

artus[®] EBV LC PCR

Kit Håndbog



24 (katalog nr. 4501063)



96 (katalog nr. 4501065)

Kvantitativ in vitro diagnostik

Til anvendelse med LightCycler[®] Instrument

version 1



4501063, 4501065



1046892DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046892DA



QIAGEN prøve- og analyse-teknologier

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

QIAGEN sætter standarder i:

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

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

Indholdsfortegnelse

1. Indhold	5
2. Opbevaring	5
3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter.....	10
4. Almindelige sikkerhedsregler	10
5. Information om smittefare	10
6. Princip for Real-Time PCR	11
7. Produktbeskrivelse	11
8. Protokol.....	12
8.1 DNA-isolering.....	12
8.2 Intern Kontrol	16
8.3 Kvantificering.....	17
8.4 Forberedelse af PCR.....	18
8.5 Programmering af <i>LightCycler</i> instrumentet.....	22
9. Analyse	20
10. Fejlkilder.....	23
11. Specifikationer.....	25
11.1 Analytisk sensitivitet.....	25
11.2 Specificitet	26
11.3 Præcision	26
11.4 Reproducerbarhed	28
11.5 Diagnostisk evaluering.....	28
12. Særlige anvisninger til brug af produktet	28

13. Advarsler og forholdsregler.....	29
14. Kvalitetskontrol	29
15. Litteratur	29
16. Symbolforklaring	30

artus EBV LC PCR Kit

Til anvendelse med *LightCycler* instrumentet.

1. Indhold

	Påskrift og indhold	Art. Nr. 4501063 24 reaktioner	Art. Nr. 4501065 96 reaktioner
Blå	EBV LC Master	2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Rød	EBV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 5 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	EBV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 5 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	EBV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 5 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Rød	EBV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 5 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grøn	EBV LC IC ^{xx}	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Hvid	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

^{xx}QS = Kvantificeringsstandard

IC = Intern Kontrol

2. Opbevaring

artus EBV LC PCR Kit opbevares ved -15 til -30 °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

- Pudderfri engangs laboratoriehandsker
- DNA-isoleringskit (se 8.1 DNA-isolering)
- Pipetter (justerbare)
- 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 µl)
- *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

Epstein-Barr-virusen (EBV) overføres oralt, for det meste af kontamineret spyt. Infektionen med EBV forløber som regel asymptomatisk, især hos børn. Kliniske symptomer på en akut infektion er den pfeifferske kirtelfeber med

feber, træthed, angina og hævelse af lymfekirtlerne og milten. Hos nogle patienter kan disse symptomer optræde kronisk-recidiverende. Alvorlige forløb for EBV-infektionen forekommer især ved immunsupprimerede patienter og personer med T-celle-defekter.

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 EBV LC PCR Kit er et brugsklart system til detektion af EBV-DNA ved hjælp af polymerase kædereaktion (PCR) i *LightCycler* instrumentet. *EBV LC Master* indeholder reagenser og enzymer til den specifikke amplifikation af en 97 bp lang sekvens af EBV-genomet og til umiddelbar detektion af et amplifikat i fluorescens-kanalen F2 af *LightCycler* instrumentet. Derudover indeholder *artus* EBV LC PCR Kit et andet heterologt amplifikationssystem, som bruges til detektion af en eventuel PCR-inhibition. Denne bliver påvist som *Intern Kontrol (IC)* i fluorescens-kanalen F3. Detektionsgrænsen for den analytiske EBV-PCR (se 11.1 **Analytisk sensitivitet**) bliver derved ikke reduceret. Der vedlægges eksterne positive kontroller (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*), som bruges til kvantificering af smitstoffet. Læs dertil afsnittet 8.3 **Kvantificering**.

Bemærk: Temperaturprofilen til detektion af EBV-DNA via *artus* EBV LC PCR Kit svarer såvel til *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit som til *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 herved de 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:

Prøvemateriale	oprensningskit	Katalognummer	Producent	Carrier RNA
Serum, plasma, CSF (cerebrospinal-væske)	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	ikke indeholdt
	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	indeholdt
blodceller	QIAamp Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	ikke indeholdt
Plasma	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	indeholdt

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

Vigtig henvisning vedrørende anvendelsen af QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini 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 Pol(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 lysisbufferen) af isoleringskittet (f.eks. AE-buffer fra QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood 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. $200 \mu\text{l}$ lysisbuffer per oprenset prøve, tilsættes $2 \mu\text{l}$ af carrier-RNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) direkte til lysisbufferen. Før begyndelsen af enhver oprensning 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. $2.400 \mu\text{l}$
Carrier-RNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2 \mu\text{l}$	$24 \mu\text{l}$
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-RNA før den første brug af isoleringskittet i 310 μl af elueringsbufferen, som er indeholdt i kittet (slutkoncentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, anvend ikke lysisbuffer), og lav af carrier-RNA-løsningen et for Deres egne krav passende antal aliquoter, som skal opbevares ved -20°C . Undgå gentagen optøning ($> 2 \times$) af carrier-RNA-aliquoten.
- b. Før begyndelsen af enhver oprensning skal blandingen af lysisbuffer og carrier-RNA (og i givent tilfælde *Intern Kontrol*, se **8.2 Intern Kontrol**) fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer AC	800 μl	9600 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.
 - Beholderene til udtagelsen af blodprøver indeholder **Antikoagulantier**, som kan virke inhiberende på PCR'en. Disse bliver enddog godt elimineret fra de oplyste oprensningskits. Der frarådes benyttelsen af heparin-blod.
 - Bruger man en oprensningsprotokol med **ethanolholdige** vaskebuffer, anbefales det, at man udfører et ekstra centrifugeringstrin (tre minutter, 13000 rpm) for at fjerne ethanolrester. Dette forhindrer eventuelle PCR-inhibitioner.

- *artus* EBV LC PCR Kit er ikke egnet til oprensingskørsler, 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: *Intern Kontrol* til *artus* EBV LC PCR Kit kan anvendes direkte i oprensningen (se **8.2 Intern Kontrol**).

8.2 Intern Kontrol

Der vedlægges en *Intern Kontrol (EBV 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**, **QIAampDNA Blood Mini Kit** eller ved **QIAamp DNA Mini Kit** tilsættes den *Interne Kontrol* i et forhold der svarer til 0,1 μl pr. 1 μl elueringsvolumen til oprensningen. Hvis De f.eks. anvender **QIAamp DNA Mini Kit** og eluerer DNA i 200 μl AE-puffer, skal der tilsættes 20 μl af den *Interne Kontrol*. Hvis De f.eks. eluerer i 100 μl , skal der tilsvarende tilsættes 10 μl . Mængden af den anvendte *Interne Kontrol* er **kun** afhængigt 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 tilsættes direkte til prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for at blandingen af den *Interne Kontrol* og lysisbuffer/carrier-RNA forberedes frisk og tilsættes med 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 μl af den *Interne Kontrol* direkte til 15 μl *EBV LC Master*. Brug til hver PCR-reaktion 15 μl af den således fremstillede *Master Mix*^{*} og tilsæt derefter 5 μl af den oprensede prøve. Ved udførelsen af en kørsel med flere prøver, er det nødvendigt at øge de krævede mængder af *EBV LC Master* og af den *Interne Kontrol* svarende til prøvetallet (se **8.4 Forberedelse af PCR**).

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

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

8.3 Kvantificering

De vedlagte *Kvantificeringsstandarder (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen (5 µl). For at udarbejde en standardkurve i *LightCycler* instrumentet, tilsæt alle fire vedlagte *Kvantificeringsstandarder*. Definér 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 mere end et herpes-artus-system integreret i Deres kørsel, skal disse analyseres separate sammen med deres tilhørende *Kvantificeringsstandarder*.

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

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

Bemærk, at der principielt skal tilsættes det oprindelige prøvevolumen i den ovennævnte formel. Dette skal tages i betragtning, hvis prøvevolumenet blev forandret før nukleinsyre-oprensningen (f.eks. at den blev indsnævret ved centrifugering eller forhøjet ved at den blev fyldt op 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 med de tilhørende adaptore (tilbehør til *LightCycler* instrumentet) er kølet ned til +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* samt en negativ kontrol (*Water, PCR grade*). Til udarbejdelse af en standardkurve anvendes per PCR-kørsel alle vedlagte *Kvantificerings-standarder* (*EBV 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	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	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 *EBV LC Master*. Brug i dette tilfælde følgende pipetteringsskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 2):

	Antal prøver	1	12
1. Opsætning af Master Mix	<i>EBV LC Master</i>	15 μ l	180 μ l
	<i>EBV LC IC</i>	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

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 (EBV 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 plastikreservoiret til kapillarerne, centrifugeres adapterne med kapillarerne i en bordcentrifuge i ti sekunder ved maksimalt 400 x g (2.000 rpm).

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

Tilsætning af *Intern Kontrol* til oprensningen

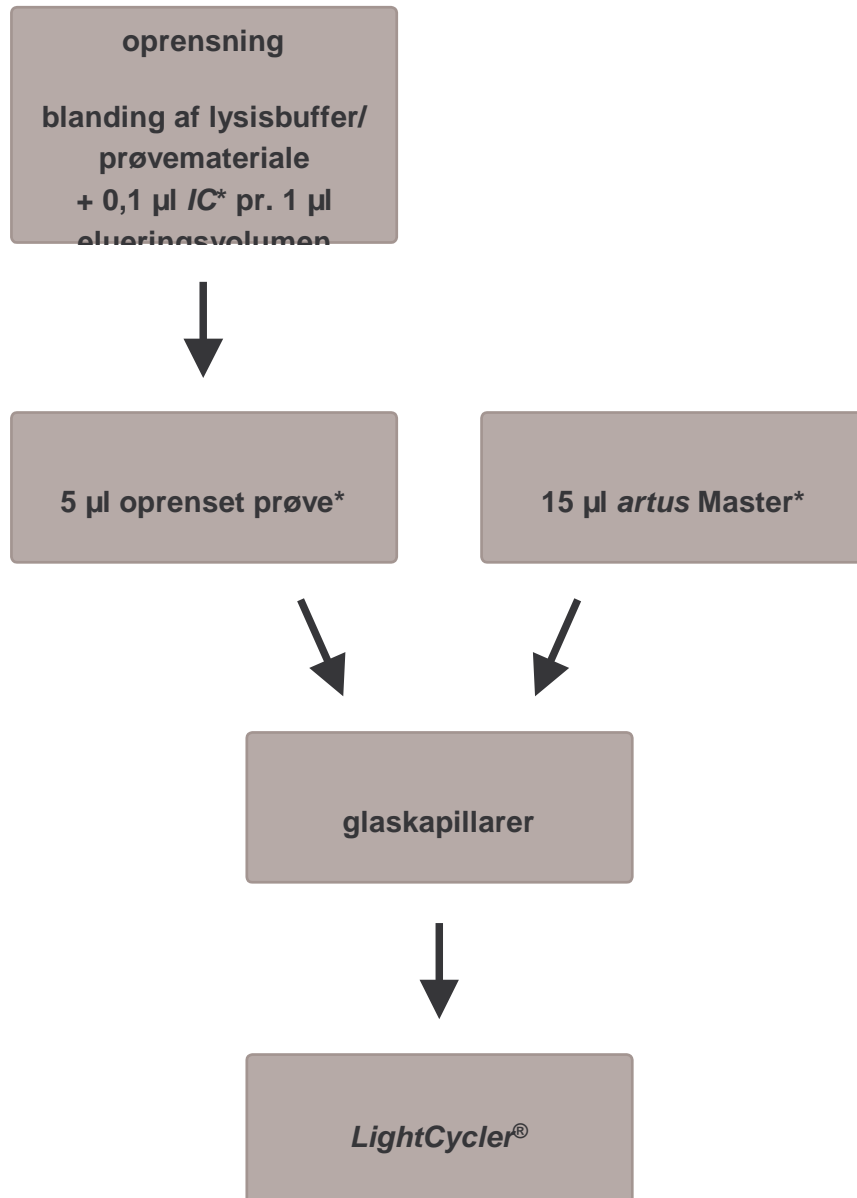


Fig. 1: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af oprensning og PCR-inhibition.

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

Tilsætning af Intern Kontrol til *artus* Master

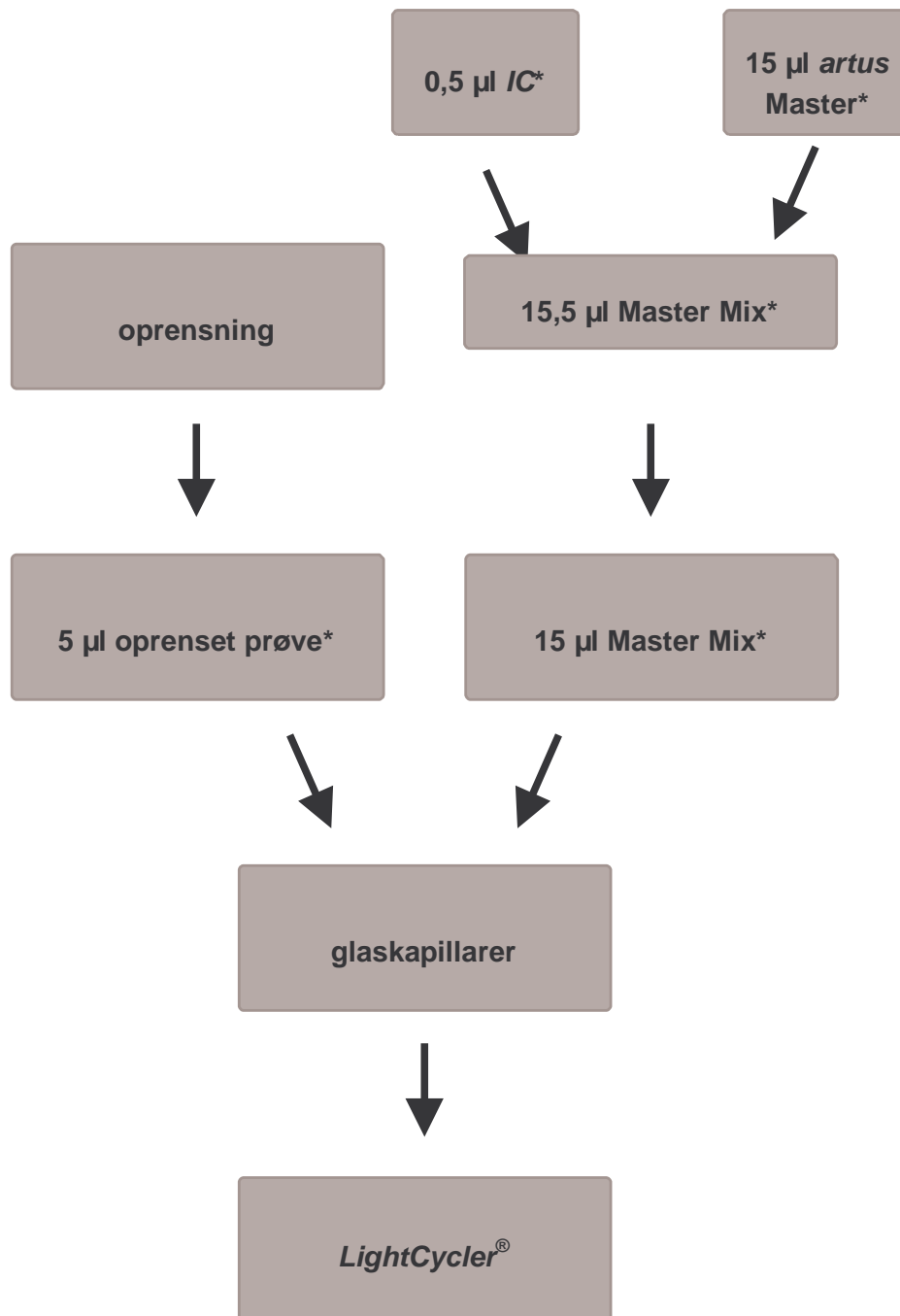


Fig. 2: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af PCR-inhibition.

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

8.5 Programmering af *LightCycler* instrumentet

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

- | | | |
|----|---------------------------------|--------|
| A. | Aktivering af hot start-enzymet | Fig. 3 |
| B. | TouchDown-trin | Fig. 4 |
| C. | Amplifikation af DNA | Fig. 5 |
| D. | Smeltekurve (valgfri) | Fig. 6 |
| E. | Køling | Fig. 7 |

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

Oprettelsen af en smeltekurve, trin D. er **valgfri**. Trinnet bliver udelukkende brugt til differentieringen mellem HSV-1 og HSV-2 ved samtidig brug af *artus* HSV 1/2 LC PCR Kit.

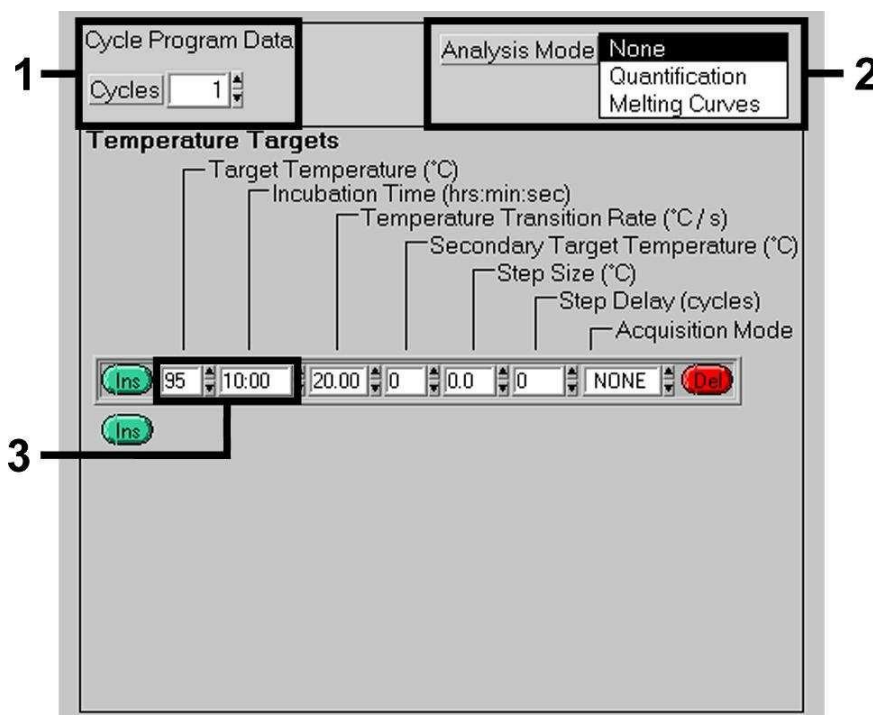


Fig. 3: Aktivering af hot start-enzymet.

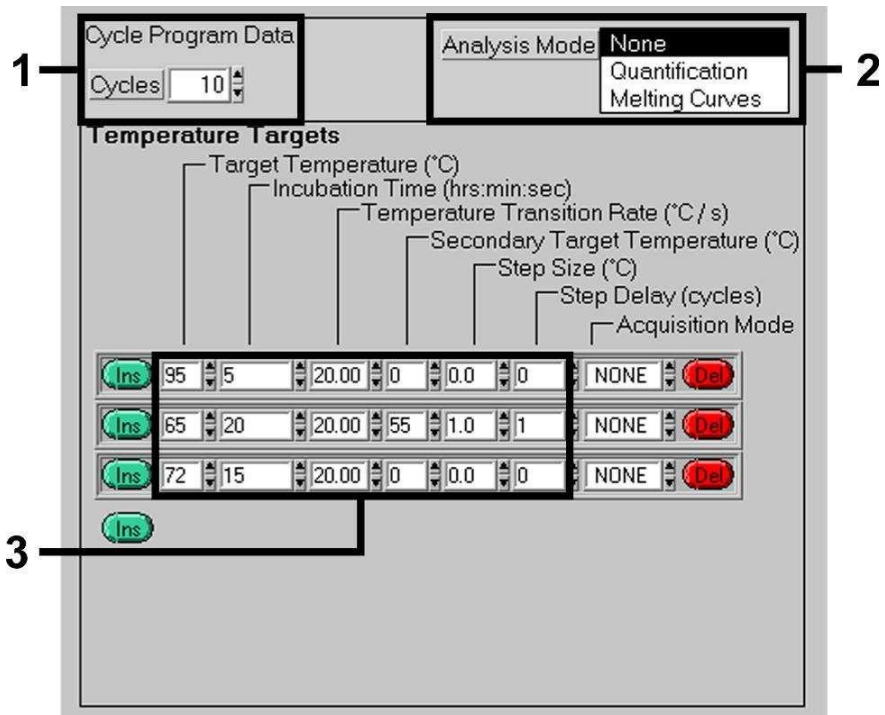


Fig. 4: Touch Down-trin.

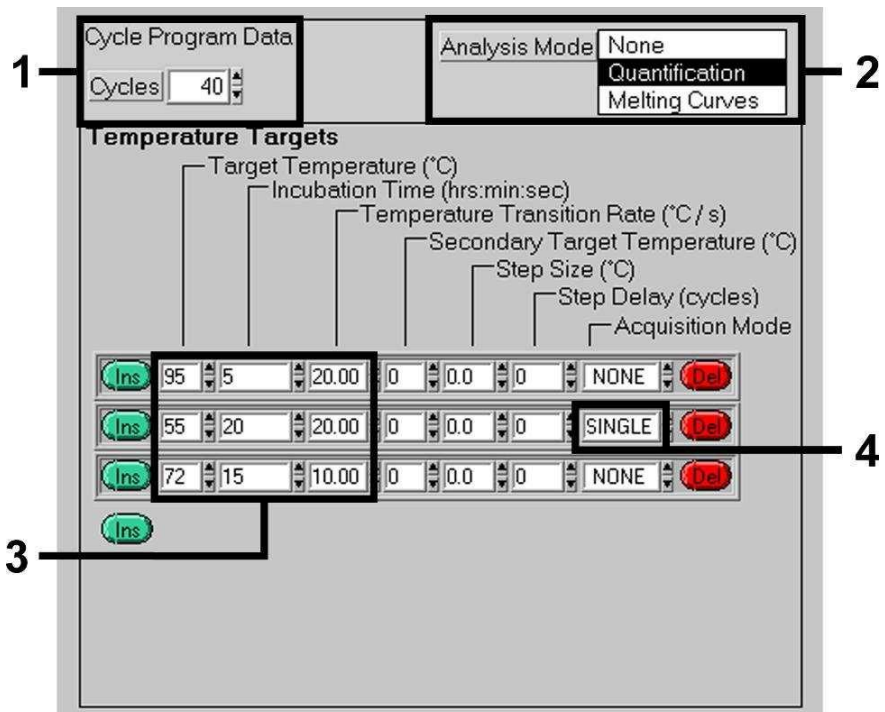


Fig. 5: Amplifikation of DNA.

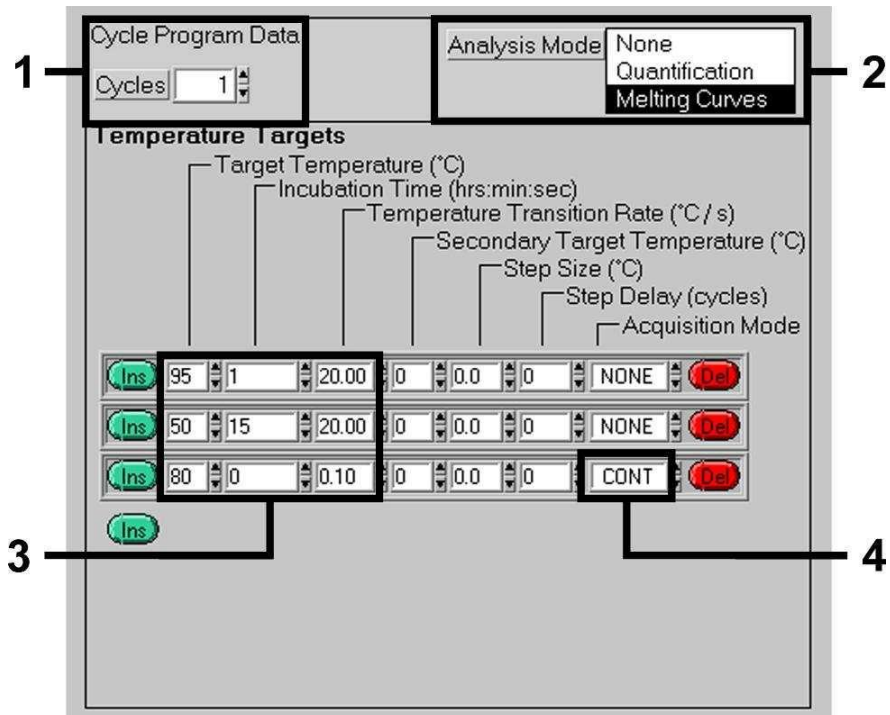


Fig. 6: Smeltekurve.

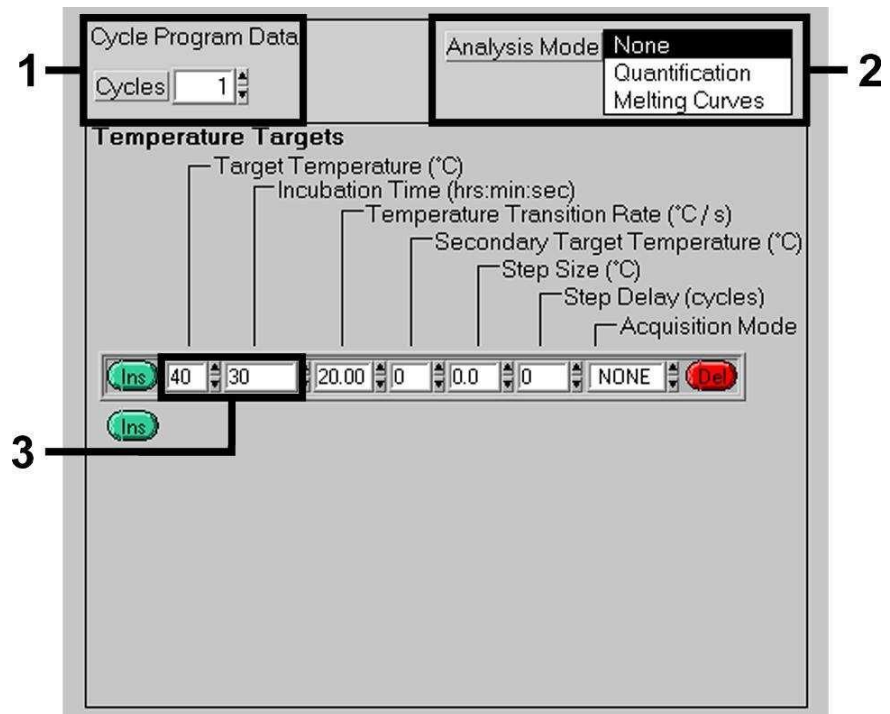


Fig. 7: Køling.

9. Analyse

Ved multifarve-analyser optræder interferenser mellem fluorescens-kanalerne. 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 EBV LC PCR Kit*, vælges visningsfunktionerne F2/Back- F1 for den analytiske EBV-PCR, hhv. F3/Back-F1 for PCR'en af den *Interne Kontrol*. For 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 mere end et herpes-*artus*-system integreret i Deres PCR-kørsel, skal der sørges for at EBV-prøver analyseres separate. Vælg dertil de tilsvarende rotor-positioner for analysen.

Følgende resultater er mulige:

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

Analysens resultat er positivt: Prøven indeholder EBV-DNA.

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

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 EBV-DNA. Den kan således betragtes som negativ.

Ved negativ EBV-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 er angivet i Fig. 8 og Fig.

9.

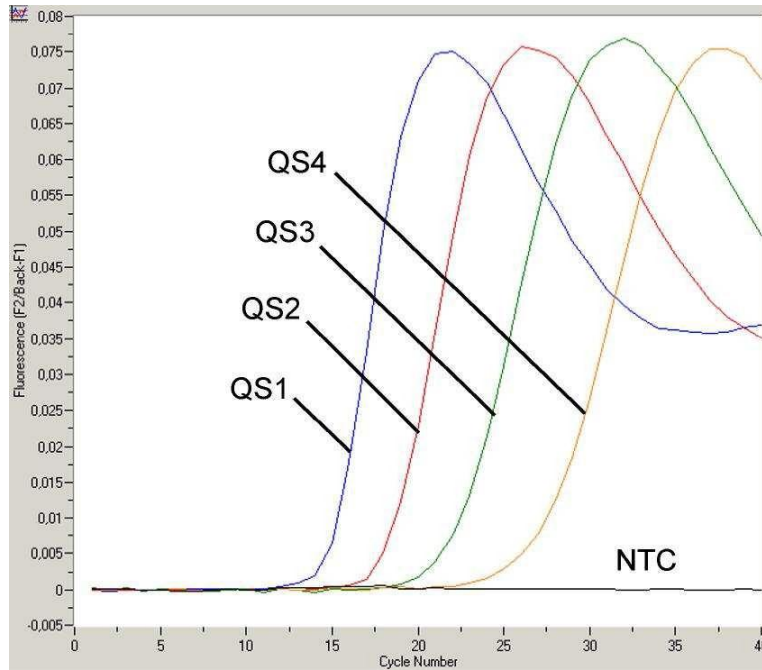


Fig. 8: Detektion af Kvantificeringsstandarder (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) i fluorescens-kanalen F2/Back-F1. NTC: non- template control (negativkontrol).

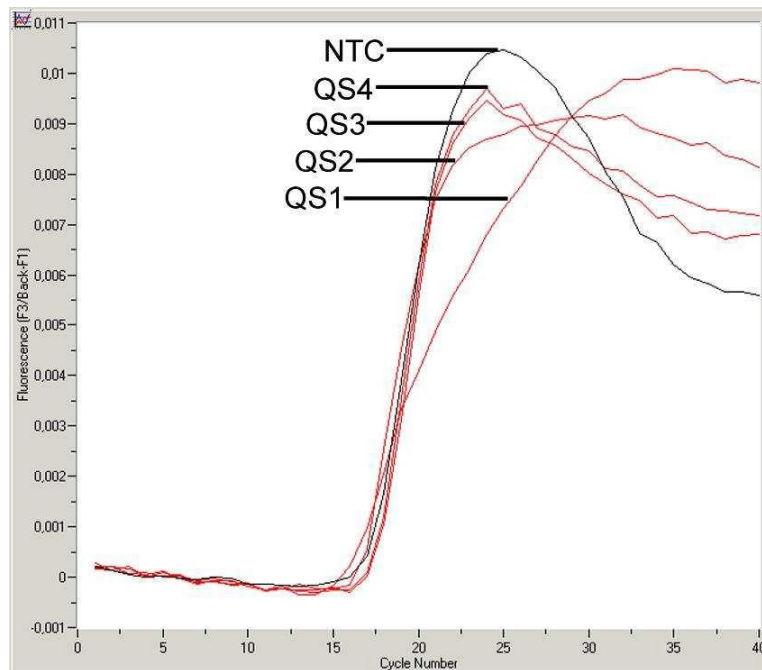


Fig. 9: Detektion af den Interne Kontrol (IC) i fluorescens-kanalen F3/Back-F1 ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativkontrol).

10. Fejlkilder

Intet signal ved positivkontrollerne (EBV 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 EBV-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 arbejdsrinnene ved hjælp af pipetteringskemaet (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* EBV 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 oprensingsmetode (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 forårsaget af 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 af en eller flere af kittets komponenter svarer ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus EBV 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 tilsidst.
 - ❖ 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 skulle opstå yderligere spørgsmål eller problemer, kontakt venligst vores tekniske service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* EBV LC PCR Kit blev der udarbejdet en standard-fortyndingsrække af 50 til nominelt 0,005 EBV-kopiækvivalenter*/ μl . Denne blev derefter analyseret med *artus* EBV 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. 10. Detektionsgrænsen for *artus* EBV LC PCR Kit ligger således ved 5,78 kopier/ μl ($p = 0,05$). Det betyder at 5,78 kopier/ μl kan detekteres med 95 % sandsynlighed.

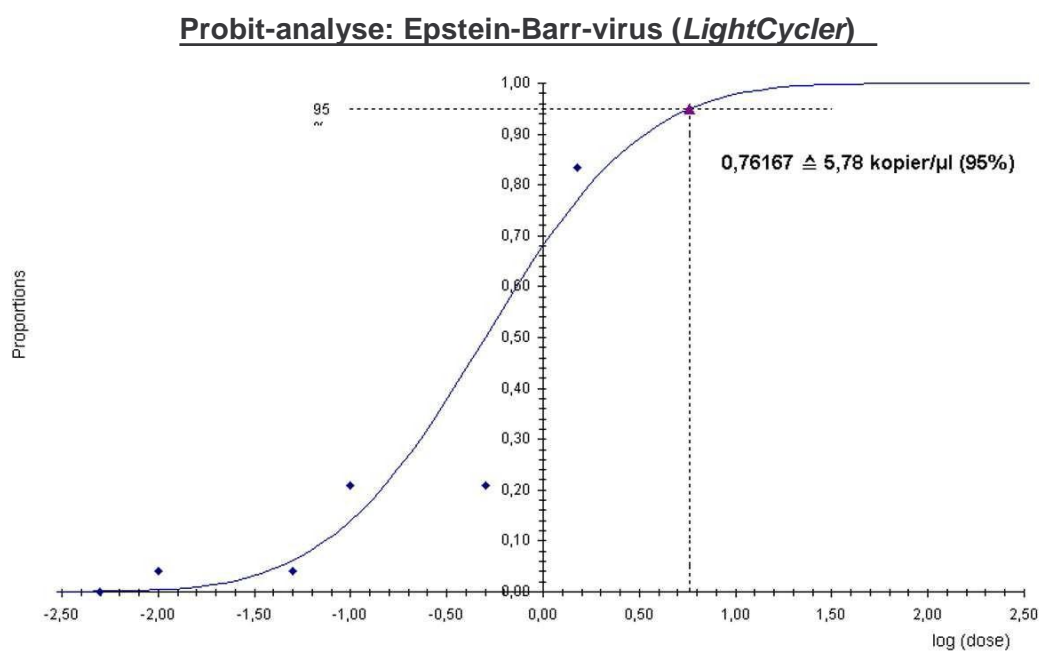


Fig. 10: Analytisk sensitivitet for *artus* EBV LC PCRKit.

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

11.2 Specificitet

Specificiteten for *artus* EBV LC PCR Kit sikres først og fremmest igennem udvalget af primere og prober samt ved valget af stringente reaktionsbetingelser. Primerne og proberne blev kontrolleret for eventuelle homologier til andre kendte sekvenser ved hjælp af en sekvenssammenlignings-analyse. Detekterbarheden for alle relevante genotyper kontrolleres herved.

Specificitetens validering blev derudover foretaget på seks forskellige EBV negative serumprøver, som ikke genererede et signal med de EBV specifikke primere og prober, der er indeholdt i *EBV LC Master*.

Til bestemmelse af specificiteten for *artus* EBV 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	EBV (F2/Back-F1)	Intern Kontrol (F3/Back-F1)
Humant herpesvirus 1 (Herpes-simplex-virus 1)	-	+
Humant herpesvirus 2 (Herpes-simplex-virus 2)	-	+
Humant herpesvirus 3 (Varizella-zoster-virus)	-	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Humant T-celle-leukæmi-virus 1	-	+
Humant T-celle-leukæmi-virus 2	-	+

11.3 Præcision

Præcisionsdata for *artus* EBV LC PCR Kit tillader en bestemmelse af totalvariansen af testsystemet. Denne totalvariens (samlet spredning) består af **Intra-assay variationen** (spredning af prøver med samme koncentration inden for en forsøgsopsætning), af **Inter-assay variationen** (spredning der forekommer pga. forskellige personer inden for et laboratorium, der udfører

analysen på forskellige apparater af samme type) og af **Inter-lot variationen** (spredning ved benyttelse af forskellige lots). Via dette bliver såvel standardafvigelsen, variansen og variationskoefficienten for både den smitstof-specifikke-, og *Intern Kontrol*- PCR'en beregnet.

Disse præcisionsdata blev for *artus EBV LC PCR Kit* bestemt på baggrund af *Kvantificeringsstandard* med den laveste koncentration (QS 4; 50 kopier/ μ l). Undersøgelserne blev udført med otte replikater. Resultaterne af præcisionsdataene blev beregnet på baggrund af amplifikationskurvens Ct-værdier (Ct: *threshold cycle*, se Tabel 2) og de derudfra beregnede kvantitative værdier i kopier/ μ l (se Tabel 3). Således omfatter den samlede variation af en prøve med den oplyste koncentration af *EBV* 1,17 % (Ct) hhv. 14,54 % (konc.), og til detektion af den *Interne Kontrol* 1,02 % (Ct). Disse værdier er baseret på helheden af enkeltværdierne af alle konstaterede variationer.

Tabel 2: Præcisionsdata på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,04	0,00	0,28
Inter-assay variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,11	0,01	0,72
Inter-lot variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,19	0,03	1,23
Totalvarians: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,17
Totalvarians: <i>Intern Kontrol</i>	0,15	0,02	1,02

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

	Standard-afvigelse	Varians	Variationskoefficient [%]
Intra-assay variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Inter-assay variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Inter-lot variation: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Totalvarians: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

11.4 Reproducerbarhed

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

11.5 Diagnostisk evaluering

artus EBV 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-diagnostika-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. Advarsler og forholdsregler

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









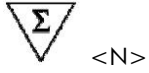

14. Kvalitetskontrol

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

15. Litteratur

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

16. Symbolforklaring

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

artus EBV LC PCR Kit

Mærker og ansvarsfraskrivelse

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

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

artus EBV 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. Kan ikke fås i alle lande..

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

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

© 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

