

artus[®] HSV-1/2 LC PCR Kit Håndbog

 24 (catalog no. 4500063)

 96 (catalog no. 4500065)

Kvantitativ in vitro diagnostik

For use with the *LightCycler*[®] Instrument

Version 1



IVD

REF

4500063, 4500065



1046888DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046888DA



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	4
2. Opbevaring	5
3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter	5
4. Almindelige sikkerhedsregler	5
5. Information om smittefare.....	6
6. Princip for Real-Time PCR.....	6
7. Produktbeskrivelse	6
8. Protokol	7
8.1 DNA-isolering	7
8.2 Intern Kontrol	10
8.3 Kvantificering.....	11
8.4 Forberedelse af PCR	12
8.5 Programmering af LightCycler instrumentet	16
9. Analyse	19
10. Fejlkilder	24
11. Specifikationer.....	26
11.1 Analytisk sensitivitet	26
11.2 Specificitet.....	28
11.3 Præcision	30
11.4 Robusthed	33
11.5 Reproducerbarhed	33
11.6 Diagnostisk evaluering	33
12. Særlige anvisninger til brug af produktet.....	34
13. Sikkerhedsinformationer.....	34
14. Kvalitetskontrol	34
15. Litteratur	34
16. Symbolforklaring	35

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Til anvendelse med *LightCycler*instrumentet.

1. Indhold

	Påskrift og indhold	Art. Nr. 4500063 24 reaktioner	Art. Nr. 4500065 96 reaktioner
Blå	HSV LC Master	2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Rød	HSV 1 LC/RG/TM QS 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 1 LC/RG/TM QS 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 1 LC/RG/TM QS 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 1 LC/RG/TM QS 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 2 LC/RG/TM QS 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 2 LC/RG/TM QS 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 2 LC/RG/TM QS 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	HSV 2 LC/RG/TM QS 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grøn	HSV LC IC ^α	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Hvid	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

^αQS = Kvantificeringsstandard
IC = Intern Kontrol

2. Opbevaring

artus HSV-1/2 LC PCR Kit opbevares ved -30 til -15 °C og er holdbart indtil datoen, der er angivet på etiketten. Gentagen optøning og nedfrysning (> 2 x) bør undgås, da sensitiviteten derved forringes. Ved uregelmæssig brug skal reagenserne derfor aliquoteres. Hvis det er nødvendigt at opbevare kittet ved $+4$ °C, må dette tidsrum ikke vare længere end fem timer.

3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter

- Puderfri engangs laboratoriehandsker
- DNA-isoleringskit (se 8.1 DNA-isolering)
- Pipetter (justerbar)
- Sterile pipettespidser med filter
- Vortex-mixer
- Bordcentrifuge med rotor til 2 ml-reaktionsbeholdere
- Color Compensation Set (Roche Diagnostics, kat.-nr. 2 158 850) til installering af en *Crosstalk Color Compensation*-fil
- *LightCycler* Kapillarer (20 μ l)
- *LightCycler* Cooling Block
- *LightCycler* Instrument
- *LightCycler* Capping Tool

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 *LightCycler*[®] Cooling Block.

5. Information om smittefare

Herpes-simplex-virus (HSV) findes i blærevæske, i spyt og i vaginalsekret og overføres via kontaktinfektion, ved samleje og perinatalt. Ved størstedelen af HSV-betingede sygdomme dominerer billedet af blæredannelser på huden og slimhinderne (mund og genitalier). HSV-infektionen kan optræde som primærinfektion, som forløber asymptomatisk i > 90 % af tilfældene, eller som recidiv. Til primærinfektionerne, som især udløses af HSV-1, hører gingivostomatitis, eksemet herpeticum, keratokonjunktivitis og encefalitis. HSV-2 optræder som primærinfektion, især som vulvovaginitis, som meningitis og som generaliseret herpes hos nyfødte. Som recidiv af HSV-infektionen opstår der især blæredannelse i nasolabial- eller genitalregionen. Recidiver for keratokonjunktivitis og meningitis er af farligere kategori.

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-amplifikatet. 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 HSV-1/2 LC PCR Kit er et brugsklart system til detektion og differentiering af herpes simplex virus-1 og -2-DNA ved hjælp af polymerase kædereaktion (PCR) og umiddelbart derefter en smeltekurve med *LightCycler* instrumentet. HSV LC Master indeholder reagenser og enzymer til den specifikke amplifikation af en 148 bp lang sekvens af herpes simplex virus-genomet og til umiddelbar detektion af en amplifikation i fluorescens-kanalen F2 i *LightCycler* instrumentet. Derudover indeholder *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit et andet heterologt amplifikations-system, som bruges til detektion af en eventuel PCR-inhibition. Denne bliver påvist som Intern Kontrol (IC) i fluorescens-kanalen F3 og detektionsgrænsen for den analytiske HSV-PCR bliver derved ikke reduceret (se 11.1 Analytisk sensitivitet).

Til bestemmelse af subtyperne bruger systemet den specifikke smeltetemperatur af proberne, som under smeltekurvens forløb udsender et signal ved 69°C for HSV-1, og ved 66°C for HSV-2 i fluorescenskanalen F2. Afhængigt af forskellige ekstraktionsbetingelser og derud resulterende bufferkoncentrationer kan der opstå temperaturafvigelser fra

1 - 2°C, dog viser sig disse på både HSV-1 og HSV-2-amplifikaterne. Der vedlægges eksterne positive kontroller (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*), som bruges til kvantificering af smitstoffet. Læs dertil afsnittet **8.3 Kvantificering**.

Bemærk: Temperaturprofilen til detektion af herpes simplex virus-DNA via *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* svarer såvel til *artus EBV LC PCR Kit*, *artus VZV LC PCR Kit* og *artus CMV LC PCR Kit*. Det betyder, at PCR-reaktionerne for disse *artus*-systemer kan gennemgås og analyseres i en kørsel. Bemærk derved specielle anvisninger til analysen under **8.3 Kvantificering** og **9. Analyse**.

8. Protokol

8.1 DNA-isolering

DNA-isoleringskits tilbydes af forskellige producenter. Prøvevolumener til DNA-isoleringsproceduren afhænger af den benyttede protokol. Tilsæt den anbefalede prøvemængde til oprensningen og udfør DNA-isoleringen efter producentens forskrift. Følgende isoleringskits anbefales:

Prøve-materiale	Oprønsningskit	Katalog-nummer	Producent	Carrier-RNA
Serum, plasma, CSF (cerebrospinalvæske), podninger	QIAamp® UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	indeholdt
	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	ikke indeholdt
CSF	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	indeholdt

*Anvendes sammen med BioRobot® EZ1 DSP Workstation (Kat. Nr. 9001360) og EZ1 DSP Virus Card (Kat. Nr. 9017707)

Vigtige henvisninger vedrørende anvendelsen af QIAamp UltraSens Virus Kit og QIAamp DNA Mini Kit:

- Anvendelsen af **carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Hvis det anvendte isoleringskit ikke indeholder carrier-RNA, anbefales der ved oprensningen af nukleinsyrer af cellefri kropsvæsker eller materialer med ringe DNA/RNA-indhold (f.eks. CSF), en tilsætning af carrier-RNA (RNA- homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat.-nr. 27-4110-01). Følg så venligst den følgende fremgangsmåde:

a) Hertil resuspenderes den lyophiliserede carrier-RNA i elueringsbufferen (ikke i lysisbuffer) af isoleringskittet (f.eks. AE-buffer fra QIAamp DNA Mini Kit) og fremstilles en fortynding med en koncentration på $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Lav derefter af carrier-RNA-løsningen et for Deres egne krav passende antal aliquoter, som skal opbevares ved -20°C . Undgå gentagen optøning ($>2 \times$) af carrier-RNA-aliquoten.

b) Per oprensning skal der tilsættes $1 \mu\text{g}$ carrier-RNA per $100 \mu\text{l}$ lysisbuffer. Bestemmer ekstraktionsprotokollen f.eks. $200 \mu\text{l}$ per oprenset prøve, tilsættes $2 \mu\text{l}$ af carrier-RNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) direkte til lysisbufferen. Før begyndelsen af oprensningen skal blandingen af lysisbuffer og carrier-RNA (og i givent tilfælde Intern Kontrol se

8.2 Intern Kontrol) fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer	f.eks. $200 \mu\text{l}$	f.eks. $2.400 \mu\text{l}$
Samlet volumen	$202 \mu\text{l}$	$2.424 \mu\text{l}$
Volumen for oprensningen	$200 \mu\text{l}$	for hver $200 \mu\text{l}$

c) Den frisk fremstillede blanding af lysisbuffer og carrier-RNA skal tilsættes oprensningen med det samme. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.

- 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 UltraSens Virus Kit vedlagte carrier-RNA, anbefaler vi følgende fremgangsmåde, som afviger fra angivelserne i håndbogen til isoleringskittet:

- a. Resuspender den lyophiliserede carrier-DNA 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 giventilfælde Intern Kontrol, se **8.2 Intern Kontrol**) fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer AC	800 μl	9.600 μl
Carrier-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5,6 μl	67,2 μl
Samlet volumen	805,6 μl	9.667,2 μl
Volumen for oprensningen	800 μl	for hver 800 μl

- c. Den frisk fremstillede blanding af lysisbuffer og carrier-RNA skal tilsættes oprensningen med det samme. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.
 - Der kan opnås en opkoncentrering af prøven ved tilsætning af **QIAamp UltraSens Virus Kit**. Hvis prøvematerialet ikke består af serum eller plasma, skal der tilføjes minimum 50 % (v/v) negativt humanplasma til prøven.
 - 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* HSV-1/2 LC PCR Kit er ikke egnet til oprensningskørsler, som arbejder på basis af **phenol**.

Vigtig henvisning vedrørende anvendelsen af EZ1 DSP Virus Kit:

- Anvendelsen af **Carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Tilsæt derfor venligst den passende mængde carrier-RNA til hver oprensning ved at følge instruktionerne i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Vigtigt: Den *Interne Kontrol* til *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit kan anvendes direkte i oprensningen (se **8.2 Intern Kontrol**).

8.2 Intern Kontrol

Der vedlægges en Intern Kontrol (HSV LC IC). Med denne er det muligt at kontrollere **både oprensningen af DNA og en mulig inhibition af PCR** (se Fig. 1). Ved anvendelsen af **EZ1 DSP Virus Kit** i oprensningen skal den Interne Kontrol tilsættes analogt til angivelserne i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Ved **QIAamp UltraSens Virus Kit** eller ved **QIAamp DNA Mini Kit** tilsættes den *Interne Kontrol* i et forhold der svarer til 0,1 μ l pr. 1 μ l elueringsvolumen til oprensningen. Hvis De for eksempel anvender QIAamp DNA Mini Kit og eluerer DNA i 200 μ l AE-buffer, skal der tilsættes 20 μ l af den Interne Kontrol. Hvis De f.eks. eluerer i 100 μ l, skal der tilsvarende tilsættes 10 μ l. Mængden af den anvendte *Interne Kontrol* er **kun** afhængig af elueringsvolumenet. Den *Interne Kontrol* og carrier-RNA (se 8.1 DNA-isolering) må kun tilsættes

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

Den Interne Kontrol må ikke direkte tilsættes prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for at blandingen af den *Interne Kontrol* og lysisbuffer/carrier-RNA forberedes frisk og tilsættes med det 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.

Optionalt kan den *Interne Kontrol* anvendes **udelukkende til kontrol af en mulig PCR-inhibition** (se Fig. 2). Til denne anvendelse tilsættes pr. testblanding 0,5 μ l af den *Interne Kontrol* direkte til 15 μ l *HSV LC Master*. Brug til hver PCR-reaktion 15 μ l af den således fremstillede Master Mix^{*} og tilsæt derefter 5 μ l af den oprensede prøve. Ved udførelsen af en kørsel med flere prøver er det nødvendigt at øge de krævede mængder af HSV LC Master og den *Interne Kontrol* svarende til prøvetallet (se 8.4 **Forberedelse af PCR**).

artus HSV-1/2 LC PCR Kit og *artus VZV LC PCR Kit* indeholder identisk Intern Kontrol (IC). *artus EBV LC PCR Kit* og *artus CMV LC PCR Kit* indeholder også identisk *Intern Kontrol*.

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

8.3 Kvantificering

De vedlagte Kvantificeringsstandarder (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen ($5 \mu\text{l}$). For at udarbejde en standardkurve i *LightCycler* instrumentet tilsættes for både HSV-1 og HSV-2 alle fire vedlagte Kvantificeringsstandarder. Definer disse i *Sample Loading Screen* som standarder, og indtast de angivne koncentrationer (se *LightCycler Operator's Manual*, version 3.5, chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Denne standardkurve kan derudover anvendes til senere kvantificeringer, hvis mindst en standard af en defineret koncentration medføres i den aktuelle kørsel. Hertil er det nødvendigt at importere den tidligere udarbejdede standardkurve (se *LightCycler Operator's Manual*, version 3.5, chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Der kan opstå afvigelser i resultatet på grund af variationen mellem PCR-kørslerne ved denne form for kvantificering.

Hvis De har integreret mere end et herpes-*artus*-system i Deres kørsel, skal disse analyseres separate med de tilhørende *Kvantificeringsstandarder*.

Bemærk: *Kvantificeringsstandarderne* er defineret som kopier/ μl . Til omregning af værdierne, der blev udarbejdet ved hjælp af standardkurven i kopier/ml prøvemateriale, skal følgende formel anvendes:

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

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 på det volumen, som kræves for oprensningen).

Vigtigt: For simplificering af den kvantitative analyse med *artus*-systemer på *LightCycler* instrumentet, findes under www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX en vejledning (Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* instrument).

8.4 Forberedelse af PCR

Sørg for at Cooling Block'en med de tilhørende adaptere (tilbehør til *LightCycler*[®] instrumentet) er kølet ned til cirka +4°C. Sæt det nødvendige antal *LightCycler*[®] kapillarer til de planlagte reaktioner ind i adapterne til Cooling Block'en. Bemærk, at hver PCR-kørsel kræver mindst en Kvantificeringsstandard (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) samt en negativ kontrol (Water, PCR grade). Anvend til udarbejdelse af en standardkurve per PCR-kørsel alle vedlagte kvantificeringsstandarder (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). Alle reagenser skal optøs fuldstændigt ved stuetemperatur, blandes godt (gentagen pipettering eller kort vortexen) og centrifugeres kort.

For tilfældet, at De **både** vil kontrollere **oprensningen af DNA og en eventuel inhibition af PCR**, skal den *Interne Kontrol* tilsættes oprensningen i forvejen (se **8.2 Intern Kontrol**). Brug dertil følgende pipetteringsskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 1):

Antal prøver		1	12
1. Opsætning af Master Mix	HSV LC Master	15 µl	180 µl
	HSV LC 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	5 µl	for hver 5 µl
	Samlet volumen	20 µl	for hver 20 µl

Hvis De **udelukkende** vil anvende den *Interne Kontrol* til kontrol af en mulig **PCR-inhibition**, skal den tilsættes direkte til HSV LC Master. Brug i dette tilfælde følgende pipetteringsskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 2):

		Antal prøver	
		1	12
1. Opsætning af Master Mix	HSV LC Master	15 μ l	180 μ l
	HSV LC IC	0,5 μ l	6 μ l
	Samlet volumen	15,5 μl*	186 μl*
2. Opsætning af PCR-reaktion	Master Mix	15 μ l*	for hver 15 μ l*
	Prøve	5 μ l	for hver 5 μ l
	Samlet volumen	20 μl	for hver 20 μl

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

Pipetter 15 μ l af Master Mix i PCR-plastikreservoiret til hver af kapillarerne. Derefter tilsættes 5 μ l af eluatet fra DNA-isoleringen. Tilsvarende skal 5 μ l af mindst én af *Kvantificeringsstandarderne* af hver *Kvantificeringsstandard*- række (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) anvendes som positiv kontrol og som negativ kontrol tilsættes 5 μ l vand (Water, PCR grade). Luk kapillarerne. For at overføre opsætningen fra plasticreservoiret til kapillarerne, centrifugeres adapterne med kapillarerne i en bordcentrifuge i ti sekunder ved maksimalt 400 x g (2.000 rpm).

Tilsætning af *Intern Kontrol* til oprensningen

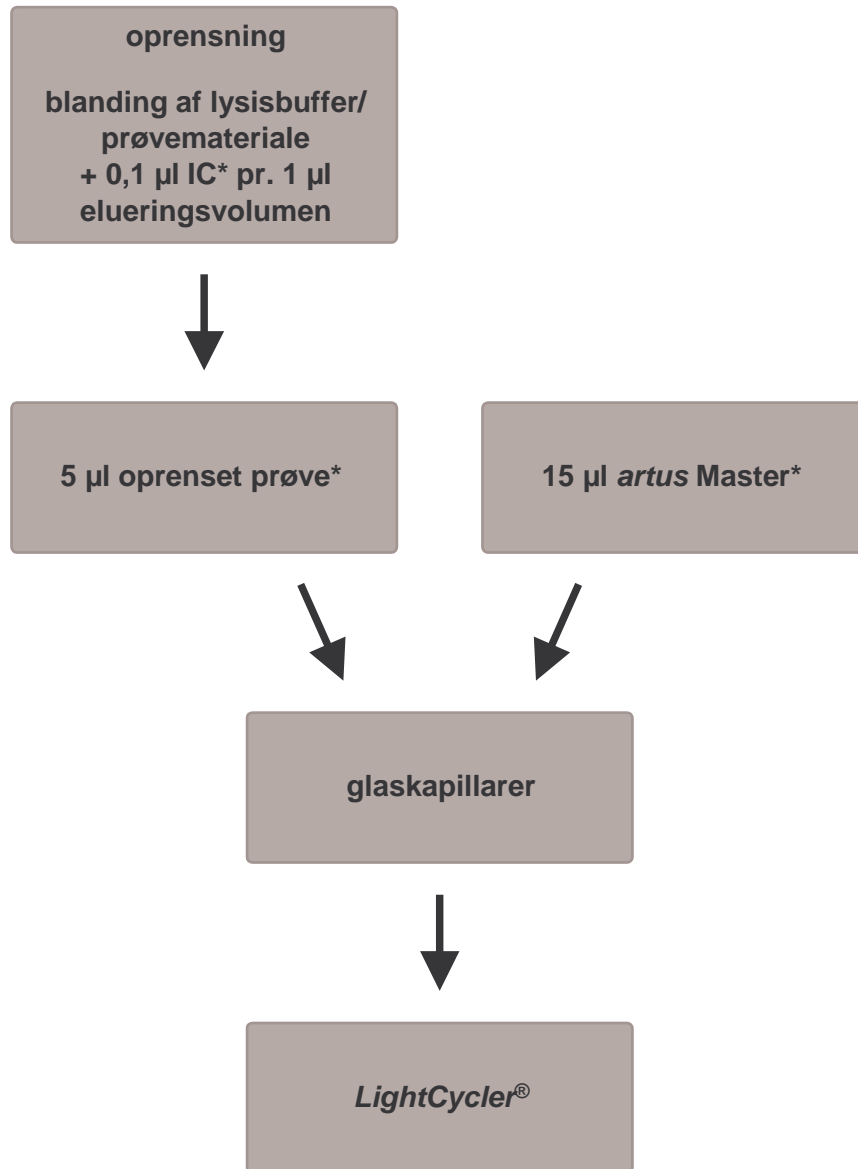


Fig. 1: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af oprensning og PCR-inhibition.

*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*

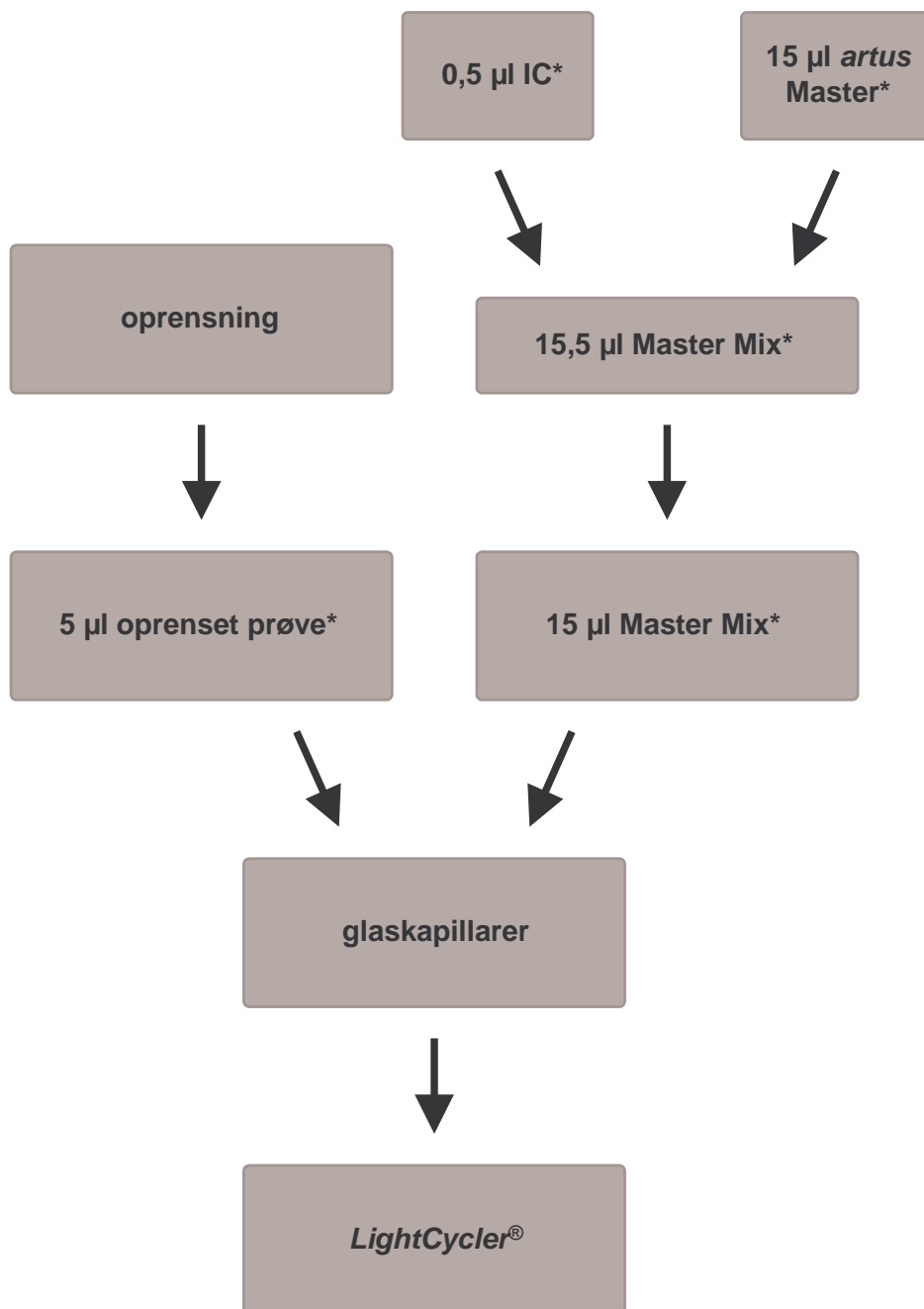


Fig. 2: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af PCR-inhibition.

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

8.5 Programmering af LightCycler instrumentet

Til detektion af herpes simplex virus-DNA udarbejder De på Deres *LightCycler*[®] instrument en temperaturprofil i henhold til de følgende fem arbejdsstrin (se Fig. 3 – 7).

- | | | |
|----|---|------|
| A. | Initiel aktivering af hot start-enzymet | Fig. |
| B. | Touch Down trin | Fig. |
| C. | Amplifikation af DNA | Fig. |
| D. | Smeltekurve | Fig. |
| E. | Køling | Fig. |

Læg især mærke til indstillingerne for *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* og *Temperature Targets*. Af hensyn til overskueligheden er indstillingerne, der skal foretages, fremhævet med sorte rammer i figurerne. Anvisninger til programmering af *LightCycler* instrumentet kan findes i *LightCycler Operator's Manual*.

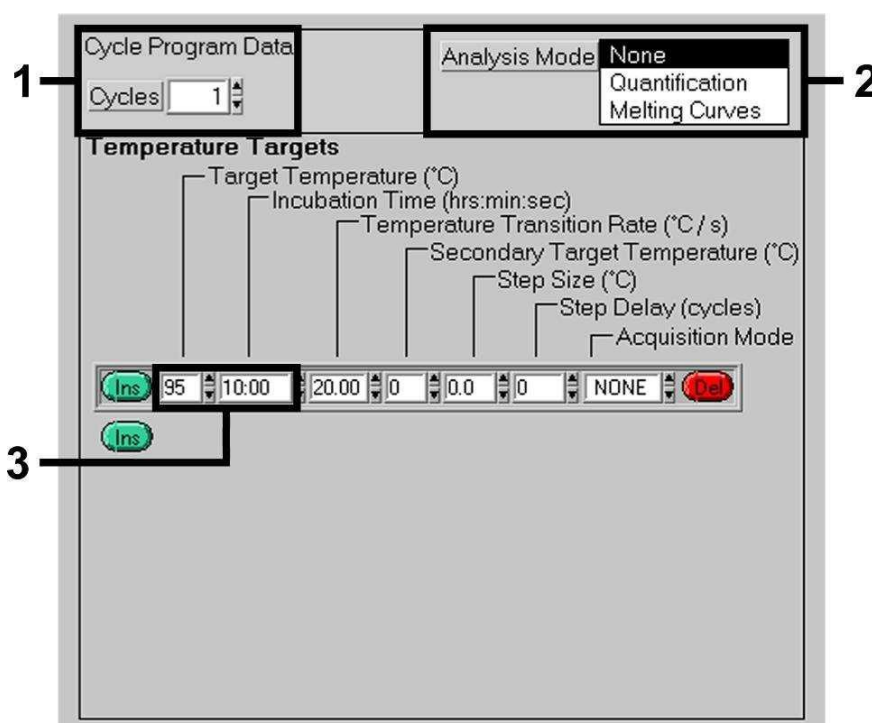


Fig. 3: Initiel aktivering af hot start-enzymet.

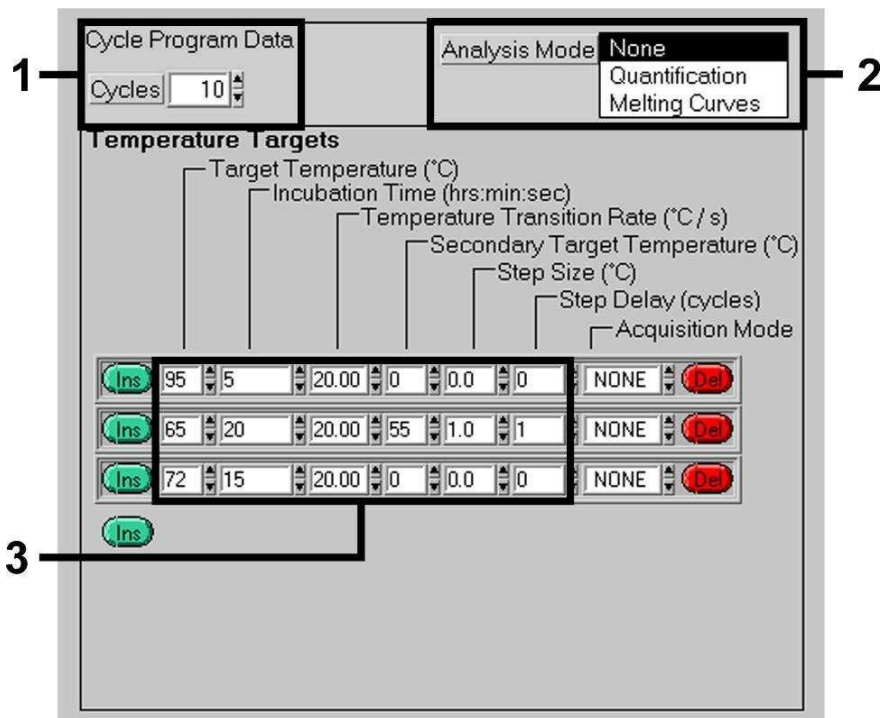


Fig. 4: Touch Down trin.

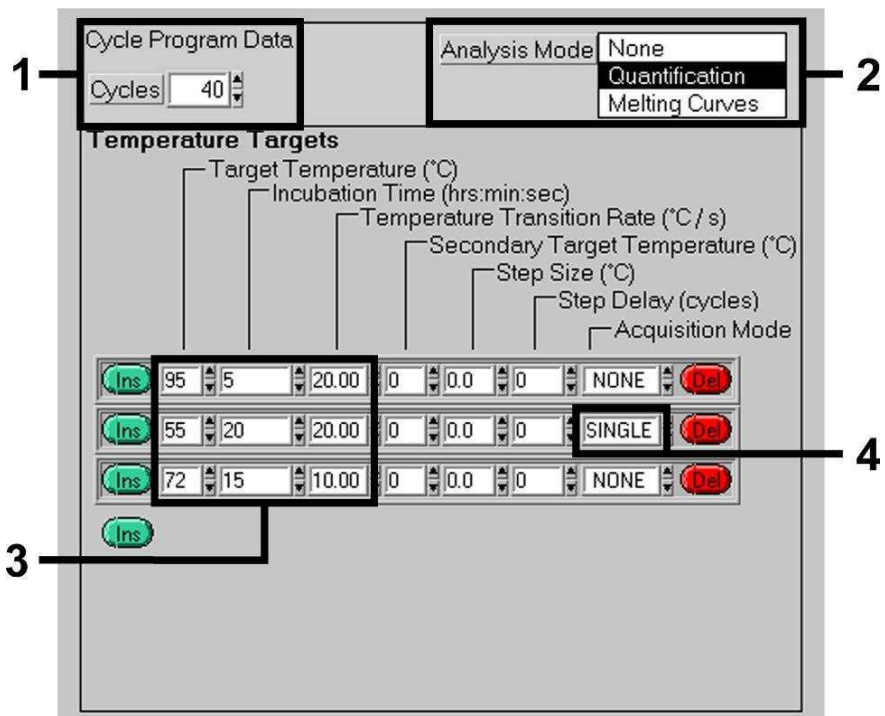


Fig. 5: Amplifikation of DNA.

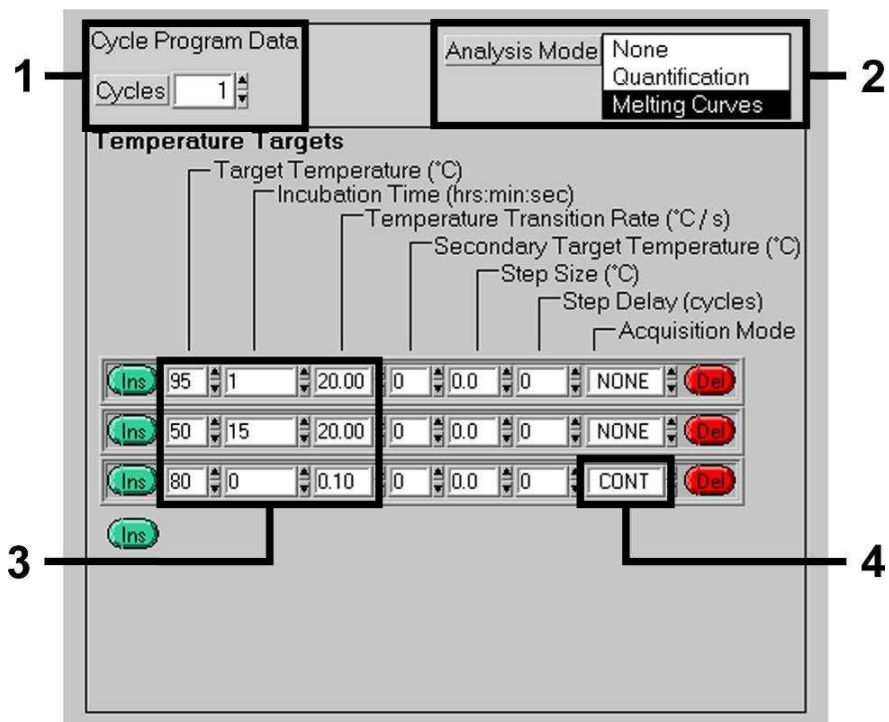


Fig. 6: Smeltekurve.

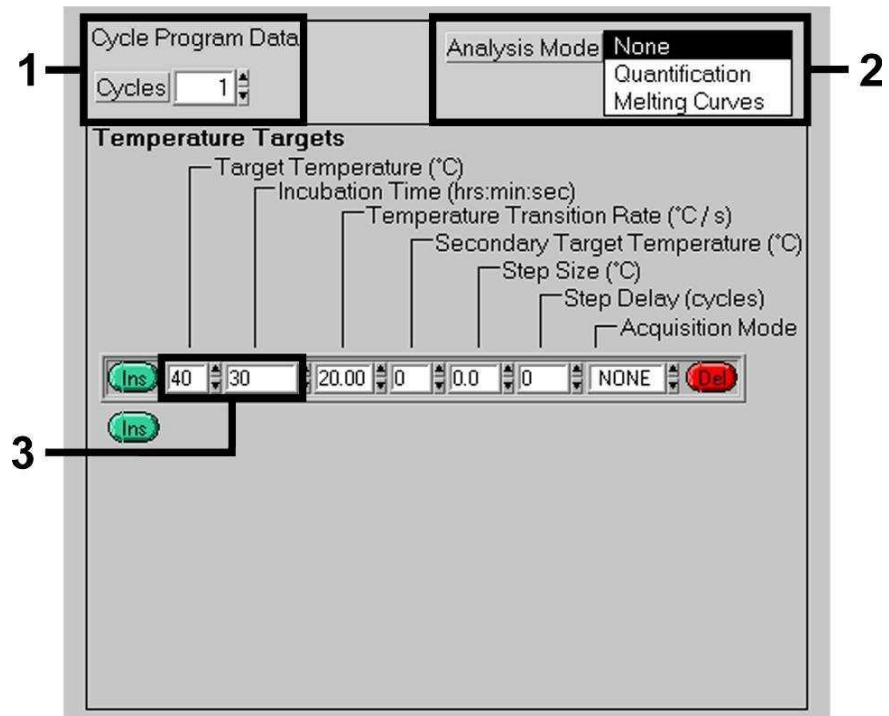


Fig. 7: Køling.

9. Analyse

Ved multifarve-analyser optræder interferenser mellem fluorescenskanalerne. Softwaren til *LightCycler* instrumentet indeholder en fil med betegnelsen *Color Compensation File*, som kompenserer for disse interferenser. Åbn denne fil før, under eller lige efter PCR-kørslen ved aktivering af *Choose CCC File* eller *Select CC Data*. Hvis der ikke er installeret en *Color Compensation File*, udarbejdes den ifølge anvisningerne i *LightCycler Operator's Manual*.

Efter aktiveringen af *Color Compensation File* fremkommer separate signaler i fluorescenskanalerne F1, F2 og F3. Til analysen af PCR-resultaterne, der blev indhentet med *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, vælges visningsfunktionen F2/Back-F1 for den analytiske HSV-PCR, hhv. F3/Back-F1 for PCR'en af den *Interne Kontrol*. Til analysen af kvantitative kørsler er det yderst vigtigt at følge afsnittet **8.3 Kvantificering** samt **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* 1.1/1.2/1.5 or *LightCycler* 2.0 instrument** på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Hvis De har integreret mere end et herpes-artus-system i Deres PCR-kørsel, skal HSV-prøverne med deres tilhørende *Kvantificeringsstandarder* analyseres separate fra alle andre systemer. Bemærk herved, at HSV-1-prøverne analyseres med den til HSV-1-standards (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4) tilhørende standardkurve og HSV-2-prøverne tilsvarende med HSV-2-standardkurven (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*).

Følgende resultater er mulige:

1. I fluorescens-kanalen F2/Back-F1 detekteres et signal.

Analysens resultat er positivt: Prøven indeholder HSV-DNA.

I tilfælde af HSV-diagnostik er detektionen af et signal i kanalen F3/Back-F1 uvæsentlig, da høje udgangskoncentrationer af HSV-DNA (positivt signal i kanalen F2/Back-F1) kan føre til et reduceret og tilmed et helt udeblivende fluorescens-signal af den *Interne Kontrol* i kanalen F3/Back-F1 (konkurrence).

Differentieringen af HSV-1 og HSV-2 kan gennemføres ved hjælp af smeltepunktet (Kanal F2/Back-F1, program *Melting Curve*) for HSV-1-amplifikatet ved 69°C og for HSV-2-amplifikatet ved 66°C.

På grund af forskellige ekstraktionsbetingelser og derud resulterende bufferkonditioner, kan det komme til afvigelser på 1 - 2°C. Disse forekommer dog på samme måde for både HSV-1 og for HSV-2-amplifikatet.

2. I fluorescens-kanalen F2/Back-F1 detekteres der ikke noget signal, men kun i kanalen F3/Back-F1 (signal for den Interne Kontrol).

I prøven kan der ikke påvises HSV-DNA. Den kan således betragtes som negativ.

Ved negativ HSV-PCR udelukker det detekterede Intern Kontrol-signal muligheden for en PCR-inhibition.

3. Hverken i kanalen F2/Back-F1 eller i kanalen F3/Back-F1 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 og for en smeltekurveanalyse er angivet i Fig. 8 til Fig. 12.

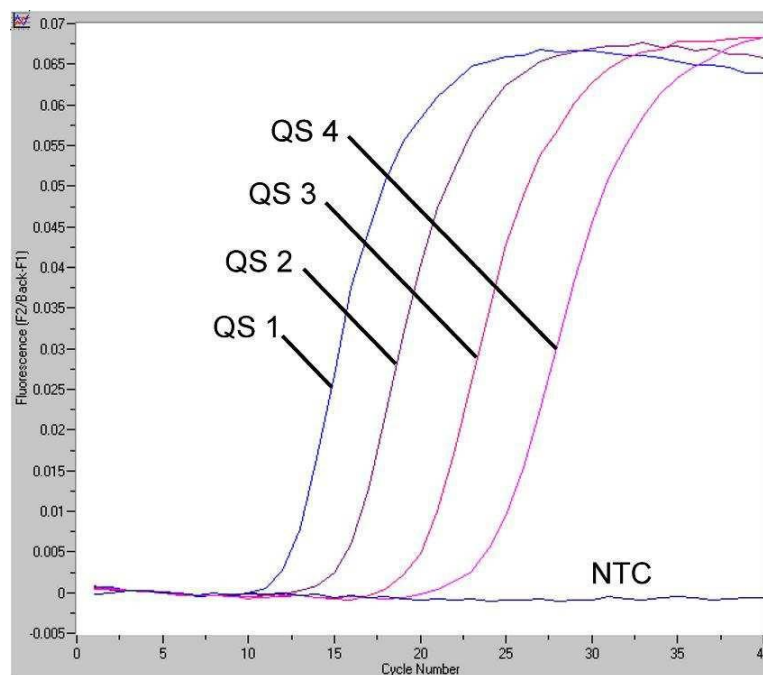


Fig. 8: Detektion af Kvantificeringsstandarder (*HSV1 LC/RG/TM* QS 1 - 4) i fluorescens-kanalen F2/Back- F1. NTC: non-template control (negativkontrol).

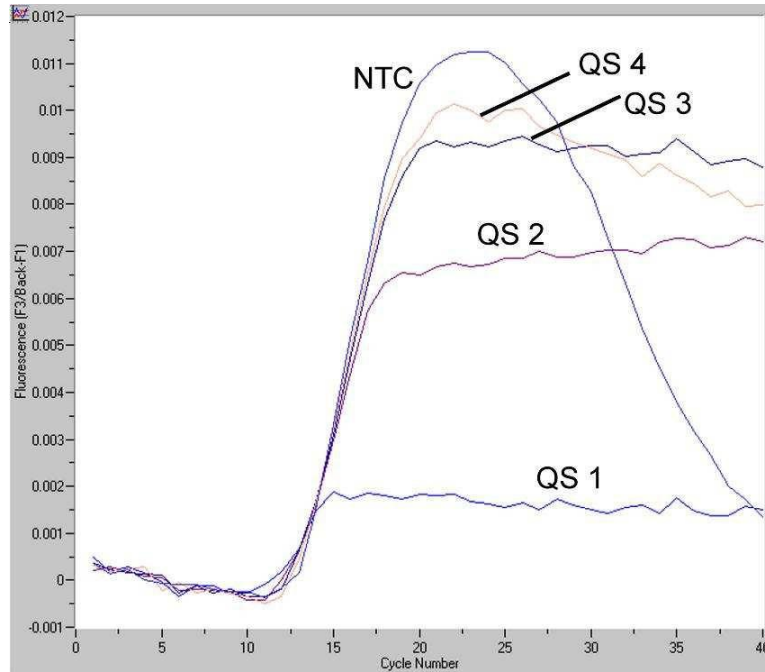


Fig. 9: Detektion af den *Interne Kontrol* (IC) i fluorescens-kanalen F3/Back-F1 ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativkontrol).

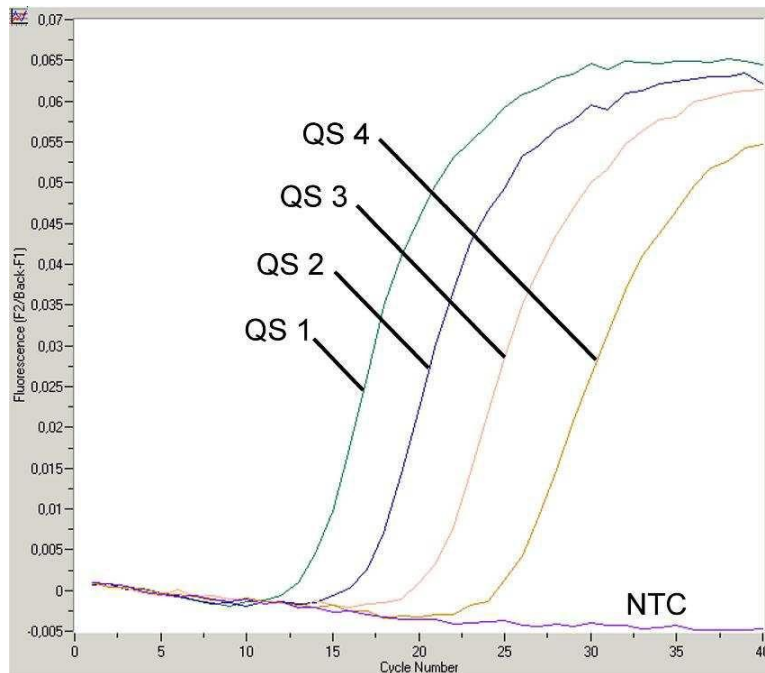


Fig. 10: Detektion af *Kvantificeringsstandarder* (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) i fluorescens-kanalen F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativkontrol).

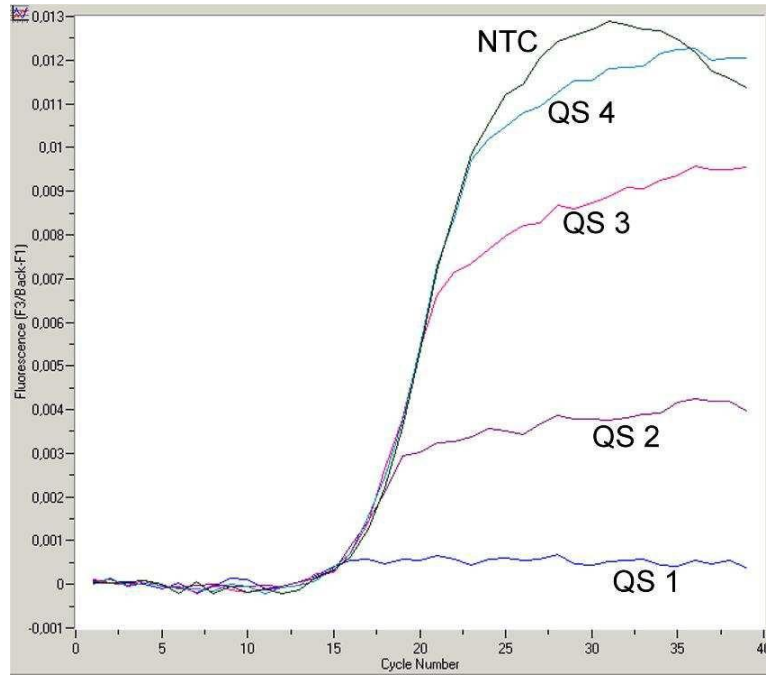


Fig. 11: Detektion af den *Interne Kontrol* (IC) i fluorescens-kanalen F3/Back-F1 ved samtidig amplifikation af *Kvantificeringsstandarder* (HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativkontrol).

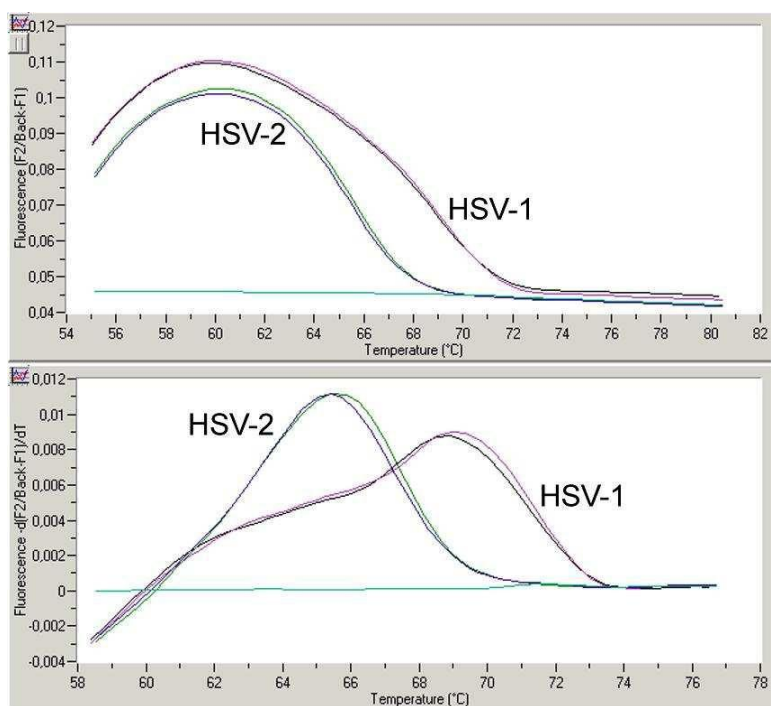


Fig. 12: Differentiering af HSV-1 og HSV-2 i fluorescens-kanalen F2/Back-F1 (program Melting Curve).

10. Fejkilder

Intet signal ved positivkontrollerne (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) i fluorescenskanalen F2/Back-F1:

- Valget af fluorescenskanalen ved PCR-data-analysen svarer ikke til angivelserne i protokollen.
- Vælg for data-analysen fluorescenskanalen F2/Back-F1 for den analytiske HSV-PCR og fluorescenskanalen F3/Back-F1 for PCR'en af den Interne Kontrol.
 - Fejl i programmeringen af temperaturprofilen for *LightCycler* instrumentet.
 - Sammenlign temperaturprofilen med angivelserne i protokollen (se **8.5 Programmering af *LightCycler* instrumentet**).
- Fejl i sammensætningen af PCR-reaktionen.
 - Kontrollér Deres arbejdsrin ved hjælp af pipetteringsskemaet (se **8.4 Forberedelse af PCR**) og gentag i givent tilfælde PCR'en.
- Betingelserne for opbevaring af en eller flere af kittets komponenter svarede ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* blev overtrådt.
- Kontrollér 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 F3/Back-F1 og samtidig fravær af et signal i kanalen F2/Back-F1:

 - PCR-betingelserne svarer ikke til protokollen.

→ Kontrollér 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 oprensningsskema (se **8.1 DNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.

→ Kontrollér, at der ved DNA-oprensningen, før gennemførelsen af elueringen, blev gennemført det anbefalede centrifugeringstrin til den fuldstændige fjernelse af ethanol-rester (se **8.1 DNA-isolering**).

- Der foreligger tab af DNA forårsaget af oprensningen.
- Hvis den Interne Kontrol blev tilsat oprensningen, kan fravær af signalet fra den *Interne Kontrol* betyde, at der foreligger tab af DNA medført igennem oprensningen. Sørg for, at De anvender en af os anbefalet oprensningsmetode (se **8.1 DNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.
- Betingelserne for opbevaring for en eller flere af kittets komponenter svarer ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen af *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit blev overtrådt.
- Kontrollér 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 F2/Back-F1 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.
- Pipettér principielt positiv-kontrollerne sidst.
- Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
- Der foreligger en kontamination forårsaget af 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 yderligere skulle opstå spørgsmål eller problemer, kontakt venligst vores tekniske service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit blev der udarbejdet en standard-fortyndingsrække af 31,6 til nominelt 0,01 HSV-1- hhv. HSV-2-kopiækvivalenter^{*} / μ l. Denne blev derefter analyseret med *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Undersøgelsen blev gennemført på tre forskellige dage med otte replikater. Resultatet blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. Dens grafiske analyse er vist i Fig. 13 og i Fig. 14. Detektionsgrænsen for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ligger således for HSV-1 og for HSV-2 ved 1 kopi/ μ l ($p = 0,05$). Det betyder, at 1 kopi/ μ l kan detekteres med 95 % sandsynlighed.

*Ved den anvendte standard drejer det sig om et klonet PCR-produkt, hvis koncentration blev bestemt spektralt og ved absorptions- og fluorescensmåling.

Probit-analyse: Herpes simplex virus-1 (LightCycler)

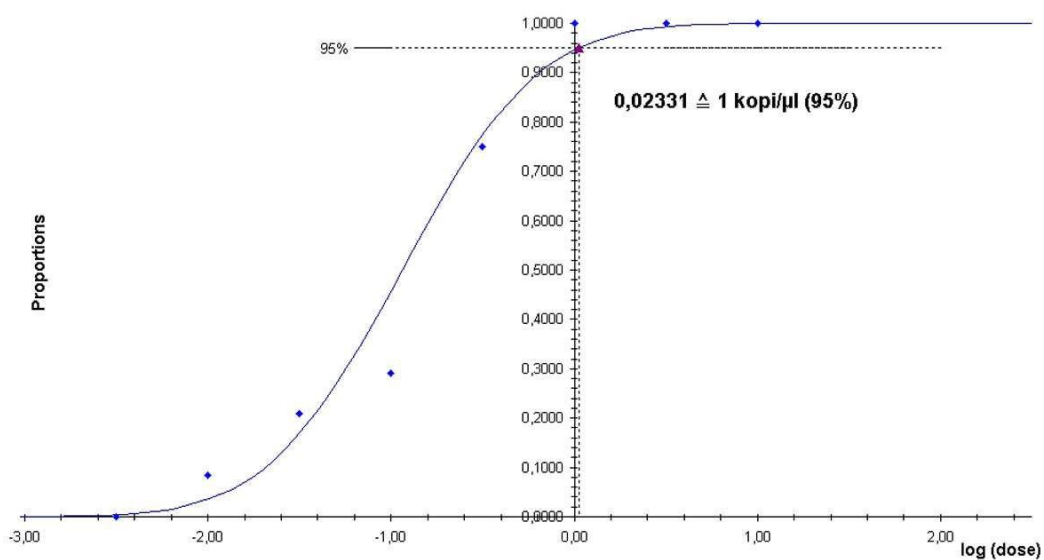


Fig. 13: Analytisk sensitivitet for artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-1).

Probit-analyse: Herpes simplex virus-2 (LightCycler®)

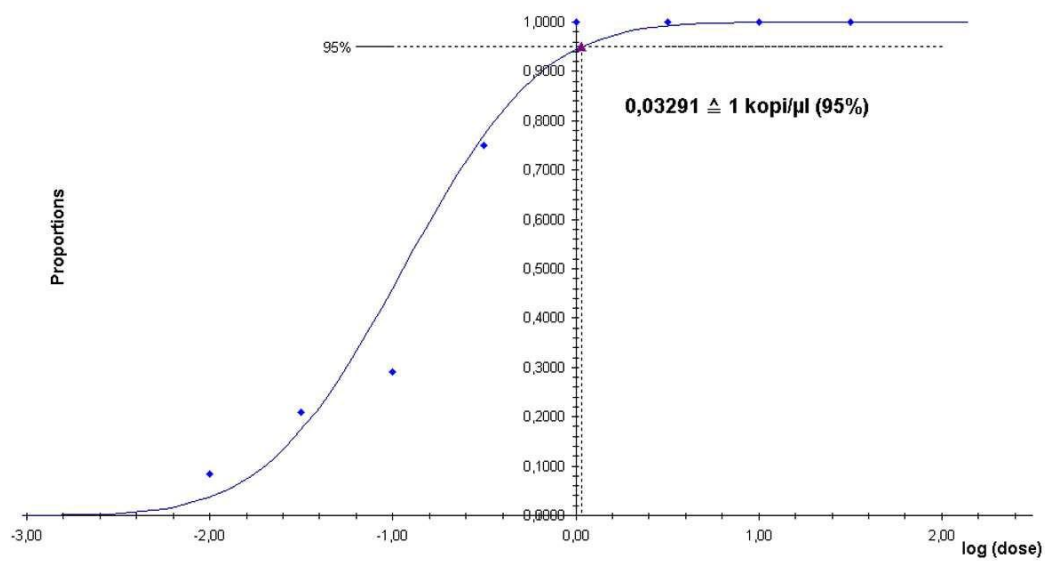


Fig. 14: Analytisk sensitivitet for artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-2).

11.2 Specificitet

Specificiteten for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit sikres først og fremmest igennem udvalget af primere og prober samt ved valget af stringente reaktionsbetingelser. Primerne og proberne blev ved hjælp af en sekvenssammenlignings-analyse kontrolleret for eventuelle homologier til andre kendte sekvenser. På denne måde blev detekterbarheden kontrolleret for alle relevante stammer.

Specificitetens validering blev derudover foretaget på 30 forskellige HSV-negative cerebrospinalvæskeprøver (CSF), som ikke genererede et signal med de i *HSV LC Master* integrerede HSV-specifikke primere og prober.

Til bestemmelse af specificiteten for *artus* HSV-1/2 LC 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	HSV 1/2 (F2/Back-F1)	Intern Kontrol (F3/Back-F1)
Human herpesvirus 3 (Varizella-zoster-virus)	-	+
Human herpesvirus 4 (Epstein-barr-virus)	-	+
Human herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Human herpesvirus 6 A	-	+
Human herpesvirus 6 B	-	+
Human herpesvirus 7	-	+
Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

11.3 Præcision

Præcisionsdata for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit tillader en bestemmelse af totalvariansen (samlet spredning) af testsystemet. Denne totalvariens består af **Intra-assay variationen** (spredning af prøver af 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 for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit bestemt på baggrund af Kvantificeringsstandarden med den laveste koncentration (QS 4; 10 kopier/ μ l). Undersøgelserne blev udført med otte replikater. Resultaterne af præcisionsdataene blev beregnet på grundlag af amplifikationskurvens Ct-værdier (Ct: threshold cycle, se Tabel 2/Tabel 4) og de derud beregnede kvantitative værdier i kopier/ μ l (se Tabel 3/Tabel 5). Således omfatter den samlede variation af en prøve med den oplyste koncentration 1,67 % (Ct, HSV-1) og 1,95 % (Ct, HSV-2) hhv. 20,66 % (konc., HSV-1) og 22,42 % (konc., HSV-2), og til detektion af den Interne Kontrol 1,23 % (Ct, HSV-1) hhv. 1,04 % (Ct, HSV-2). Disse værdier er baseret på helheden af alle enkeltværdiernes konstaterede variationer.

Tabel 2: Præcisionsdata for HSV-1 på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,03	0,00	0,23
Inter-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,12	0,01	0,99
Inter-lot variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,17	0,03	1,40
Totalvarians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Totalvarians: <i>Intern Kontrol</i>	0,15	0,02	1,23

Tabel 3: Præcisionsdata for HSV-1 på grundlag af de kvantitative værdier (i kopier/ μ l).

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Inter-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Inter-lot variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Totalvarians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Tabel 4: Præcisionsdata for HSV-2 på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,04	0,00	0,33
Inter-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,12	0,01	0,98
Inter-lot variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,14	0,02	1,12
Totalvarians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Totalvarians: <i>Intern Kontrol</i>	0,13	0,02	1,04

Tabel 5: Præcisionsdata for HSV-2 på grundlag af de kvantitative værdier (i kopier/ μ l).

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Inter-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Inter-lot variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Totalvarians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

11.4 Robusthed

Kontrol af robustheden bruges til bestemmelse af den samlede fejlrate for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Hertil blev 30 HSV negative cerebrospinalvæske- prøver (CSF) blandet med hver 3 kopier/ μ l elueringsvolumen HSV-1-kontrol- DNA (tredobbelt koncentration af den analytiske sensitivitetsgrænse). Efter oprensning med QIAamp DNA Mini Kit (se **8.1 DNA-isolering**) blev disse prøver analyseret med *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. På samme måde blev undersøgelsen for HSV-2 gennemført (30 cerebrospinal væskeprøver; 3 kopier/ μ l HSV-2-kontroll-DNA). Fejlraten for såvel HSV-1 og HSV-2 udgjorde for alle prøver 0 %. Robustheden for den Interne Kontrol blev yderligere kontrolleret igennem oprensning og analyse af 30 HSV negative cerebrospinalvæskeprøver. Den samlede fejlrate udgjorde 0 %. Inhibitioner blev ikke observeret. Dermed er robustheden for *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhed

Dataene til reproducerbarheden registreres for at kunne foretage en regelmæssig vurdering af effekten af *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit samt for en sammenligning med effekten af andre produkter. Disse bliver bekræftet ved deltagelse i ringforsøg.

11.6 Diagnostisk evaluering

artus HSV-1/2 LC 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- diagnostik-proceduren, bør anvende dette udstyr.
- Det er absolut nødvendigt at protokollen overholdes nøje, for at opnå optimale PCR-resultater.
- Holdbarhedsdatoerne for de enkelte komponenter, der er angivet på emballagen og etiketterne, skal overholdes. Udløbne reagenser må ikke benyttes.

13. Sikkerhedsinformationer

Sikkerhedsinformationer vedrørende *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* findes i de tilsvarende sikkerheds-datablade (afety data sheets, SDS). Disse findes som kompakt og brugervenlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.

14. Kvalitetskontrol










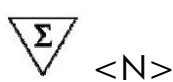

I overensstemmelse med det ISO 9001 og ISO 13485-certificerede kvalitets- management-system fra QIAGEN blev ethvert lot af *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* testet imod givne specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

15. Litteratur

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

(2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swap specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 - 767.

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 HSV-1/2 LC PCR Kit

Mærker og ansvarfraskrivelse

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (QIAGEN Group); *LightCycler*®, (Roche Diagnostics).

Registrerede Navn, varemærker, osv. I dette document kan ikke betragtes som juridisk ubeskyttede, selvom de mangler en tilsvarende kendetegnelse.

artus HSV-1/2 LC PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation og EZ1 DSP Virus Kit og Card er CE-mærkede diagnostiske produkter i overensstemmelse med den europæiske retningslinje 98/79/EF om in vitro-diagnostik. Kann 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 licenc 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 og 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

