



Handbok till *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR Kit

 24 (katalognr. 4500263)
 96 (katalognr. 4500265)

Version 1



Kvalitativ in vitro-diagnostik

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



4500263, 4500265



1060171SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

 MAT

1060171SV



QIAGEN provtagnings- och analysmetoder

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder, som möjliggör isolering och detektion av innehållet i vilket som helst biologiskt prov. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

QIAGEN bestämmer normerna vid:


- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vår mission är att göra det möjligt för dig att uppnå stor framgång och genombrott. För ytterligare information, se www.qiagen.com.

Innehåll

Satsinnehåll	4
Symboler	4
Förvaring	5
Avsedd användning	5
Begränsningar för produktanvändning	6
Teknisk support	6
Kvalitetskontroll	6
Varningar och försiktighet	7
Inledning	8
Princip	8
Information om patogenen	8
Prestanda och egenskaper	9
Analytisk sensitivitet	9
Specificitet	10
Precision	13
Robusthet	16
Reproducerbarhet	16
Utrustning och reagenser som tillhandahålls av användaren	17
Viktiga anmärkningar	18
Allmänna försiktighetsåtgärder	18
Isolering av DNA	18
Intern kontroll	19
Protokoll: PCR- och dataanalys	20
<i>i</i> Viktigt att tänka på före start	20
Saker som bör göras före start	20
Procedur	20
Felsökningsguide	31
Referenser	34
Beställningsinformation	35

Satsinnehåll

artus HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Katalognummer		4500263	4500265
Antal reaktioner		24	96
Blå	HSV-1/2 RG Master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Gul	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Röd	HSV-1 RG PC [†] (100 kop/µl)	200 µl	200 µl
Brun	HSV-2 RG PC [†] (100 kop/µl)	200 µl	200 µl
Grön	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Vit	Vatten (PCR-grad)	1000 µl	1000 µl
	Handbok 	1	1

* Magnesiumlösning.

† Positiv kontroll.

‡ Intern kontroll.

Symboler



<N>

Innehållet räcker till <N> tester



Använd senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsningar



Lagenlig tillverkare



Se den information som finns i handboken



Viktig anmärkning

Förvaring

Komponenterna i *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit ska förvaras vid -15 till -30 °C och är stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Upprepad upptining och frysning (>2 gånger) bör undvikas, eftersom detta kan minska analysens sensitivitet. Om reagenserna ska användas endast intermittent bör de frysas in i aliquoter. Förvaring vid $2-8$ ° C får inte överstiga 5 timmar.

Avsedd användning

artus HSV-1/2 RG PCR Kit är en realtidsbaserad polymeraskedjereaktionsanalys (polymerase chain reaction, PCR) för detektion och diskriminering av humant herpes simplex-virus 1 och 2 DNA i Rotor-Gene Q-instrument efter helautomatisk rening av prover av cerebrospinalvätska (CSV) från personer som infekterats med HSV med användning av EZ1[®] DSP Virus Kit.



artus HSV-1/2 RG PCR Kit får inte användas med Rotor-Gene Q 2plex-instrument.

artus HSV-1/2 RG PCR Kit är avsett att användas i samband med kliniska fynd och andra laboriemarkörer för sjukdomsprognos.

Begränsningar för produktanvändning

Samtliga reagens får endast användas vid in vitro-diagnostik.

Produkten får endast användas av personal som fått specialinstruktioner och utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer (EN375).

Strikt efterlevnad av användarmanualen krävs för optimala PCR-resultat.

De utgångsdatum som står tryckta på kartongen och etiketterna till samtliga komponenter måste observeras. Använd inte komponenter som passerat sitt utgångsdatum.

Teknisk support

Vi på QIAGEN är stolta över vår tekniska supports kvalitet och tillgänglighet. Våra tekniska serviceavdelningar är bemannade med erfarna vetenskapsmän med omfattande praktisk och teoretisk expertis inom molekylärbiologi och användningen av QIAGEN®-produkter. Tveka inte att kontakta oss om du har frågor eller problem med *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit eller QIAGEN-produkter i allmänhet.

QIAGEN-kunder är en viktig informationskälla beträffande avancerad eller specialiserad användning av våra produkter. Denna information är användbar såväl för andra vetenskapsmän som för forskarna på QIAGEN. Vi uppmanar dig därför att kontakta oss om du har några förslag om produktprestanda eller nya applikationer och metoder.

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ring en av QIAGEN tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot av *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Varningar och försiktighet

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, där du finner och kan skriva ut datablad för materialsäkerhet för alla QIAGEN®-satser och satskomponenter.

Kassera prover och avfall från analysen enligt lokala säkerhetsbestämmelser.

Inledning

artus HSV-1/2 RG PCR Kit är ett bruksfärdigt system för detektion av HSV-1 och HSV-2 DNA med hjälp av en polymeraskedjereaktion (PCR) i Rotor-Gene Q-instrument. HSV-1/2 RG Master innehåller reagens och enzymer för specifik förstärkning av en 154 bp-region på HSV-1- och HSV-2-genomen, samt för direkt detektion av den specifika amplikonen på fluorescenskanalerna Cycling Green (källa 470 nm, detektor 510 nm) och Cycling Orange (källa 585 nm, detektor 610 nm) i Rotor-Gene Q-instrument.

Dessutom innehåller *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit ytterligare ett heterologt förstärkningssystem för att identifiera eventuell PCR-inhibering. Detta detekteras som en internkontroll (IC) på fluorescenskanal Cycling Gul (källa 530 nm, detektor 555 nm) i Rotor-Gene Q-instrument. Detektionsgränsen på den analytiska HSV-1/2 RG PCR (se "Prestanda och egenskaper", sida 9) reduceras inte. De externa positiva kontrollerna (HSV-1 RG PC och HSV-2 RG PC) medföljer.

Princip

Detektion av patogener genom polymeraskedjereaktion (PCR) baseras på förstärkning av specifika regioner i patogenens genom. Vid realtids-PCR detekteras den förstärkta produkten via fluorescerande färgningar. Dessa är oftast länkade till oligonukleotida prober som binds specifikt till den förstärkta produkten. Genom att övervaka fluorescensens intensitet under PCR-körningen (dvs. i realtid) kan den ackumulerande produkten detekteras och kvantifieras utan att reaktionsprovrören behöver öppnas igen efter PCR-körningen.*

Information om patogenen

Herpes simplex-virus (HSV) förekommer i sårvätska, saliv, cerebrospinalvätska (CSV) och vaginalt sekret. Det överförs i huvudsak via direktkontakt med sår och vid samlag samt perinatalt. Sår på hud och slemhinnor i mun och könsorgan är kännetecknande för de flesta HSV-positiva fall. HSV-infektionen kan vara antingen primär (> 90 % av dessa fall är asymptomatiska) eller återkommande (sekundär). Primär infektion med HSV-1 kan leda till bland annat gingivostomatit, eczema herpeticum, keratokonjunktivit och encefalit. Primär HSV-2-infektion uppträder bland annat i form av vulvovaginit, meningit och generaliserad herpes hos nyfödda. De primära symptomen på en sekundär infektion är hudlesioner i näsa, mun och könsorganen. De återkommande formerna av keratokonjunktivit och meningit är ännu mer allvarliga.

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

Prestanda och egenskaper

Analytisk sensitivitet

För att fastställa den analytiska sensitiviteten för *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit förbereddes en standardspädningsserie från 10 till 0,001 kopior/ μ l och analyserades på Rotor-Gene Q/6000 i kombination med *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Testerna utfördes 3 olika dagar på 8 replikat. Resultaten fastställdes genom probit-analys. Den analytiska detektionsgränsen för *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit i kombination med Rotor-Gene Q/6000 är konsekvent 0,12 kopior/ μ l ($p = 0,05$) för HSV-1 och 0,16 kopior/ μ l ($p=0,05$) för HSV-2. Det innebär att det är 95 % sannolikhet att 0,12 kopior/ μ l av HSV-1-DNA eller 0,16 kopior/ μ l av HSV-2-DNA kommer att detekteras. En grafisk illustration av probit-analysen för HSV-1 visas i Fig. 1 ovan; diagrammet över probit-analysen för HSV-2 visas i Fig. 2

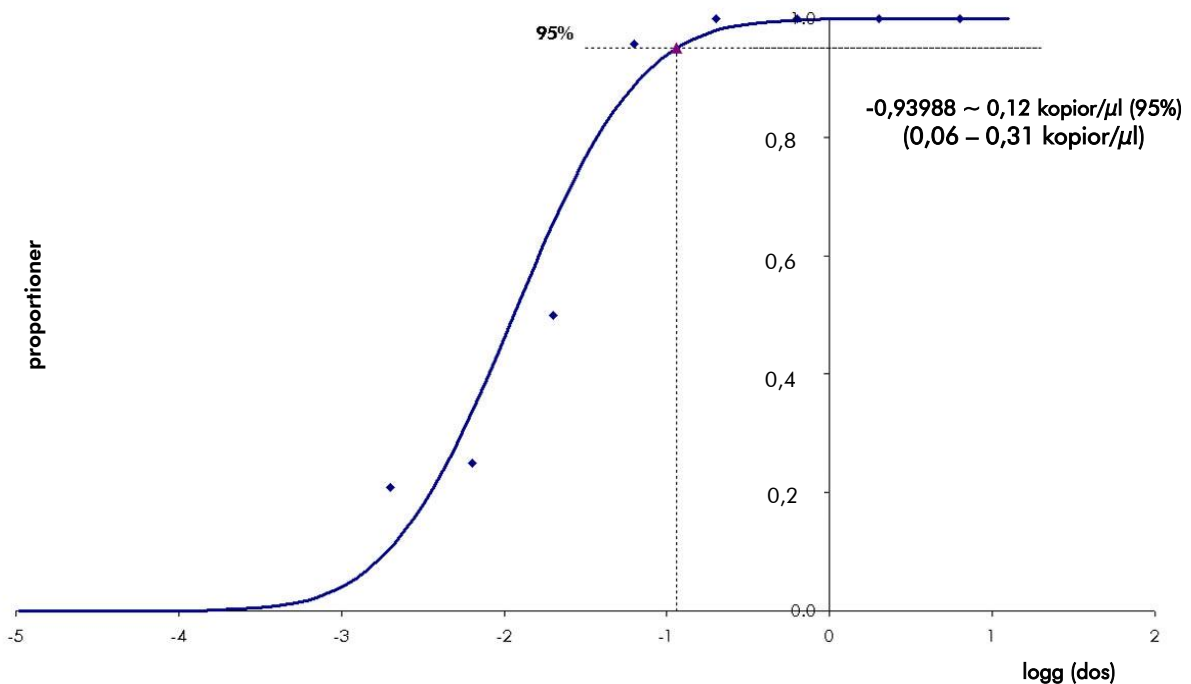


Fig. 1. Probit-analys: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). *artus* HSV-1/2 RG PCR Kits analytiska sensitivitet för HSV-1 på Rotor-Gene Q/ 6000.

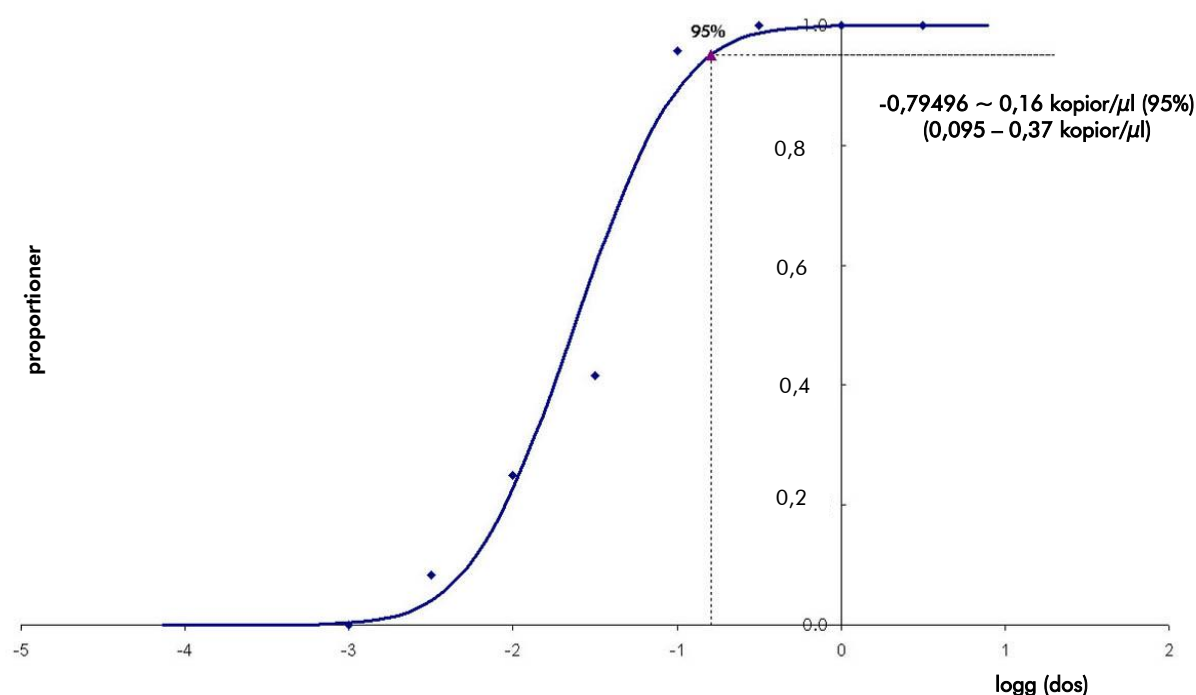


Fig. 2. Probit-analys: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). *artus* HSV-1/2 RG PCR Kits analytiska sensitivitet för HSV-1 på Rotor-Gene Q/ 6000.

Specificitet

artus HSV-1/2 PCR Kits specificitet garanteras främst genom valet av primers och prober samt genom att välja strikta reaktionsförhållanden. Primerna och proberna kontrollerades för möjliga homologier med alla publicerade sekvenser i genbanker genom jämförande sekvensanalys. Möjligheten att detektera alla relevanta genotyper hade därmed garanterats genom justering mot en databas samt genom en PCR-körning på Rotor Gene-instrument med de stammar som anges i tabell 1.

Dessutom validerades specificiteten med 30 olika HSV-1- och HSV-2-negativa CSV-prover. Dessa genererade inga signaler med de HSV-1- och HSV-2-specifika primers och prober som ingår i HSV-1/2 RG Master.

Potentiell korsreaktivitet för *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit testades med användning av den kontrollgrupp som anges i tabell 2. Inga av de testade patogenerna har varit reaktiva.

Tabell 1. Test av specificiteten för relevanta genotyper

Virus	Stam	Källa	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Intern kontroll (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	–	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	–	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	–	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	–	+	+
HSV-2	G	ATCC*	–	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	–	+	+

* ATCC American Type Culture Collection.

† INSTAND Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories.

‡ QCMD Quality Control for Molecular Diagnostics.

§ NCPV National Collection of Pathogenic Viruses.

Tabell 2. Test av kitets specificitet vid potentiellt korsreaktiva patogener

Kontrollgrupp	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Intern kontroll (Cycling Yellow)
Humant herpesvirus 3 (varicella-zoster-virus)	–	–	+
Humant herpesvirus 4 (Epstein-Barr-virus)	–	–	+
Humant herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	–	+
Humant herpesvirus 6A	–	–	+
Humant herpesvirus 6B	–	–	+
Humant herpesvirus 7	–	–	+
Humant herpesvirus 8 (Kaposis sarkom-associerat herpesvirus)	–	–	+
Hepatit A-virus	–	–	+
Hepatit B-virus	–	–	+
Hepatit C-virus	–	–	+
Humant immunbristvirus (HIV)	–	–	+
Humant T-cellsleukemivirus 1	–	–	+
Humant T-cellsleukemivirus 2	–	–	+
Enterovirus	–	–	+
Parvovirus B19	–	–	+
Västnilvirus	–	–	+

Precision

Precisionsdata för *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit har samlats in med hjälp av Rotor-Gene-instrument och ger möjlighet att fastställa analysens totala varians. Den totala variansen består av intraanalysvariabilitet (variabilitet mellan flera olika resultat för prover med samma koncentration inom ett och samma experiment), interanalysvariabilitet (variabilitet mellan flera olika resultat av analysen som genererats på olika instrument av samma typ av olika operatörer på ett och samma laboratorium) samt interbatchvariabilitet (variabilitet mellan flera olika resultat av analysen med användning av flera olika batcher). Erhållna data användes för att fastställa standardavvikelsen, variansen samt variationskoefficienten för den patogenspecifika och interna kontroll-PCR:en.

Precisionsdata för *artus* HSV-1/2 RG PCR har samlats in med användning av HSV-1- och HSV-2-DNA med en koncentration av 10 kopior/ μ l. Testerna utfördes med 8 replikat. Precisionsdata beräknades grundat på C_T -värdena för förstärkningskurvorna (C_T : tröskelcykel, se tabell 3 och tabell 4). Baserat på dessa resultat är den övergripande statistiska spridningen för ett givet prov med angiven koncentration 1,82 % (C_T) för HSV-1, 0,67 % (C_T) för HSV-2 samt 1,24 % (C_T) respektive 1,58 % (C_T) för detektion av den interna kontrollen. Dessa värden är baserade på summan av alla de enstaka värdena i den fastställda variabiliteten.

Tabell 3. Precisionsdata för HSV-1 på grundval av C_T-värdena

	C_T-värde	Standard- avvikelse.	Variations- koefficient (%)
Intraanalysvariabilitet: HSV-1 10 kopior/ μ l	30,46	0,25	0,81
Intraanalysvariabilitet: Intern kontroll	25,29	0,08	0,3
Interanalysvariabilitet: HSV-1 10 kopior/ μ l	29,69	0,69	2,05
Interanalysvariabilitet: Intern kontroll	24,97	0,31	1,25
Interbatchvariabilitet: HSV-1 10 kopior/ μ l	29,95	0,40	1,35
Interbatchvariabilitet: Intern kontroll	24,90	0,30	1,20
Total varians: HSV-1 10 kopior/ μ l	29,91	0,55	1,82
Total varians: Intern kontroll	24,99	0,31	1,24

Tabell 4. Precisionsdata för HSV-2 på grundval av C_T-värdena

	C_T-värde	Standard- avvikelse.	Variations- koefficient (%)
Intraanalysvariabilitet: HSV-2 10 kopior/ μ l	29,5	0,15	0,50
Intraanalysvariabilitet: Intern kontroll	25,17	0,39	1,55
Interanalysvariabilitet: HSV-2 10 kopior/ μ l	29,92	0,15	0,49
Interanalysvariabilitet: Intern kontroll	25,11	0,41	1,63
Interbatchvariabilitet: HSV-2 10 kopior/ μ l	29,80	0,23	0,79
Interbatchvariabilitet: Intern kontroll	24,89	0,33	1,32
Total varians: HSV-2 10 kopior/ μ l	29,88	0,20	0,67
Total varians: Intern kontroll	25,07	0,40	1,58

Robusthet

Verifikation av robusthet gör det möjligt att fastställa den totala misslyckandefrekvensen för *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. För att erhålla mycket låga virustitrer av HSV-1 och HSV-2 tillsattes 0,36 kopior/ μ l elueringsvolym av HSV-1- eller 0,48 kopior/ μ l elueringsvolym av HSV-2-DNA (trefaldig koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen) till 30 negativa CSV-prover. Efter extrahering med EZ1 DSP Virus Kit analyserades dessa prover med *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Alla 30 proverna bedömdes korrekt som svagt positiva för respektive HSV-typ, vilket ledde till en misslyckandefrekvens på 0 %. Dessutom bedömdes den interna kontrollens robusthet genom rening och analys av 30 HSV-1- och HSV-2-negativa CSV-prover. Ingen inhibering av PCR detekterades, vilket resulterade i en total misslyckandefrekvens på 0 %. *artus* HSV-1/2 RG PCR Kits robusthet är därmed ≥ 99 %.

Reproducerbarhet

Reproducerbarhetsdata möjliggör regelbunden prestandabedömning av *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit liksom effektivitetsjämförelse med andra produkter. Dessa data erhålls genom deltagande i etablerade kvalitetsprogram.

Utrustning och reagenser som tillhandahålls av användaren

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

- DNA-isoleringskit (se "Isolering av DNA", sidan 18)
- Pipetter (justerbara)*
- Sterila pipettspetsar med filter
- Vortex mixer*
- Centrifug* för arbetsbänken med rotor för 2 ml reaktionsrör
- Rotor-Gene Q- eller Rotor-Gene-instrument*† med fluorescenskanaler för Cycling Green, Cycling Orange och Cycling Yellow
- Rotor-Gene Q-programversion 1.7.94 och senare (Rotor-Gene 6000 programversion 1.7.65 och senare)
- Provrör och lock på remsa, 0,1 ml, för användning med en 72-brunns rotor (kat.nr. 981103 eller 981106)
- Alternativt: PCR-provrör, 0,2 ml, för användning med en 36-brunns rotor (kat.nr. 981005 eller 981008)
- Kylblock (laddningsblock 72 x 0,1 ml provrör, kat.nr. 9018901, eller laddningsblock 96 x 0,2 ml provrör, kat.nr. 9018905)

* Se till att instrumenten kontrolleras och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens angivelser.

† *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit får inte användas med Rotor-Gene Q 2plex-instrument.

Viktiga anmärkningar

Allmänna försiktighetsåtgärder

Användaren ska alltid vara uppmärksam på följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Förvara och extrahera positivt material (prover, positiva kontroller och amplikoner) separat från alla andra reagens, och tillsätt den till reaktionsblandningen i en spatiellt avskild anläggning.
- Tina upp alla komponenter noga i rumstemperatur (15–25° C) innan analysen startas.
- När de tinats ska komponenterna blandas (gen upprepad pipettering upp och ned eller genom pulsvortexering) och centrifugeras kortvarigt.
- Arbeta snabbt och låt komponenterna ligga på is eller i kylblocket (72/96-brunnars laddningsblock).

Isolering av DNA

EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, kat.nr. 62724*) är validerat för viral DNA-rening från human CSV för användning med *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit. Utför den virala DNA-reningen enligt anvisningarna i Handboken till *EZ1 DSP Virus Kit*.

- ⓘ *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit får inte användas med fenol-baserade isoleringsmetoder.
- ⓘ Användningen av bärar-RNA är avgörande för extraheringens effektivitet och därmed för DNA-utbytet. Tillsätt lämplig mängd bärar-RNA till varje extrahering enligt anvisningarna i *Handboken till EZ1 DSP Virus Kit*.
- ⓘ Den interna kontrollen av *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit kan användas direkt i isoleringsproceduren (se "Intern kontroll", nedan).

* EZ1 DSP Virus Kit finns också i form av CE-IVD-märkta EASY*artus*® HSV-1/2 RG PCR Kit, i kombination med *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit (se sidan 35 för beställningsinformation).

Intern kontroll

En internkontroll (HSV-1/2 RG IC) medföljer. Denna gör det möjligt för användaren att både kontrollera DNA-isoleringsprocessen och söka efter eventuell PCR-inhibering. För detta användningsområde ska den interna kontrollen tillsättas till isoleringen med ett förhållande av 0,1 μ l per 1 μ l elueringsvolym. Om exempelvis EZ1 DSP Virus Kit används, elueras DNA i 60 μ l elueringsbuffert (AVE). Därmed ska 6 μ l internkontroll tillsättas initialt.

i Tillsätt inte den interna kontrollen och bärar-RNA till provmaterial direkt.

Den interna kontrollen kan dessutom användas enbart för att kontrollera eventuell PCR-inhibering. För detta användningsområde ska den interna kontrollen tillsättas direkt till blandningen av HSV-1/2 RG Master och HSV-1/2 RG Mg-Sol, enligt beskrivningen i steg 2b i protokollet (sidan 21).

Protokoll: PCR- och dataanalys

i Viktigt att tänka på före start

- Läs "Viktiga anmärkningar", sidan 18.
- Innan du startar proceduren. Ta dig tid att göra dig välbekant med Rotor-Gene Q-instrumentet innan du startar protokollet. Se instrumentets användarhandbok.
- Kontrollera att de positiva kontrollerna och en negativ kontroll (vatten, PCR-grad) tas med i varje PCR-körning.

Saker som bör göras före start

- Kontrollera att kylblocket (tillbehör till Rotor-Gene Q-instrumentet) kyls i förväg till 2–8° C.
- Före varje användningstillfälle måste samtliga reagens tina helt, blandas (genom upprepad pipettering upp och ned eller genom snabb blandning med vortex) och centrifugeras som hastigast.

Procedur

- 1. Placera önskat antal PCR-provrör i adaptrarna på kylblocket.**
- 2. Om du använder den interna kontrollen för att övervaka DNA-isoleringsprocessen och kontrollera eventuell PCR-inhibering, följ steg 2a.**
Om du använder den interna kontrollen enbart för att kontrollera PCR-inhibering, följ steg 2b.
Använd den interna kontrollen enligt steg 2b för alla positiva och negativa kontroller.
- 2a. Den interna kontrollen har redan tillsatts till isoleringen (se "Intern kontroll", sidan 19). Bered i så fall en Master Mix enligt tabell 5.**
Reaktionsblandningen innehåller normalt samtliga komponenter som behövs för PCR utom provet.

Tabell 5. Beredning av Master Mix (internkontroll används för att övervaka DNA-isolering och kontrollera PCR-inhibering)

Antal prover	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	0 μ l	0 μ l
Total volym	30 μl	360 μl

- 2b. Den interna kontrollen måste tillsättas direkt till blandningen av HSV-1/2 RG Master och HSV-1/2 RG Mg-Sol. Bered i så fall en Master Mix enligt tabell 6.**

Reaktionsblandningen innehåller normalt samtliga komponenter som behövs för PCR utom provet.

Tabell 6. Beredning av Master Mix (internkontroll används endast för att kontrollera PCR-inhibering)

Antal prover	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	2 μ l	24 μ l
Total volym	32 μl*	384 μl*

* Den volymökning som uppstår på grund av tillsatsen av den interna kontrollen ignoreras vid beredningen av PCR-analysen. Detektionssystemets sensitivitet försämras inte.

- 3. Pipettera 30 μ l av Master Mixen till varje PCR-rör. Tillsätt sedan 20 μ l av det eluerade prov-DNA:t (se tabell 7), och blanda noga genom upprepade pipetteringar upp och ned. På motsvarande sätt måste 20 μ l av HSV-1 RG PC och HSV-2 RG PC användas som positiva kontroller och 20 μ l vatten (vatten, PCR-grad) som negativ kontroll.**

Tabell 7. Förberedelse av PCR

Antal prover	1	12
Masterblandning	30 μ l	30 μ l var
Prov	20 μ l	20 μ l var
Total volym	50 μl	50 μl var

4. Stäng PCR-rören. Kontrollera att låsringen (tillbehör till Rotor-Gene-instrumentet) placeras ovanpå rotorn för att förhindra att provrören oavsiktligen öppnas under körningen.
5. För detektion av HSV-1 DNA eller HSV-2 DNA skapar du en temperaturprofil enligt följande steg.

Inställning av allmänna analysparametrar	Fig. 3, 4, 5
Initial aktivering av enzymet vid het start	Fig. 6
Förstärkning av DNA	Fig. 7
Justering av fluorescenskanalens sensitivitet	Fig. 8
Starta körningen	Fig. 9

Samtliga specifikationer avser Rotor-Gene Q-programversion 1.7.94 och senare (Rotor-Gene 6000 programversion 1.7.65 och senare). Mer information om hur man programmerar Rotor-Gene-instrument finns i instrumentets användarhandbok. I illustrationerna är dessa inställningar inramad med en tjock svart ram. På illustrationerna visas Rotor-Gene Q-instrument.

- Öppna först dialogrutan "New Run Wizard" (guiden för ny körning) med versionen "Advanced" (avancerad) (Fig. 3) Markera kryssrutan vid "Locking Ring Attached" (låsring ansluten) och klicka på "Next" (nästa).

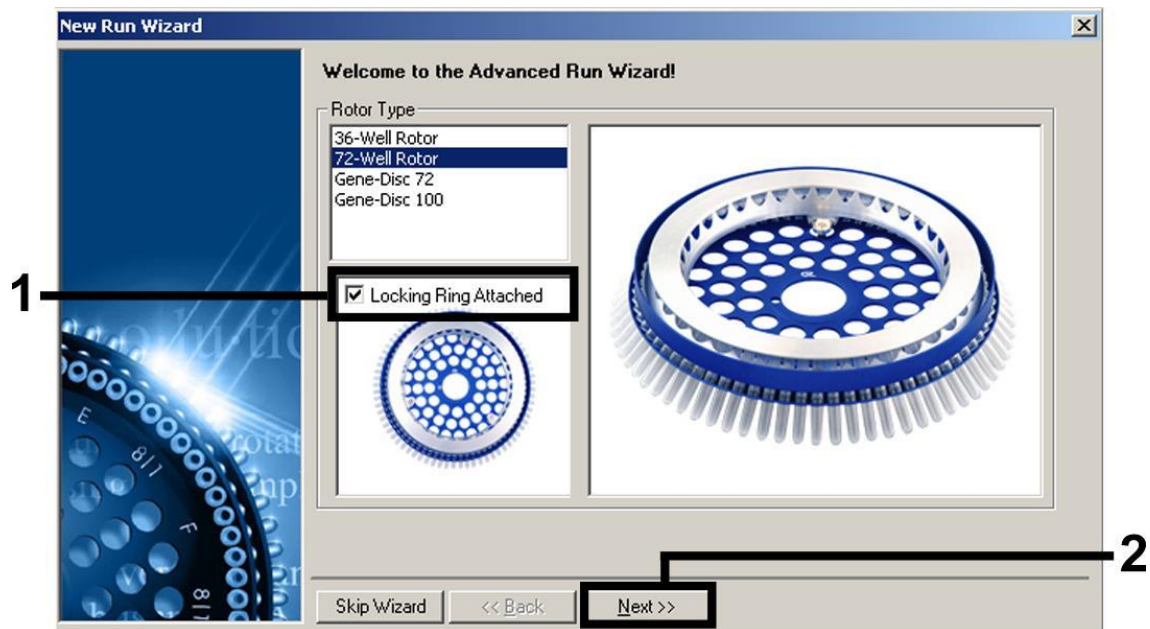


Fig. 3. Dialogrutan "New Run Wizard".

- Välj 50 som PCR-reaktionsvolym och klicka på "Next" (Fig. 4).

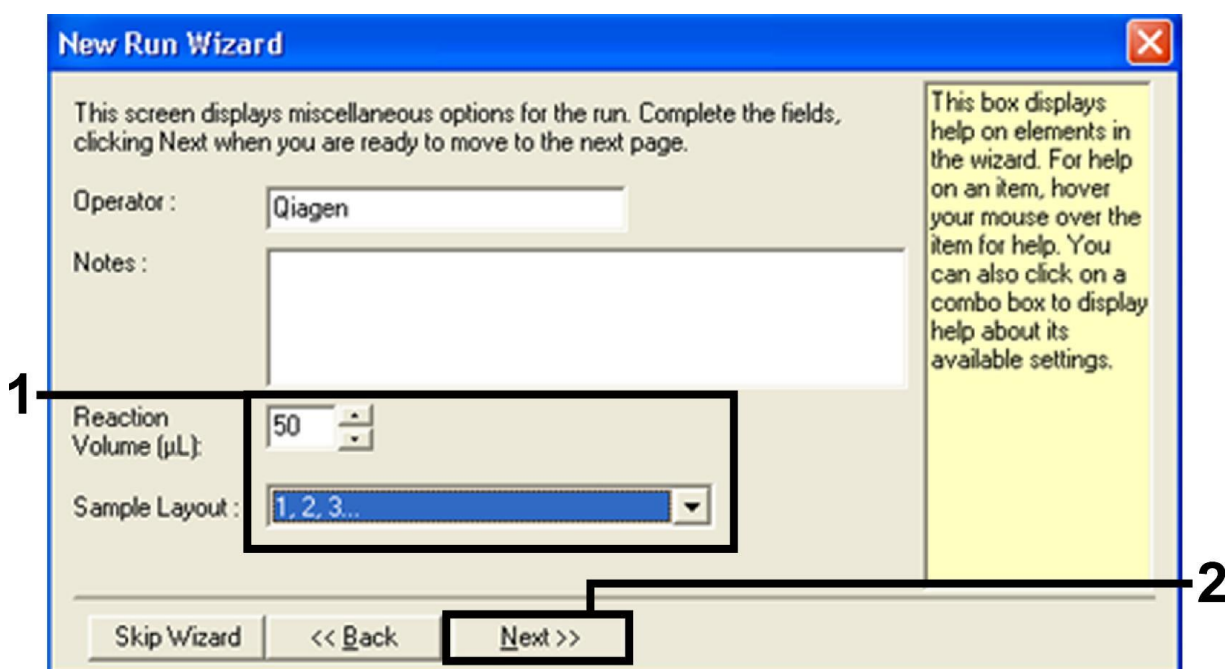


Fig. 4. Inställning av allmänna analysparametrar.

8. Klicka på knappen "Edit Profile" (redigera profil) i nästa dialogruta i "New Run Wizard" (Fig. 5) och programmera temperaturprofilen på det sätt som visas i Fig. 6–7.

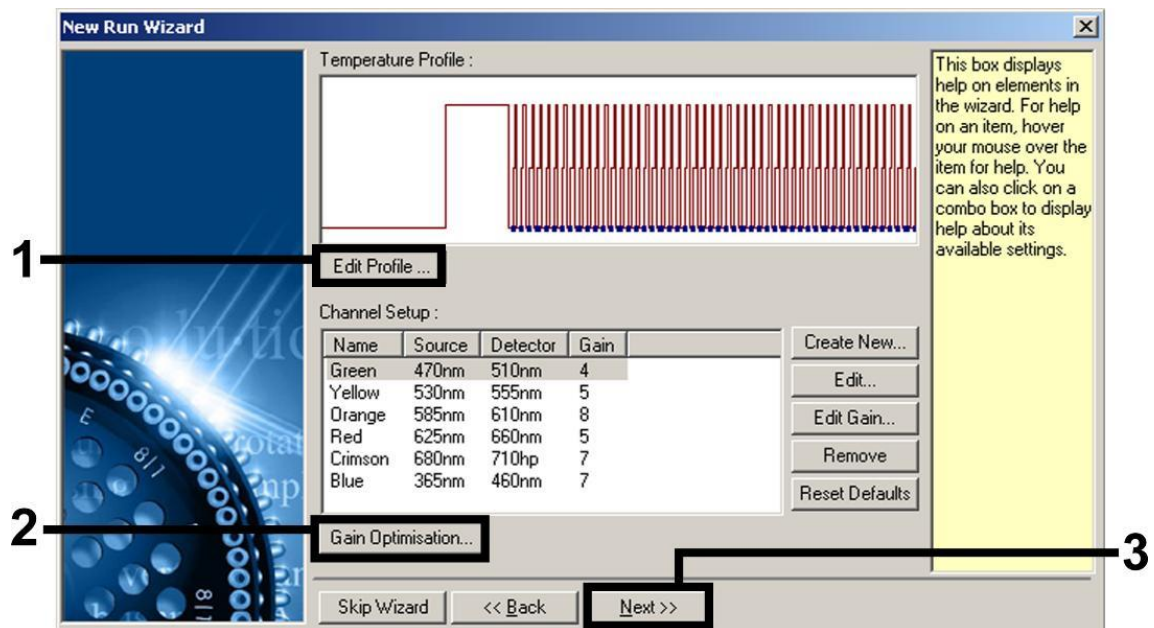


Fig. 5. Redigera profilen.

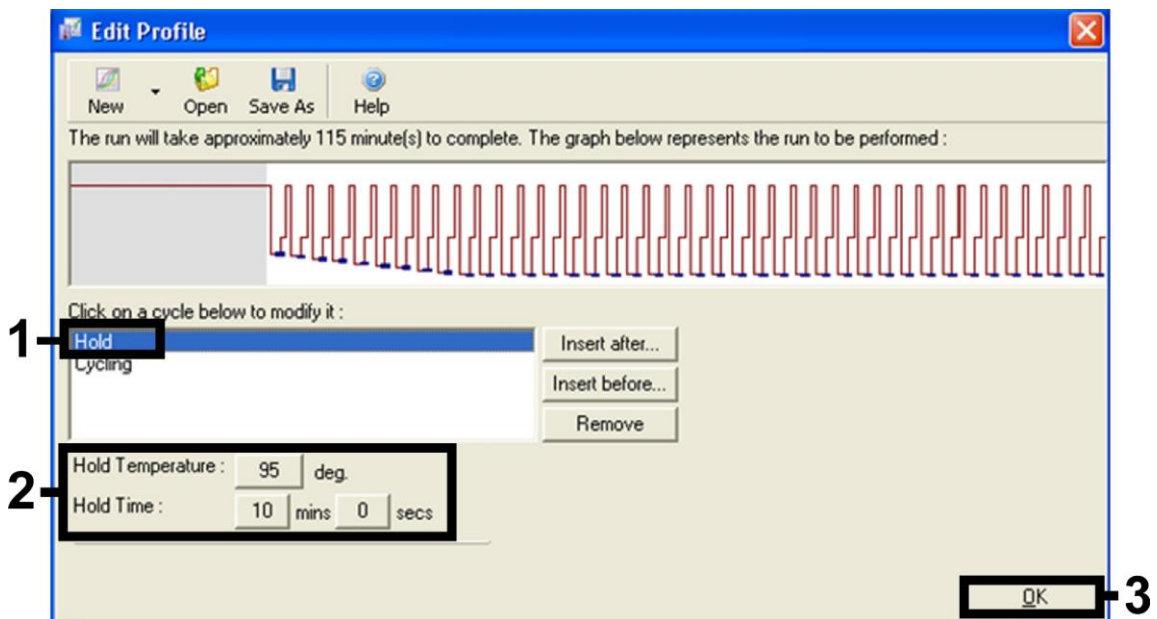


Fig. 6. Initial aktivering av enzymet vid het start.

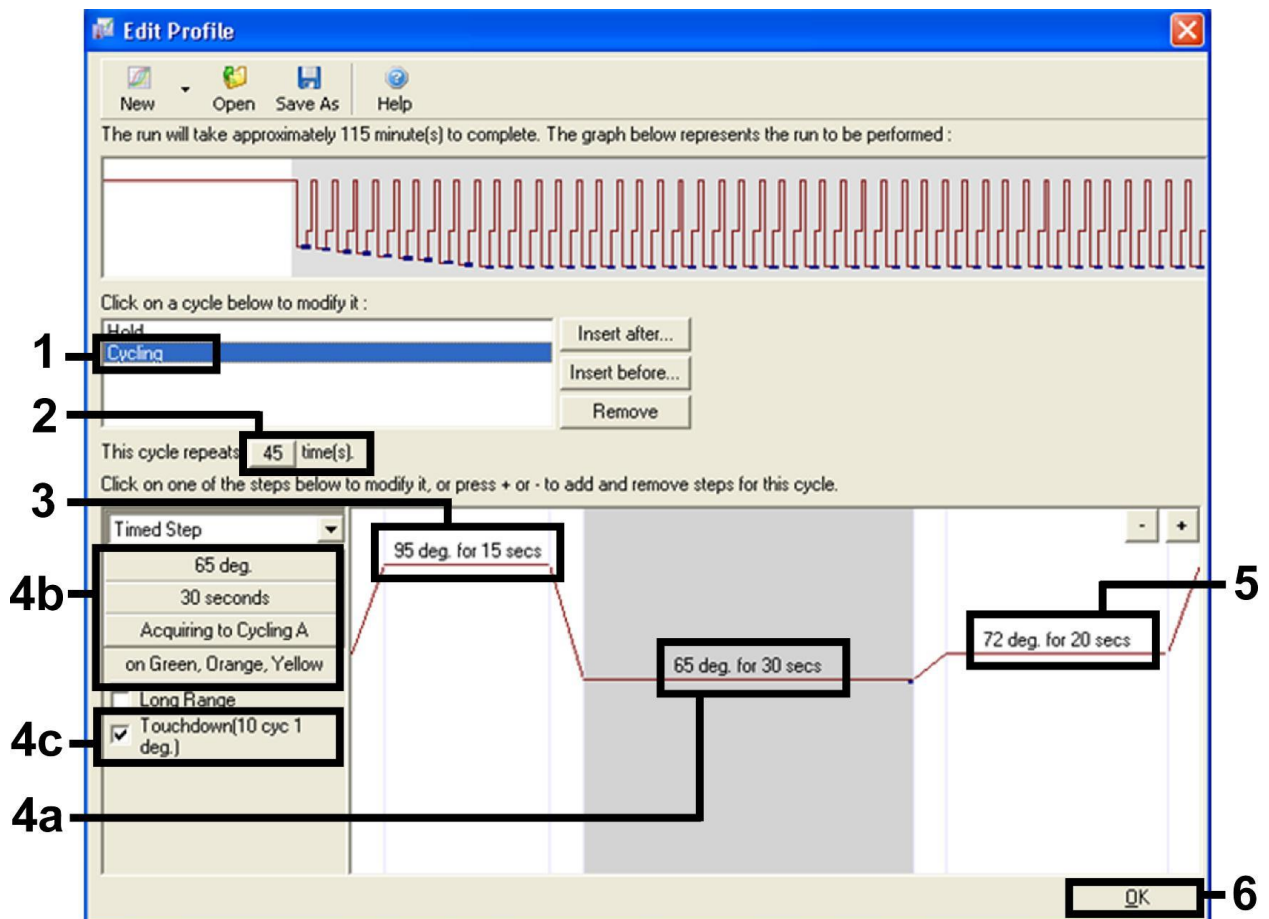


Fig. 7. Förstärkning av DNA. Se till att aktivera nedslagsfunktionen för 10 cykler i steget "Annealing" (kylning).

Fluorescenskanalernas detektionsområde måste fastställas utifrån okänsligheten för fluorescens i PCR-rören. Klicka på "Gain Optimisation" (optimering av förstärkning) i dialogrutan "New Run Wizard" (se Fig. 5. Redigera profilen).

9. , steg 2) för att öppna dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" (inställning av automatisk optimering av förstärkning) (Fig. 8). Ställ in kalibreringstemperaturen på 65 för att matcha kylningstemperaturen i förstärkningsprogrammet (Fig. 7, steg 4b). Se till att alla tre kanalerna (grön, orange och gul) är valda för "Auto-Gain Optimisation". (Sök rätt på kanalerna i rullgardinsmenyn under "Channel Settings" (kanalinställningar) och klicka på "Add" (lägg till).) Klicka på "Start" för att starta optimeringen av förstärkningen. Klicka på "Close" (stäng) i dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" när kalibreringen av förstärkningen är klar.

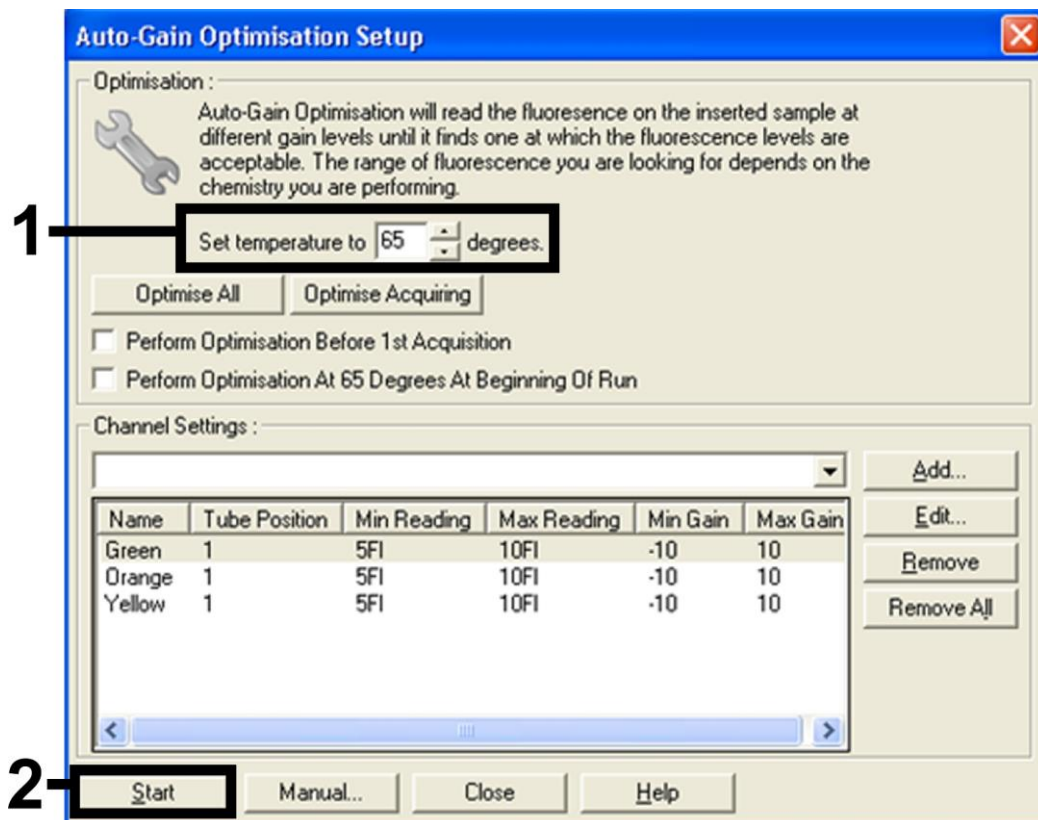


Fig. 8. Justering av fluorescenskanalernas sensitivitet

10. De förstärkningsvärden som fastställdes vid kanalkalibreringen sparas automatiskt och tas med i det sista menyfönstret i programmeringsprocessen (Fig. 9). Klicka på "Start Run" (starta körning).

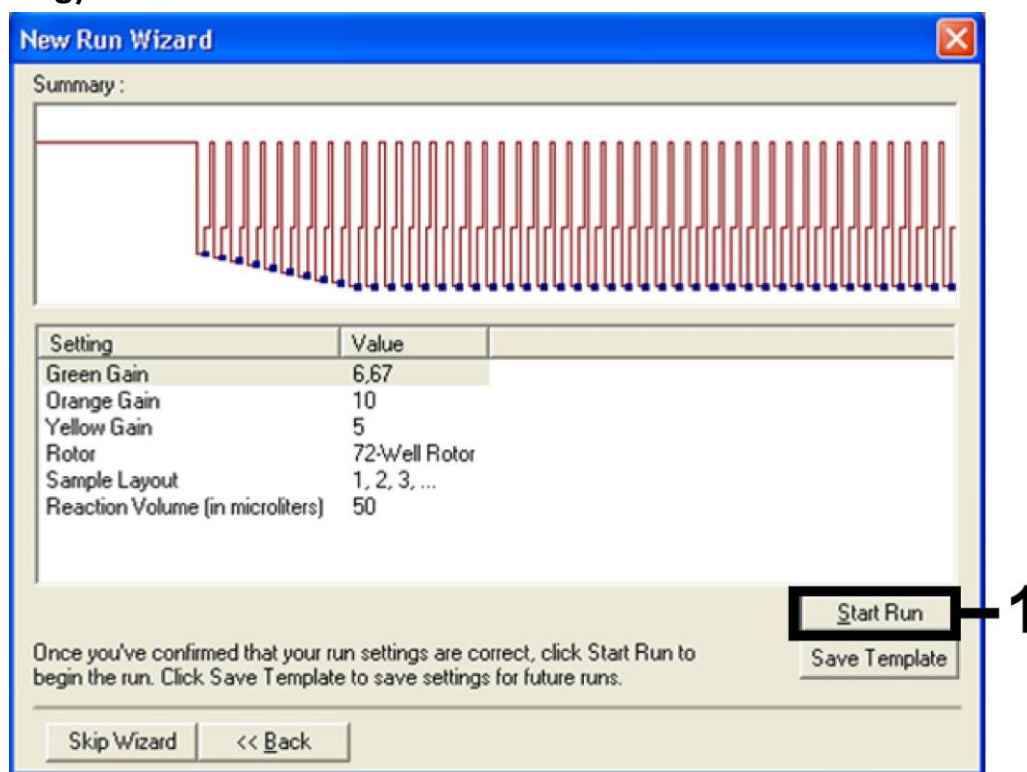


Fig. 9. Starta körningen.

11. Analysera data när körningen är klar. Följande resultat (11a, 11b, 11c, 11d, 11e och 11f) kan förekomma.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner visas i Fig. 10, Fig. 11 och Fig. 12.

- 11a. En signal detekteras i fluorescenskanal Cycling Green.

Analysresultatet är positivt: Provet innehåller HSV-1-DNA.

I detta fall är detektion av en signal på kanalen Cycling Yellow inte nödvändig, eftersom höga initiala koncentrationer av HSV-1-DNA (positiv signal på kanalen Cycling Green) kan leda till minskad eller fullständig frånvaro av fluorescenssignal i den interna kontrollen på kanalen Cycling Yellow (konkurrens).

- 11b. Ingen signal detekteras på fluorescenskanal Cycling Green.

Samtidigt framträder en signal från den interna kontrollen på kanalen Cycling Yellow.

Inget HSV-1-DNA kan detekteras i provet. Det kan betraktas som negativt.

Vid negativ HSV-1-PCR utesluter detekterad signal från den interna kontrollen möjligheten till PCR-inhibering.

**11c. En signal detekteras på fluorescenskanal Cycling Orange.
Analysresultatet är positivt: Provet innehåller HSV-2-DNA.**

I detta fall är detektion av en signal på kanalen Cycling Yellow inte nödvändig, eftersom höga initiala koncentrationer av HSV-2-DNA (positiv signal på kanalen Cycling Orange) kan leda till minskad eller fullständig frånvaro av fluorescenssignal i den interna kontrollen på kanalen Cycling Yellow (konkurrens).

**11d. Ingen signal detekteras på fluorescenskanal Cycling Orange.
Samtidigt framträder en signal från den interna kontrollen på kanalen Cycling Yellow.
Inget HSV-2-DNA kan detekteras i provet. Det kan betraktas som HSV-2-negativt.**

Vid negativ HSV-2-PCR utesluter detekterad signal från den interna kontrollen möjligheten till PCR-inhibering.

**11e. Signal detekteras på kanalerna Cycling Green och Cycling Orange.
Analysresultatet är positivt: Provet innehåller både HSV-1-DNA och HSV-2-DNA.**

I detta fall är detektion av en signal på kanalen Cycling Yellow inte nödvändig, eftersom höga initiala koncentrationer av både HSV-1- och HSV-2-DNA (positiv signal på kanalerna Cycling Green och Cycling Orange) kan leda till minskad eller fullständig frånvaro av fluorescenssignal i den interna kontrollen på kanalen Cycling Yellow (konkurrens).

**11f. Ingen signal detekteras på kanalerna Cycling Green,
Cycling Orange eller Cycling Yellow.
Det går inte att dra några slutsatser om resultatet.**

Information om felkällor och lösningar på problemen finns i "Felsökningsguide", på sidan 31.

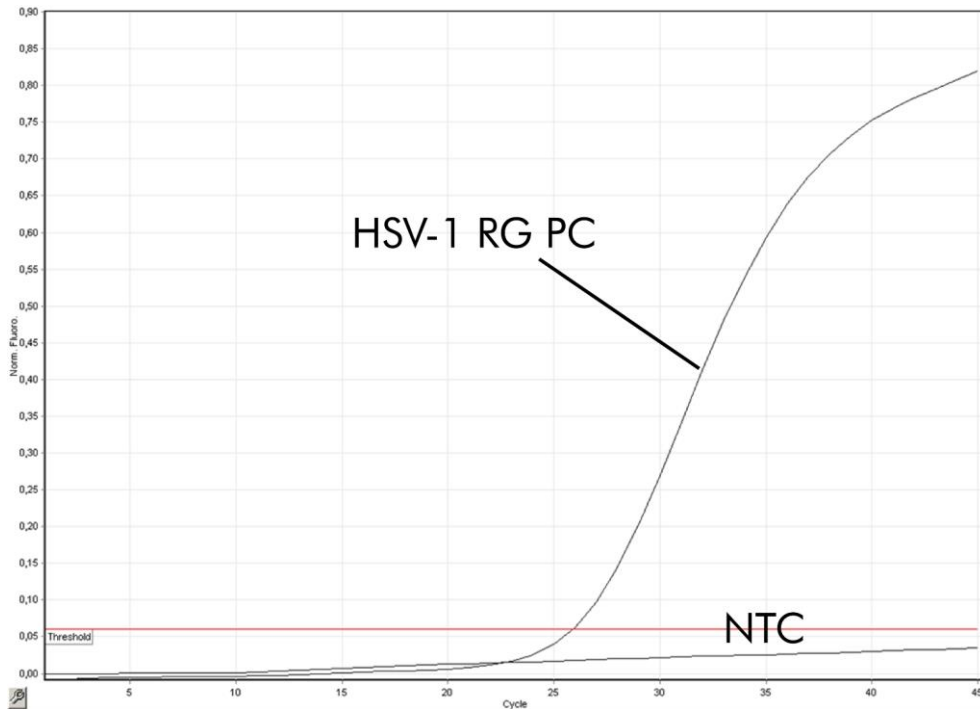


Fig. 10. Detektion av HSV-1-positiv kontroll (HSV-1 RG PC) på fluorescenskanal Cycling Green. NTC: Ingen mallkontroll (negativ kontroll).

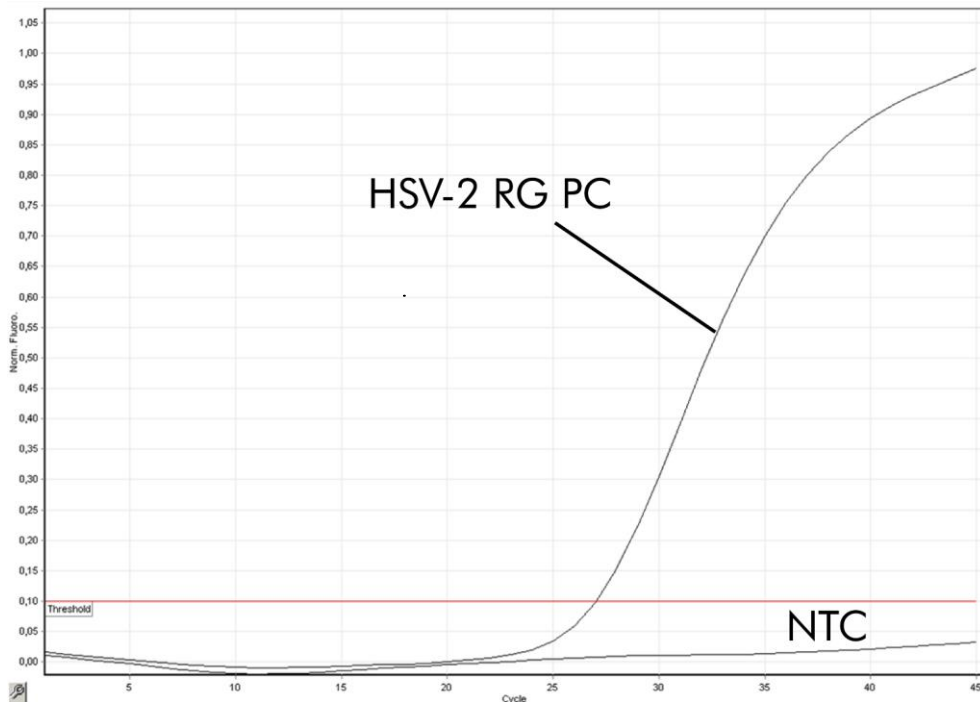


Fig. 11. Detektion av HSV-2-positiv kontroll (HSV-2 RG PC) på fluorescenskanal Cycling Orange. NTC: Ingen mallkontroll (negativ kontroll).

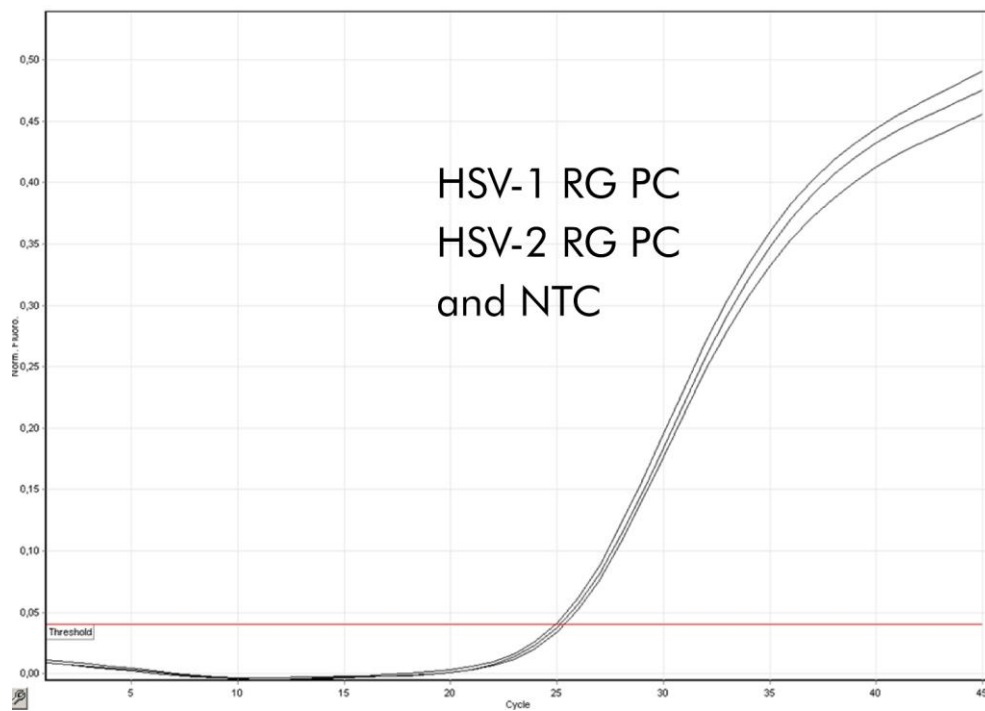







Fig. 12. Detektion av den interna kontrollen (IC) på fluorescenskanal Cycling Yellow med samtidig förstärkning av de positiva kontrollerna (HSV-1 RG PC och HSV-2 RG PC). NTC: Ingen mallkontroll (negativ kontroll).

Felsökningsguide






Denna felsökningsguide kan vara användbar för att lösa eventuellt förekommande problem. För ytterligare information, se även sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt Tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet hos QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysteknologi, (för kontaktinformation, se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag

Ingen signal med positiva kontroller (HSV-1 RG PC och HSV-2 RG PC) på fluorescenskanal Cycling Green eller Cycling Orange

- | | |
|---|--|
| a) Vald fluorescenskanal för PCR-dataanalys stämmer inte med protokollet |  Välj fluorescenskanal Cycling Green och Cycling Orange för analytisk HSV-1/2 PCR samt fluorescenskanal Cycling Yellow för internkontroll-PCR för dataanalys. |
| b) Felprogrammering av temperaturprofilen i Rotor-Gene-instrumentet |  Jämför temperaturprofilen med protokollet. Se "Protokoll: PCR- och dataanalys", sidan 20. |
| c) Felaktig konfigurering av PCR |  Kontrollera dina arbetssteg enligt pipetteringsschemat och upprepa PCR-analysen, om det behövs. Se "Protokoll: PCR- och dataanalys", sidan 20. |
| d) Förvaringsförhållandena för en eller flera satser uppfyller inte anvisningarna i "Förvaring" (sidan 5) |  Kontrollera förvaringsförhållandena och utgångsdatum (se satsens etikett) på reagenserna och använd en ny sats om det behövs. |
| e) <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit har passerat sitt utgångsdatum |  Kontrollera förvaringsförhållandena och utgångsdatum (se satsens etikett) på reagenserna och använd en ny sats om det behövs. |

Svag eller ingen signal från den interna kontrollen av ett negativt CSV-prov som renats med EZ1 DSP Virus Kit på fluorescenskanal Cycling Yellow, och samtidigt frånvaro av signal på kanal Cycling Green eller Cycling Orange

- a) PCR-förhållandena stämmer inte med protokollet  Kontrollera PCR-förhållandena (se ovan) och gör om PCR med korrigerade inställningar om det behövs.
- b) PCR har inhiberats  Kontrollera att du använder rekommenderad isoleringsmetod och följ tillverkarens anvisningar noggrant.
- c) DNA gick förlorat under extraheringen  Om den interna kontrollen tillsattes till extraheringen kan frånvaro av signal från den interna kontrollen tyda på att DNA gått förlorat under extraheringen. Kontrollera att du använder rekommenderad isoleringsmetod (se "Isolering av DNA", på sidan 18) och följ tillverkarens anvisningar noggrant.
- d) Förvaringsförhållandena för en eller flera satser uppfyller inte anvisningarna i "Förvaring" (sidan 5)  Kontrollera förvaringsförhållandena och utgångsdatum (se satsens etikett) på reagenserna och använd en ny sats om det behövs.
- e) *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR Kit har passerat sitt utgångsdatum  Kontrollera förvaringsförhållandena och utgångsdatum (se satsens etikett) på reagenserna och använd en ny sats om det behövs.

Signaler från de negativa kontrollerna på fluorescenskanal Cycling Green eller Cycling Orange vid PCR-analysen

- a) Kontaminering har inträffat under förberedelserna av PCR
- ① Upprepa PCR med nya reagens i replikat.
 - ① Stäng om möjligt PCR-provrören direkt efter tillsats av det prov som ska testas.
 - ① Se till att du pipetterar de positiva kontrollerna sist.
 - ① Se till att arbetsutrymmet och instrumenten dekontamineras regelbundet.
- b) Kontaminering har inträffat under extraheringen
- ① Upprepa extrahering och PCR av det prov som ska testas med nya reagens.
 - ① Se till att arbetsutrymmet och instrumenten dekontamineras regelbundet.

Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer som använder QIAGEN-produkter. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.

För en fullständig lista över referenser, besök QIAGEN referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakta QIAGEN:s tekniska support eller din lokala distributör.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr.
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Master, Mg-lösning, 2 positiva kontroller, internkontroll, vatten (PCR-grad)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	För 96 reaktioner: Master, Mg-lösning, 2 positiva kontroller, internkontroll, vatten (PCR-grad)	4500265
EZ1 DSP Virus Kit – för rening av virala nukleinsyror från human CSV för in vitro-diagnostik		
EZ1 DSP Virus Kit	För 48 prepareringar av virala nukleinsyror: Förfyllda reagenskassetter, engångspetshållare, engångsfilterspetsar, provrör, elueringsrör, buffert, bärar-RNA	62724
EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit – för helt CE-IVD-uppfyllande integrerad automatisk rening av prover och patogendetektion		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	För 48 prepareringar av virala nukleinsyror och 24 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10023
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 2	För 48 prepareringar av virala nukleinsyror och 48 analyser: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024
Rotor-Gene Q och tillbehör		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Realtids PCR-instrument högupplöst smältanalysator med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, rosa) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete	På förfrågan
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med enkanalig pipett i 72 x 0,1 ml provrör	9018901

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

Se respektive QIAGEN-sats handbok eller användarmanual för aktuell information om licenser och produktspecifika friskrivningsklausuler. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satserna finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska service eller lokal distributör.

Denna sida har avsiktligen lämnats tom

Denna sida har avsiktligt lämnats tom

Denna sida har avsiktligen lämnats tom

Inköp av denna produkt ger köparen tillstånd att använda den för att utföra diagnostiska tjänster för human in vitro-diagnostik. Ingen annan rättighet eller licens av något slag annat än denna specifika rättighet efter köpet medges genom detta.

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

artus HSV-1/2 RG PCR Kit och EZ1 DSP Virus Kit är CE-märkta diagnostiska satser i enlighet med det europeiska in-vitro-diagnostiska direktivet 98/79/EC. Ej tillgängliga i alla länder.

Begränsat licensavtal

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit godkänner följande villkor:

1. *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit får endast användas i enlighet med *Handbok till artus HSV-1/2 RG PCR Kit* och endast med de komponenter som medföljer i satsen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna sats med komponenter som inte ingår i denna sats förutom vad som beskrivs i *Handbok till artus HSV-1/2 RG PCR Kit* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna sats och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Denna sats och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av satsen åtar sig att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer som beskrivs ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol, och skall ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, med ensamrätt.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

