

Manuale kit *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR

 24 (cat. n. 4500263)
 96 (cat. n. 4500265)

Versione 1

IVD

Diagnostica qualitativa in vitro

Da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene[®] Q



REF

4500263, 4500265



1060171IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1060171IT



Tecnologie per campioni e test QIAGEN

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque campione biologico. I nostri prodotti e servizi avanzati di alta qualità assicurano la riuscita dall'inizio alla fine.

QIAGEN definisce gli standard in:

- purificazione di DNA, RNA e proteine
- test di acido nucleico e proteine
- ricerca microRNA e RNAi
- automazione delle tecnologie per campioni e test

Il nostro obiettivo è farvi raggiungere risultati e innovazioni eccezionali. Per ulteriori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Contenuto	
Contenuto del kit	4
Simboli	4
Conservazione	5
Uso previsto	5
Limiti sull'utilizzo del prodotto	6
Assistenza tecnica	6
Controllo di qualità	6
Avvertenze e precauzioni	7
Presentazione	8
Principio	8
Informazioni sull'agente patogeno	8
Prestazioni caratteristiche	9
Sensibilità analitica	9
Specificità	10
Precisione	13
Robustezza	16
Riproducibilità	16
Equipaggiamento e reagenti in dotazione all'utente	17
Note importanti	18
Precauzioni generali	18
Isolamento del DNA	18
Controllo interno	19
Protocollo: analisi della PCR e dei dati	20
<i>i</i> Punti importanti prima di iniziare	20
Operazioni da eseguire prima di iniziare	20
Procedura	20
Guida alla ricerca guasti	31
Bibliografia	34
Informazioni per l'ordine	35

Contenuto del kit

<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Numero del catalogo		4500263	4500265
Numero di reazioni		24	96
Blu	HSV-1/2 RG Master	2 x 300µl	8 x 300µl
Giallo	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Rosso	HSV-1 RG PC [†] (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Marrone	HSV-2 RG PC [†] (100 cop/µl)	200 µl	200 µl
Verde	HSV-1/2 RG IC [‡] IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Bianco	Acqua (PCR-grade)	1000 µl	1000 µl
	Manuale 	1	1

* Soluzione di magnesio.

† Controllo positivo.

‡ Controllo interno.

Simboli



Contiene reagenti per <N> test



Utilizzare entro



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero del catalogo



Numero del lotto



Numero del materiale



Componenti



Contiene



Numero



Global Trade Item Number



Limiti di temperatura



Produttore legale



Fare riferimento alle informazioni riportate nel manuale



Nota importante

Conservazione

I componenti del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -15 e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e ricongelarli più di due volte, perché ciò potrebbe ridurre la sensibilità del test. Se si prevede un uso intermittente dei reagenti, congelarli in aliquote. La conservazione a $2-8^{\circ}\text{C}$ non deve superare un periodo di 5 ore.

Uso previsto

Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR è un test real-time basato sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) per rilevamento e discriminazione del DNA dei virus herpes simplex umani 1 e 2 sugli strumenti Rotor-Gene Q dopo purificazione interamente automatica mediante il kit EZ1[®] DSP Virus di campioni di fluido cerebrospinale (CSF) ottenuti da soggetti infettati da HSV.



Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR non deve essere usato con strumenti Rotor-Gene Q 2plex.

Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR è destinato ad essere usato in associazione con la presentazione clinica e con altri marker di laboratorio per la prognosi.

Limiti sull'utilizzo del prodotto

L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.

L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro (EN375).

Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

Assistenza tecnica

Alla QIAGEN siamo orgogliosi della qualità e della disponibilità del nostro staff tecnico. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da scienziati esperti che hanno alle spalle una lunga esperienza, maturata a livello pratico e teorico, nelle tecnologie per campioni e test e nell'impiego dei prodotti QIAGEN®. In caso volette porgere delle domande o incontraste delle difficoltà con il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR o con i prodotti QIAGEN in generale, vi preghiamo di non esitare a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia ai nostri scienziati che ai ricercatori della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a contattarci, in caso aveste dei suggerimenti da darci sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche varie.

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultate il nostro sito www.qiagen.com/Support oppure contattate il servizio assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito www.qiagen.com).

Controllo di qualità

In conformità al Sistema di gestione della qualità con certificazione ISO della QIAGEN, ciascun lotto di kit *artus* HSV-1/2 RG PCR viene testato con le specifiche predefinite per garantire una qualità del prodotto costante.

Avvertenze e precauzioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

Presentazione

Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA di HSV-1 e HSV-2 tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) su strumenti Rotor-Gene Q. L'HSV-1/2 RG Master contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 154 bp dei genomi di HSV-1 e HSV-2, nonché per la rilevazione immediata dell'amplicone specifico nei canali di fluorescenza Cycling Green (origine 470 nm, rilevatore 510 nm) e Cycling Orange (origine 585 nm, rilevatore 610 nm) degli strumenti Rotor-Gene Q.

Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologa per la rilevazione di una possibile inibizione della PCR, che viene identificato come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow (origine 530 nm, rilevatore 555 nm) per Rotor-Gene Q. Esso inoltre non riduce il limite analitico di rilevabilità della PCR di HSV-1/2 RG (vedere "Sensibilità analitica", pag. 9). Il kit contiene controlli positivi esterni (HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC).

Principio

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Per la real-time PCR la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito legate a sonde oligonucleotidiche, che si legano in modo specifico al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare i prodotti senza dover riaprire le provette dei campioni al termine della PCR.*

Informazioni sull'agente patogeno

Si riscontra la presenza del virus Herpes simplex (HSV) negli essudati di lesioni, nella saliva, nel fluido cerebrospinale (CSF) e nelle secrezioni vaginali. Viene trasmesso principalmente per contatto diretto con le lesioni, con i rapporti sessuali e per via perinatale. La maggior parte dei casi HSV positivi è caratterizzata da lesioni della pelle e delle mucose orali e genitali. L'infezione da HSV può essere primaria (> 90 % di questi casi è asintomatico) o ricorrente (secondaria). L'infezione primaria da HSV-1 può fra l'altro causare gengivostomatite, eczema erpetico, cheratocongiuntivite ed encefalite; l'infezione primaria da HSV-2 si manifesta fra l'altro come vulvovaginite, meningite ed herpes generalizzato nei neonati. I sintomi primari di un'infezione secondaria sono lesioni della pelle del naso, della bocca e delle regioni

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

genitali. Anche più gravi sono le forme ricorrenti di cheratocongiuntivite e meningite.

Prestazioni caratteristiche

Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, è stata stabilita una serie di diluizioni standard da 10 a 0,001 copie/ μ l analizzate poi su Rotor-Gene Q/6000 in combinazione con il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. I test sono stati eseguiti in 3 giornate diverse su 8 replicati. I risultati sono stati determinati da un'analisi del probit. Il limite di rivelazione analitica del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR in combinazione con il Rotor-Gene Q/6000 è coerentemente di 0,22 copie/ μ l ($p = 0,05$) per HSV-1 e di 0,26 copie/ μ l ($p=0,05$) per HSV-2. Ciò indica una probabilità del 95% di rilevare 0,22 copie/ μ l di DNA di HSV-1 o 0,26 copie/ μ l di DNA di HSV-2 DNA. Un'illustrazione grafica dell'analisi del probit per HSV-1 è contenuta nella Fig. 1 più sotto; che segue; il diagramma dell'analisi del probit per HSV-2 è contenuta nella Figura 2

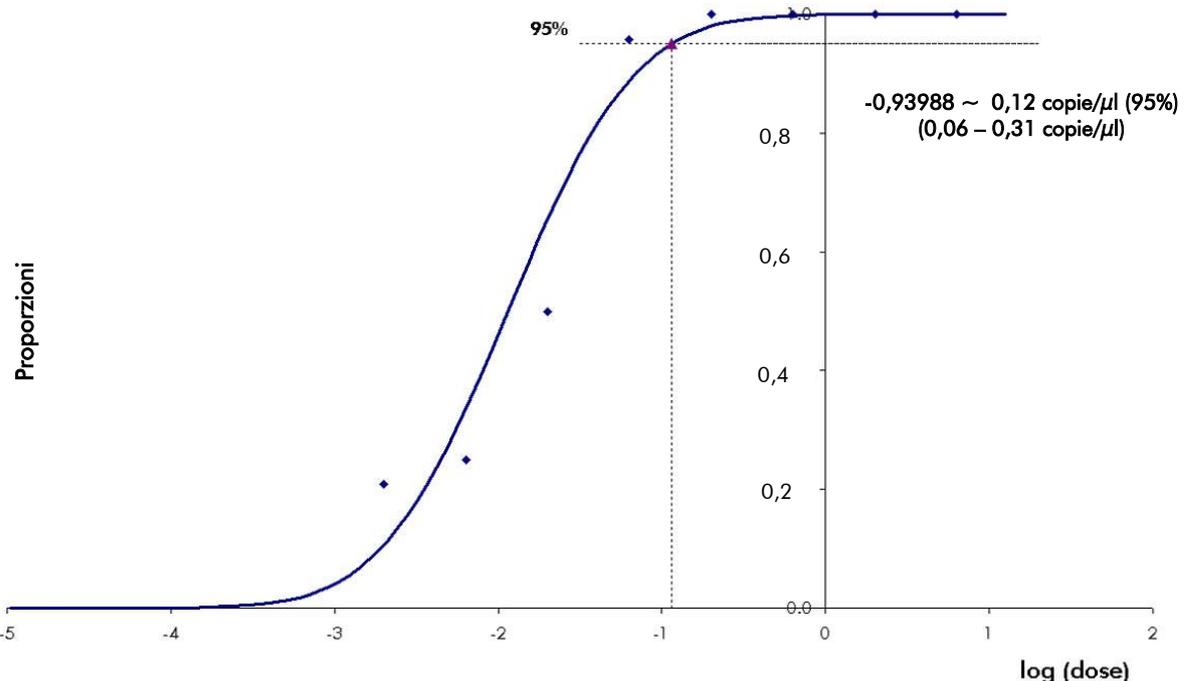


Figura 1. Analisi del probit: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilità analitica per HSV-1 del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sul Rotor-GeneQ/ 6000.

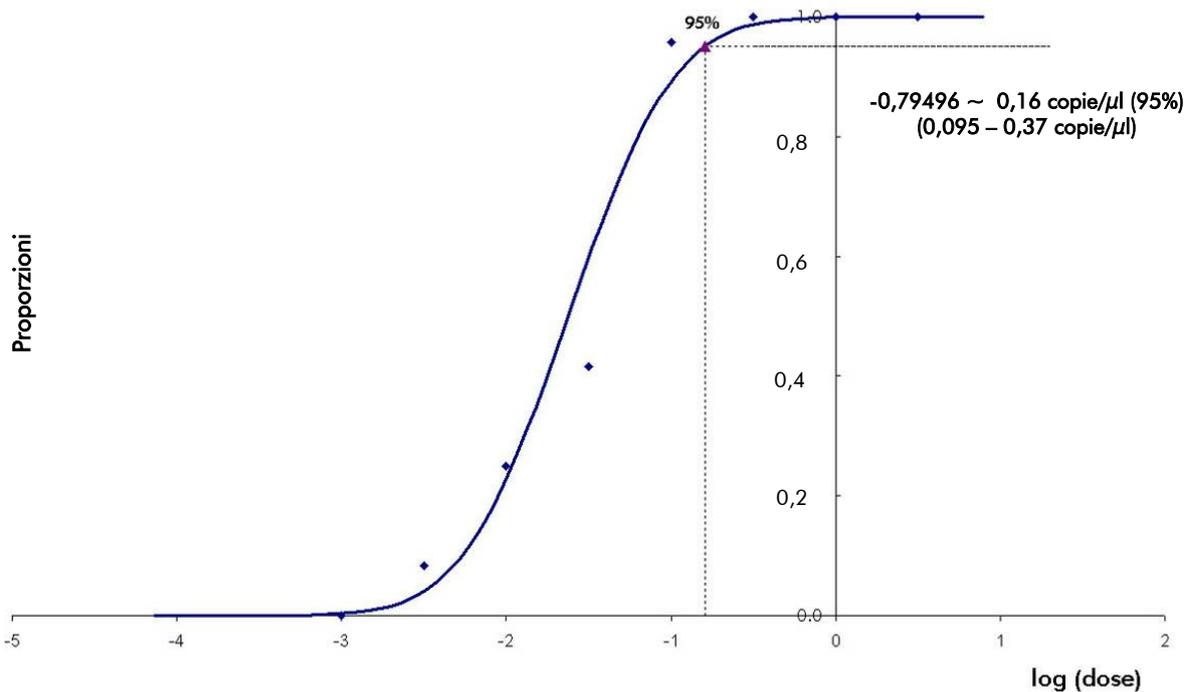


Figura 2. Analisi del probit: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilità analitica per HSV-2 del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sul Rotor-Gene Q/ 6000.

Specificità

La specificità del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR è garantita in primissima linea dalla selezione dei primer e delle sonde, nonché dalla selezione di rigorose condizioni di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. La rilevabilità di tutti i genotipi pertinenti è stata così assicurata da un allineamento del database e da una PCR eseguita su strumenti Rotor-Gene con i ceppi elencati nella Tabella 1.

Inoltre la specificità è stata validata da 30 diversi campioni di CSF negativi a HSV-1 e HSV-2. Tali campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per HSV-1 e HSV-2 inclusi nel HSV-1/2 RG Master.

Si è testata una potenziale cross-reattività del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR mediante il gruppo di controllo elencato nella Tabella 2. Nessuno dei patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1. Test della specificità di genotipi pertinenti

Virus	Ceppo	Origine	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Controllo interno (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 Raccolta americana di colture tipologiche.

† INSTAND Società per la promozione della garanzia di qualità nei laboratori medici.

‡ QCMD Controllo qualità per la diagnostica molecolare.

§ NCPV Raccolta nazionale di virus patogeni.

Tabella 2. Test della specificità del kit con genotipi potenzialmente cross-reattivi

Gruppo di controllo	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Controllo interno (Cycling Yellow)
Herpes virus umano 3 (virus varicella-zoster)	–	–	+
Herpes virus umano 4 (virus Epstein-Barr)	–	–	+
Herpes virus umano 5 (citomegalovirus)	–	–	+
Herpes virus umano 6A	–	–	+
Herpes virus umano 6B	–	–	+
Herpes virus umano 7	–	–	+
Herpes virus umano 8 (herpes virus associato a sarcoma di Kaposi)	–	–	+
Virus epatite A	–	–	+
Virus epatite B	–	–	+
Virus epatite C	–	–	+
Virus umano da immunodeficienza (HIV)	–	–	+
Virus umano di tipo 1 della leucemia dei linfociti T	–	–	+
Virus umano di tipo 2 della leucemia dei linfociti T	–	–	+
Enterovirus	–	–	+
Parvovirus B19	–	–	+
Virus del Nilo occidentale	–	–	+

Precisione

I dati sulla precisione del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sono stati raccolti mediante strumenti Rotor-Gene e consentono di determinare la varianza totale del test. La varianza totale è composta dalla variabilità intra-test (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione in uno stesso esperimento), dalla variabilità inter-test (variabilità di risultati multipli del test generati su strumenti differenti dello stesso tipo da operatori differenti in uno stesso laboratorio) e dalla variabilità inter-lotto (variabilità di risultati multipli del test ottenuti con lotti diversi). I dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard, la varianza e il coefficiente di variazione per il patogeno specifico e per la PCR del controllo interno.

I dati sulla precisione del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR sono stati raccolti mediante DNA di HSV-1 e HSV-2 alla concentrazione di 10 copie/ μ l. I test sono stati effettuati con 8 replicati. I dati sulla precisione sono stati calcolati sulla base dei valori C_T delle curve di amplificazione (C_T : ciclo soglia, vedere Tabella 3 e Tabella 4). Sulla base di tali risultati, lo spread statistico generale di un dato campione alla concentrazione menzionata è di 0,82% (C_T) per HSV-1, 0,67% (C_T) per HSV-2 e di 0,24% (C_T) e 0,58% (C_T) rispettivamente per il rilevamento del controllo interno. Questi valori sono basati sulla totalità di tutti i singoli valori della variabilità determinata.

Tabella 3. Dati sulla precisione per HSV-1 sulla base dei valori C_T

	Valore C_T	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-test: HSV-1 10 copie/ μ l	30,46	0,25	0,81
Variabilità intra-test: controllo interno	25,29	0,08	0,3
Variabilità inter-test: HSV-1 10 copie/ μ l	29,69	0,69	0,05
Variabilità inter-test: controllo interno	24,97	0,31	1,25
Variabilità inter-lotto: HSV-1 10 copie/ μ l	29,95	0,40	1,35
Variabilità inter-lotto: controllo interno	24,90	0,30	1,20
Varianza totale: HSV-1 10 copie/ μ l	29,91	0,55	1,82
Varianza totale: controllo interno	24,99	0,31	1,24

Tabella 4. Dati sulla precisione per HSV-2 sulla base dei valori C_T

	Valore C_T	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-test: HSV-2 10 copie/ μ l	29,85	0,25	0,50
Variabilità intra-test: controllo interno	25,17	0,39	1,55
Variabilità inter-test: HSV-2 10 copie/ μ l	29,92	0,25	0,49
Variabilità inter-test: controllo interno	25,11	0,41	0,63
Variabilità inter-lotto: HSV-2 10 copie/ μ l	29,80	0,23	0,79
Variabilità inter-lotto: controllo interno	24,89	0,33	0,32
Varianza totale: HSV-2 10 copie/ μ l	29,88	0,20	0,67
Varianza totale: controllo interno	25,07	0,40	0,58

Robustezza

La verifica della robustezza permette di determinare la percentuale totale di insuccesso del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Per ottenere titoli molto bassi di HSV-1 e HSV-2, 30 campioni negativi di CSF sono stati arricchiti con 0,36 copie/ μ l del volume di eluizione del DNA di HSV-1 o con 0,48 copie/ μ l del volume di eluizione del DNA di HSV-2 (concentrazione tripla del limite di sensibilità analitica). Dopo estrazione con il kit EZ1 DSP Virus, questi campioni sono stati analizzati con il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Tutti i 30 campioni sono stati valutati correttamente come debolmente positivi per ciascun tipo di HSV, quindi con un tasso di insuccesso dello 0%. Inoltre, la robustezza del controllo interno è stata validata mediante purificazione e analisi di 30 campioni di CSF negativi per HSV-1 e HSV-2. Nessuna inibizione della PCR è stata rilevata, quindi con una percentuale totale di insuccesso dello 0%. Pertanto la robustezza del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR è $\geq 99\%$.

Riproducibilità

I dati di riproducibilità permettono sia una valutazione delle prestazioni regolari del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR che un confronto dell'efficienza con altri prodotti. Questi dati sono stati ottenuti mediante la partecipazione a programmi di proficiency riconosciuti.

Equipaggiamento e reagenti in dotazione all'utente

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Kit per isolamento DNA (vedere "Isolamento del DNA", pag. 18)
- Pipette (regolabili)*
- Puntali per pipetta sterili con filtri
- Agitatore vortex *
- Centrifuga da banco* con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Strumento Rotor-Gene Q o Rotor-Gene*[†] con canali di fluorescenza per Cycling Green, Cycling Orange e Cycling Yellow
- Software Rotor-Gene Q versione 1.7.94 e superiore (software Rotor-Gene 6000 versione 1.7.65 e superiore)
- Provette e tappi per strisce, 0,2 ml, da usare con rotore a 72 pozzetti (cat. n. 981103 o 981106)
- In alternativa: provette per PCR, 0,2 ml, da usare con rotore a 36 pozzetti (cat. n. 981005 o 981008)
- Blocco di raffreddamento (blocco di caricamento per 72 provette x 0,2 ml, cat. n. 9018901, o blocco di caricamento per 96 provette x 0,2 ml, cat. n. 9018905)

* Verificare che gli strumenti siano stati controllati e calibrati secondo le raccomandazioni per produttore.

[†] Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR non deve essere usato con gli strumenti Rotor-Gene Q 2plex.

Note importanti

Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali sterili con filtro per pipette.
- Conservare ed estrarre i materiali positivi (campioni, controlli positivi e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un ambiente separato nello spazio.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente (15–25°C).
- Una volta scongelati, miscelare i componenti (pipettandoli ripetutamente su e giù o in vortex a impulsi) e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente tenendo i componenti in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento (blocco di caricamento a 72/96 pozzetti).

Isolamento del DNA

Il kit EZ1 DSP Virus (QIAGEN, cat. n. 62724*) è validato per la purificazione del DNA virale da CSF umano da usare con il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Effettuare la purificazione del DNA seguendo le istruzioni del *Manuale del kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ Il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR non deve essere usato con metodi di isolamento a base di fenolo.

ⓘ L'utilizzo di carrier RNA è determinante per l'efficienza dell'estrazione e di conseguenza per la resa in DNA. Aggiungere la quantità adeguata di carrier RNA a ciascuna estrazione seguendo le istruzioni del *Manuale del kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ Il controllo interno del kit *artus* HSV-1/2 RG PCR può essere utilizzato direttamente nella procedura di isolamento (vedere "Controllo interno" qui di seguito, più sotto).

* Il kit EZ1 DSP Virus è disponibile anche come kit dotati di contrassegno EASYartus® HSV-1/2 RG PCR, in combinazione con il kit *artus* HSV-1/2 RG PCR (vedere a pag. 35 i dati per l'ordinazione).

Controllo interno

È fornito un controllo interno (HSV-1/2 RG IC). Questo controllo permette all'utilizzatore sia di controllare la procedura di isolamento del DNA che di verificare la possibile inibizione della PCR. Per questa applicazione, aggiungere il controllo interno all'isolamento in ragione di 0,2 μ l per 1 μ l di volume di eluizione. Per esempio, se si utilizza il kit EZ1 DSP Virus, il DNA viene eluito in 60 μ l di tampone per eluizione (AVE). Quindi si devono aggiungere inizialmente 6 μ l del controllo interno.

 Non aggiungere un controllo interno e il carrier RNA direttamente al materiale campione.

Il controllo interno può essere utilizzato come opzione per verificare la possibile inibizione della PCR. Per questa applicazione, aggiungere il controllo interno direttamente alla miscela di HSV-1/2 RG Master e HSV-1/2 RG Mg-Sol, come descritto nella fase 2b del protocollo (pag. 21).

Protocollo: analisi della PCR e dei dati

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere “Note importanti”, pag. 18.
- Dedicare il tempo necessario alla familiarizzazione con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale dello strumento.
- Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi i controlli positivi e un controllo negativo (acqua, PCR-grade).

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Verificare che il blocco di raffreddamento (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia stato preraffreddato a 2–8°C.
- Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o in vortex rapido) e centrifugati per breve tempo.

Procedura

- 1. Inserire il numero desiderato di provette per PCR negli adattatori del blocco di raffreddamento.**
 - 2. Se si usa il controllo interno per controllare la procedura di isolamento del DNA e per verificare la possibile inibizione della PCR, seguire la fase 2a.
Se si usa il controllo interno esclusivamente per controllare l'inibizione della PCR, seguire la fase 2b.
Utilizzare il controllo interno secondo la fase 2b per tutti i controlli positivi e negativi.**
- 2a. Il controllo interno è già stato aggiunto all'isolamento (vedere “Controllo interno”, pag. 19). In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 5.**

La miscela di reazione contiene normalmente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Tabella 5. Preparazione della miscela master (controllo interno usato per controllare l'isolamento del DNA e verificare l'inibizione della PCR)

Numero di campioni	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
Volume totale	30 μl	360 μl

- 2b. Il controllo interno deve essere aggiunto direttamente alla miscela di HSV-1/2 RG Master e HSV-1/2 RG Mg-Sol. In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 6.**

La miscela di reazione contiene normalmente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Tabella 6. Preparazione della miscela master (controllo interno usato esclusivamente per verificare l'inibizione della PCR)

Numero di campioni	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
Volume totale	32 μl*	384 μl*

* L'aumento di volume causato dall'aggiunta del controllo interno viene trascurato quando si prepara il test PCR. La sensibilità del sistema di rilevamento non ne è compromessa.

- 3. Pipettare 30 μ L della miscela master in ogni provetta PCR. Aggiungere poi 20 μ l del campione eluito di DNA (vedere Tabella 7) e miscelare bene pipettando ripetutamente su e giù. Parallelamente, utilizzare 20 μ l di HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC come controlli positivi e 20 μ l di acqua (acqua, PCR-grade) come controllo negativo.**

Tabella 7. Preparazione del test PCR

Numero di campioni	1	12
Miscela master	30 μ l	30 μ l cadauno
Campione	20 μ l	20 μ l cadauno
Volume totale	50 μl	50 μl cadauno

4. **Chiudere le provette PCR. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia presente sopra il rotore per evitare l'apertura accidentale delle provette durante l'analisi.**
5. **Per l'individuazione del DNA di HSV-1 o HSV-2, creare un profilo termico con le seguenti operazioni.**

Impostazione dei parametri generali del test	Figure 3, 4, 5
Attivazione iniziale dell'enzima hot-start	Figura 6
Amplificazione del DNA	Figura 7
Regolazione della sensibilità del canale di fluorescenza	Figura 8
Avvio dell'analisi	Figura 9

Tutte le specifiche sono relative al Rotor-Gene Q software versione 1.7.94 o superiore e al Rotor-Gene 6000 software versione 1.7.65 o superiore. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene consultare il relativo manuale utente. Nelle illustrazioni queste impostazioni sono evidenziate da una cornice nera spessa. Le illustrazioni incluse riguardano anche gli strumenti Rotor-Gene Q.

6. In primo luogo, aprire la finestra di dialogo "New Run Wizard" con la versione "Advanced" (Avanzata) (Figura 3). Controllare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio applicato) e cliccare su "Next" (Avanti).

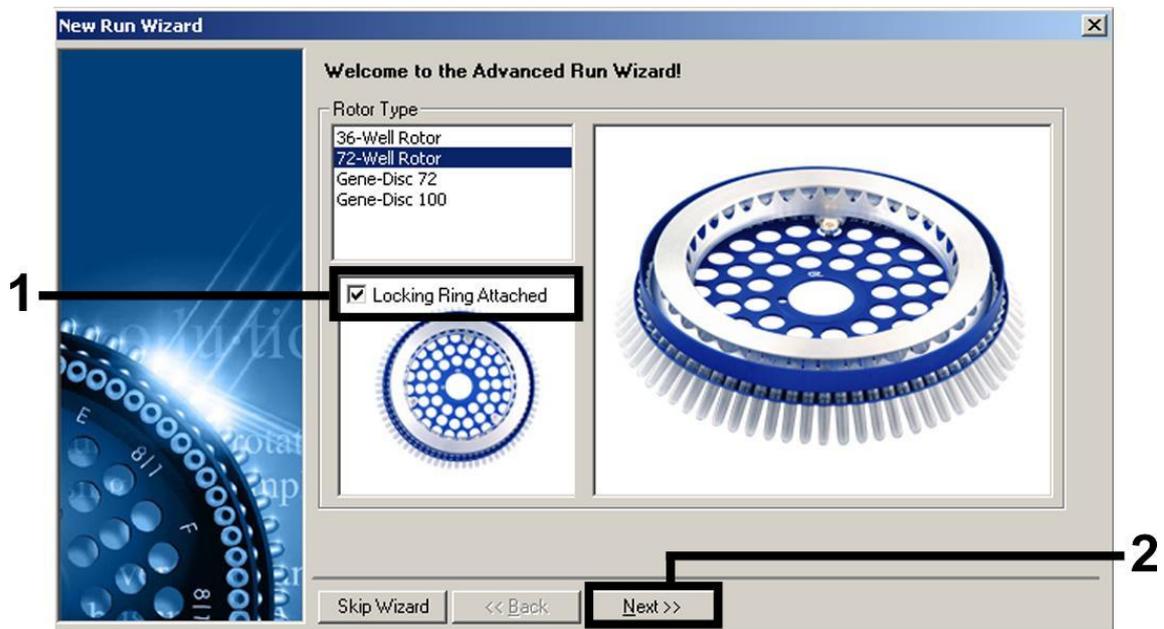


Figura 3. La finestra di dialogo "New Run Wizard".

7. Selezionare 50 per il volume di reazione PCR e cliccare su "Next" (Avanti) (Figura 4).

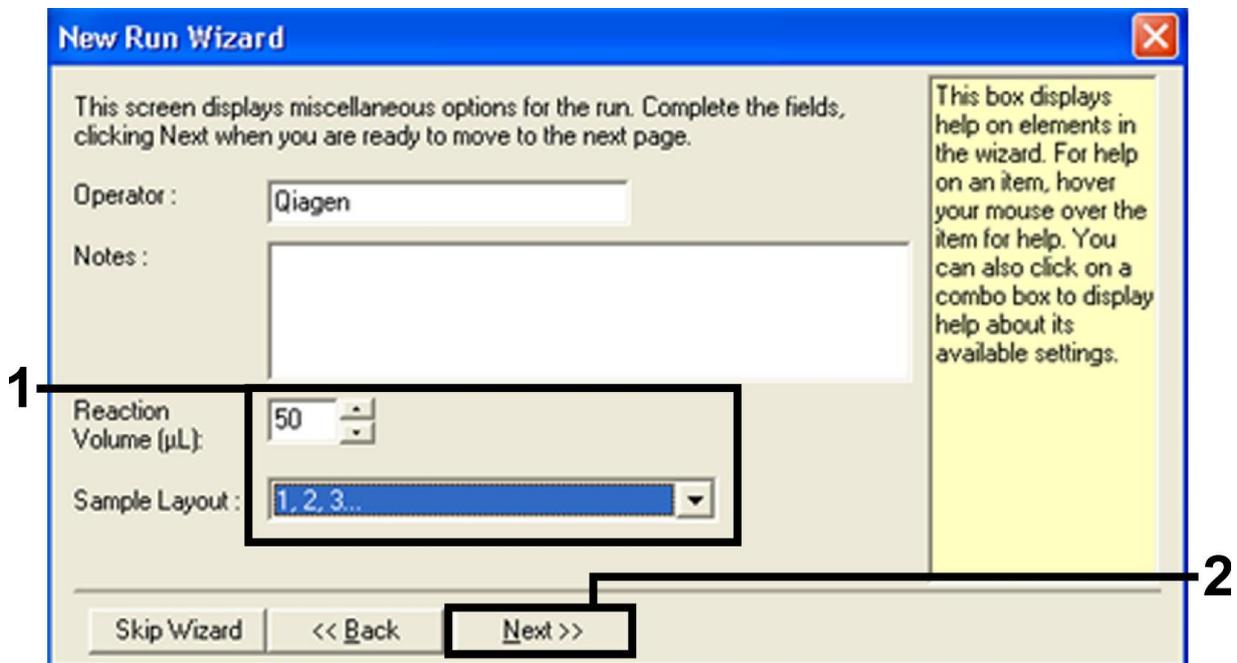


Figura 4. Impostazione dei parametri generali del test.

8. Cliccare sul pulsante "Edit Profile" (Modifica profilo) nella successiva finestra di dialogo "New Run Wizard" (Figura 7) e programmare il profilo termico come mostrato dalle Figure 6-7.

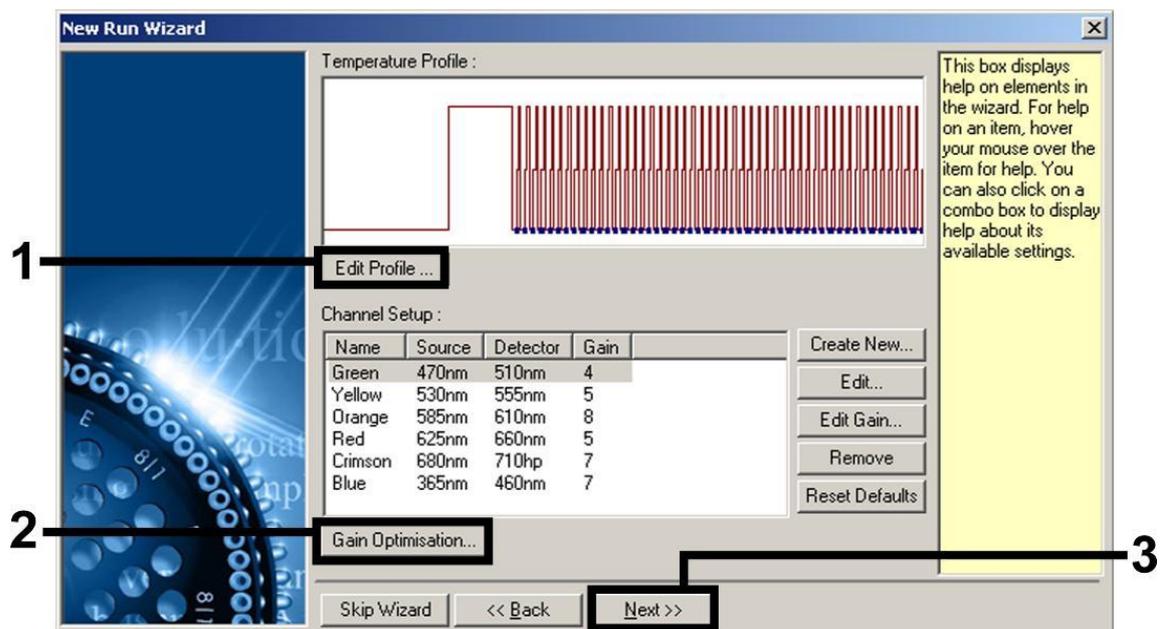


Figura 5. Modifica del profilo.

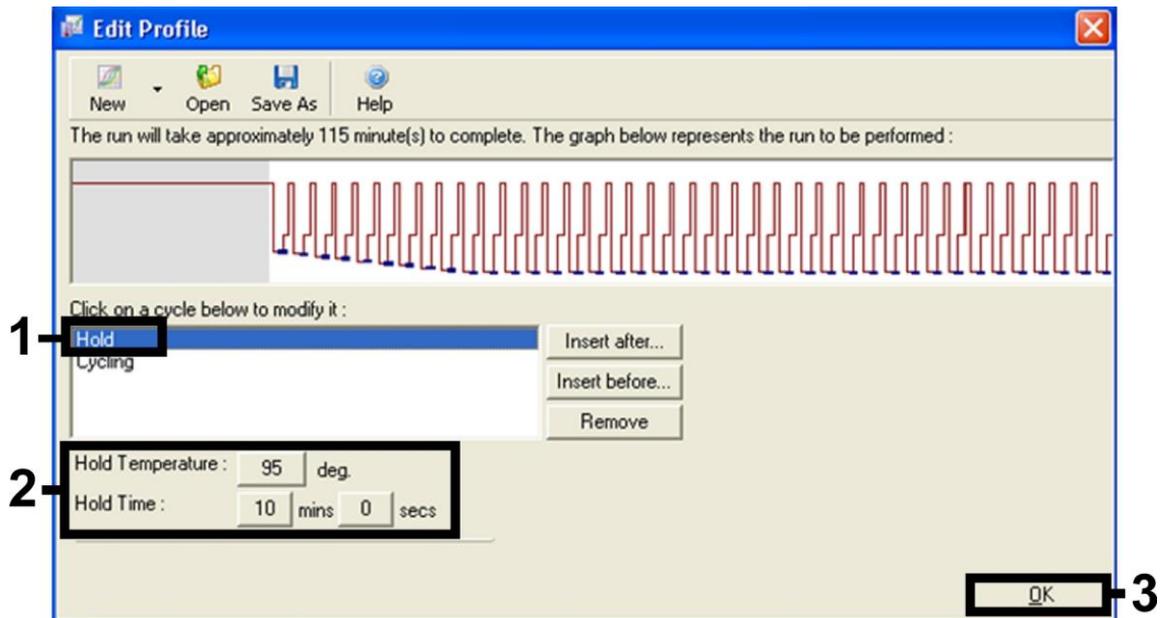


Figura 6. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

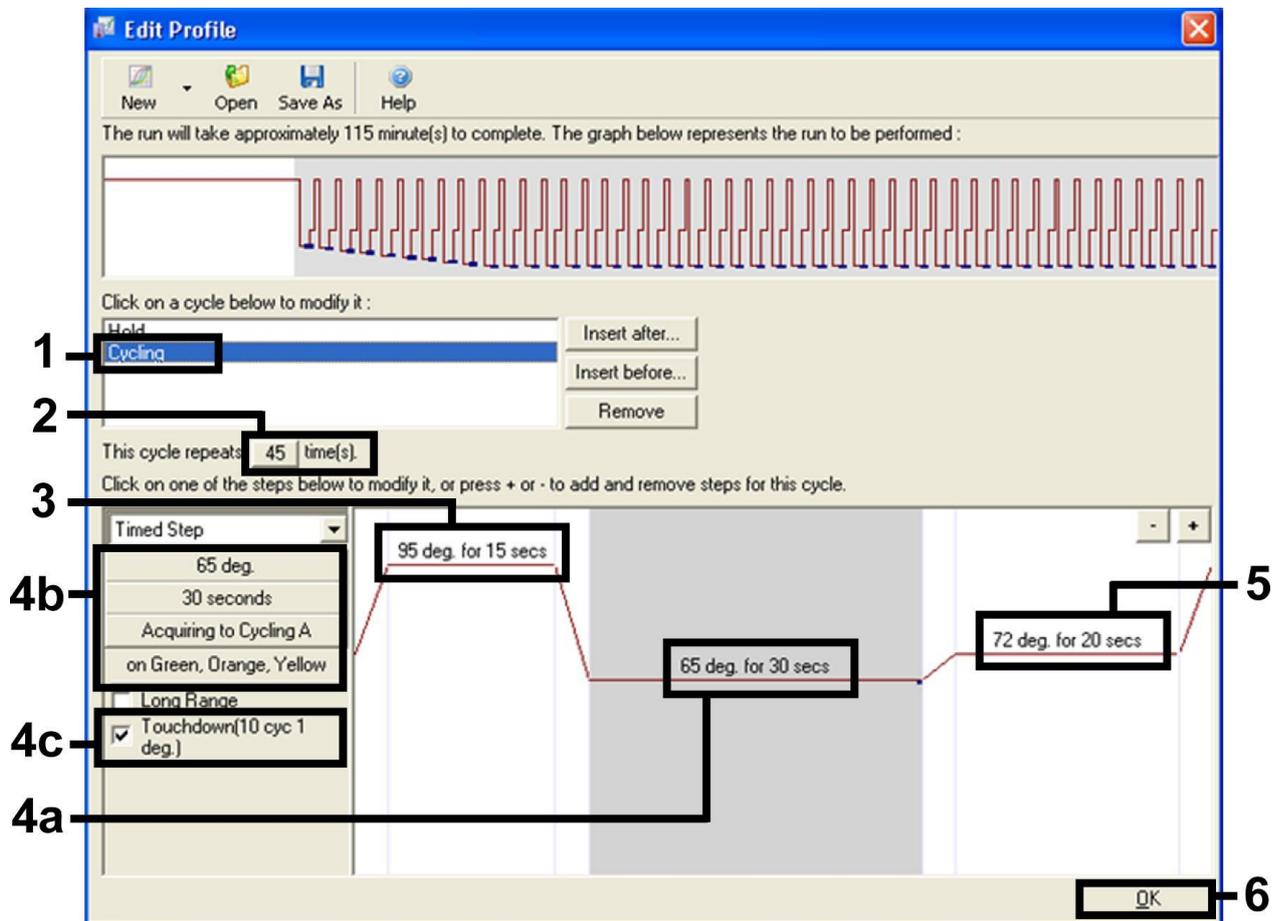


Figura 7. Amplificazione del DNA. Accertarsi di attivare la funzione Touchdown per 10 cicli nella fase di Annealing.

9. Il range di rilevamento dei canali di fluorescenza deve essere determinato in base all'intensità della fluorescenza nelle provette

PCR. Cliccare "Gain Optimisation" (Ottimizzazione gain) nella finestra "New Run Wizard" (vedere , fase 2) per aprire il dialogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Setup ottimizzazione auto-gain) (vedere Figura 8). Impostare la temperatura di calibrazione su 65 per farla coincidere con la temperatura di annealing del programma di amplificazione (Figura 7, fase 4b). Accertarsi che siano stati selezionati tutti i tre canali (Green, Orange e Yellow) per la "Auto-Gain Optimisation" (Ottimizzazione auto-gain). (Trovare i canali nel menu a discesa sotto "Channel Settings" (Impostazioni canali) e cliccare su "Add"- Aggiungi). Cliccare "Start" per iniziare l'ottimizzazione del gain. Cliccare "Close" (Chiudi) nella finestra di dialogo "Auto-Gain Optimisation Setup" una volta completata la calibrazione del gain.

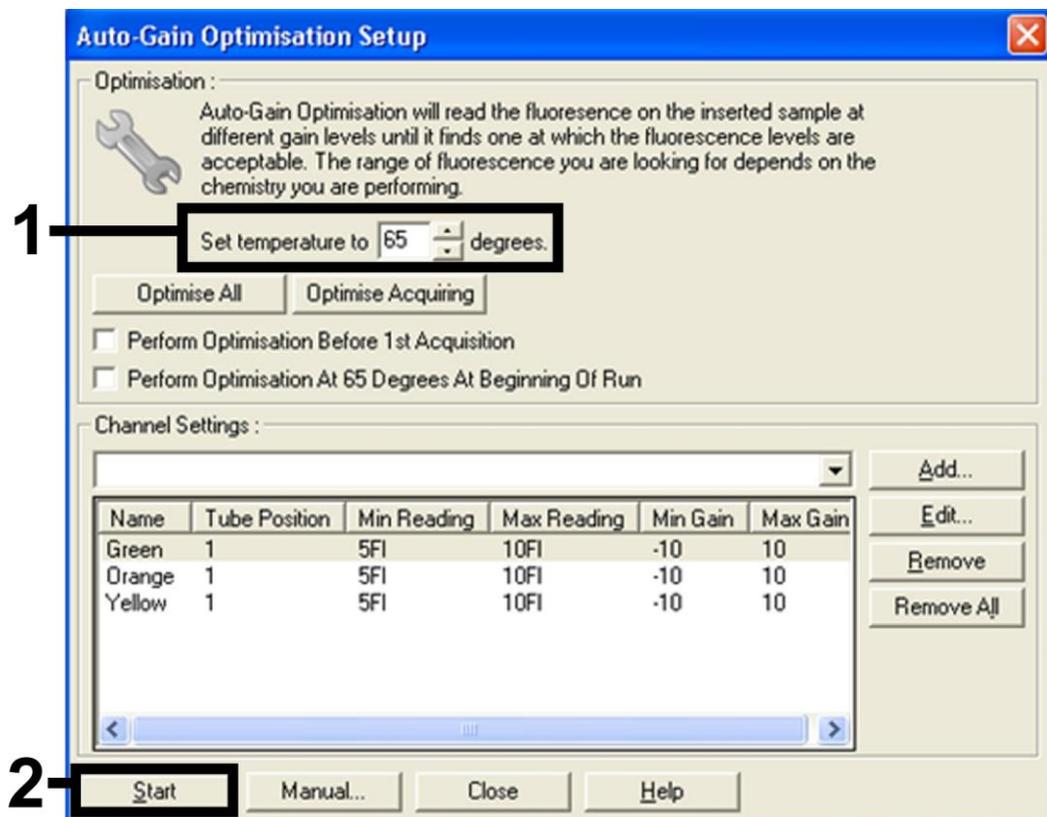


Figura 8. Regolazione della sensibilità del canale di fluorescenza.

10. I valori del gain determinati con la calibrazione del canale sono salvati automaticamente e sono elencati nell'ultima finestra del menu della procedura di programmazione (Figura 9). Cliccare "Start Run" (Avvio analisi).

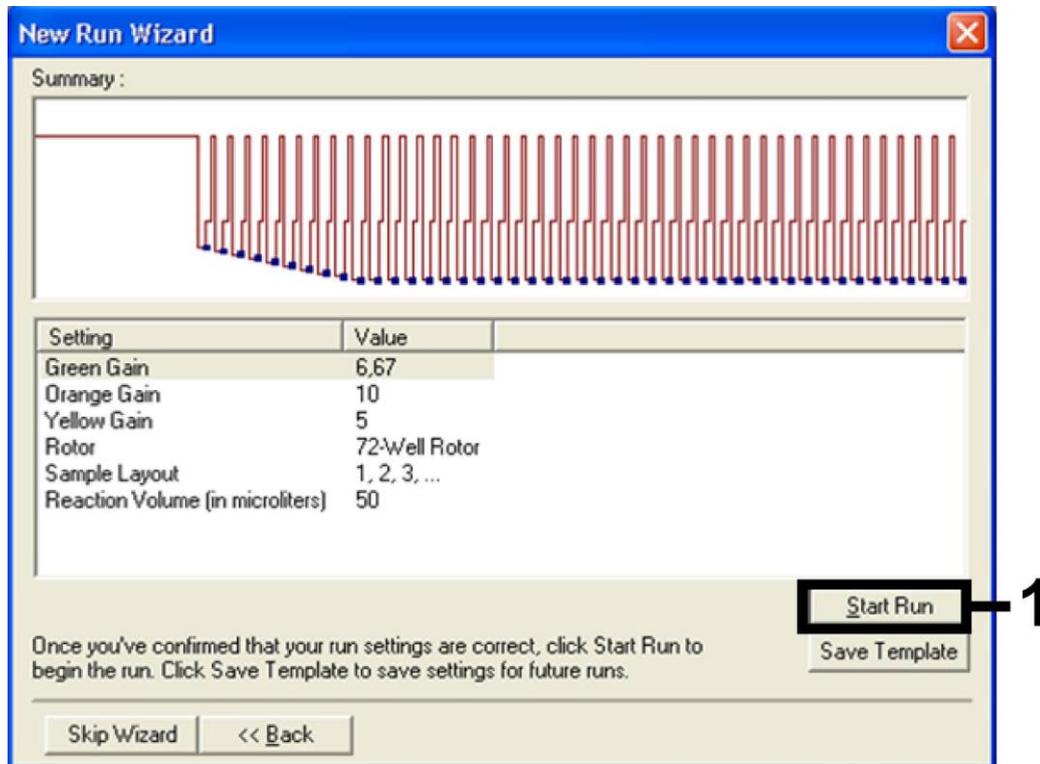


Figura 9. Avvio dell'analisi.

11. Terminata l'analisi, analizzare i dati. Sono possibili i seguenti risultati (11a, 11b, 11c, 11d, 11e, e 11f).

Alcuni esempi di reazioni PCR positive e negative sono riportati nelle Figura 10, 11 e 12.

- 11a. Viene rilevato un segnale nel canale di fluorescenza Cycling Green. Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di HSV-1.

In questo caso, il rilevamento di un segnale nel canale Cycling Yellow è superfluo, dal momento che le concentrazioni iniziali di DNA di HSV-1 (segnale positivo nel canale Cycling Green) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente nel canale Cycling Yellow (concorrenza).

11b. Non viene rilevato nessun segnale nel canale di fluorescenza Cycling Green. Al tempo stesso viene rilevato un segnale dal controllo interno nel canale Cycling Yellow. Nel campione non è rilevabile DNA di HSV-1. Il risultato può essere considerato negativo.

In caso di PCR di HSV-1 negativa, il segnale rilevato del controllo interno esclude la possibile inibizione della PCR.

11c. Viene rilevato un segnale nel canale di fluorescenza Cycling Orange. Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di HSV-2.

In questo caso, il rilevamento di un segnale nel canale Cycling Yellow è superfluo, dal momento che le concentrazioni iniziali di DNA di HSV-2 (segnale positivo nel canale Cycling Orange) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente nel canale Cycling Yellow (concorrenza).

11d. Non viene rilevato nessun segnale nel canale di fluorescenza Cycling Orange. Al tempo stesso viene rilevato un segnale dal controllo interno nel canale Cycling Yellow. Nel campione non è rilevabile DNA di HSV-2. Il risultato può essere considerato negativo per HSV-2.

In caso di PCR di HSV-2 negativa, il segnale rilevato del controllo interno esclude la possibile inibizione della PCR.

11e. Non si rileva nessun segnale nei canali Cycling Green e Cycling Orange. Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA sia di HSV-1 che di HSV-2.

In questo caso, il rilevamento di un segnale nel canale Cycling Yellow è superfluo, dal momento che le concentrazioni iniziali di DNA sia di HSV-1 che di HSV-2 (segnale positivo nei canali Cycling Green e Cycling Orange) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente nel canale Cycling Yellow (concorrenza).

11f. Non si rileva nessun segnale nei canali Cycling Green, Cycling Orange o Cycling Yellow. Non si può trarre alcun risultato.

Si possono trovare informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni in "Guida alla ricerca guasti", pag. 31.

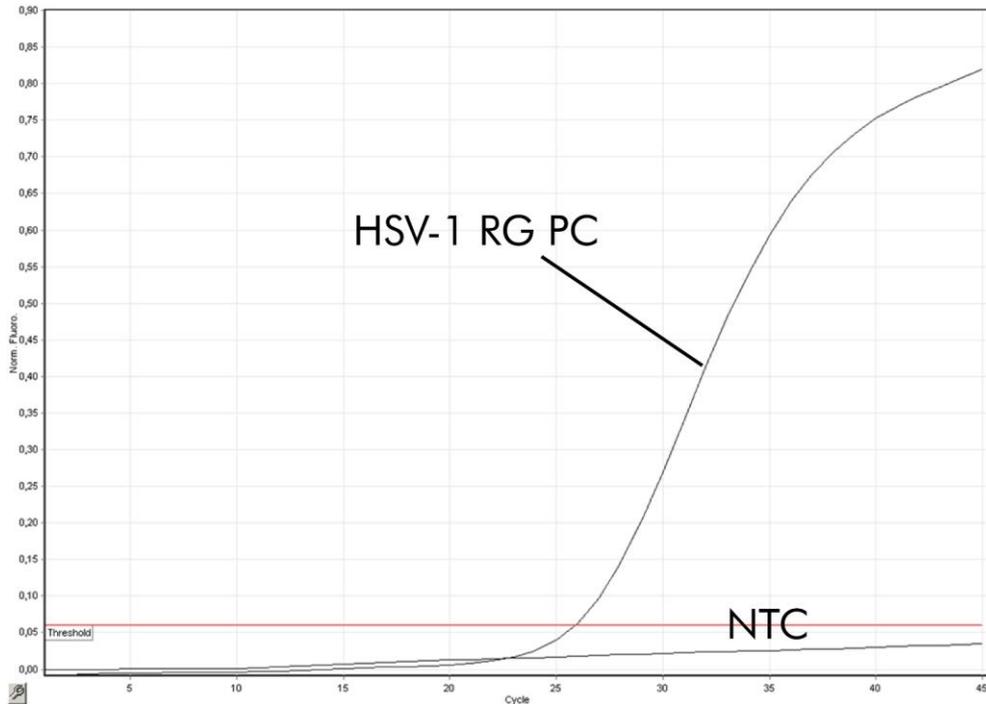


Figura 10. Rilevamento del controllo positivo per HSV-1 (HSV-1 RG PC) nel canale di fluorescenza Cycling Green. NTC: No template control (controllo negativo).

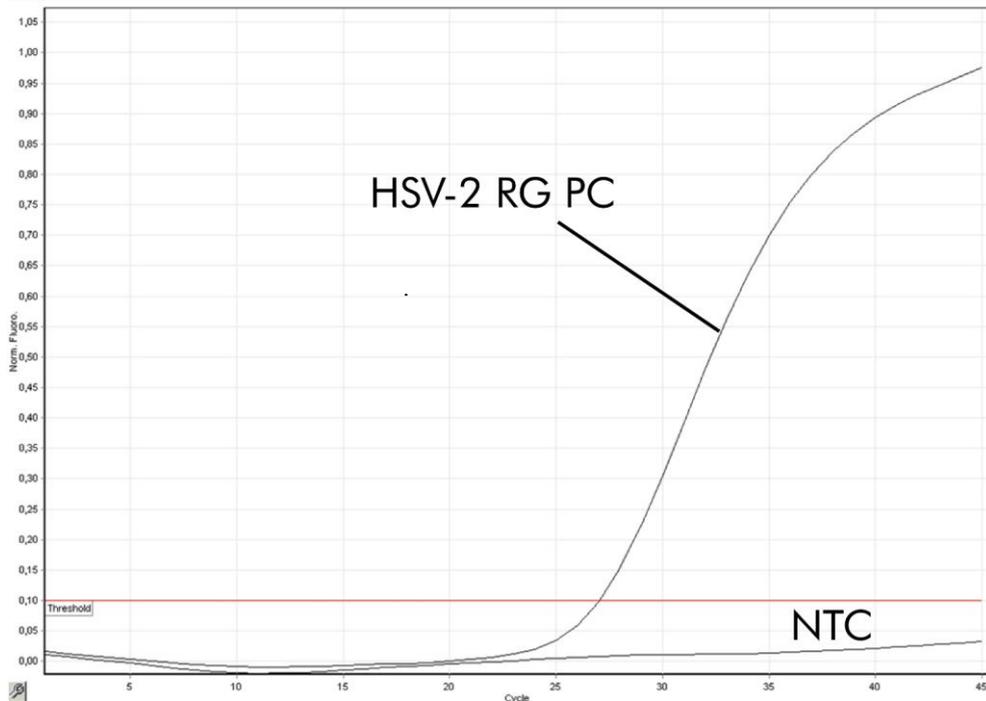


Figura 11. Rilevamento del controllo positivo per HSV-2 (HSV-2 RG PC) nel canale di fluorescenza Cycling Orange. NTC: No template control (controllo negativo).

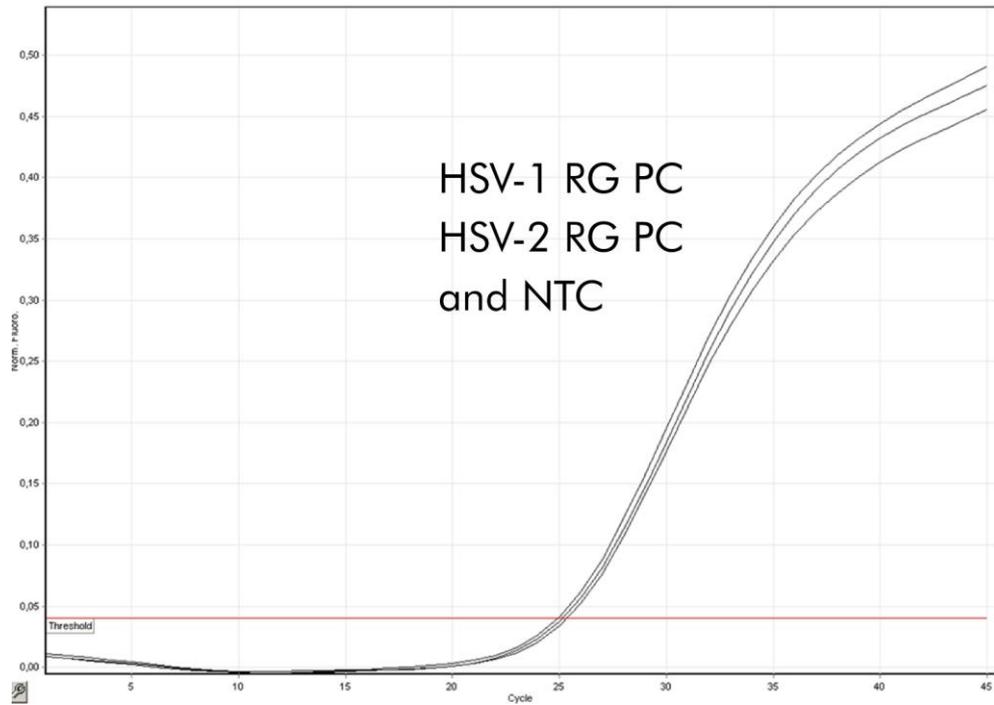


Figura 12. Rilevamento del controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow con amplificazione contemporanea dei controlli positivi (HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC). NTC: No template control (controllo negativo).

Guida alla ricerca guasti

La presente guida alla ricerca guasti può essere utile nel risolvere qualsiasi problema che possa nascere. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del supporto tecnico di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e raccomandazioni

Non viene rilevato nessun segnale con controlli positivi (HSV-1 RG PC and HSV-2 RG PC) nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling Orange

- | | |
|--|--|
| a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo |  Per l'analisi dei dati selezionare i canali di fluorescenza Cycling Green e Cycling Orange per la PCR analitica HSV-1/2 e il canale Cycling Yellow per il controllo interno PCR. |
| b) Programmazione non corretta del profilo termico dello strumento Rotor-Gene |  Confrontare il profilo termico con il protocollo. Vedere "Protocollo: analisi della PCR e dei dati", pag. 20. |
| c) Configurazione non corretta di PCR |  Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettazione e ripetere la PCR se necessario. Vedere "Protocollo: analisi della PCR e dei dati", pag. 20. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione" (pag. 5) |  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario. |
| e) Il kit <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR è scaduto. |  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario. |

Commenti e raccomandazioni

Segnale debole o assente del controllo interno di un campione di CSF sottoposto a purificazione con il kit EZ1 DSP Virus nel canale di fluorescenza Cycling Yellow e assenza simultanea di segnale nel canale Cycling Green o Cycling Orange

- a) Le condizioni della PCR non sono conformi al protocollo  Verificare le condizioni PCR (vedere sopra) e ripetere la PCR con impostazioni corrette, se necessario.
- b) La PCR era inibita  Verificare che sia stato usato il metodo di isolamento raccomandato e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore.
- c) DNA perso durante l'estrazione  Se all'estrazione era stato aggiunto il controllo interno, l'assenza di segnale del controllo interno può indicare la perdita del DNA durante l'estrazione. Verificare che sia stato usato il metodo di isolamento validato (vedere "Isolamento del DNA", pag. 18) e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore.
- d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione" (pag. 5)  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.
- e) Il kit *artus*HSV-1/2 RG PCR è scaduto.  Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.

Commenti e raccomandazioni

Segnali con i controlli negativi nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling Orange della PCR analitica

- a) Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR
- ⓘ Ripetere la PCR con nuovi reagenti in replicati.
 - ⓘ Se possibile, chiudere le provette PCR subito dopo l'immissione del campione da testare.
 - ⓘ Accertarsi di avere pipettato i controlli positivi per ultimi.
 - ⓘ Verificare che l'ambito di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- b) Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione
- ⓘ Ripetere l'estrazione e la PCR del campione da testare utilizzando nuovi reagenti.
 - ⓘ Verificare che l'ambito di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

Bibliografia

QIAGEN dispone on-line di un ampio e aggiornato database di pubblicazioni scientifiche relative ai prodotti QIAGEN. Potrete reperire gli articoli desiderati utilizzando le opzioni di ricerca o inserendo una semplice parola chiave oppure specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo e così via.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il sito QIAGEN Reference Database www.qiagen.com/RefDB/search.asp oppure contattate il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Informazioni per l'ordine

Prodotto	Contenuto	Cat. n.
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: Master, soluzione Mg, 2 controlli positivi, controllo interno, acqua (PCR-grade)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master, soluzione Mg, 2 controlli positivi, controllo interno, acqua (PCR-grade)	4500265
EZ1 DSP Virus Kit — purificazione degli acidi nucleici virali da CSF umano per analisi diagnostiche in vitro		
Virus Kit EZ1 DSP	Per 48 prep. di acido nucleico virale: cartucce reagenti preriempite, portapuntali monouso, puntali con filtro monouso, provette per campioni, provette per eluizione, tamponi, carrier RNA	62724
EASY<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kits — per purificazione integrata automatica dei campioni e rilevazione dei patogeni in perfetta conformità con CE-IVD		
EASY <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Per 48 prep. di acido nucleico virale e 24 test: 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	Per 48 prep. di acido nucleico virale e 24 test: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024
Rotor-Gene Q e accessori		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore ad alta risoluzione (High Resolution Melt analyzer) a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette x 0,2 ml	9018901

Prodotto	Contenuto	Cat. n.
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione in una serie standard 8 x 12 con 96 provette x 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981008

Per le informazioni di licenza aggiornate e i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale specifico del kit QIAGEN. I manuali dei kit QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Non è garantito alcun altro brevetto o altra licenza di qualsiasi tipo diversi da questo specifico diritto d'uso.

Marchi commerciali: QIAGEN®, artus®, EZ1®, EASYartus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

I kit artus HSV-1/2 RG PCR e EZ1 DSP Virus sono dispositivi di diagnostica contrassegnati CE secondo la direttiva europea della diagnostica in vitro 98/79/CE. Non disponibili in tutti i paesi.

Contratto di licenza limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del kit artus HSV-1/2 RG PCR dei seguenti termini:

1. Il kit artus HSV-1/2 RG PCR deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit artus HSV-1/2 RG PCR* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del kit artus HSV-1/2 RG PCR* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di licenza limitato, e recuperare tutte le spese di investigazione e legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di licenza limitato o qualunque diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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

