

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Manuál



24 (Katalogové čís. 4511263)

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s artus[™] 3000 a Rotor-Gene[®] 3000

Verze 1



4511263



1046936CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R2

MAT

1046936CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

1. Obsah	5
2. Skladování	5
3. Další potřebné vybavení	6
4. Všeobecná preventivní opatření	6
5. Informace o původcích	7
6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase	8
7. Popis produktu	8
8. Protokol	9
8.1 Preanalytika: Odběr, skladování a přeprava vzorků.....	9
8.2 Izolace RNA.....	10
8.3 Interní kontrola.....	12
8.4 Kvantifikace	13
8.5 Příprava PCR	14
8.6 Programování <i>artus 3000</i> nebo <i>Rotor-Gene 3000</i>	18
9. Vyhodnocení	22
10. Řešení problémů	24
11. Specifikace	26
11.1 Analytická senzitivita.....	26
11.2 Specificita	26
11.3 Přesnost	27
11.4 Robustnost	28
11.5 Reprodukovatelnost.....	29
11.6 Diagnostické hodnocení.....	29

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu	29
13. Varování a bezpečnostní opatření.....	29
14. Kontrola kvality	30
15. Literatura.....	30
16. Vysvětlení symbolů	31

artus SARS RG RT-PCR Kit

Pro použití s artus 3000 nebo Rotor-Gene 3000*.

1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. čís. 4511263 24 reakcí
Modrá	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Červená	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Červená	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Červená	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Červená	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Zelená	SARS-CoV LC/RG/TM IC [‡]	1 x 1 000 μl
Bílá	Water (PCR grade)	1 x 1 000 μl

[‡] QS = Kvantifikační standard
IC = Interní kontrola

2. Skladování

Komponenty artus SARS RG RT-PCR Kit se skladují při –30 °C až –15 °C a mají trvanlivost do data uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2 x), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagentie alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě +4°C, skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

* artus SARS RG RT-PCR Kit může být použit i ve spojení s Rotor-Gene™ 2000.

3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- RNA-izolační souprava (viz **8.2 Izolace RNA**)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vortex mixer
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- *artus 3000* nebo *Rotor-Gene 3000*
- PCR zkumavky s objemem 0,1 ml pro použití 72 jamkového rotoru (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699982;
0.1 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: ST-1001)
- Alternativně: PCR zkumavky s objemem 0,2 ml pro použití 36-ti jamkového rotoru (např. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: SE-1003F)
- Chladicí blok (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. Všeobecná preventivní opatření

Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Skladujte, izolujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, kontroly, amplifikáty) do reakce na jiném místě než ostatní reagenty.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte plynule na ledu nebo v chladicím bloku (72/96 well loading block).

5. Informace o původcích

Coronaviry patří do čeledi *Coronaviridae* a jde o velké obalené RNA viry s pozitivní šroubovicí, které u člověka a domácích zvířat způsobují vysoce virulentní choroby. Dva dosud známé lidské koronaviry způsobují třetinu normálních nemocí z nachlazení a nozokomiálních infekcí horních cest dýchacích u předčasně narozených dětí.

Nový člen čeledi koronavirů je považován za původce těžkého akutního syndromu horních cest dýchacích („Severe Acute Respiratory Syndrom“, SARS). Část genu polymerázy SARS koronaviru (SARS CoV) byla u pacienta identifikována v Institutu Bernharda Nochta pro tropickou medicínu v Hamburku a ve spolupracujících laboratořích pro PCR. Na základě tohoto testu byl vyvinut komerční Real-Time RT-PCR-System pro přímý průkaz SARS CoV. PCR dokáže detekovat genetický materiál viru SARS CoV v různých vzorcích (krev, sekrety dýchacích cest nebo tkáně).

Vyhodnocení výsledků testu

Důležité: Dodržujte prosím oficiální pokyny Světové zdravotnické organizace (WHO) na následující internetové adrese: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Pozitivní výsledky testu: Pozitivní SARS CoV test poukazuje na SARS CoV infekci, i když pacient nevykazuje žádné symptomy nemoci SARS.

Negativní výsledky testu: Negativní SARS CoV test onemocnění SARS nevyklučuje. Důvody negativního výsledku testu u pacientů se SARS symptomy mohou být:

- V době odběru nebyl virus ve vzorku obsažen (zatím je nejasné, v jakém stádiu patogeneze SARS CoV je virus v určitém vzorku možno dokázat).
- Pacient vykazuje symptomy podobné onemocnění SARS, které jsou však vyvolány jiným původcem.

6. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat testovací zkumavky (Mackay, 2004).

7. Popis produktu

artus SARS RG RT-PCR Kit je systém k přímému použití pro průkaz SARS CoV RNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v *artus 3000* nebo *Rotor-Gene 3000*. *SARS-CoV RG/TM Master* obsahuje reagentie a enzymy

pro reverzní transkripci a specifickou amplifikaci 92 bp dlouhého úseku genomu SARS CoV a dále pro bezprostřední detekci amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM přístroje *artus 3000* popř. *Rotor-Gene 3000*. Kromě toho obsahuje *artus SARS RG RT-PCR Kit* druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako *Interní kontrola (IC)* ve fluorescenčním kanálu

Cycling A.JOE. Limit detekce analytické SARS CoV RT-PCR (viz

11.1 Analytická senzitivita) přitom není negativně ovlivněn. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*), s jejichž pomocí lze určit množství původce ve vzorku. Prostudujte si prosím oddíl **8.4 Kvantifikace**.

8. Protokol

8.1 Preanalytika: Odběr, skladování a přeprava vzorků

Upozornění: Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Důležité: Dosud známé údaje prokazují sputum jako nejvhodnější vzorek pro průkaz SARS CoV. Doporučujeme tedy používání tohoto materiálu s *artus SARS RG RT-PCR Kit*.

Interní validace *artus SARS RG RT-PCR Kit* byla provedena pomocí sérových vzorků. Jiné vzorky jako BAL, nasofaryngeální výplach, výtěry, plicní tkáň a sputum ještě nejsou zcela validovány. Prosím používejte pro přípravu vzorku pouze doporučené RNA-izolační soupravy (viz **8.2 Izolace RNA**).

U určitých vzorků je nezbytné dodržovat zvláštní předpisy pro odběr, skladování a přepravu.

Upozornění: Dbejte také oficiálních pokynů Světové zdravotnické organizace (WHO) na následující internetové stránce: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Odběr vzorků

Pro odběr výtěrových vzorků používejte prosím následující materiály:

Používejte pouze výtěrové tampony se špičkou z Dacronu[®] nebo Rayonu a s násadami z plastu. **Nepoužívejte výtěrové tampony s dřevěnými nebo hliníkovými násadami.**

8.1.2 Skladování vzorků

Výkonnost testu může být pravidelným zmrazováním nebo delším skladováním vzorků narušena.

Vzorky se skladují při 2 - 8°C. (Pokud musí být výtěrové vzorky do výzkumné laboratoře zaslány, musí být odeslány co nejdříve po odběru v souladu s laboratorními předpisy pro přepravu SARS CoV).

Výtěrové vzorky, které nebudou testovány bezprostředně po doručení do laboratoře, musí být uskladněny při 2 - 8°C a během jednoho dne zpracovány. Výtěrové vzorky, které nemohou být zpracovány do jednoho dne po odběru, musí být uskladněny při -20°C a méně a testovány do 30-ti dnů po odběru.

8.1.3 Přeprava vzorků

Výtěrové vzorky musí být přepravovány v chladu.

Musí-li být výtěrové vzorky do laboratoře zaslány, je nutné je odeslat co nejdříve po odběru v souladu s laboratorními předpisy pro přepravu v chladu. Vzorky musí být zaslány podle platných místních a státních předpisů pro přepravu látek vyvolávajících nákazu.*

8.2 Izolace RNA

RNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. V závislosti na protokolu zvoleného výrobce použijte dané množství vzorku a proveďte izolaci RNA podle návodu. Doporučujeme následující izolační soupravy:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
sputum, sérum, BAL, nasofaryngeální výplach výtěru	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	obsažen
plicní tkáň	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	neobsažen

Při používání sputa jako vzorku dbejte prosím následujícího pokynu: Vzorek připravíte tak, že jej v jedné zkumavce stejným dílem smícháte s 0,9 % roztokem NaCl, který obsahuje 1 % N-Acetylcysteinu (Sigma kat. č. A8199) (např. 300 µl sputa + 300 µl NaCl směsi). Po inkubaci směsi, trvající 30 minut při pokojové teplotě, přidejte 140 µl lysátu pro následující izolaci RNA pomocí QIAamp Viral RNA Mini Kit. Dále se držte protokolárních údajů výrobce.

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

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosiče RNA dodávaného s QIAamp Viral RNA Mini Kit, doporučujeme následující postup lišící se od údajů uvedených v příručce izolační soupravy:
 - a. Resuspendujte lyofilizovaný nosič RNA před prvním použitím izolační soupravy v 310 μl elučního pufru obsaženého v soupravě (konečná koncentrace 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, nepoužívejte lyzační pufr). Rozdělte tento roztok nosiče RNA na počet alikvotů odpovídající Vaším požadavkům a skladujte je při -20°C . Zabraňte opakovanému rozmrazení ($> 2 \times$) alikvotu nosiče RNA.
 - b. Před začátkem každé izolace musí být podle následujícího pipetovacího schématu čerstvě vytvořena směs lyzačního pufru a nosiče RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **8.3 Interní kontrola**):

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr AVL	560 μl	6 720 μl
Nosič RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Celkový objem	565,6 μl	6 787,2 μl
Objem pro izolaci	560 μl	po 560 μl

- c. Tuto čerstvě vytvořenou směs lyzačního pufru a nosiče RNA vložte ihned do izolace. Skladování směsi není možné.
- Při izolaci využívající promývací pufr s obsahem **etanolu** bezpodmínečně zajistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
 - *artus* SARS RG RT-PCR Kit není vhodný pro izolace na bázi **fenolu**.

Důležité: *Interní kontrolu* soupravy *artus* SARS RG RT-PCR Kit lze vložit přímo do izolace (viz **8.3 Interní kontrola**).

8.3 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *Interní kontrola (SARS-CoV LC/RG/TM IC)*. Máte tak možnost kontrolovat **jak izolaci RNA, tak také možnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci *Interní kontrolu* v poměru 0,1 μ l na 1 μ l elučního objemu. Jestliže například používáte QIAamp Viral

RNA Mini Kit a eluujete RNA v 60 μ l AVE pufru, vložte 6 μ l *Interní kontroly*. Jestliže např. eluujete v 50 μ l, vložte 5 μ l. Množství vkládané *Interní kontroly* závisí **pouze** na elučním objemu. *Interní kontrola* a nosič RNA (viz **8.2 Izolace RNA**) by měly být přidávány pouze k

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs *Interní kontroly*, lyzačního pufru a nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *Interní kontroly* a ke snížení efektivity izolace). *Interní kontrolu* a nosič RNA **nepipetujte** přímo do vzorku.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 1 μ l *Interní kontroly* na jednu testovací směs přímo do 15 μ l SARS-CoV RG/TM Master. Pro každou PCR reakci použijte 15 μ l takto vytvořeného Master Mixu* a následně přidejte 10 μ l izolátu. Jestliže připravujete jeden běh pro více vzorků, zvyšte potřebná množství SARS-CoV RG/TM Master a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **8.5 Příprava PCR**).

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

8.4 Kvantifikace

S Kvantifikačnými standardy (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (10 µl). Standardní křivku v *artus 3000* nebo v *Rotor-Gene 3000* vytvoříte tak, že vložíte všechny čtyři Kvantifikační standardy dodávané s produktem, definujete je v okně menu *Edit Samples* jako standardy a zadáte uvedené koncentrace (viz *artus 3000 Software Manual* popř. *Rotor-Gene Manual*, verze 4.6). Tuto standardní křivku lze použít také pro následné kvantifikace, pokud je během aktuálního běhu použit alespoň jeden standard **jedné** definované koncentrace. K tomu je zapotřebí dříve vytvořenou standardní křivku importovat (viz *artus 3000 Software Manual* popř. *Rotor-Gene Manual*, verze 4.6). U této formy kvantifikace je však třeba zohlednit skutečnost, že v důsledku variability mezi PCR běhy může nastat odchylka ve výsledku.

Upozornění: Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{výsledek (kopie/ml)} = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

Prosím povšimněte si, že se do výše uvedeného vzorce dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

Důležité: Na www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX je k dispozici příručka pro zjednodušení kvantitativního vyhodnocení systémů *artus* na *artus 3000* popř. *Rotor-Gene 3000* (**Technical Note for quantitation on the *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000***).

8.5 Příprava PCR

Ověřte, že je chladič blok (příslušenství k *artus 3000* popř. *Rotor-Gene 3000*) předem vychlazen přibližně na +4°C. Vložte pro plánované reakce potřebný počet zkumavek pro PCR. Dbejte na to, aby byl společně s každým během PCR proveden alespoň jeden *KvantifikačnÝ standard* a jedna negativní kontrola (*Water, PCR grade*). Pro vytvoření standardní křivky použijte prosím u každého běhu PCR všechny spolu s produktem dodávané *KvantifikačnÝ standardy (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)*. Všechny reagenty se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo opětovné převrácení zkumavky) a následně centrifugovány.

Chcete-li *InternÝ kontrolou* kontrolovat **jak izolaci RNA, tak možnou inhibici PCR**, musí být napřed *InternÝ kontrola* přidána k izolaci (viz **8.3 Interní kontrola**). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	SARS-CoV RG/TM Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	0 μ l	0 μ l
	celkový objem	15 μ l	180 μ l
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 μ l	po 15 μ l
	vzorek	10 μ l	po 10 μ l
	celkový objem	25 μ l	po 25 μ l

Jestliže chcete *InternÝ kontrolu* použít **výhradně ke kontrole PCR inhibice**, je třeba ji přidat přímo do SARS-CoV RG/TM Master. V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

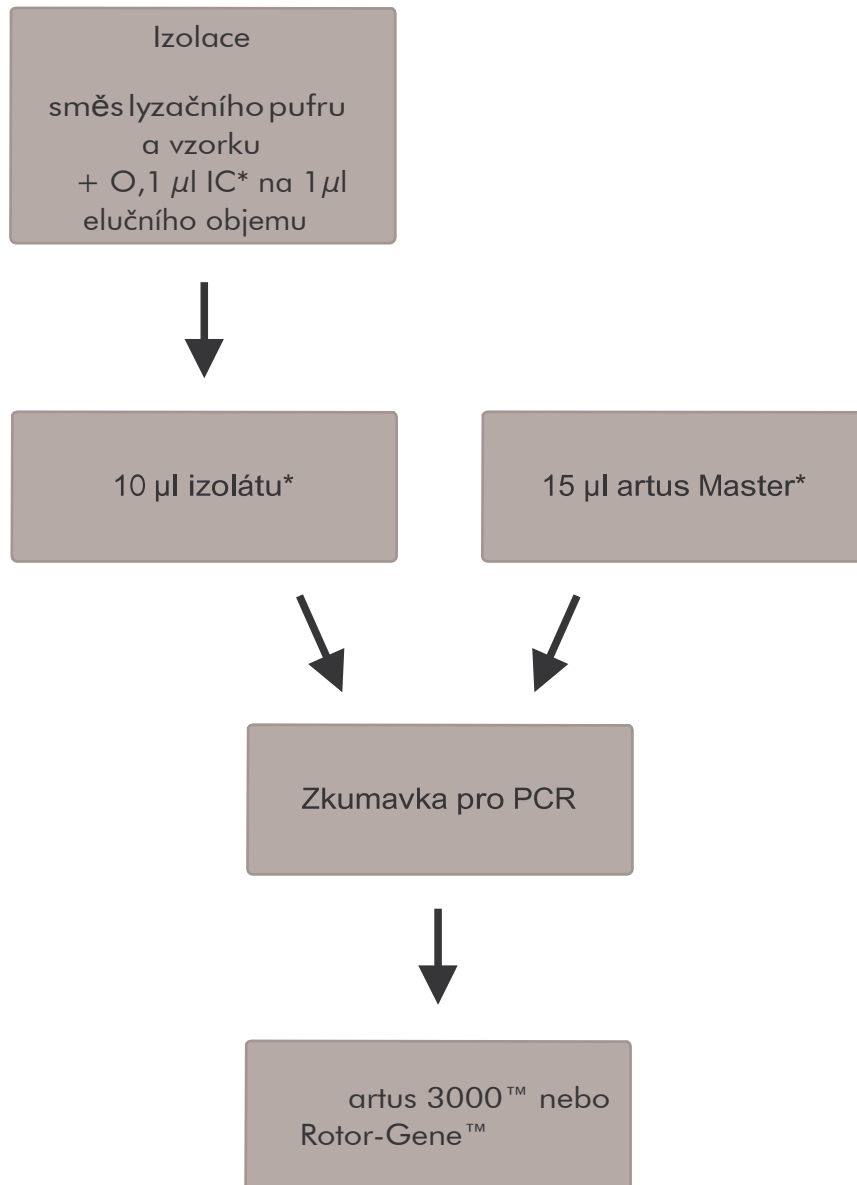
	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	SARS-CoV RG/TM Master	15 μ l	15 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	1 μ l	12 μ l
	celkový objem	16 μl*	192 μl*
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	15 μ l*	je 15 μ l*
	Vzorek	10 μ l	po 10 μ l
	celkový objem	25 μl	po 25 μl

Pipetujte do každé zkumavky pro PCR reakci 15 μ l Master Mixu. Následně přidejte 10 μ l eluátu z izolace RNA a řádně promíchejte opakovaným náběrem pipetou a jejím vypuštěním. Obdobně musíte přidat jako pozitivní kontrolu 10 μ l alespoň jednoho *KvantifikačnÝho standardu (SARS-CoV*

LC/RG/TM QS 1 - 4) a jako negativní kontrolu 10 μ l vody (*Water, PCR grade*). Uzavřete PCR zkumavky. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen *Locking Ring* (příslušenství k *artus 3000* popř. *Rotor-Gene 3000*), jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.

* Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita není omezena.

Přidání *Interní kontroly* k izolaci

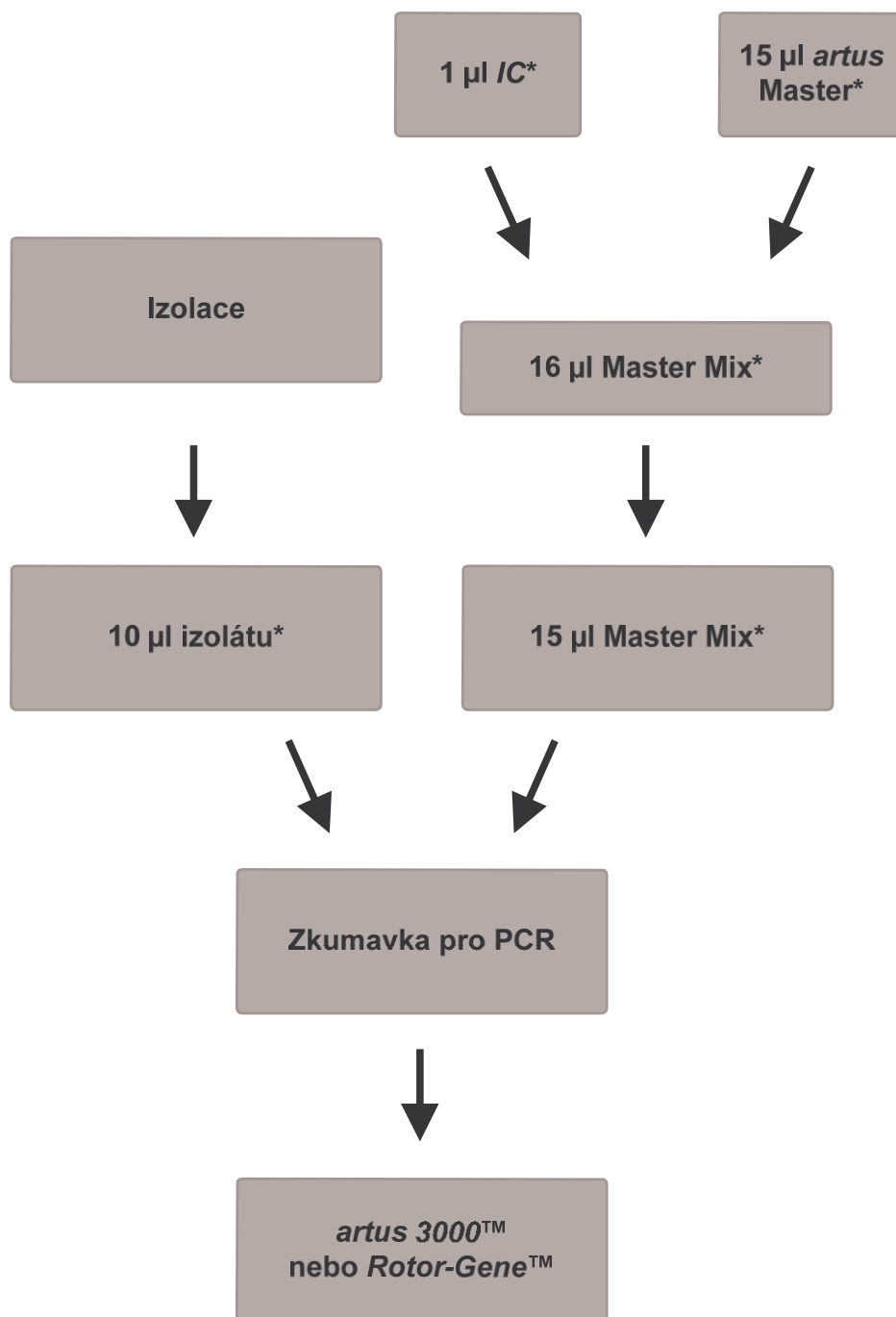


Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a PCR inhibice.

*

Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

Přidání *Interní kontroly* k *artus Master*



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu PCR inhibice.

* Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

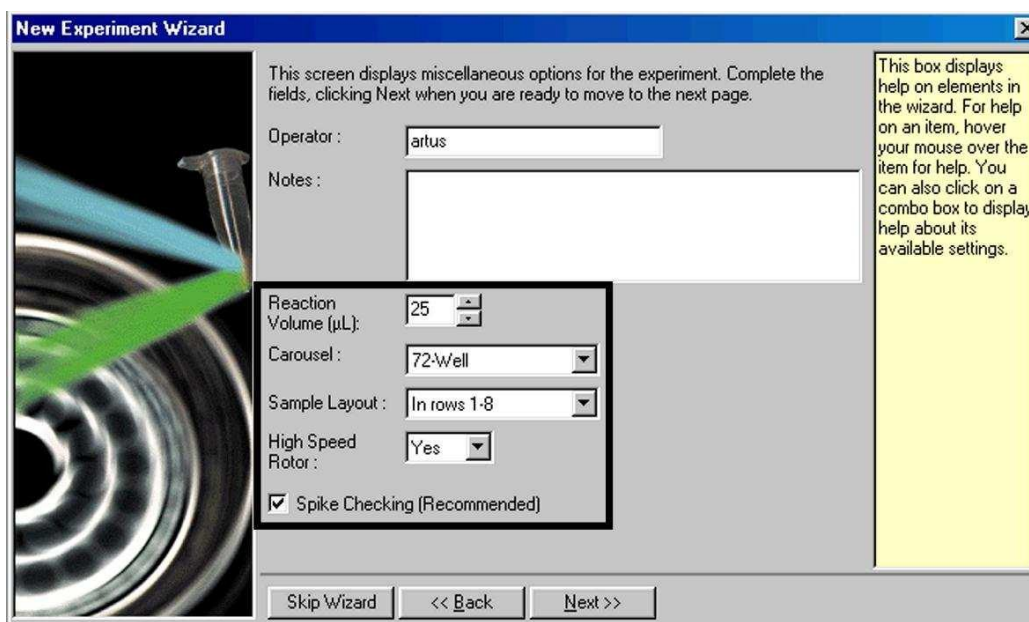
8.6 Programování *artus 3000* nebo *Rotor-Gene 3000*

Pro detekci SARS CoV RNA vytvořte na *artus 3000*[™] nebo *Rotor-Gene 3000* teplotní profil následujícími šesti pracovními kroky (viz Obr. 3 - 8):

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Nastavení obecných parametrů PCR | Obr. 3 |
| B. | Reverzní transkripce RNA | Obr. 4 |
| C. | Počáteční aktivace Hot Start enzymu | Obr. 5 |
| D. | Amplifikace cDNA | Obr. 6 |
| E. | Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů Start | Obr. 7 |
| F. | běhu <i>artus 3000</i> [™] nebo <i>Rotor-Gene</i> [™] 3000 | Obr. 8 |

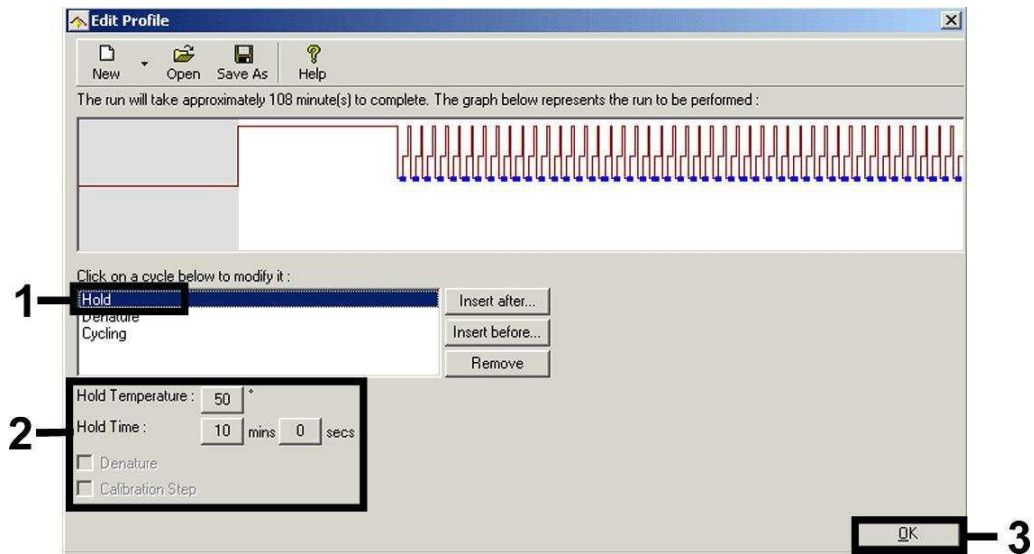
Veškeré údaje se vztahují na software *artus 3000*, verzi 5.0.69, a software *Rotor-Gene*, verzi 4.6.94. Podrobnosti k programování *artus 3000* nebo *Rotor-Gene 3000* si prostudujte v příručce *artus 3000 Software Manual* popř. *Rotor-Gene Manual*, verze 4.6. Na obrázcích jsou tato nastavení zvýrazněna černými rámečky.

Nejprve objem PCR reakce přeneste do okna menu *New Experiment Wizard* (viz Obr. 3).

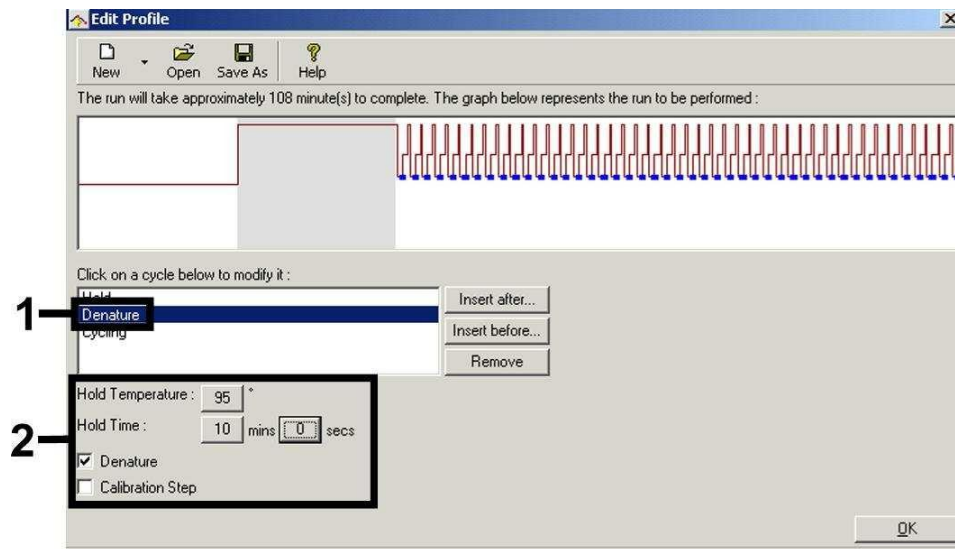


Obr. 3: Nastavení obecných parametrů PCR.

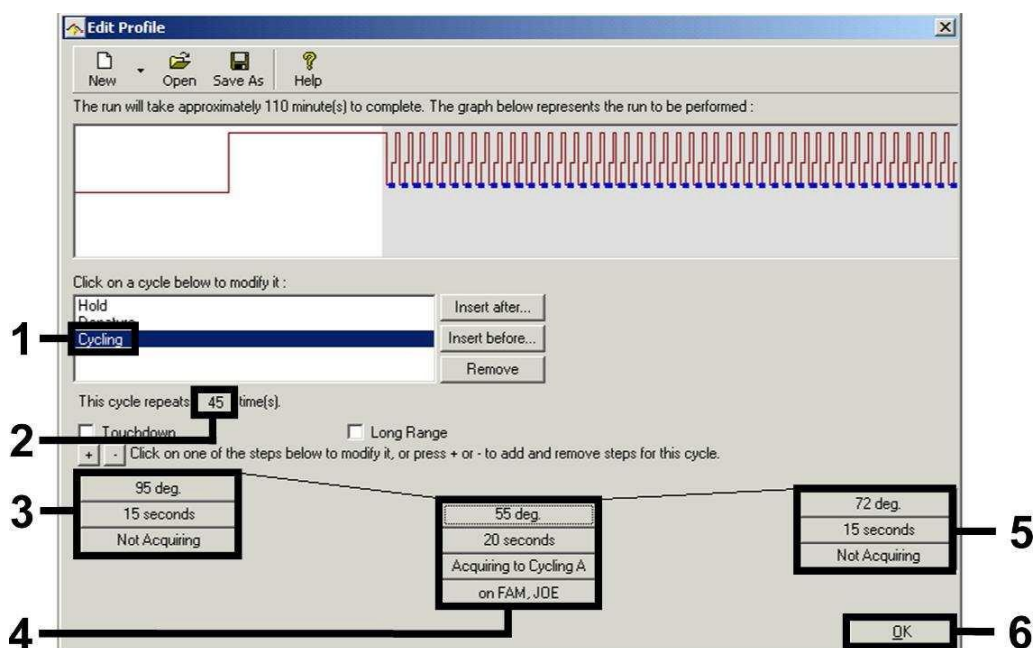
Programování teplotního profilu se provádí aktivací funkce *Edit* v dalším okně menu *New Experiment Wizard* (viz Obr. 4, 5 a 6).



Obr. 4: Reverzní transkripce RNA.

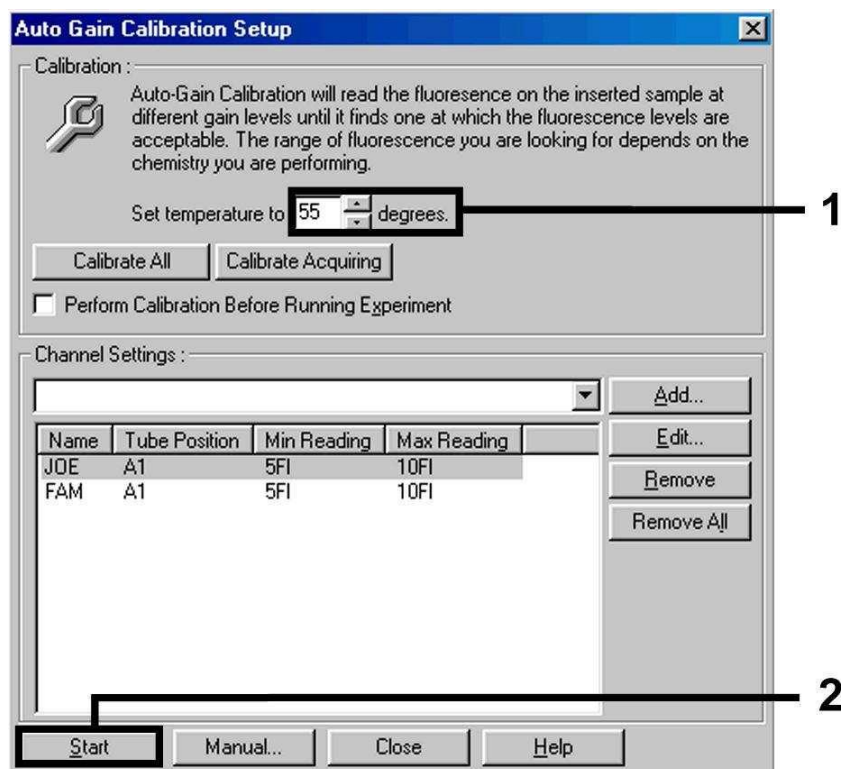


Obr. 5: Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



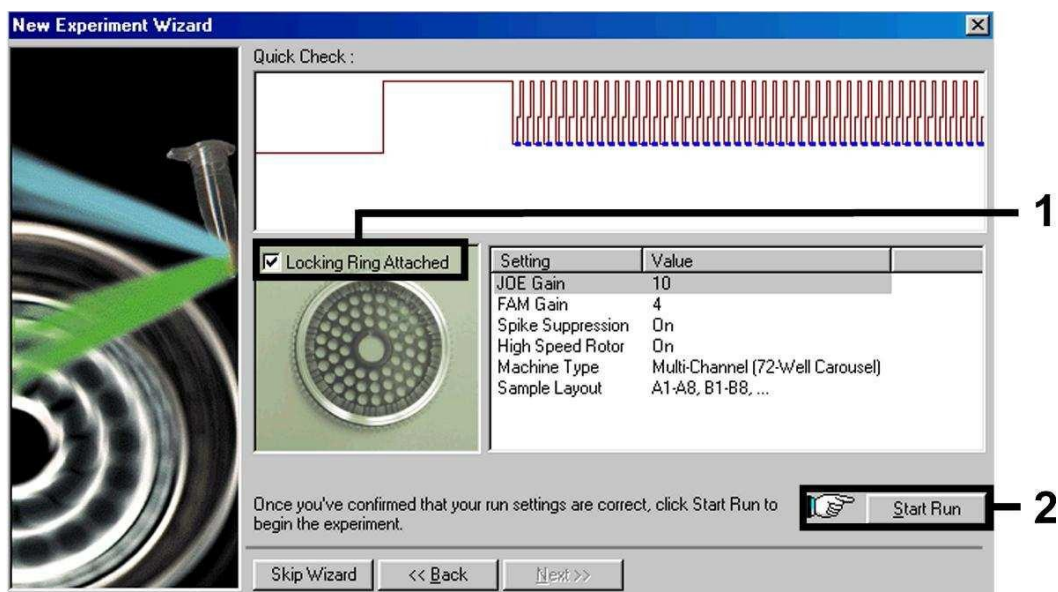
Obr. 6: Amplifikace cDNA.

Měřící rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity ve směsích PCR. Toto nastavení se provádí v okně menu *Auto Gain Calibration Setup* (aktivace v okně menu *New Experiment Wizard* pod *Calibrate*). Nastavte kalibrační teplotu na reasociační (annealing) teplotu amplifikačního programu (viz Obr. 7).



Obr. 7: Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.

Hodnoty *Gain* zjištěné kalibrací kanálu se automaticky uloží a jsou uvedeny v posledním okně menu programování (viz Obr. 8).



Obr. 8: Start běhu *artus 3000* nebo *Rotor-Gene 3000*.

9. Vyhodnocení

Vyhodnocení provádějte pomocí software *artus 3000* nebo *Rotor-Gene* podle návodu výrobce (*artus 3000 Software Manual* popř. *Rotor-Gene Manual*, verze 4.6).

Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM je detekován signál.

Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje SARS CoV RNA.

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling A.JOE podružná, protože vysoké výchozí koncentrace SARS CoV RNA (pozitivní signál v kanálu Cycling A.FAM) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* v kanálu Cycling A.JOE (kompetice).

2. Ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM není detekován žádný signál, nýbrž pouze v kanálu Cycling A.JOE (signál *Interní kontroly*).

Ve vzorku není prokazatelná žádná SARS CoV RNA. Lze jej proto považovat za negativní.

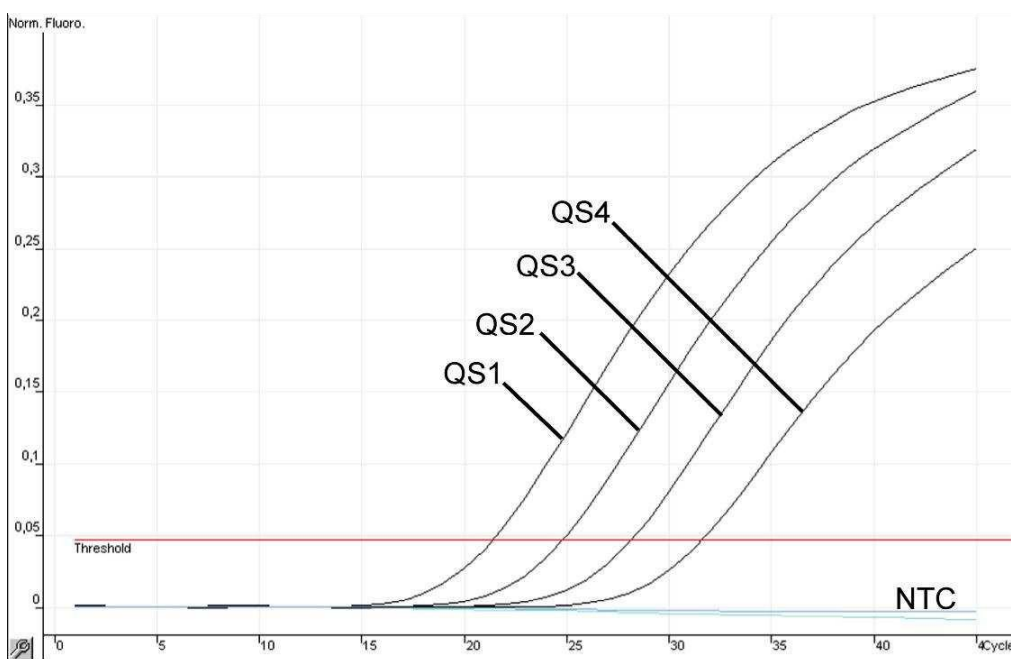
Při negativní SARS CoV RT-PCR vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost RT-PCR inhibice.

3. Signál není detekován ani v kanálu Cycling A.FAM ani v kanálu Cycling A.JOE.

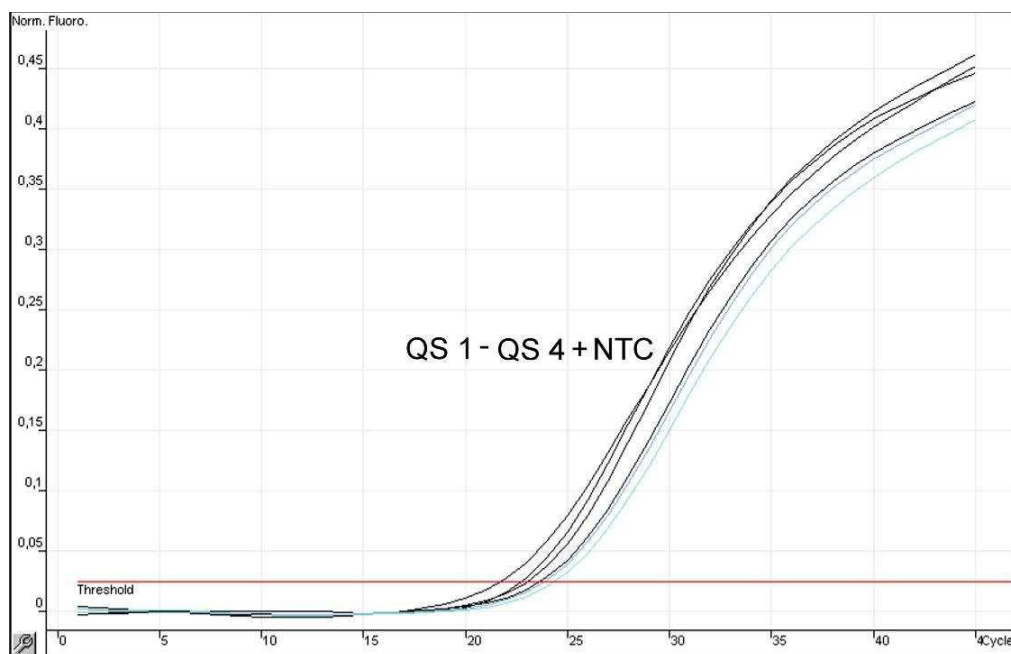
Není možné učinit diagnostický závěr.

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v kapitole 10. Řešení problémů.

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou uvedeny na Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 9: Průkaz KvantifikačnÝch standardů (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obr. 10: Průkaz InternÝ kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling A.JOE při současné amplifikaci KvantifikačnÝch standardů (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativní kontrola).

10. Řešení problémů

Žádný signál při pozitivních kontrolách (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM.

- Volba fluorescenčního kanálu při analýze dat PCR neodpovídá protokolu.
 - ❖ K analýze dat zvolte fluorescenční kanál Cycling A.FAM pro analytickou SARS CoV RT-PCR a fluorescenční kanál A.JOE pro RT-PCR *Interní kontroly*.
- Naprogramování teplotního profilu přístroje *artus 3000* nebo *Rotor-Gene™ 3000* je chybné.
 - ❖ Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **8.6 Programování artus 3000** nebo **Rotor-Gene 3000**).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
 - ❖ Porovnejte Vaše pracovní kroky s pipetovacím schématem (viz **8.5 Příprava PCR**) a popř. PCR zopakujte.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus SARS RG RT-PCR Kit*.
 - ❖ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* ve fluorescenčním kanálu Cycling A.JOE při současné nepřítomnosti signálu v kanálu Cycling A.FAM:

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
 - ❖ Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- PCR byla inhibována.
 - ❖ Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.2 Izolace RNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
 - ❖ Přesvědčte se, že byl při izolaci RNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz **8.2 Izolace RNA**).
- Během izolace dochází k úbytku RNA.

- ◆ Byla-li k izolaci přidána *Interní kontrola*, může nepřítomnost signálu *Interní kontroly* znamenat úbytek RNA během izolace. Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **8.2 Izolace RNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
- Podmínky skladování jednoho nebo více komponentů soupravy neodpovídají předpisům uvedeným v kapitole **2. Skladování** nebo byla překročena doba použitelnosti soupravy *artus SARS RG RT-PCR Kit*.
 - ◆ Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

Signály při negativních kontrolách ve fluorescenčním kanálu Cycling A.FAM analytické RT-PCR.

- Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci.
 - ◆ Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
 - ◆ Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
 - ◆ Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.
 - ◆ Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- Během izolace dochází ke kontaminaci.
 - ◆ Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
 - ◆ Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

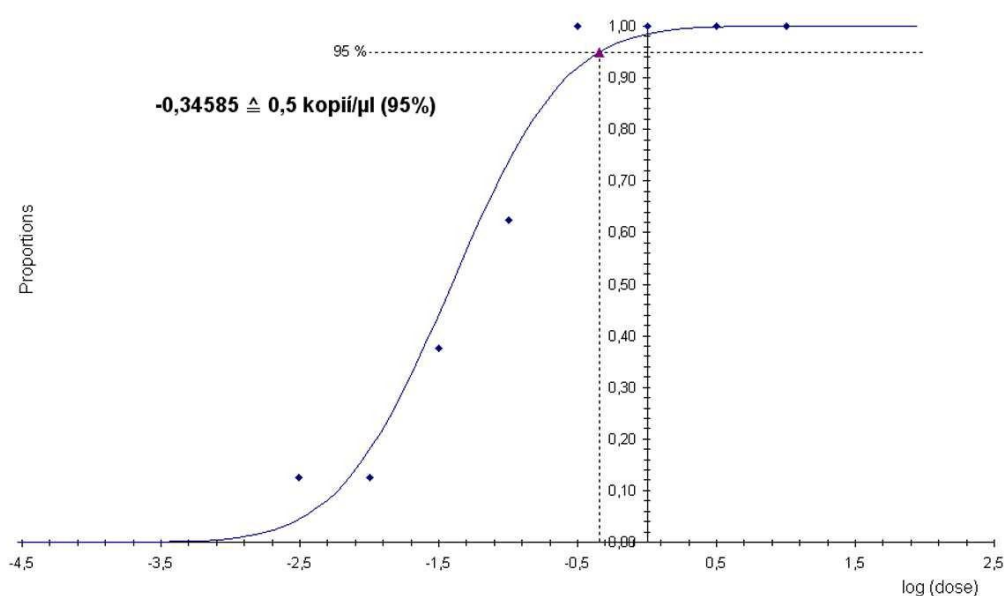
Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

11. Specifikace

11.1 Analytická senzitivita

Pro určení analytické senzitivity *artus* SARS RG RT-PCR Kit byla vytvořena řada ředění standardů od 10 do nominálně 0,003 *in vitro* transkribovaných RNA kopií na μl SARS CoV amplikonu a analyzována pomocí *artus* SARS RG RT-PCR Kit. Experimenty byly provedeny ve třech různých dnech formou osminásobných určení. Výsledek byl zjištěn pomocí probitové analýzy. Jeho grafické vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 11. Analytický limit detekce soupravy *artus* SARS RG RT-PCR Kit leží proto u 0,5 kopií/ μl ($p = 0,05$). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 0,5 kopií/ μl .

Probitová analýza: SARS coronavirus (*artus* 3000/Rotor-Gene 3000)



Obr. 11: Analytická senzitivita *artus* SARS RG RT-PCR Kit.

11.2 Specificita

Specificita *artus* SARS RG RT-PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech relevantních subtypů a genotypů.

Validace specifity byla provedena na 30 různých SARS CoV negativních sérových vzorcích, které spolu se SARS-CoV specifickými primery a sondami obsaženými v SARS-CoV RG/TM Master negenerovaly žádný signál.

K určení specifity *artus* SARS RG RT-PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v Tabulce 1 testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1: Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců.

Kontrolní skupina	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Interní kontrola (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 CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

11.3 Přesnost

Údaje o přesnosti pro *artus* SARS RG RT-PCR Kit umožňují stanovení celkové variability testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **Intra-Assay variability** (variabilita vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), z **Inter-Assay variability** (variabilita způsobená provedením experimentu různými osobami v jedné laboratoři a užitím různých přístrojů stejného typu) a z **Inter-Batch variability** (variabilita způsobená použitím různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontroly*.

Tyto údaje byly pro *artus SARS RG RT-PCR Kit* stanoveny na základě *KvantifikačnÝho standardu* s nejnižší koncentrací (QS 4; 10 kopií/μl). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno na základě Ct hodnot amplifikačních křivek (Ct: *threshold cycle*, viz Tabulka 2). Celková variabilita libovolného vzorku uvedené koncentrace činí tedy 1,66 % (Ct), pro průkaz *InternÝ kontrola* 1,28 % (Ct). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti na základě Ct hodnot.

	Standardní odchylka	Variance	Koeficient variace [%]
Intra-Assay variabilita: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS 4</i>	0,15	0,02	0,48
Intra-Assay variabilita: <i>InternÝ kontrola</i>	0,40	0,15	1,67
Inter-Assay variabilita: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,75
Inter-Assay variabilita: <i>InternÝ kontrola</i>	1,13	1,28	4,53
Inter-Batch variabilita: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS 4</i>	0,52	0,25	1,69
Inter-Batch variabilita: <i>InternÝ kontrola</i>	0,94	0,63	3,62
Celková variabilita: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS 4</i>	0,51	0,26	1,66
Celková variabilita: <i>InternÝ kontrola</i>	1,13	1,28	1,28

11.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb *artus SARS RG RT-PCR Kit*. Za tímto účelem bylo 30 SARS CoV negativních sérových vzorků smíšeno s 1,5 kopiemi/μl elučního objemu kontrolní SARS CoV RNA (třínásobná koncentrace analytického limitu senzitivity), pomocí QIAamp Viral RNA Mini Kit izolováno (viz **8.2 Izolace RNA**) a pomocí

artus SARS RG RT-PCR Kit analyzováno. Četnost chyb pro SARS CoV činila u všech vzorků 0 %. Robustnost *Interní kontroly* byla dodatečně přezkoušena izolací a analýzou 30 SARS CoV negativních sérových vzorků. Celková četnost chyb činila 0 %. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost *artus SARS RG RT-PCR Kit* činí tedy $\geq 99\%$.

11.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti *artus SARS RG RT-PCR Kit* a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí na mezilaboratorních pokusech.

11.6 Diagnostické hodnocení

artus SARS RG RT-PCR Kit je v současné době evaluován ve více studiích.

12. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagentie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Prostředek by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.

13. Varování a bezpečnostní opatření

Bezpečnostní informace k soupravě *artus SARS RG RT-PCR Kit* naleznete v odpovídajících bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS). Tyto listy jsou k dispozici v podobě kompaktního a snadno použitelného PDF souboru na www.qiagen.com/safety.












14. Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO 9001 a ISO 13485 byla každá šarže *artus* SARS RG RT-PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

15. Literatura

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

16. Vysvětlení symbolů

	Použijte do
	Číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Číslo materiálu
	Manuál
	Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Ethanol
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Obsahuje reagentie pro <N> reakcí
	Teplotní rozmezí
QS	Kvantifikační standard
IC	Interní kontrola

artus SARS RG RT-PCR Kit

Ochranné známky a vyloučení odpovědnosti

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

Registrované názvy, ochranné známky etc. použité v tomto manuálu nelze považovat za nechráněné zákonem, ani když nejsou jako takové označeny.

artus SARS RG RT-PCR Kit je diagnostická souprava označená značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Souprava není dostupná ve všech zemích.

Soupravy QIAamp Kit jsou určeny pro obecné laboratorní použití. Údaje produktu nebo jeho prezentace nejsou určeny k tomu, aby podávaly informace o diagnóze, prevenci nebo léčení nemoci.

Koupě souprav artus PCR Kit zahrnuje limitovanou licenci pro jejich použití v procesu polymerázové řetězové reakce (PCR) v rámci humánní a veterinární in vitro diagnostiky, ve spojení s termocyklerem, jehož použití při automatizovaném provedení PCR je kryto předem splatným licenčním poplatkem, který se odvádí buď platbou společnosti Applied Biosystems nebo koupí autorizovaného termocykleru. Technologie PCR je chráněna národními patentními právy ekvivalentními k USA patentům čí. 5.219.727 a 5.322.770 a 5.210.015 a 5.176.995 a 6.040.166 a 6.197.563 a 5.994.056 a 6.171.785 a 5.487.972 a 5.804.375 a 5.407.800 a 5.310.652 a 5.994.56 ; vlastněno firmou F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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

