

Handleiding *artus*[®] VZV RG PCR-kit

 24 (catalogusnr. 4502263)

 96 (catalogusnr. 4502265)

Versie 1

IVD

Kwantitatieve in-vitrodiagnostiek

Voor gebruik met Rotor-Gene[®] Q-apparaten



REF 4502263, 4502265

HB 1056824NL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R4 **MAT** 1056824NL



QIAGEN monster- en assaytechnologieën

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN zet de toon voor:

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Wij stellen ons ten doel ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken kunt bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoud

Beoogd gebruik	4
Samenvatting en uitleg	4
Informatie met betrekking tot het pathogeen	4
Principe van de procedure	5
Meegeleverde materialen	5
Inhoud van de kit	5
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	7
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	7
Algemene voorzorgsmaatregelen	8
Opslag en verwerking van reagentia	8
Procedure	9
DNA-isolatie	9
Interne controle	9
Protocol: PCR en gegevensanalyse	11
Interpretatie van de resultaten	18
Kwantificatie	18
Resultaten	19
Problemen oplossen	21
Kwaliteitscontrole	23
Beperkingen	24
Prestatiekenmerken	24
Analytische gevoeligheid	24
Specificiteit	25
Precisie	27
Referenties	29
Symbolen	29
Contactgegevens	30
Bestelgegevens	31

Beoogd gebruik

De *artus* VZV RG PCR-kit is een in-vitronucleïnezuuramplificatietest voor de kwantificatie van VZV-DNA in humaan cerebrospinaal vocht (CSF). Deze diagnostische testkit gebruikt de polymerasekettingreactie (polymerase chain reaction, PCR) en is geconfigureerd voor gebruik met Rotor-Gene Q-apparaten.

NB: De *artus* VZV RG PCR-kit mag niet worden gebruikt met Rotor-Gene Q 2plex-apparaten.

Samenvatting en uitleg

De *artus* VZV RG PCR-kit is een gebruiksklaar systeem voor de detectie van VZV-DNA met gebruikmaking van de polymerasekettingreactie (PCR) op Rotor-Gene Q-apparaten. De VZV RG Master bevat reagentia en enzymen voor de specifieke amplificatie van een gebied van 82 bp van het VZV-genoom, en voor de directe detectie van het specifieke amplicon in fluorescentiekanaal Cycling Green van Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q of Rotor-Gene 6000 (bron 470 nm, detector 510 nm).

Daarnaast bevat de *artus* VZV RG PCR-kit een tweede heteroloog amplificatiesysteem voor de identificatie van een mogelijke PCR-inhibitie. Dit wordt gedetecteerd als een interne controle (IC) in fluorescentiekanaal Cycling Orange van Rotor-Gene Q of Rotor-Gene 6000 (bron 585 nm, detector 610 nm). De detectielimiet van de analytische PCR van het VZV (zie 'Analytical sensitivity', pagina 24) wordt niet verlaagd. Er zijn externe positieve controles (VZV RG QS 1–4) meegeleverd die de bepaling van de hoeveelheid viraal DNA mogelijk maken. Voor meer informatie, zie 'Quantitation', pagina 18.

Informatie met betrekking tot het pathogeen


Het varicellazostervirus (VZV) is een DNA-virus, dat van persoon op persoon wordt overgedragen als een druppelinfectie of door direct contact. Infectie met VZV veroorzaakt een lichte temperatuurverhoging en heeft een matige invloed op de algemene gezondheid. Polymorf eczeem met striemen, blaren en korsten, samen met ernstige jeuk (waterpokken) zijn kenmerkend voor de ziekte. Ernstige VZV-infecties worden vaak waargenomen bij patiënten met een onderdrukt immuunsysteem en kunnen resulteren in gevaarlijke complicaties, zoals pneumonie en encefalitis. Na de acute infectie blijft het pathogeen aanwezig in de sensorische spinale ganglia en in de ganglia van de craniale zenuwen. Als de immuniteit verzwakt is, kunnen verergeringen optreden (bijv. gordelroos).

Principe van de procedure

Pathogeendetectie met behulp van de polymerasekettingreactie (PCR) is gebaseerd op de amplificatie van specifieke gebieden van het pathogeengenoem. Bij realtime PCR wordt het geamplificeerde product gedetecteerd door middel van fluorescerende kleurstoffen. Deze zijn doorgaans gekoppeld aan oligonucleotideprobes die specifiek aan het geamplificeerde product binden. Door het monitoren van de fluorescentie-intensiteiten tijdens de PCR-run (d.w.z. in realtime) kan het zich ophopende product worden gedetecteerd en gekwantificeerd zonder na de PCR-run de reageerbuisjes opnieuw te hoeven openen.*

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>artus</i> VZV RG PCR Kit			(24)	(96)
Catalogusnr.			4502263	4502265
Aantal reacties			24	96
Blauw	VZV RG Master		2 x 12 reacties	8 x 12 reacties
Geel	VZV RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	600 µl	600 µl
Rood	VZV RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ kopieën/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rood	VZV RG QS 2 [‡] (1 x 10 ³ kopieën/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rood	VZV RG QS 3 [‡] (1 x 10 ² kopieën/µl)	QS	200 µl	200 µl
Rood	VZV RG QS 4 [‡] (1 x 10 ¹ kopieën/µl)	QS	200 µl	200 µl
Groen	VZV RG IC [§]	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Wit	Water (PCR-kwaliteit)		1000 µl	1000 µl
	Handleiding		1	1

[†] Magnesium Solution (magnesiumoplossing).

[‡] Quantitation Standard (kwantificatiestandaard).

[§] Internal Control (interne controle).

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

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB of SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- DNA-isolatiekit (zie 'DNA isolation', pagina 9)

Verbruiksartikelen

- Steriele pipetpunten met filters
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for use with 72-well rotor (stripbuisjes met dopjes, 0,1 ml, voor gebruik met rotor met 72 putjes) (cat.nr. 981103 of 981106)
- Alternatief: PCR Tubes, 0.2 ml, for use with 36-well rotor (PCR-buisjes, 0,2 ml, voor gebruik met rotor met 36 putjes) (cat.nr. 981005 of 981008)

Apparatuur

- Pipetten (afstelbaar)*
- Vortexmixer*
- Tafelcentrifuge* met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml
- Rotor-Gene Q MDx-, Rotor-Gene Q- of Rotor-Gene-apparaat*[†] met fluorescentiekanalen voor Cycling Green en Cycling Orange
- Rotor-Gene Q MDx-/Rotor-Gene Q-softwareversie 1.7.94 of hoger (Rotor-Gene 6000-softwareversie 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94)
- Cooling block (koelblok) (laadblok 72 buisjes van 0,1 ml, cat.nr. 9018901, of laadblok 96 buisjes van 0,2 ml, cat.nr. 9018905)

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn online beschikbaar in een handig en compact pdf-formaat op www.qiagen.com/safety. Hier vindt u de SDS's van alle kits en kitonderdelen van QIAGEN®, die u kunt bekijken en afdrukken.

Gooi monster- en assayafval weg in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsvoorschriften.

* Zorg ervoor dat apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† De *artus* VZV RG PCR-kit mag niet worden gebruikt met Rotor-Gene Q 2plex-apparaten.

Algemene voorzorgsmaatregelen

De gebruiker dient altijd aandacht te besteden aan het volgende:

- Gebruik steriele pipetpunten met filters.
- Positieve materialen (monsters, positieve controles en amplicons) dienen apart van alle andere reagentia te worden opgeslagen en te worden geëxtraheerd en in een ruimtelijk gescheiden instelling aan het reactiemengsel te worden toegevoegd.
- Ontdooi alle onderdelen volledig bij kamertemperatuur (15–25 °C) voordat u een assay start.
- Als de onderdelen zijn ontdooit, mengt u deze (door herhaaldelijk op en neer te pipetteren of te mengen met een pulse-vortexmixer) en centrifugeert u ze kort.
- Werk snel en bewaar de onderdelen op ijs of in het koelblok (laadblok met 72/96 putjes).

Opslag en verwerking van reagentia

De onderdelen van de *artus* VZV RG PCR-kit dienen te worden bewaard bij -15 °C tot -30 °C en blijven stabiel tot de uiterste houdbaarheidsdatum die op het etiket staat vermeld. Herhaaldelijk ontdooien en weer invriezen (> 2 x) dient te worden vermeden, aangezien dit de gevoeligheid van de assay kan verminderen. Als de reagentia slechts periodiek moeten worden gebruikt, dienen ze in kleine hoeveelheden te worden ingevroren. De bewaring bij 2–8 °C mag niet langer dan 5 uur duren.

Procedure

DNA-isolatie

De EZ1 DSP Virus-kit (QIAGEN, cat.nr. 62724)* is gevalideerd voor de zuivering van viraal nucleïnezuur uit humaan CSF, voor gebruik met de *artus* VZV RG PCR-kit. Voer de zuivering van viraal nucleïnezuur uit volgens de instructies in het *EZ1 DSP Virus Kit Handbook* (Handleiding *EZ1 DSP Virus Kit*), met een uitgangsmongergrootte van 200 µl.

NB: De *artus* VZV RG PCR-kit mag niet worden gebruikt met op fenol gebaseerde isolatiemethoden.

NB: Het gebruik van drager-RNA is essentieel voor de extractie-efficiëntie en, dientengevolge, voor de opbrengst van DNA/RNA. Voeg de gepaste hoeveelheid drager-RNA aan iedere extractie toe volgens de instructies in het *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

NB: De interne controle van de *artus* VZV RG PCR-kit kan direct in de isolatieprocedure worden gebruikt (zie 'Internal control', hieronder).

Interne controle

Er is een interne controle (VZV RG IC) meegeleverd. Hierdoor kan de gebruiker zowel de DNA-isolatieprocedure controleren als op mogelijke PCR-inhibitie controleren. Voeg voor deze toepassing de interne controle aan de isolatie toe in een verhouding van 0,1 µl per 1 µl elutievolume. Als bijvoorbeeld de virale nucleïnezuren met gebruikmaking van de EZ1 DSP Virus-kit worden geëluëerd in 60 µl Elution Buffer (AVE), dient aanvankelijk 6 µl van de interne controle te worden toegevoegd.

NB: De interne controle en het drager-RNA (zie 'DNA isolation', pagina 9) dienen alleen te worden toegevoegd aan het mengsel van lysisbuffer en monstermateriaal of direct aan de lysisbuffer.

De interne controle mag niet direct worden toegevoegd aan het monstermateriaal. Let op: bij toevoeging aan de lysisbuffer moet het mengsel van interne controle en lysisbuffer-drager-RNA vers worden bereid en onmiddellijk worden gebruikt (bewaring van het mengsel bij kamertemperatuur of in de koelkast gedurende slechts een paar uur kan leiden tot een slechte werking van de interne controle en een verminderde extractie-efficiëntie).

NB: Voeg de interne controle en het drager-RNA niet direct aan het monstermateriaal toe.

De interne controle kan optioneel uitsluitend worden gebruikt om te controleren op mogelijke PCR-inhibitie. Voor deze toepassing voegt u de interne controle direct aan het mengsel van VZV RG Master en VZV

RG Mg-Sol toe, zoals beschreven in stap 2b van het protocol (pagina 12).

* De EZ1 DSP Virus-kit is ook leverbaar als CE-IVD-gecertificeerde EASYartus® VZV RG PCR-kits, in combinatie met de *artus* VZV RG PCR-kit (zie pagina 31 voor bestelgegevens).

Protocol: PCR en gegevensanalyse

Wat u moet weten voor u begint

- Neem de tijd om vertrouwd te raken met het Rotor-Gene Q-apparaat voordat u start met het protocol. Zie de gebruikershandleiding van het apparaat.
- Zorg ervoor dat per PCR-run ten minste één kwantificatiestandaard en één negatieve controle (water, PCR-kwaliteit) worden opgenomen. Om een standaardcurve te genereren, gebruikt u voor elke PCR-run alle 4 de meegeleverde kwantificatiestandaarden (VZV RG QS 1-4).

Wat u moet doen voor u begint

- Zorg ervoor dat het koelblok (accessoire van het Rotor-Gene Q-apparaat) is voorgekoeld op 2-8 °C.
- Voorafgaand aan elk gebruik moeten alle reagentia volledig worden ontdooid, gemengd (door ze herhaaldelijk met een pipet op te zuigen of door ze snel te vortexen) en kort worden gecentrifugeerd.

Procedure

1. Plaats het gewenste aantal PCR-buisjes in de adapters van het koelblok.
2. Volg stap 2a als u de interne controle gebruikt om zowel de DNA-isolatieprocedure te monitoren als op mogelijke PCR-inhibitie te controleren. Volg stap 2b als u de interne controle uitsluitend gebruikt om op PCR-inhibitie te controleren.
- 2a. De interne controle is al toegevoegd aan de isolatie (zie 'Internal control', pagina 9). Bereid in dat geval een mastermix volgens tabel 1.

Het reactiemengsel bevat doorgaans alle onderdelen die voor de PCR nodig zijn, behalve het monster.

Tabel 1. Bereiding van mastermix (interne controle gebruikt voor monitoring van DNA-isolatie en controle op PCR-inhibitie)

Aantal monsters	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	0 µl	0 µl
Totaal volume	30 µl	360 µl

- 2b. De interne controle moet direct aan het mengsel van VZV RG Master en VZV RG Mg-Sol worden toegevoegd. Bereid in dat geval een mastermix volgens tabel 2.

Het reactiemengsel bevat doorgaans alle onderdelen die voor de PCR nodig zijn, behalve het monster.

Tabel 2. Bereiding van mastermix (interne controle uitsluitend gebruikt voor controle op PCR-inhibitie)

Aantal monsters	1	12
VZV RG Master	25,5 µl	306 µl
VZV RG Mg-Sol	4,5 µl	54 µl
VZV RG IC	2 µl	24 µl
Totaal volume	32 µl*	384 µl*

* De volumetoename als gevolg van het toevoegen van de interne controle wordt bij het voorbereiden van de PCR-assay genegeerd. Dit doet geen afbreuk aan de gevoeligheid van het detectiesysteem.

3. Pipetteer 30 µl mastermix in elk PCR-buisje. Voeg vervolgens 20 µl van het geëluëerde monster-DNA toe (zie tabel 3). Dienovereenkomstig moet 20 µl van ten minste één van de kwantificatiestandaarden (VZV RG QS 1–4) worden gebruikt als positieve controle, en 20 µl water (water, PCR-kwaliteit) als negatieve controle.

Tabel 3. Voorbereiding van PCR-assay

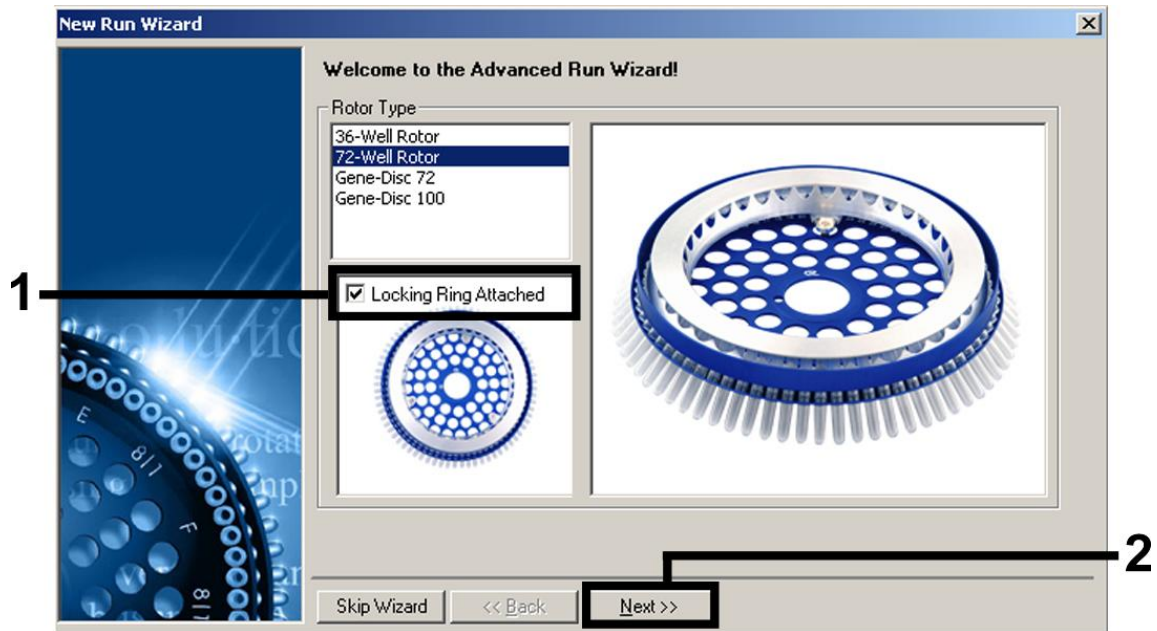
Aantal monsters	1	12
Mastermix	30 µl	elk 30 µl
Monster	20 µl	elk 20 µl
Totaal volume	50 µl	elk 50 µl

- Sluit de PCR-buisjes af. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (accessoire van het Rotor-Gene-apparaat) op de rotor is geplaatst om te voorkomen dat de buisjes tijdens de run per ongeluk opengaan.
- Volg de onderstaande stappen om een temperatuurprofiel aan te maken voor de detectie van VZV-DNA.

Instellen van de algemene analyseparameters	Afbeeldingen 1, 2, 3
Eerste activering van het hot-start-enzym	Afbeelding 4
Amplificatie van het DNA	Afbeelding 5
Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal	Afbeelding 6
Starten van de run	Afbeelding 7

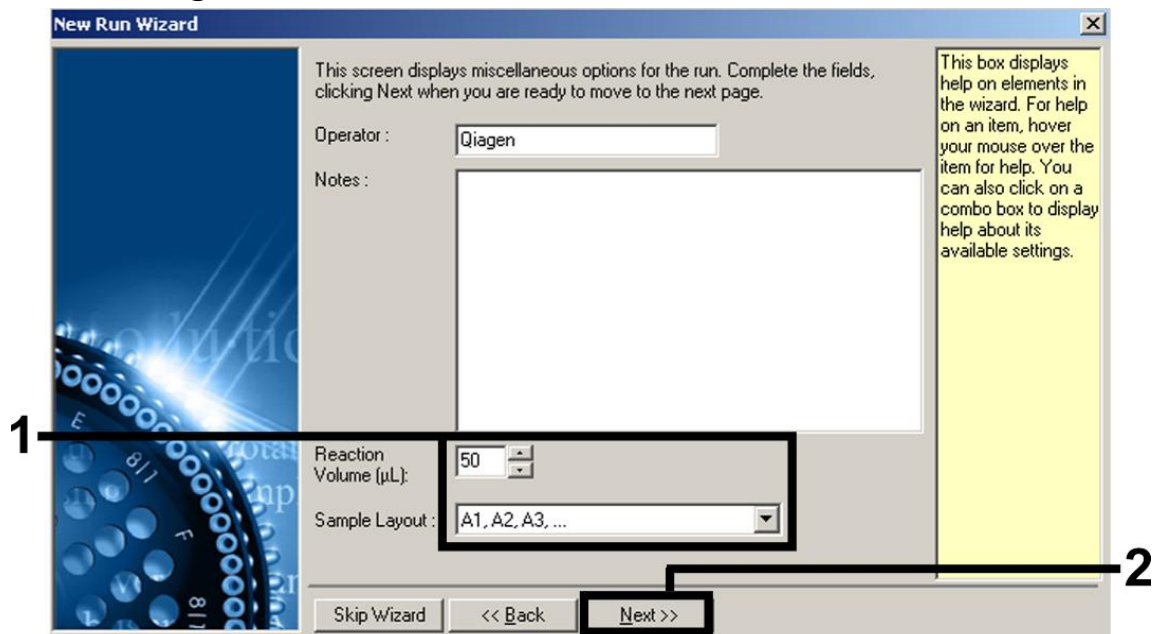
Alle specificaties verwijzen naar de Rotor-Gene Q MDx-/Rotor-Gene Q-softwareversie 1.7.94 en Rotor-Gene 6000-softwareversies 1.7.65, 1.7.87 en 1.7.94. Meer informatie over het programmeren van Rotor-Gene-apparaten vindt u in de gebruikershandleiding bij het apparaat. In de illustraties hebben deze instellingen een vet zwart kader. Illustraties zijn opgenomen voor Rotor-Gene Q-apparaten.

- Open in de eerste plaats het dialoogvenster 'New Run Wizard' (wizard nieuwe run) (afbeelding 1). Vink het vakje 'Locking Ring Attached' (vergrendelingsring aangebracht) aan en klik op 'Next' (volgende).



Afbeelding 1. Het dialoogvenster 'New Run Wizard'.

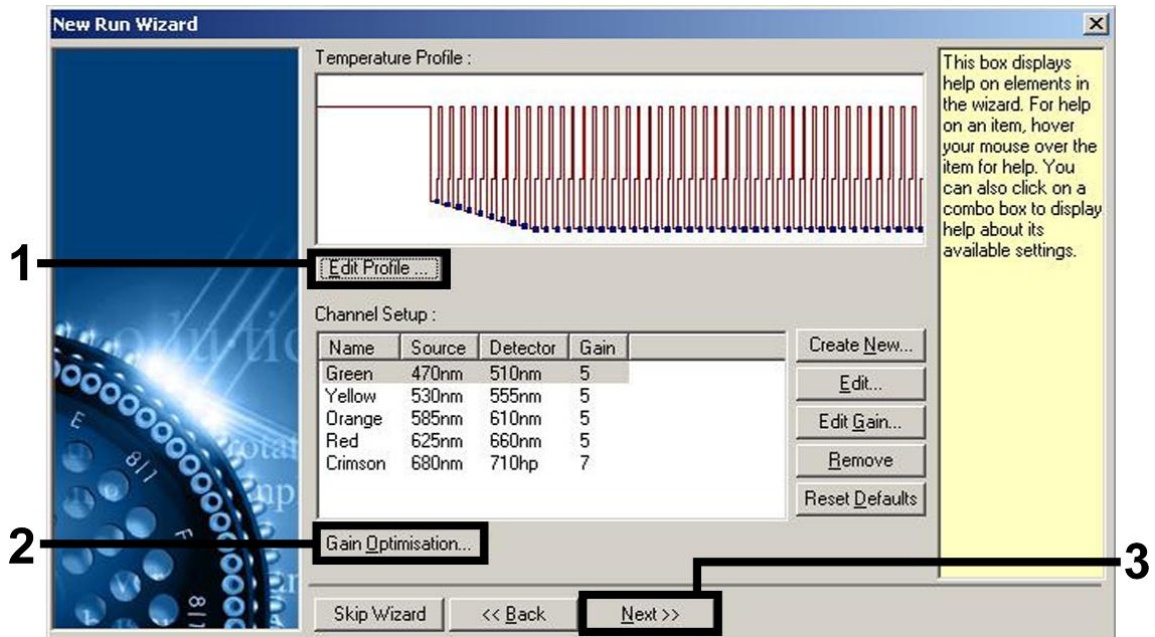
- Selecteer 50 voor het PCR-reactievolumen en klik op 'Next' (afbeelding 2).



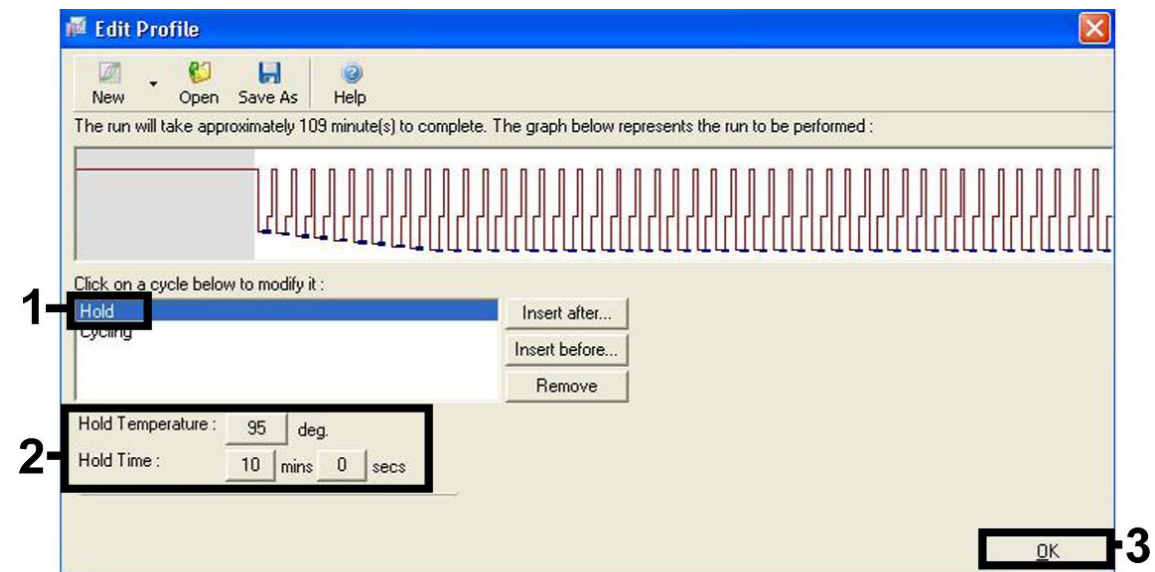
Afbeelding 2. Instellen van de algemene analyseparameters.

- Klik op de knop 'Edit Profile' (profiel bewerken) in het volgende dialoogvenster van de 'New Run Wizard' (afbeelding 3) en

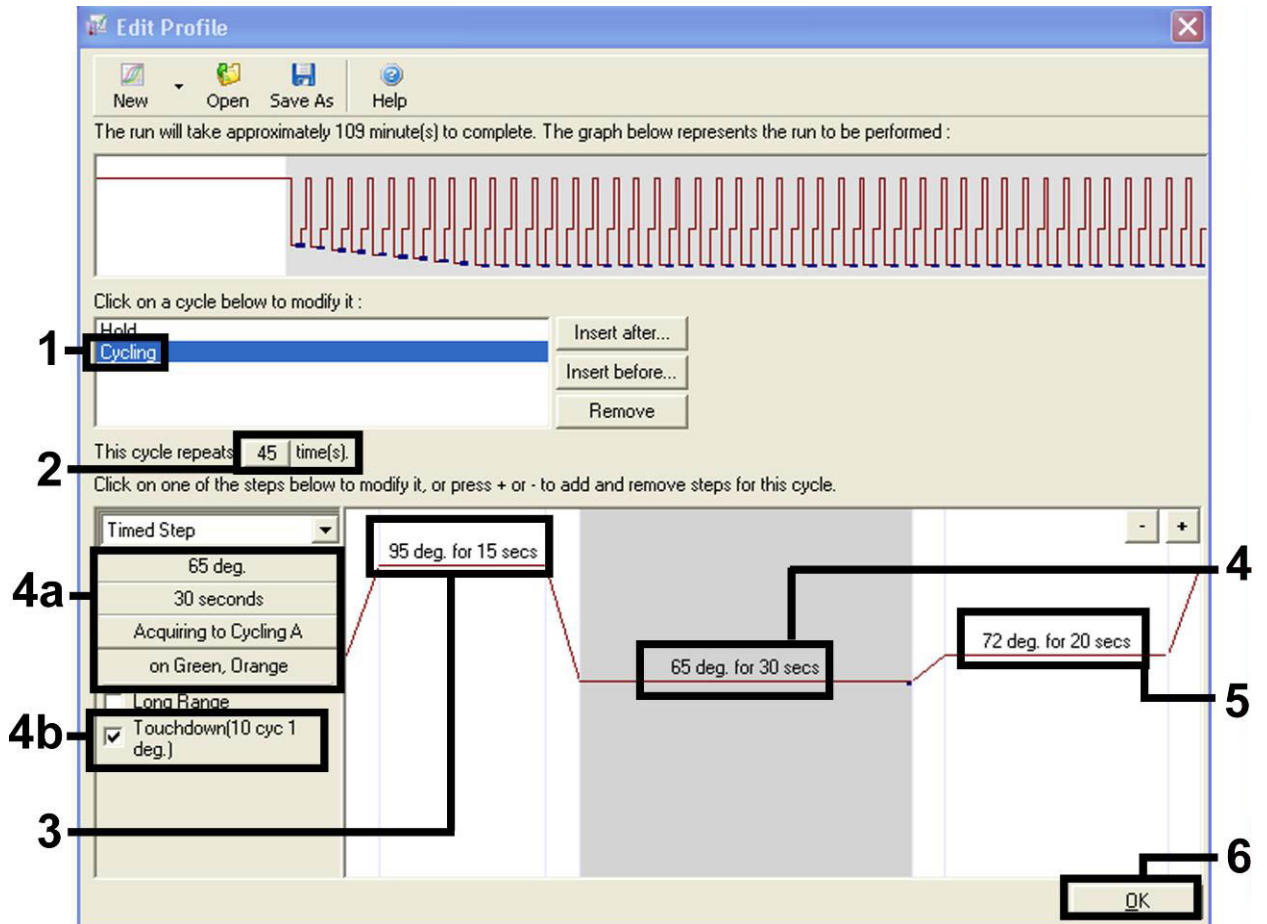
programmeer het temperatuurprofiel zoals getoond in afbeeldingen 3-5.



Afbeelding 3. Het profiel bewerken.

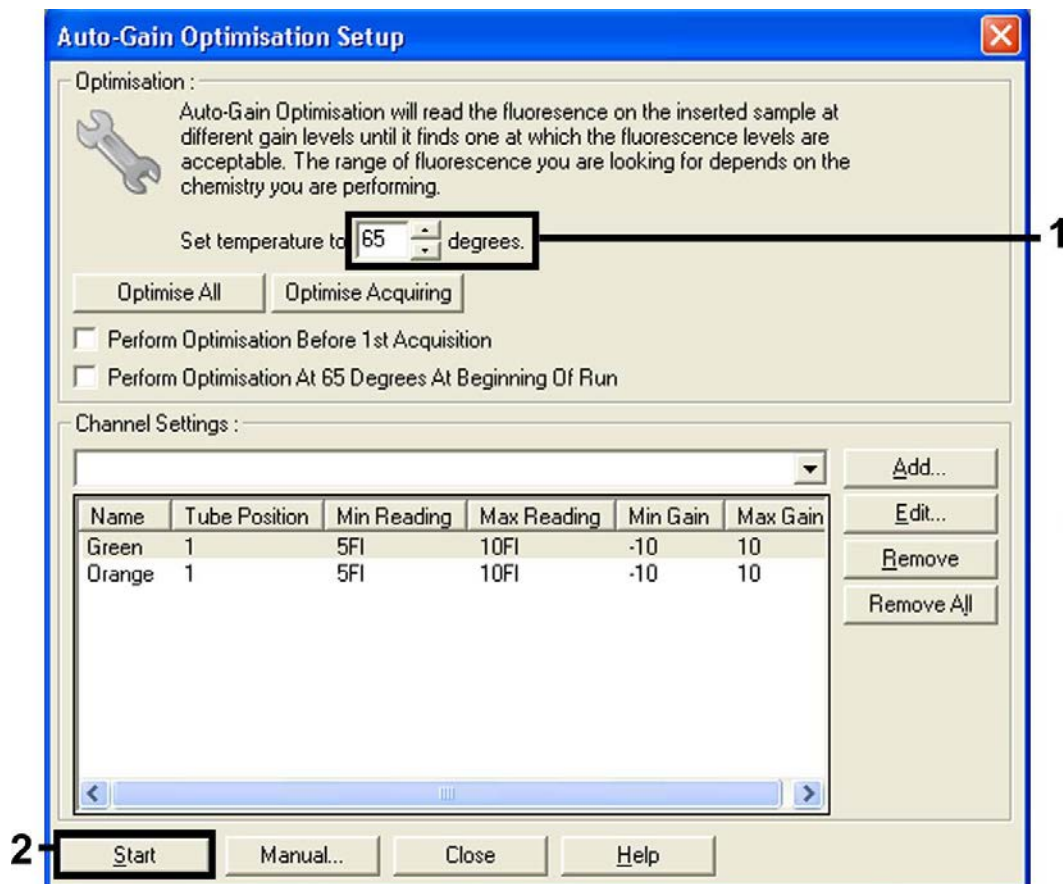


Afbeelding 4. Eerste activering van het hot-start-enzym.



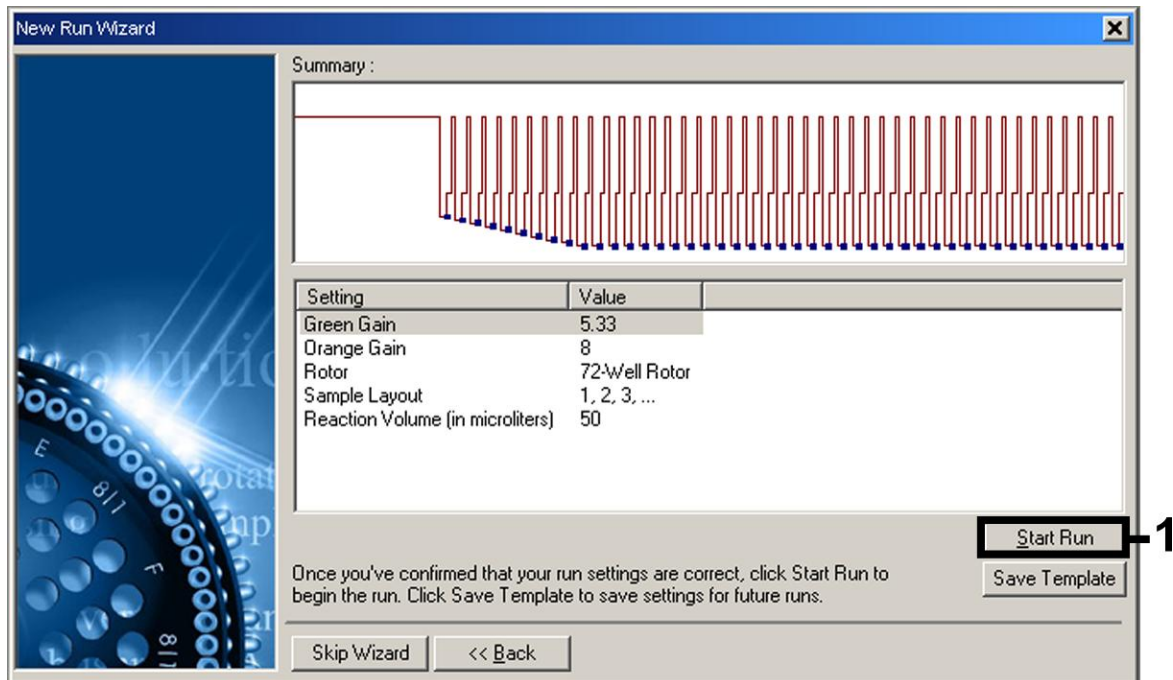
Afbeelding 5. Amplificatie van het DNA. Vergeet niet in de versmeltingsstap de touchdown-functie te activeren voor 10 cycli.

9. Het detectiebereik van de fluorescentiekanalen moet worden bepaald volgens de fluorescentie-intensiteiten in de PCR-buisjes. Klik op 'Gain Optimisation' (optimalisatie versterking) in het dialoogvenster van de 'New Run Wizard' (zie afbeelding 3) om het dialoogvenster 'Auto-Gain Optimisation Setup' (configuratie optimalisatie auto-versterking) te openen. Stel de kalibratietemperatuur in op 65 zodat deze overeenkomt met de versmeltingstemperatuur van het amplificatieprogramma (afbeelding 6).



Afbeelding 6. Instellen van de gevoeligheid van het fluorescentiekanaal.

10. De versterkingswaarden die bepaald zijn aan de hand van de kanaalkalibratie worden automatisch opgeslagen en verschijnen in het laatste menuvenster van de programmeringsprocedure (afbeelding 7). Klik op 'Start Run' (run starten).



Afbeelding 7. Starten van de run.

Interpretatie van de resultaten

Kwantificatie

De bijgevoegde kwantificatiestandaarden (VZV RG QS 1–4) worden op dezelfde wijze behandeld als vooraf gezuiverde monsters en hetzelfde volume wordt gebruikt (20 µl). Om een standaardcurve te genereren op Rotor-Gene Q-apparaten dienen alle 4 de kwantificatiestandaarden te worden gebruikt en in het dialoogvenster 'Edit Samples' (monsters bewerken) te worden gedefinieerd als standaarden met de gespecificeerde concentraties (zie de gebruikershandleiding van het apparaat).

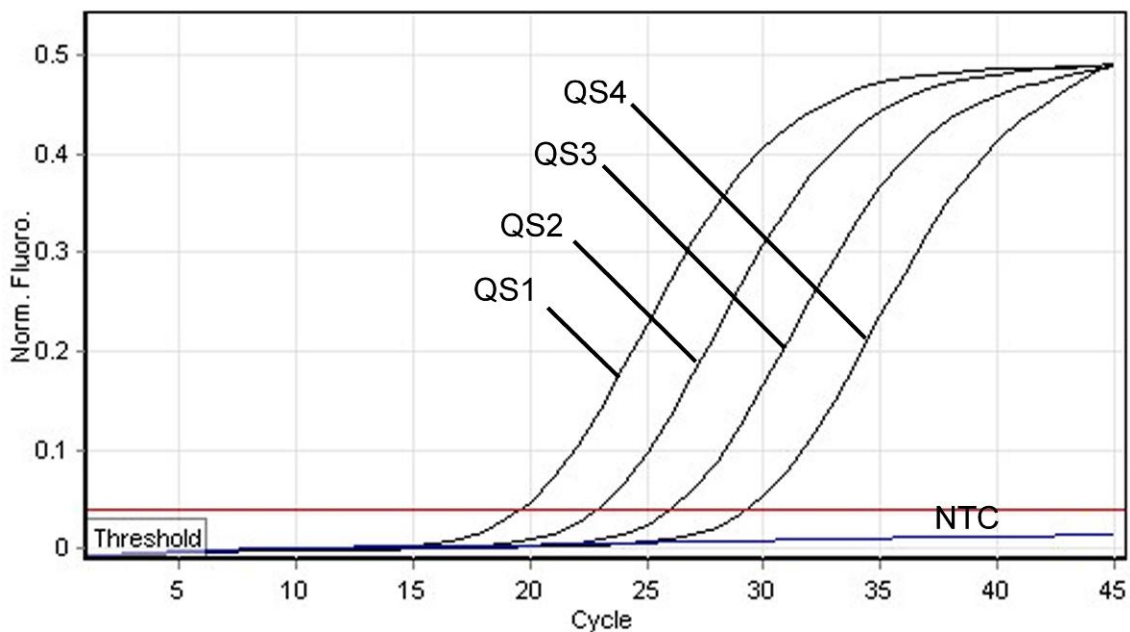
NB: De kwantificatiestandaarden worden gedefinieerd als kopieën/µl. Onderstaande vergelijking moet worden gebruikt om de waarden die zijn bepaald met gebruikmaking van de standaardcurve om te zetten in kopieën/ml van het monstermateriaal:

$$\text{Resultaat (kopieën/ml)} = \frac{\text{Resultaat (kopieën/}\mu\text{l)} \times \text{elutievolume (}\mu\text{l)}}{\text{Monstervolume (ml)}}$$

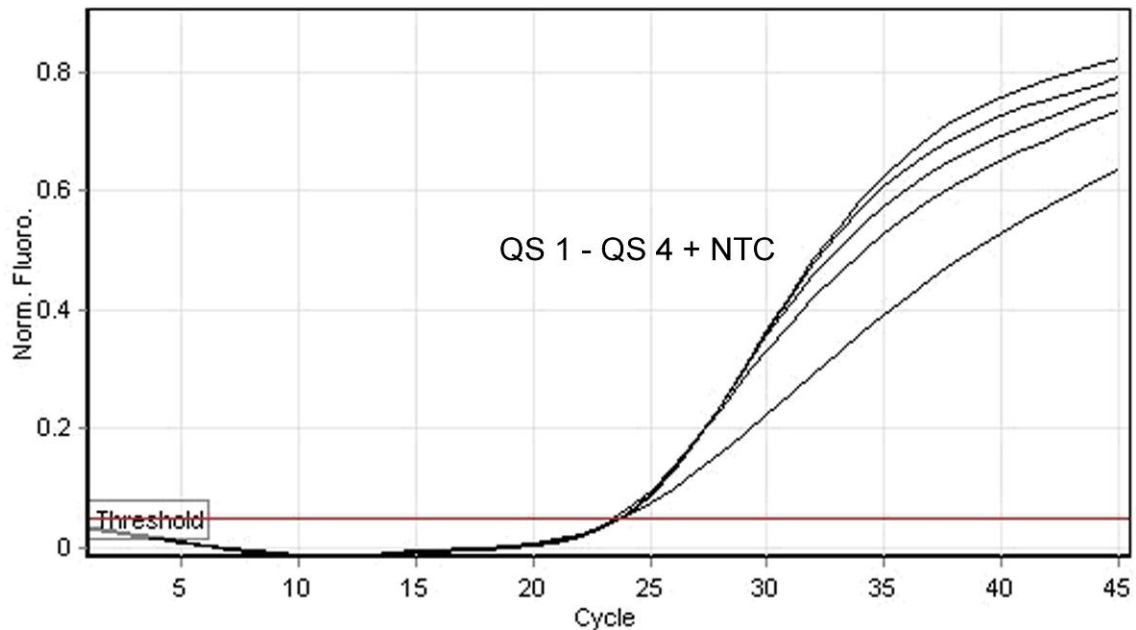
Als uitgangspunt dient het aanvankelijke monstervolume in bovengenoemde vergelijking te worden ingevoerd. Hiermee moet rekening worden gehouden wanneer het monstervolume voorafgaand aan de nucleïnezuurextractie is veranderd (bijv. verkleining van het volume door middel van centrifugeren of vergroting van het volume door aanvulling tot het voor de isolatie vereiste volume).

Resultaten

Voorbeelden van positieve en negatieve PCR-reacties worden gegeven in afbeelding 8 en afbeelding 9.



Afbeelding 8. Detectie van de kwantificatiestandaarden (VZV RG QS 1–4) in fluorescentiekanaal Cycling Green. NTC: Controle zonder matrijs (no template control) (negatieve controle).



Afbeelding 9. Detectie van de interne controle (IC) in fluorescentiekanaal Cycling Orange met gelijktijdige amplificatie van de kwantificatiestandaarden (VZV RG QS 1–4). NTC: Controle zonder matrijs (negatieve controle).

Er wordt een signaal gedetecteerd in fluorescentiekanaal Cycling Green.

Het resultaat van de analyse is positief: het monster bevat VZV-DNA.

In dit geval is de detectie van een signaal in het kanaal Cycling Orange van weinig belang, aangezien hoge aanvankelijke concentraties van VZV-DNA (positief signaal in het kanaal Cycling Green) kunnen leiden tot een verminderd of afwezig fluorescentiesignaal van de interne controle in het kanaal Cycling Orange (competitie).

In fluorescentiekanaal Cycling Green wordt geen signaal gedetecteerd. Tegelijkertijd verschijnt een signaal van de interne controle in het kanaal Cycling Orange.

In het monster wordt geen VZV-DNA gedetecteerd. Het kan worden beschouwd als negatief.

In het geval van een negatieve VZV-PCR sluit het gedetecteerde signaal van de interne controle de mogelijkheid van PCR-inhibitie uit.

Er wordt geen signaal gedetecteerd in de kanalen Cycling Green of Cycling Orange.

Er kan geen resultaat worden vastgesteld.

Informatie met betrekking tot foutbronnen en de oplossing ervan kunt u vinden in 'Troubleshooting guide', pagina 21.

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en het protocol in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

Geen signaal met de positieve controles (VZV RG QS 1–4) in fluorescentiekanaal Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Het gekozen fluorescentiekanaal voor de analyse van PCR-gegevens voldoet niet aan het protocol | Voor de analyse van gegevens kiest u het fluorescentiekanaal Cycling Green voor de analytische VZV-PCR en het fluorescentiekanaal Cycling Orange voor de interne controle-PCR. |
| b) Onjuiste programmering van het temperatuurprofiel van het Rotor-Gene-apparaat | Vergelijk het temperatuurprofiel met het protocol. Zie 'Protocol: PCR and data analysis', pagina 10. |
| c) Onjuiste configuratie van de PCR | Controleer uw werkstappen aan de hand van het pipetteerschema en herhaal zo nodig de PCR. Zie 'Protocol: PCR and data analysis', pagina 10. |

Opmerkingen en suggesties

- | | |
|---|--|
| d) De bewaarcondities voor een of meer kitonderdelen voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in 'Reagent Storage and Handling' (pagina 8) | Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |
| e) De houdbaarheidsdatum van de <i>artus</i> VZV RG PCR-kit is verstreken | Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |

Zwak of geen signaal van de interne controle van een negatief CSF-monster dat is gezuiverd met gebruikmaking van de EZ1 DSP Virus-kit in fluorescentiekanaal Cycling Orange en tegelijkertijd afwezigheid van een signaal in kanaal Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) De PCR-condities voldoen niet aan het protocol | Controleer de PCR-condities (zie hierboven) en herhaal indien nodig de PCR met de gecorrigeerde instellingen. |
| b) De PCR werd geremd | Zorg ervoor dat u de aanbevolen isolatiemethode gebruikt en volg de instructies van de fabrikant nauwkeurig op. |
| c) Tijdens de extractie is DNA verloren gegaan | Als de interne controle aan de extractie werd toegevoegd, kan een afwezig signaal van de interne controle duiden op het verlies van DNA tijdens de extractie. Zorg ervoor dat u de aanbevolen isolatiemethode gebruikt (zie 'DNA isolation', pagina 9) en volg de instructies van de fabrikant nauwkeurig op. |

Opmerkingen en suggesties

- | | |
|---|--|
| d) De bewaarcondities voor een of meer kitonderdelen voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in 'Reagent Storage and Handling' (pagina 8) | Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |
| e) De houdbaarheidsdatum van de <i>artus</i> VZV RG PCR-kit is verstreken | Controleer de bewaarcondities en de houdbaarheidsdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en neem indien nodig een nieuwe kit. |

Signalen met de negatieve controles in fluorescentiekanaal Cycling Green van de analytische PCR

- | | |
|--|---|
| a) Er is contaminatie opgetreden tijdens de voorbereiding van de PCR | Herhaal de PCR in replica's met nieuwe reagentia.
Sluit indien mogelijk de PCR-buisjes direct na toevoeging van het te testen monster af.
Zorg ervoor dat u de positieve controles het laatst pipetteert.
Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden. |
| b) Er is contaminatie opgetreden tijdens de extractie | Herhaal de extractie en de PCR van het te testen monster met gebruikmaking van nieuwe reagentia.
Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden. |

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij van de *artus* VZV RG PCR-kit getest tegen vooraf vastgestelde specificaties om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Beperkingen

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de procedures voor in-vitrodiagnostiek.

Om optimale PCR-resultaten te verkrijgen is het noodzakelijk dat men zich strikt houdt aan de gebruikershandleiding.

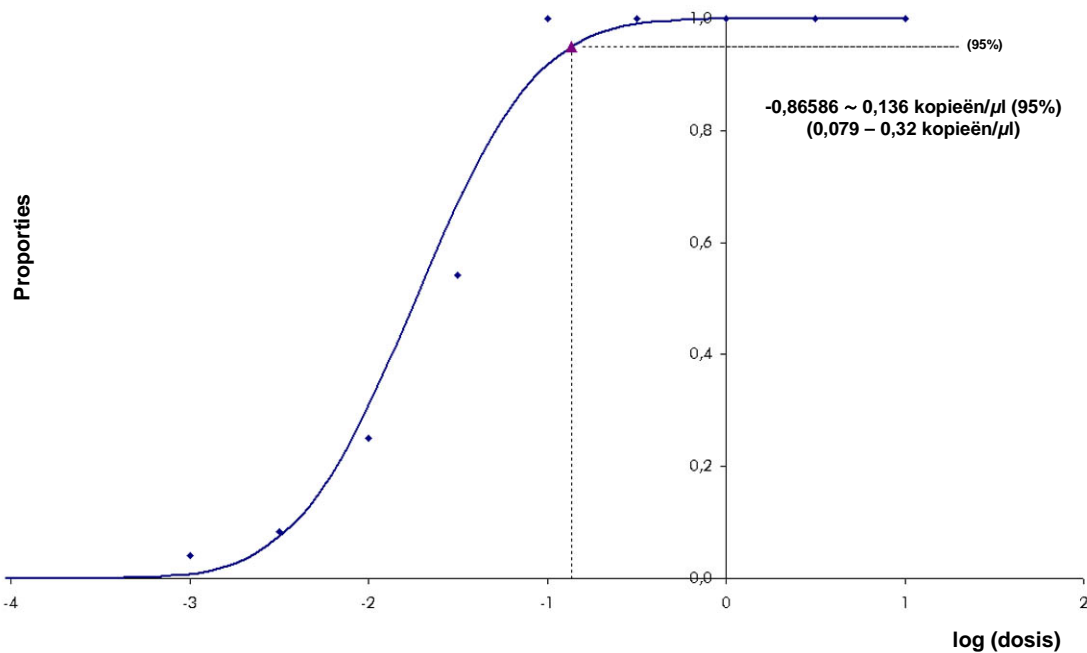
Let goed op de uiterste houdbaarheidsdatums op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen onderdelen waarvan de uiterste houdbaarheidsdatum is verstreken.

Hoewel dit zelden voorkomt, kunnen mutaties binnen de sterk geconserveerde gebieden van het virale genoom waar de primers van de kit en/of de probe aan binden, ertoe leiden dat de aanwezigheid van het virus in deze gevallen niet wordt gedetecteerd of wordt ondergewaardeerd. De validiteit en de werking van de assay-opzet worden op regelmatige tijden herzien.

Prestatiekenmerken

Analytische gevoeligheid

Om de analytische gevoeligheid van de *artus* VZV RG PCR-kit te bepalen werd een verdunningsreeks van genomisch VZV-DNA van 10 tot 0,001 kopieën/ μ l opgezet en geanalyseerd op de Rotor-Gene 6000 in combinatie met de *artus* VZV RG PCR-kit. De tests werden uitgevoerd op 3 verschillende dagen op 8 replica's. De resultaten werden bepaald via een probit-analyse. Een grafische illustratie van de probit-analyse op de Rotor-Gene 6000 wordt getoond in afbeelding 10. De analytische detectielimiet van de *artus* VZV RG PCR-kit in combinatie met de Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 bedraagt 0,136 kopieën/ μ l ($p = 0,05$). Dit betekent dat er een waarschijnlijkheid van 95% is dat er 0,136 kopieën/ μ l zullen worden gedetecteerd.



Afbeelding 10. Probit-analyse: VZV (Rotor-Gene 6000). Analytische gevoeligheid van de *artus* VZV RG PCR-kit op de Rotor-Gene 6000.

Specificiteit

De specificiteit van de *artus* VZV RG PCR-kit wordt in de eerste plaats gegarandeerd door de selectie van de primers en probes, alsook de selectie van stringente reactiecondities. De primers en probes zijn door middel van sequentievergelijkinganalyse gecontroleerd op mogelijke homologieën met alle gepubliceerde sequenties in genenbibliotheken. Zo is de detecteerbaarheid van alle relevante genotypen geverifieerd.

Verder werd de specificiteit gevalideerd met 30 verschillende VZV-negatieve CSF-monsters. Deze genereerden geen signalen met de VZV-specifieke primers en probes die zijn inbegrepen in de VZV RG Master.

Mogelijke kruisreactiviteit van de *artus* VZV RG PCR-kit werd getest met de controlegroep die in tabel 4 wordt vermeld. Geen van de geteste pathogenen was reactief.

Tabel 4. Tests van de specificiteit van de kit met mogelijk kruisreactieve pathogenen

Controlegroep	VZV (Cycling Green)	Interne controle (Cycling Orange)
Humaan herpesvirus 1 (herpes simplex-virus 1)	-	+
Humaan herpesvirus 2 (herpes simplex-virus 2)	-	+
Humaan herpesvirus 4 (epstein-barrvirus)	-	+
Humaan herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	-	+
Humaan herpesvirus 6A	-	+
Humaan herpesvirus 6B	-	+
Humaan herpesvirus 7	-	+
Humaan herpesvirus 8 (kaposisarcoomherpesvirus)	-	+
Hepatitis A-virus	-	+
Hepatitis B-virus	-	+
Hepatitis C-virus	-	+
Humaan immunodeficiëntievirus (hiv)	-	+
Humaan T-celleukemievirus 1	-	+
Humaan T-celleukemievirus 2	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+
Westnijlvirus	-	+

Precisie

De nauwkeurighedsgegevens van de *artus* VZV RG PCR-kit zijn verzameld door middel van Rotor-Gene-apparaten en maken de bepaling van de totale variantie van de analyse mogelijk. De totale variantie bestaat uit de intra-analysevariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van monsters van dezelfde concentratie binnen één experiment), de interanalysevariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van de analyse, gegenereerd op verschillende apparaten van hetzelfde type door verschillende operatoren binnen één laboratorium) en de interbatchvariabiliteit (variabiliteit van meerdere resultaten van de analyse met gebruikmaking van verschillende batches). De verkregen gegevens werden gebruikt voor het bepalen van de standaarddeviatie, de variantie en de variatiecoëfficiënt voor de pathogeenspecifieke PCR en de interne controle-PCR.

Nauwkeurighedsgegevens van de *artus* VZV RG PCR werden verzameld met gebruikmaking van de kwantificatiestandaard met de laagste concentratie (QS 4; 10 kopieën/ μ l). De tests werden uitgevoerd met 8 replica's. De nauwkeurighedsgegevens werden berekend op basis van de C_T -waarden van de amplificatiecurven (C_T : drempelcyclus [threshold cycle], zie tabel 5, pagina 28). Bovendien werden nauwkeurighedsgegevens voor kwantitatieve resultaten in kopieën/ μ l bepaald met gebruikmaking van de corresponderende C_T -waarden (zie tabel 6, pagina 29). Op basis van deze resultaten is de totale statistische spreiding van een gegeven monster met de genoemde concentratie 0,45% (C_T) of 8,32% (concentratie), en 2,81% (C_T) voor de detectie van de interne controle. Deze waarden zijn gebaseerd op het geheel van alle enkelvoudige waarden van de bepaalde variabiliteiten.

Robuustheid

De verificatie van de robuustheid laat ruimte voor de bepaling van het totale faalpercentage van de *artus* VZV RG PCR-kit. 30 VZV-negatieve monsters van CSF werden gespiked met 0,4 kopieën/ μ l elutievolumen VZV-DNA (concentratie van ongeveer driemaal de limiet van de analytische gevoeligheid). Na extractie met gebruikmaking van de EZ1[®] DSP Virus-kit (zie 'DNA isolation', pagina 9) werden deze monsters geanalyseerd met de *artus* VZV RG PCR-kit. Voor alle 30 monsters was het faalpercentage 0%. Daarnaast werd de robuustheid van de interne controle beoordeeld door middel van zuivering en analyse van 30 VZV-negatieve CSF-monsters. Het totale faalpercentage bedroeg 0%. Remmingen werden niet waargenomen. De robuustheid van de *artus* VZV RG PCR-kit is dus $\geq 99\%$.

Reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheidsgegevens maken een regelmatige prestatiebeoordeling van de *artus* VZV RG PCR-kit mogelijk, alsook een efficiëntievergelijking met andere producten. Deze gegevens worden verkregen door de deelname aan gevestigde bekwaamheidsprogramma's.

Tabel 5. Nauwkeurighedsgegevens op basis van de C_T-waarden

	Standaarddevi atie	Varianti e	Variatiecoëffici ënt (%)
Intra- analysevariabiliteit: VZV QS 4	0,08	0,01	0,26
Intra- analysevariabiliteit: Interne controle	0,04	0,002	0,17
Interanalysevariabili teit: VZV QS 4	0,15	0,02	0,5
Interanalysevariabili teit: Interne controle	0,39	0,15	1,63
Interbatchvariabilite it: VZV QS 4	0,1	0,01	0,34
Interbatchvariabilite it: Interne controle	0,66	0,43	2,65
Totale variantie: VZV QS 4	0,13	0,02	0,45
Totale variantie: Interne controle	0,68	0,47	2,81

Tabel 6. Nauwkeurigheidgegevens op basis van de kwantitatieve resultaten (in kopieën/ μ l)

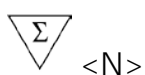
	Standaarddeviatie	Variantie	Variatiecoëfficiënt (%)
Intra-analysevariabiliteit: VZV QS 4	0,5	0,25	5,46
Interanalysevariabiliteit: VZV QS 4	0,85	0,72	8,72
Interbatchvariabiliteit: VZV QS 4	0,75	0,56	7,67
Totale variantie: VZV QS 4	0,81	0,66	8,32

Referenties

QIAGEN onderhoudt een grote, regelmatig bijgewerkte onlinedatabase van wetenschappelijke publicaties waarin producten van QIAGEN zijn gebruikt. Uitgebreide zoekopties stellen u in staat om de artikelen die u nodig hebt te vinden, door eenvoudig te zoeken op trefwoord of door de toepassing, het onderzoeksgebied, een titel, etc. op te geven.

Kijk voor een volledige lijst met referenties in de online beschikbare QIAGEN Reference Database op www.qiagen.com/RefDB/search.asp, of neem contact op met de technische diensten van QIAGEN of met uw plaatselijke leverancier.

Symbolen






Bevat voldoende reagentia voor <N> tests



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek

REF	Catalogusnummer
LOT	Partijnummer
MAT	Materiaalnummer
COMP	Onderdelen
CONT	Bevat
NUM	Nummer
GTIN	Global Trade Item Number
	Temperatuurbeperring
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Contactgegevens

Ga voor technische ondersteuning en voor meer informatie naar ons centrum voor technische ondersteuning op www.qiagen.com/Support of bel één van de afdelingen voor technische diensten of plaatselijke leveranciers van QIAGEN (zie de achterzijde van deze handleiding of kijk op www.qiagen.com).

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: Master, 4 kwantificatiestandaarden, interne controle, magnesiumoplossing, water (PCR-kwaliteit)	4502263
<i>artus</i> VZV RG PCR Kit (96)	Voor 96 reacties: Master, 4 kwantificatiestandaarden, interne controle, magnesiumoplossing, water (PCR-kwaliteit)	4502265
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR-kits — voor geïntegreerde, geautomatiseerde monsterzuivering en pathogeendetectie die volledig voldoen aan de CE-IVD-vereisten		
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 1	Voor 48 bereidingen van viraal nucleïnezuur en 24 assays: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 1 x <i>artus</i> VZV RG PCR-kit (24)	EA10223
EASY <i>artus</i> VZV RG PCR Kit 2	Voor 48 bereidingen van viraal nucleïnezuur en 48 assays: 1 x EZ1 DSP Virus-kit, 2 x <i>artus</i> VZV RG PCR-kit (24)	EA10224
EZ1 DSP Virus-kit — voor geautomatiseerde, gelijktijdige zuivering van viraal DNA en RNA uit 1–14 monsters van humaan plasma, serum of CSF		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Voor 48 bereidingen van viraal nucleïnezuur: Voorgevulde reagenscartridges, wegwerppunthouders, wegwerppunten, monsterbuisjes, elutiebuisjes, buffers, drager-RNA	62724
Rotor-Gene Q MDx en accessoires		

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR-cycler met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), laptopcomputer, software, accessoires: inclusief 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator (smeltanalysator met hoge resolutie) met 5 kanalen (green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-systeem	Realtime PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002033

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor-Gene Q MDx 6-plex platform	Realtime PCR-apparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, exclusief installatie en training	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR-apparaat met 6 kanalen (blue [blauw], green [groen], yellow [geel], orange [oranje], red [rood], crimson [karmijnrood]), inclusief laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002043
Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een single-channel pipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 × 0.2 ml Tubes	Aluminium blok voor het handmatig opzetten van reacties in een standaard 8 x 12-opstelling met gebruikmaking van 96 buisjes van 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dunwandige buisjes voor 1000 reacties	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 dunwandige buisjes voor 10.000 reacties	981008

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten

De aankoop van dit product geeft de koper het recht om het product te gebruiken voor het uitvoeren van diagnostische diensten voor humane in-vitrodiagnostiek. Hierbij wordt door de aanschaf geen algemeen octrooi of andere licentie van enige aard verleend anders dan dit specifieke recht van gebruik.

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

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *artus* VZV RG PCR-kit zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De *artus* VZV RG PCR-kit mag alleen worden gebruikt in overeenstemming met de handleiding van de *artus* VZV RG PCR-kit en voor toepassing met uitsluitend de onderdelen die in de kit zitten. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de handleiding van de *artus* VZV RG PCR-kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor bijgewerkte licentievoorwaarden www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

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

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

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

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

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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

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

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

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

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

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

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

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

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

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

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

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

