Antal prover	1	12
BK Virus RG Master	7 μ l	84 μ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 μ l	36 μ l
BK Virus RG IC	0 μ l	0 μ l
Total volym	10 μl	120 μl

2b. Den interna kontrollen måste tillsättas direkt till blandningen av BK Virus RG Master och BK Virus RG Mg-Sol. I detta fall ska du bereda en masterblandning enligt tabell 2.

Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 2. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering)

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

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

3. Pipettera 10 μ l av masterblandningen i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 15 μ l av eluerad prov-DNA (se tabell 3). På motsvarande sätt måste 15 μ l av minst en av kvantifieringsstandarderna (BK Virus RG QS 1–4) användas som en positiv kontroll och 15 μ l vatten (vatten, PCR-kvalitet) som en negativ kontroll.

Tabell 3. Beredning av PCR-reaktion

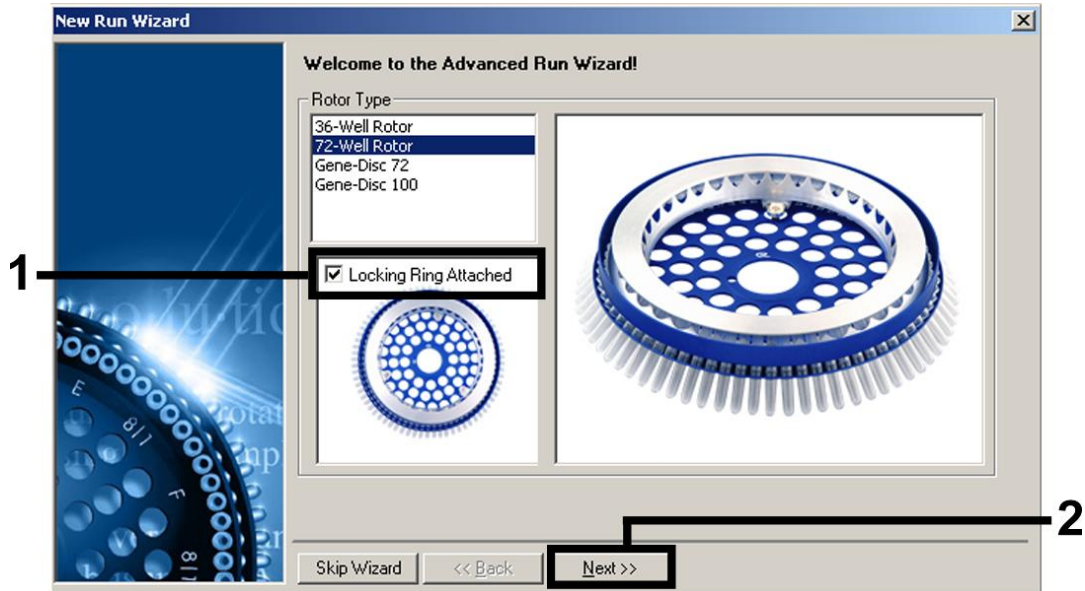
Antal prover	1	12
Masterblandning	10 μ l	10 μ l av vardera
Prov	15 μ l	15 μ l av vardera
Total volym	25 μl	25 μl av vardera

4. Stäng PCR-rören. Kontrollera att låsringen (tillhör till Rotor-Gene-instrumentet) är placerad överst på rotorn för att förhindra att rören öppnas av misstag under körningen.
5. Skapa en temperaturprofil för detektion av BK-virus-DNA genom att utföra följande steg.

Inställning av allmänna analysparametrar	Figurer 1, 2, 3
Första aktivering av enzym med varmstart	Figur 4
DNA-amplifiering	Figur 5
Justering av fluorescenskanalsensitiviteten	Figur 6
Start av körningen	Figur 7

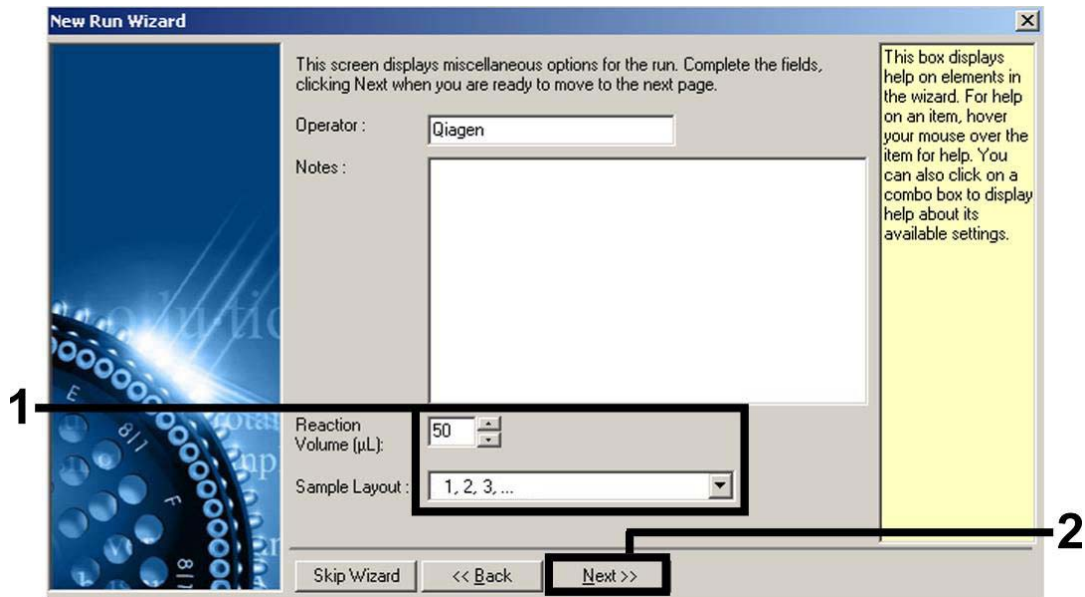
Alla specifikationer gäller för Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q-programvaruversion 1.7.94 och Rotor-Gene 6000-programvaruversion 1.7.65. Mer information om hur du programmerar Rotor-Gene-instrument hittar du i användarhandboken till instrumentet. I illustrationerna är dessa inställningar inramade i svart fet stil. Illustrationer ingår för Rotor-Gene Q-instrument.

6. Öppna först dialogrutan "New Run Wizard" (Ny körning av guide) (figur 1). Markera rutan "Locking Ring Attached" (Låsring fäst) och klicka på "Next" (Nästa).



Figur 1. Dialogrutan "New Run Wizard".

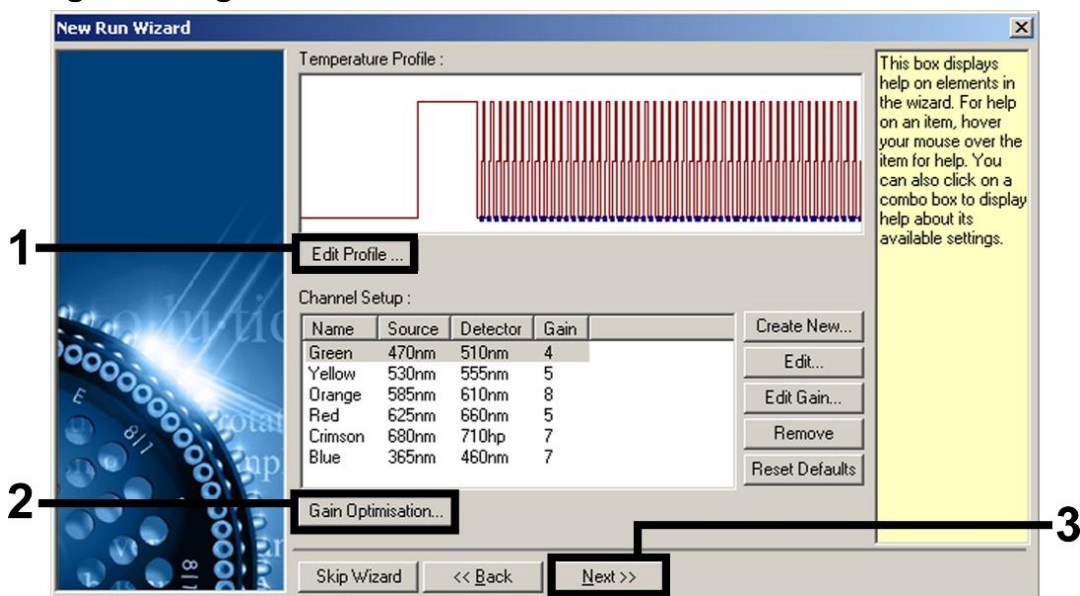
7. Välj 50 för PCR-reaktionsvolymen och klicka på "Next" (figur 2).



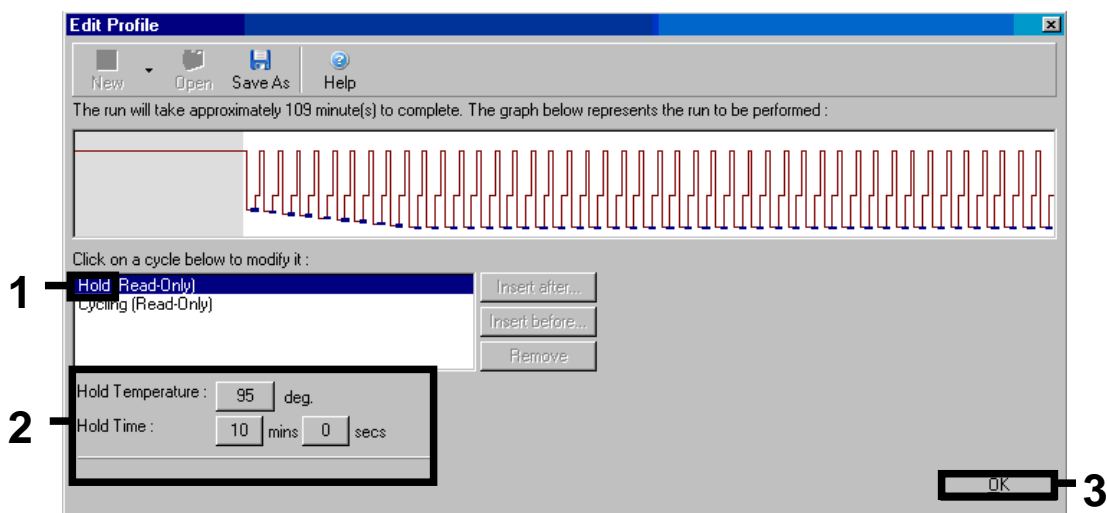
Figur 2. Inställning av allmänna analysparametrar.

Obs! Även om den fysiska reaktionsvolymen är 25 µl, måste du se till att du väljer 50 för reaktionsvolymen i Rotor-Gene-programvaran.

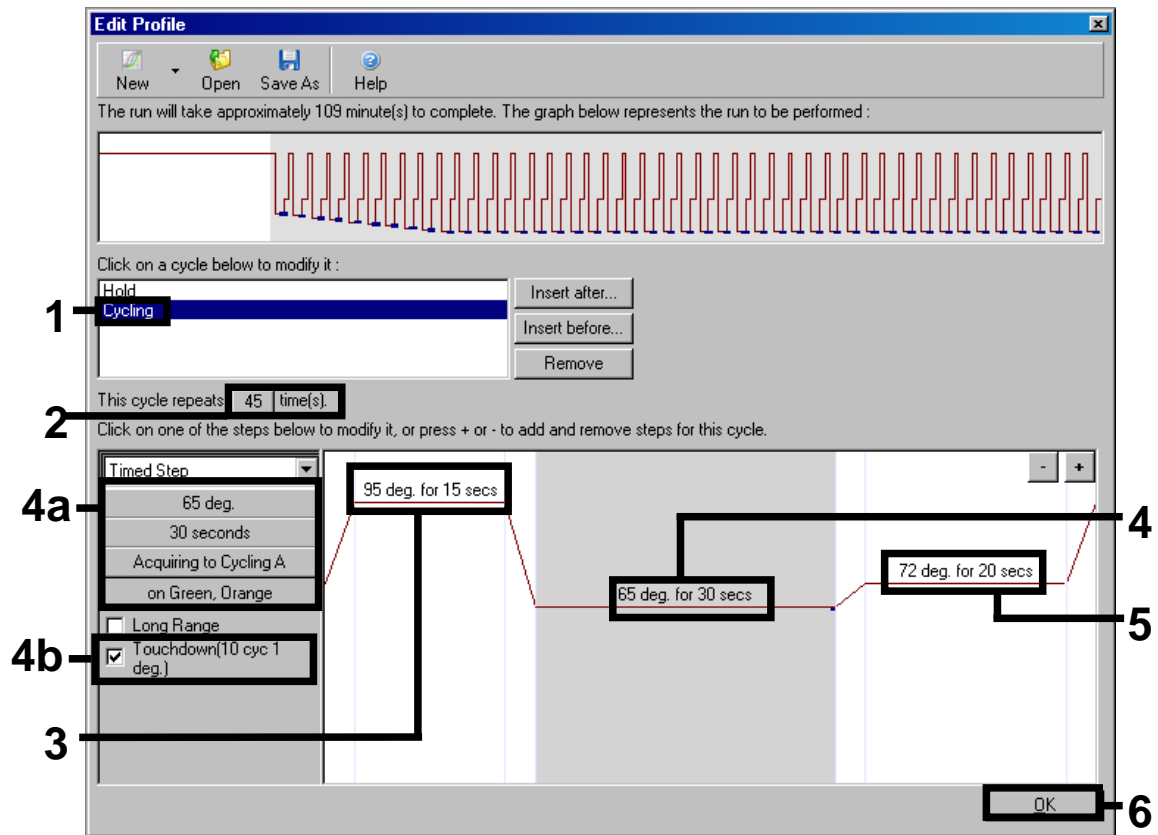
8. Klicka på knappen "Edit Profile" (Redigera profil) i nästa dialogruta "New Run Wizard", (figur 3), och programmera temperaturprofilen enligt bild i figurerna 3–5.



Figur 3. Redigering av profilen.

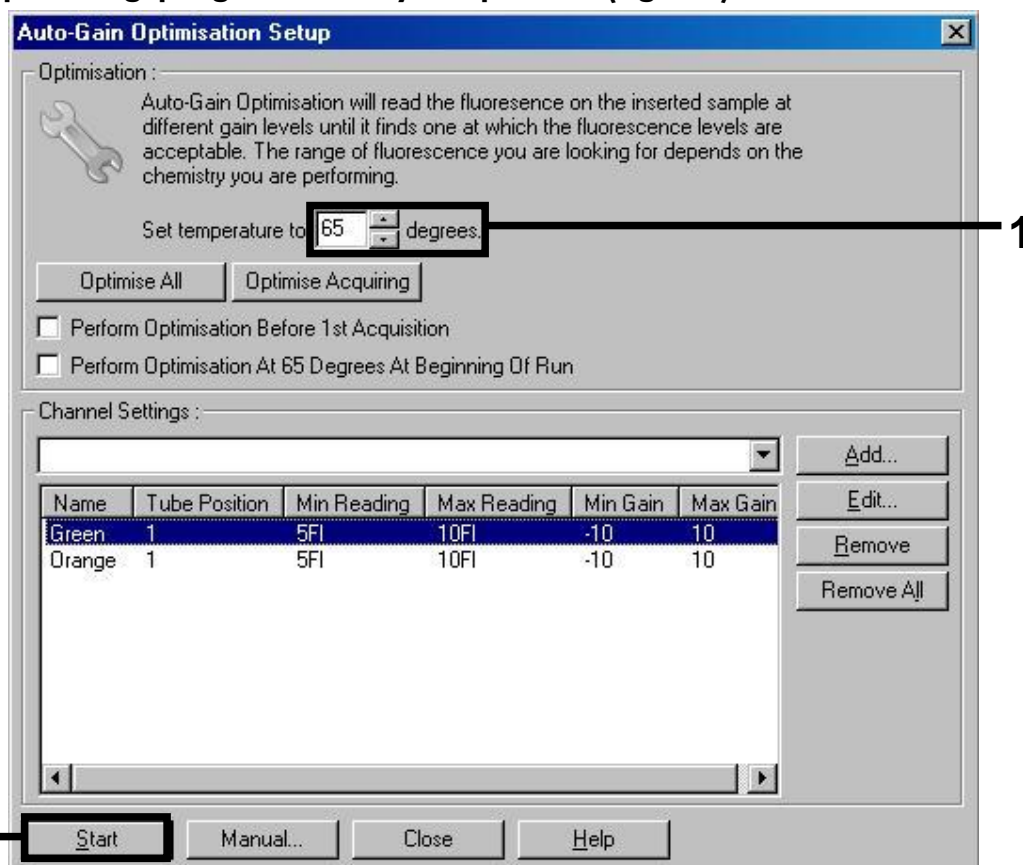


Figur 4. Första aktivering av enzym med varmstart.



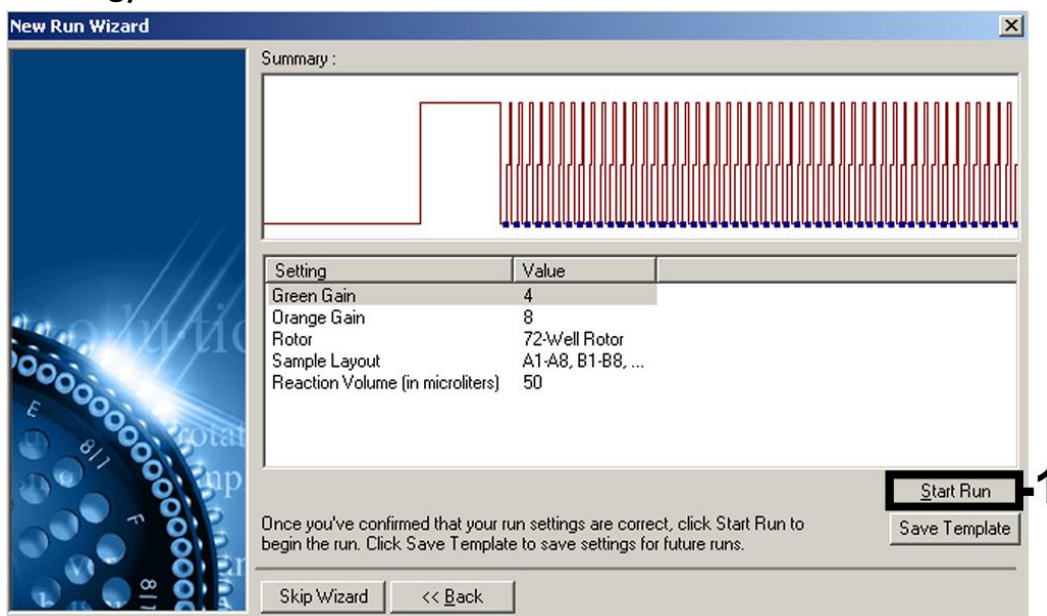
Figur 5. DNA-amplifiering. Kontrollera att du har aktiverat den slutliga funktionen för tio cykler i glödgningssteget.

9. Detektionsintervallet för fluorescenskanalerna måste fastställas enligt fluorescensintensiteterna i PCR-rören. Klicka på "Gain Optimisation" (Optimeringsvinst) i dialogrutan "New Run Wizard", (se figur 3) för att öppna dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" (Inställningar av automatisk optimeringsvinst). Ställ in kalibreringstemperaturen på 65 så att den stämmer överens med amplifieringsprogrammets kyltemperatur (figur 6).



Figur 6. Justering av fluorescenskanalssensitiviteten.

10. De förstärkningsvärden som fastställs av kanalkalibreringen sparas automatiskt och anges i det sista menyfönstret i programmeringsproceduren (figur 7). Klicka på "Start Run" (Starta körning).



Figur 7. Start av körningen.

Tolkning av resultat

Kvantifiering

De medföljande kvantifieringsstandarderna (BK Virus RG QS 1–4) behandlas på samma sätt som redan isolerade prover och används i samma volym (15 μ l). För att generera en standardkurva på Rotor-Gene Q-instrument ska alla 4 kvantifieringsstandarder användas och definieras i dialogrutan "Edit Samples" (Redigera prover) som standarder med specificerade koncentrationer (se instrumentets användarhandbok).

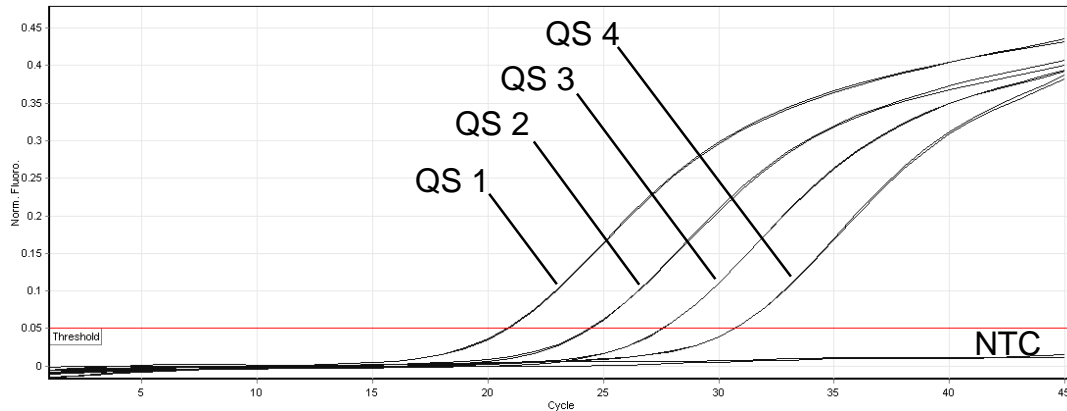
Obs! Kvantifieringsstandarderna definieras som kopior/ μ l. Följande ekvation måste användas för att omvandla de fastställda värdena med hjälp av standardkurvan till kopior/ml provmaterial:

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

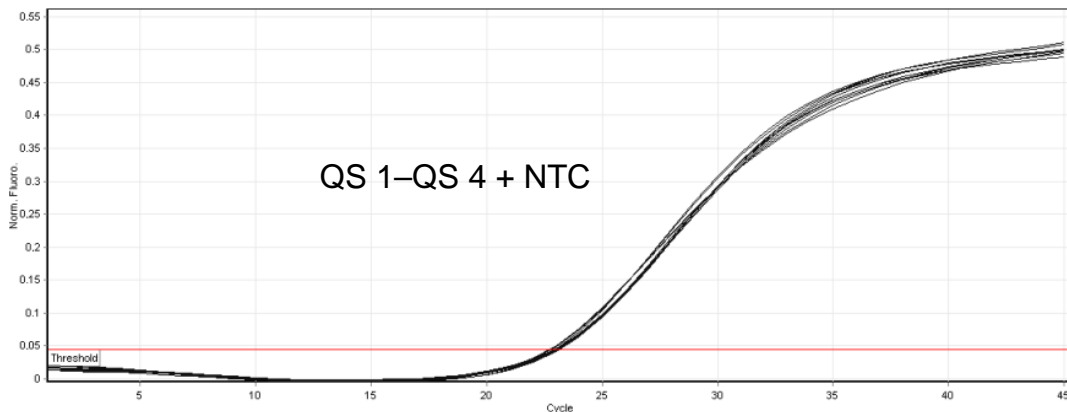
Principiellt ska den inledande provvolymen ifyllas i ekvationen ovan. Tag hänsyn till denna när provvolymen har förändrats före extraheringen av nukleinsyra (till exempel reducering av volymen genom centrifugering eller ökning av volymen genom att tillsätta den volym som krävs för isoleringen).

Resultat

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner ges i figur 8 och figur 9.



Figur 8. Detektion av kvantifieringsstandarderna (BK-virus RG QS 1-4) i fluorescenskanalen Cycling Green. NTC: Kontroll utan mall (negativ kontroll).



Figur 9. Detektion av den interna kontrollen (IC) i fluorescenskanalen Cycling Orange med samtidig amplifiering av kvantifieringsstandarderna (BK-virus RG QS 1-4). NTC: Kontroll utan mall (negativ kontroll).

En signal har upptäckts i fluorescenskanalen "Cycling Green" (grön återvinning).

Analysresultatet är positivt: provet innehåller BK-virus-DNA.

I det här fallet är detektionen av en signal i kanalen Cycling Orange umbärlig, eftersom höga inledande koncentrationer av BK-virus-DNA (positiv signal i kanalen Cycling Green) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för den interna kontrollen i kanalen Cycling Orange (konkurrens).

I fluorescenskanalen "Cycling Green" har ingen signal upptäckts. På samma gång syns en signal från den interna kontrollen i kanalen Cycling Orange.

I provet upptäcks inget BK-virus-DNA. Det kan betraktas som negativt.

Om PCR för BK-virus är negativ utesluter den detekterade signalen i den interna kontrollen möjligheten av en inhibition av PCR.

Ingen signal har detekterats i kanalerna Cycling Green respektive Cycling Orange.

Det går inte att komma fram till några resultat.

Information om felkällor och deras lösning kan du hitta i "Felsökningshandbok" nedan.

Felsökningshandbok

Denna felsökningshandbok kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För ytterligare information, se även sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag

Ingen signal med positiva kontroller (BK-virus RG QS 1–4) i fluorescenskanalen Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Den valda fluorescenskanalen för PCR-dataanalys stämmer inte överens med protokollet | För dataanalys väljer du fluorescenskanalen Cycling Green för den analytiska PCR för BK-virus och fluorescenskanalen Cycling Orange för den interna kontrollen av PCR. |
| b) Felaktig programmering av temperaturprofilen för Rotor-Gene-instrumentet | Jämför temperaturprofilen med protokollet. Se "Protokoll: PCR och dataanalys", sidan 13. |
| c) Felaktig konfiguration av PCR | Kontrollera ditt arbete med användning av pipetteringsschemat och upprepa PCR-analysen vid behov. Se "Protokoll: PCR och dataanalys", sidan 13. |

Kommentarer och förslag

- d) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagens" (sidan 10).
Kontrollera reagensernas förvaringsvillkor och utgångsdatum (se kitetiketten) och använd ett nytt kit vid behov.
- e) Utgångstiden för *artus* BK-virus RG-PCR-kitet har passerats
Kontrollera reagensernas förvaringsvillkor och utgångsdatum (se kitetiketten) och använd ett nytt kit vid behov.

Svag eller obefintlig signal för den interna kontrollen för ett negativt plasma- eller urinprov som renats med hjälp av *artus* BK-virus RG PCR-kitet i fluorescenskanalen Cycling Orange och samtidig frånvaro av signal i kanalen Cycling Green

- a) Villkoren för PCR stämmer inte överens med protokollet
Kontrollera villkoren för PCR (se ovan) och upprepa reaktionen med korrekt inställningar vid behov.
- b) PCR inhiberades
Säkerställ att du använder den rekommenderade isoleringsmetoden och noggrant följer tillverkarens anvisningar.
- c) DNA förlorades under extraktion
Om den interna kontrollen tillsattes i extraheringen kan en frånvarande signal för den interna kontrollen tyda på att DNA gått förlorad under extraheringen. Säkerställ att du använder den rekommenderade isoleringsmetoden (se "DNA-isolering", sidan 11) och noggrant följer tillverkarens anvisningar.
- d) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagens" (sidan 10).
Kontrollera reagensernas förvaringsvillkor och utgångsdatum (se kitetiketten) och använd ett nytt kit vid behov.
- e) Utgångstiden för *artus* BK-virus RG-PCR-kitet har passerats
Kontrollera reagensernas förvaringsvillkor och utgångsdatum (se kitetiketten) och använd ett nytt kit vid behov.

Kommentarer och förslag

Signaler med de negativa kontrollerna i fluorescenskanalen Cycling Green i den analytiska PCR

- | | |
|---|---|
| a) Kontamination inträffade under förberedelse av PCR | Upprepa PCR med nya reagenser i replikat.
Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas.
Se till att pipettera den positiva kontrollen sist.
Kontrollera med jämna mellanrum att arbetsytan och instrumenten är dekontaminerade. |
| b) Kontamination inträffade 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. |

Kvalitetskontroll

I enlighet med QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem testas varje lot av *artus* BK-virus RG PCR-kitet mot förutbestämda specifikationer för att garantera enhetlig produktkvalitet.

Begränsningar

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.

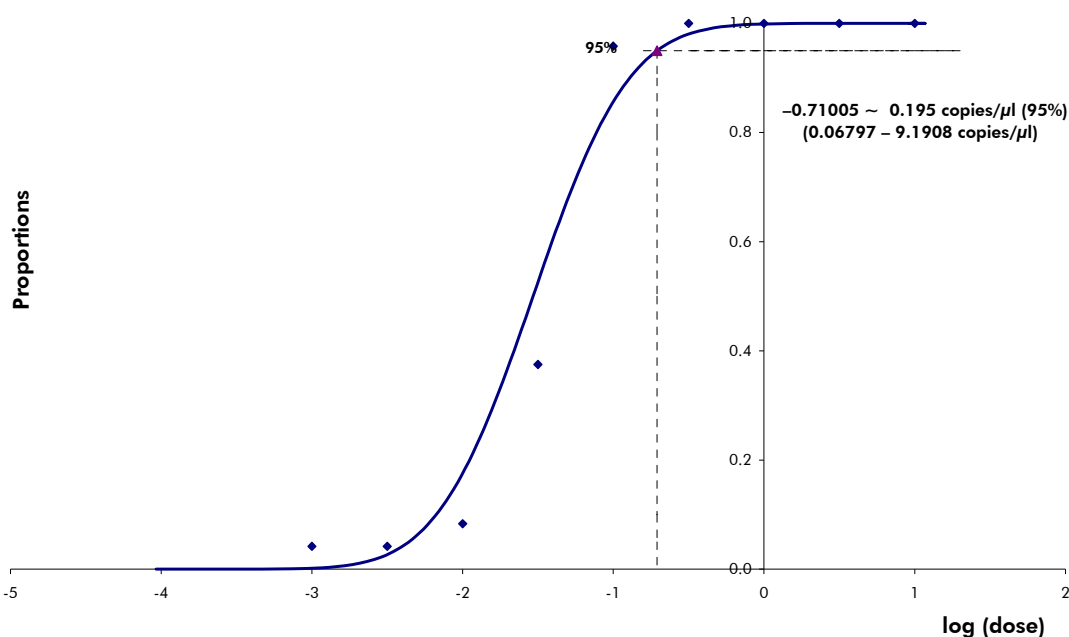
Även om det i sällsynta fall kan uppkomma mutationer inom virusgenomets i hög grad bevarade områden, vilka täcks av satsens primrar och/eller prob, kan dessa kvantifieras i underkant eller kan befintligheten av virus i dessa fall missas att upptäckas. Därför granskas analysens giltighet och prestanda med jämna mellanrum.

Prestandaegenskaper

Analytisk sensitivitet

För att bestämma den analytiska sensitiviteten för *artus* BK-virus RG PCR-kitet ordnades en standardspädningsserie från 10 till nominellt 0,001 kopieekvivalenter/ μ l och analyserades i Rotor-Gene 6000 i kombination med

artus BK-virus RG PCR-kitet. Testningen utfördes under 3 olika dagar med 8 replikat. Resultaten fastställdes genom en probitanalys. En grafisk bild av probitanalysen i Rotor-Gene 6000 visas i figur 10. Den analytiska detektionsgränsen för *artus* BK-virus RG PCR-kitet i kombination med Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 är 0,195 kopior/ml ($p = 0,05$). Detta innebär att det finns en 95-procentig sannolikhet att 0,195 kopior/ μ l kommer att detekteras.



Figur 10. Probitanalys: BK-virus (Rotor-Gene 6000). Analytisk sensitivitet för *artus* BK-virus RG PCR-kitet i Rotor-Gene 6000.

Specificitet

Specificiteten för *artus* BK-virus 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. Möjligheten att detektera alla relevanta stammar har på det viset garanterats genom en justering av databasen och genom en PCR-körning i Rotor-Gene-instrument med följande stammar (se tabell 4).

Tabell 4. Testning av relevanta stammars specificitet

Virus	Stam	Källa	BK-virus (Cycling Green)	Intern kontroll (Cycling Orange)
BK-virus	Dunlop	ATCC*	+	+
BK-virus	Gardner	ATCC	+	+
BK-virus	AB269822	Geneart	+	+
BK-virus	S72390	Geneart	+	+

* American Type Culture Collection.

Dessutom utvärderades specificiteten med 30 olika BK-virusnegativa plasmaprover. Dessa genererade inte några signaler med BK-virus-specifika primrar och prober, vilka ingår i BK-virus RG-mastern.

En potentiell korsreaktivitet för *artus* BK-virus RG PCR-kitet testades med hjälp av den kontrollgrupp som anges i tabell 5. Ingen av de testade patogenerna har varit reaktiv. Inga korsreaktiviteter visade sig med blandade infektioner.

Tabell 5. Testning av kitets specificitet med potentiellt korsreaktiva patogener

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

Precision

Precisionsuppgifter för *artus* BK-virus RG PCR-kitet har samlats in med användning av Rotor-Gene-instrument och möjliggör bestämning av analysens totala varians. 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). De uppgifter som erhöles användes för att fastställa standardavvikelsen, variansen, variationskoefficienten för den specifika patogenen och den interna kontrollen för PCR.

Precisionsdata för *artus* BK-virus RG PCR-kitet har samlats in med hjälp av kvantifieringsstandarderna för den lägsta koncentrationen (QS 4; 1×10^1 kopior/ μ l). Testning utfördes med 8 replikat. Precisionsdata beräknades med utgångspunkt från C_T -värdena för amplifieringskurvorna (C_T : tröskelcykel, se tabell 6). Baserat på dessa resultat är den totala statistiska spridningen för ett givet prov med nämnd koncentration 2,11 % (C_T), och 3,59 % (C_T) för

detektionen av den interna kontrollen. Dessa värden baseras på slutsumman för alla enskilda värden av de fastställda variabiliteterna.

Tabell 6. Precisionsdata på grundval av C_T-värdena

	C _T - värde	Standardavvikelse	Variationskoefficient (%)
Intraanalysvariabilitet: BK Virus RG QS 4	29,45	0,17	0,56
Intraanalysvariabilitet: Intern kontroll	24,31	0,12	0,49
Interanalysvariabilitet: BK Virus RG QS 4	29,42	0,25	0,85
Interanalysvariabilitet: Intern kontroll	23,30	0,77	3,30
Interbatchvariabilitet: BK Virus RG QS 4	30,31	0,64	2,10
Interbatchvariabilitet: Intern kontroll	22,53	0,40	1,78
Total varians: BK Virus RG QS 4	29,80	0,63	2,11
Total varians: Intern kontroll	23,12	0,83	3,59

Robusthet

Genom verifiering av robustheten går det att fastställa den totala felfrekvensen för *artus* BK-virus RG PCR-kitet. I detta syfte spetsades 30 BK-virusnegativa prover med 1 kopia/ μ l elueringsvolym av BK-viruskontroll-DNA (ungefär fem gånger koncentrationen av den analytiska sensitivitetsgränsen). Efter extraktion med användning av EZ1[®] DSP-viruskitet (se "DNA-isolering", sida 11) analyserades dessa prover med *artus* BK-virus RG PCR-kitet. Felfrekvensen var 0 % för alla de 30 proven. Dessutom utvärderades robustheten för den interna kontrollen genom rening och analys av 30 BK-virusnegativa prover. Den totala felfrekvensen var 0 %. Inhibitioner observerades inte. Robustheten för *artus* BK-virus RG PCR-kitet är således ≥ 99 %.

Reproducerbarhet

Med hjälp av reproducerbarhetsdata är det möjligt att regelbundet utvärdera prestandan för *artus* BK-virus RG PCR-kitet och att göra en effektivitetsjämförelse med andra produkter. Dessa uppgifter erhålls vid deltagande i etablerade kunskapsprogram.

Diagnostisk utvärdering

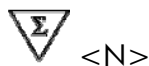
För närvarande genomgår *artus* BK-virus RG PCR-kitet en serie av utvärderingsstudier.

Litteraturhänvisningar

QIAGEN upprätthåller en stor och uppdaterad databas online med vetenskapliga publiceringar där QIAGEN-produkter används. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera tillämpning, forskningsområde, titel osv.

Om du vill ha en fullständig referenslista kan du besöka QIAGEN:s referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakta QIAGEN:s tekniska serviceavdelning eller din lokala distributör.

Symboler



Innehåller reagenser som räcker för <N> tester



Utgångsdatum



Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



GTIN-artikelnnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt center för teknisk support på www.qiagen.com/Support eller ring en av QIAGEN:s avdelningar för teknisk support eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Master, 4 kvantifieringsstandarder, intern kontroll, magnesiumlösning, vatten (PCR-kvalitet)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96)	För 96 reaktioner: Master, 4 kvantifieringsstandarder, intern kontroll, magnesiumlösning, vatten (PCR-kvalitet)	4514265
EASYartus BK Virus RG PCR Kits – för fullständigt CE-IVD-överensstämmande integrerad automatisk provrening och patogendetektion		
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 1	För 48 virusnukleinsyrapreparat och 24 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11423
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 2	För 48 virusnukleinsyrapreparat och 48 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	EA11424
EZ1 DSP Virus Kit – för automatisk, simultan rening av virus-DNA och -RNA från 1–14 prover av human plasma, serum eller CSF		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	För 48 virusnukleinsyrapreparat: Förfyllda reagenskassetter, engångsspetshållare, engångsfilterspetsar, provrör, elueringsrör, buffertar, bärar-RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002022

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002043
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning i en standarduppsättning på 8 x 12 med 96 x 0,2 ml rör	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor för 4 rör och lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor för 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 tunnväggiga rör för 1 000 reaktioner	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1 000 tunnväggiga rör för 10 000 reaktioner	981008

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:s tekniska serviceavdelning eller från lokal återförsäljare.

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

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.

Varumärken: QIAGEN®, *artus*®, EASY*artus*®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Begränsat licensavtal

Användningen av denna produkt innebär att inköparen eller användaren av *artus* BK-virus RG PCR-kitet samtycker till följande villkor:

1. *artus* BK-virus RG PCR-kitet får endast användas i enlighet med handboken till *artus* BK-virus RG PCR-kitet och med de komponenter som ingår i kitet. QIAGEN beviljar inget tillstånd enligt någon av företagets immaterialrättigheter till att använda eller inkorporera de ingående komponenterna i detta kit med någon komponent som inte ingår i kitet enligt beskrivning i handboken till BK-virus RG 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 frånsäger 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.

© 2009-2014 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)

