

artus[®] EBV LC PCR Kit

Handbok



24 (Katalog nr. 4501063)



96 (Katalog nr. 4501065)

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning tillsammans med LightCycler[®] instrumentet

Version 1



4501063, 4501065



1046892SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046892SV



QIAGEN Sample & Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar 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 analystekniker

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på www.qiagen.com.

Innehållsförteckning

1. Innehåll.....	5
2. Förvaring.....	5
3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer	6
4. Allmänna försiktighetsåtgärder.....	6
5. Information om patogener.....	6
6. Principen för realtids-PCR	7
7. Produktbeskrivning	7
8. Protokoll.....	8
8.1 DNA-isolering.....	8
8.2 Internkontroll	11
8.3 Kvantifiering	13
8.4 Förberedelse av PCR.....	14
8.5 Programmering av <i>LightCycler</i> instrumentet	18
9. Tolkning av resultat.....	20
10. Felsökning	23
11. Specifikationer.....	25
11.1 Analytisk sensitivitet.....	25
11.2 Specificitet	26
11.3 Precision.....	26
11.4 Reproducerbarhet	28
11.5 Diagnostisk utvärdering.....	28

12. Särskild information om produktanvändning.....	28
13. Varningar och försiktighet.....	29
14. Kvalitetskontroll	29
15. Referenser.....	29
16. Symbolförklaring	30

artus EBV LC PCR Kit

För användning tillsammans med *LightCycler* instrumentet.

1. Innehåll

	Benämning och innehåll	Art. nr. 4501063 24 reaktioner	Art. nr. 4501065 96 reaktioner
Blå	EBV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Röd	EBV LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 5 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	EBV LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 5 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	EBV LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 5 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	EBV LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 5 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grön	EBV LC IC ^{xx}	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Vit	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

^{xx}QS = Kvantifieringsstandard

IC = Internkontroll

2. Förvaring

Komponenterna hos artus EBV LC PCR Kit ska förvaras vid -30 till -15 °C och är hållbara till det datum som anges på etiketten. Undvik upprepade tining och frysning (> 2 x), eftersom det minskar sensitiviteten. Om reagenserna inte används regelbundet, bör de därför frysas i portioner. Komponenterna kan förvaras i +4°C i högst fem timmar, om nödvändigt.

3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer

- Puderfria laboratoriehandskar
- DNA-isoleringskit (se 8.1 DNA-isolering)
- Pipetter (inställbara)
- Sterila pipettspetsar med filter
- Vortex
- Bordscentrifug med rotor för 2 ml rör
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, kat. nr. 2 158 850) för framtagning av en *Crosstalk Color Compensation*-fil
- *LightCycler*-kapillärer (20 µl)
- *LightCycler*-Cooling Block
- *LightCycler* instrument
- *LightCycler* Capping Tool

4. Allmänna försiktighetsåtgärder

Tänk alltid på följande:

- Använd sterila pipettspetsar med filter.
- Positivt material (prover, kontroller, amplikon) ska förvaras, isoleras och tillsättas till reaktionen i utrymme som är skilt från övriga reagenser.
- Tina alla komponenter fullständigt i rumstemperatur innan testet påbörjas.
- Blanda komponenterna väl och centrifugera en kort stund.
- Arbeta snabbt på is eller i *LightCycler* Cooling Block.

5. Information om patogener

Epstein-Barr-viruset (EBV) överförs oralt, i de flesta fall genom smittad saliv. EBV-infektionen förlöper i regel utan symptom, i synnerhet under barndomen. Kliniska tecken på en akut infektion är mononukleos med feber, trötthet, angina samt förstoring av lymfkörtlar och mjälte. Hos några patienter kan

dessa besvär uppträda kroniskt-recidiverande. Allvarliga förloppsformer av EBV-infektion ser man i synnerhet hos immunsupprimerade patienter och personer med T-cellsdefekter.

6. Principen för realtids-PCR

Vid diagnostik med hjälp av polymeras-kedjereaktion (PCR) amplifieras specifika regioner av patogengenomet. Vid realtids-PCR sker detektion med hjälp av fluoroforer. Dessa är i regel bundna till oligonukleotidprober, som binder specifikt till PCR-amplikon. Genom detektion av fluorescensintensiteten under realtids-PCR-förloppet kan produkterna påvisas och kvantifieras utan att provrören behöver öppnas efteråt (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivning

artus EBV LC PCR Kit är ett bruksfärdigt system för påvisning av EBV-DNA med polymeras-kedjereaktion (PCR) i *LightCycler* instrumentet. *EBV LC Master* innehåller reagenser och enzymer för specifik amplifiering av ett 97 bp långt fragment i EBV-genomet samt för omedelbar detektion av amplikon i fluorimeterkanalen F2 på *LightCycler* instrumentet. Dessutom innehåller *artus* EBV LC PCR Kit ett andra heterologt amplifieringssystem för detektion av en eventuell PCR-inhibering. Detta detekteras som *Internkontroll (IC)* i fluorimeterkanalen F3. Därigenom blir detektionsgränsen av det analytiska EBV-PCR-förfarandet inte negativt påverkat (se 11.1 **Analytisk sensitivitet**). Externa positiva kontroller (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) medföljer, med vars hjälp en bestämning av patogenbelastningen kan utföras. Du kan läsa mer om detta i stycket **8.3 Kvantifiering**.

Obs!: Temperaturprofilen för detektion av EBV-DNA med hjälp av *artus* EBV LC PCR Kit, motsvaras av *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit och *artus* CMV LC PCR Kit. Följaktligen kan PCR-reaktionen för dessa *artus*-

systemen genomförs och analyseras i en körning. Märk därvid de speciella hänvisningar för tolkning under

8.3 Kvantifiering och under 9. Tolkning av resultat.

8. Protokoll

8.1 DNA-isolering

Kit för DNA-isolering kan erhållas från olika tillverkare. Följ tillverkarens protokoll och tillsätt angiven provmängd till isoleringen och utför DNA-isoleringen enligt anvisningarna. Följande isoleringskit rekommenderas:

Provmaterial	Isoleringskit	Katalog-nummer	Tillverkare	Bärar RNA
Serum, plasma, CSF (Cerebrospinalvätska)	QIAamp [®] DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Ingår ej
	QIAamp UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	Ingår
Blodceller	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	Ingår ej
Plasma	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	Ingår

*För användning tillsammans med BioRobot[®] EZ1 DSP Workstation (kat. nr. 9001360) och EZ1 DSP Virus Card (kat. nr. 9017707).

Viktig hänvisning vid användning av QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit och QIAamp DNA Mini Kit:

- Tillsatsen av **bärar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. Om det använda isoleringskitet inte innehåller någon bärar-RNA, bör du vid isolering av nukleinsyror från cellfria kroppsvätskor eller material med låg DNA/RNA-halt (t. ex. likvor) tillsätta bärar-RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. nr. 27-4110-01). Följande tillvägagångssätt

rekommenderas:

- a) Resuspendera de frystorkade bärar-RNA i isoleringskitets eluerings buffert (ej i lyseringsbufferten) (t. ex. QIAamp DNA Mini Kit/ QIAamp DNA Blood Mini Kit AE-buffert) och bered en utspädning med en koncentration av 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Portionera denna bärar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C . Undvik upprepade tining ($> 2 \times$) av en bärar-RNA-alikvot.
- b) För varje isolering skall 1 μg bärar-RNA per 100 μl lyseringsbuffert användas. Föreslår extraktionsprotokollet t. ex. 200 μl lyseringsbuffert per prov som skall isoleras, skall 2 μl av bärar-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) tillsättas direkt till lyseringsbuffert. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringsschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert	t. ex. 200 μl	t. ex. 2.400 μl
Bärar-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Total volym	202 μl	2.424 μl
Volym per extraktion	200 μl	vardera 200 μl

- c) Tillsätt den färskt tillredda blandningen av lyseringsbuffert och bärar-RNA direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.
- Tillsatsen av **bärar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. För att uppnå en högre stabilitet av det bärar-RNA som medföljer QIAamp UltraSens Virus Kit, rekommenderar vi följande tillvägagångssätt, vilket frångår angivelserna i isoleringskitets handbok:
 - a. Innan första användningen resuspendera de frystorkade bärar-RNA av isoleringskitet i 310 μl AE eller AVE buffert (eluerings buffert, slutkoncentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, använd ingen lyseringsbuffert) och portionera denna bärar-RNA-lösning till det passande antalet

aliquoter du behöver, och lagra dem i -20°C. Undvik upprepad tining (> 2 x) av en bärar-RNA-alikvot.

- b. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert AC	800 µl	9.600 µl
Bärar-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Total volym	805,6 µl	9.667,2 µl
Volym per extraktion	800 µl	vardera 800 µl

- c. Tillsätt den färskt tillredda lyseringsbufferten direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.

- Genom användning av **QIAamp UltraSens Virus Kit** kan provet ytterligare koncentreras. Om provmaterialet inte är serum eller plasma, ska minst 50 % (v/v) negativ humanplasma tillsättas till provet.
- De **antikoagulantia** som finns i de små blodprovtagningsrören kan verka inhiberande på PCR-processen, men elimineras väl genom de angivna isoleringskiten. Det rekommenderas att avstå från användning av heparinblod.
- Om isoleringar med **etanolhaltiga** tvättbuffertar används, ska innan eluering ytterligare ett centrifugeringssteg (tre minuter, 13.000 rpm) utföras så att eventuella etanolrester avlägsnas. Detta förhindrar eventuella PCR-inhiberingar.
- *artus* EBV LC PCR Kit är inte lämpligt för isoleringsförfarande baserade på **fenol**.

Viktig hänvisning vid användning av EZ1 DSP Virus Kit:

- Tillsatsen av **bärar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. Tillsätt därför till varje isolering den angivna mängden bärar-RNA och följ instruktionerna i *EZ1*

Viktigt: Internkontrollen för artus EBV LC PCR Kit kan tillsättas direkt i isoleringen (se 8.2 Internkontroll).

8.2 Internkontroll

En Internkontroll (EBV LC IC) medföljer. Med Internkontrollen kan du kontrollera både isoleringen av DNA och en eventuell inhibering av PCR (se Fig. 1). Vid användning av EZ1 DSP Virus Kit skall Internkontrollen tillsättas enligt instruktionerna i EZ1 DSP Virus Kit Handbook. Vid användning av QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit eller QIAamp DNA Mini Kit tillsätter du Internkontrollen till isoleringen i ett förhållande på 0,1 μ l per 1 μ l elueringsvolym. Om du till exempel använder QIAamp DNA Mini Kit och eluerar DNA i 200 μ l AE-buffert, så använder du 20 μ l av Internkontrollen. Om du t. ex. eluerar i 100 μ l, så använder du motsvarande 10 μ l. Mängden använd Internkontroll beror **enbart** på elueringsvolymen. Internkontroll och bärar-RNA (se 8.1 DNA-isolering) får endast tillsättas till

- blandning av lyseringsbuffert och provmaterial eller
- direkt till lyseringsbufferten.

Internkontroll får inte tillsättas direkt till provmaterialet. Beakta att vid tillsättning till lyseringsbufferten blandningen av Internkontroll, lyseringsbuffert och bärar-RNA då måste vara färskt tillredd och användas direkt (förvaras blandningen i rumstemperatur eller i kylskåp kan detta redan efter några timmar leda till bortfall av Internkontrollen, och till en minskning av isoleringsefficienten). Pipettera **inte** Internkontroll och bärar-RNA direkt till provmaterialet.

Alternativt kan *Internkontroll* användas **enbart för kontroll av en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 0,5 μ l *Internkontroll* per reaktion direkt till 15 μ l *EBV LC Master*. För varje PCR-reaktion används 15 μ l av den så tillverkade *Master Mixen** varefter 5 μ l av det renade provet tillsätts. Om du förbereder en körning för flera prover, ökar du den erforderliga mängden *EBV LC Master*, och *Internkontroll* motsvarande antalet prover (se

8.4 Förberedelse av PCR).

artus EBV LC PCR Kit och *artus CMV LC PCR Kit* innehåller en identisk *Internkontroll (IC)*. *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* och *artus VZV LC PCR Kit* innehåller också en identisk *Internkontroll*.

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av *Internkontroll* ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

8.3 Kvantifiering

De medföljande *Kvantifieringsstandarderna* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) behandlas på samma sätt som ett redan isolerat prov och används i samma volym (5 µl). Ta fram en standardkurva på *LightCycler* instrumentet genom att använda samtliga fyra medföljande *Kvantifieringsstandarder*, definiera dem som standarder i *Sample Loading Screen* och skriv in den angivna koncentrationen (se *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Denna standardkurva kan även användas för efterföljande kvantifieringar om minst en standard av **en** definierad koncentration medtas vid den aktuella körningen. Den tidigare framtagna standardkurvan måste då importeras (se *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Tänk dock på att det vid denna form av kvantifiering kan förekomma resultatavvikelser mellan PCR-omgångarna till följd av variabiliteten.

Om mer än ett *Herpes-artus*-system är integrerat i en körning är det viktigt att dessa analyseras med tillhörande *Kvantifieringsstandarder* separerade från varandra.

Obs!: *Kvantifieringsstandarderna* anges som kopior/µl. Vid omräkning av de värden som framtagits med hjälp av standardkurvan i kopior/ml provmaterial används följande formel:

$$\text{Resultat (kopior/ml)} = \frac{\text{resultat (kopior/}\mu\text{l)} \times \text{elueringsvolymen (}\mu\text{l)}}{\text{provvolymen (ml)}}$$

Tänk på att den ursprungliga provvolymen skall användas i den ovanstående formeln. Detta är att beakta när provvolymen för nukleinsyreisoleringen ändrats (t. ex. minskning genom centrifugering eller ökning genom påfyllnad för att nå den volym som krävs för isolering).

Viktigt: Riktlinjer för tolkning av kvantitativa resultat för *artus*-systemen på *LightCycler* instrumentet finns på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/ (Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument).

8.4 Förberedelse av PCR

Kontrollera att Cooling Block med de däri ingående adaptrarna (tillbehör till *LightCycler* instrumentet) är kylt till ca +4°C. Placera det antal *LightCycler*-kapillärer som behövs för de planerade reaktionerna i Cooling Block adaptrarna. Observera att minst en *Kvantifieringsstandard* samt minst en negativ kontroll (*Water, PCR grade*) ska medtas vid varje PCR-körning. För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* användas. Innan testet påbörjas ska alla reagenser finnas fullständigt i rumstemperatur och blandas väl (pipetteras upp och ned flera gånger eller vortexas en kort stund) och därefter kort centrifugeras.

Om du med *Internkontrollen* vill kontrollera **både isoleringen av DNA och en eventuell inhibering av PCR**, ska du tillsätta *Internkontrollen* redan vid isoleringen (se **8.2 Internkontroll**). Använd i så fall följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 1):

		Antal prover	
		1	12
1. Beredning av Master Mix	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Total volym	15 µl	180 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	vardera 15 µl
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

Om du vill använda *Internkontroll* enbart för kontroll av en PCR-inhibering, ska du tillsätta den direkt till *EBV LC Master*. I så fall använder du följande pipetteringsschema (se även den schematiska översikten i Fig. 2):

	Antal prover	1	12
1. Beredning av Master Mix	EBV LC Master	15 μ l	180 μ l
	EBV LC IC	0,5 μ l	6 μ l
	Total volym	15,5 μl*	186 μl*
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 μ l*	vardera 15 μ l*
	Prov	5 μ l	vardera 5 μ l
	Total volym	20 μl	vardera 20 μl

Pipettera i plastbehållaren till varje kapillär 15 μ l av Master Mix. Tillsätt därefter 5 μ l eluat från DNA-isoleringen. På motsvarande sätt måste 5 μ l av minst en av *Kvantifieringsstandarderna (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* tillsättas som positiv kontroll och 5 μ l vatten (*Water, PCR grade*) som negativ kontroll. Förslut kapillärerna. För att överföra blandningen från plastbehållaren till kapillärerna, centrifugera adaptrar med kapillärer i en bordscentrifug i tiosekunder vid max. 400 x g (2.000 rpm).

* Den volymökning som uppstår vid tillsats av *Internkontroll* ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Detektionssystemets sensitivitet påverkas inte.

Tillsats av Internkontroll till isolering

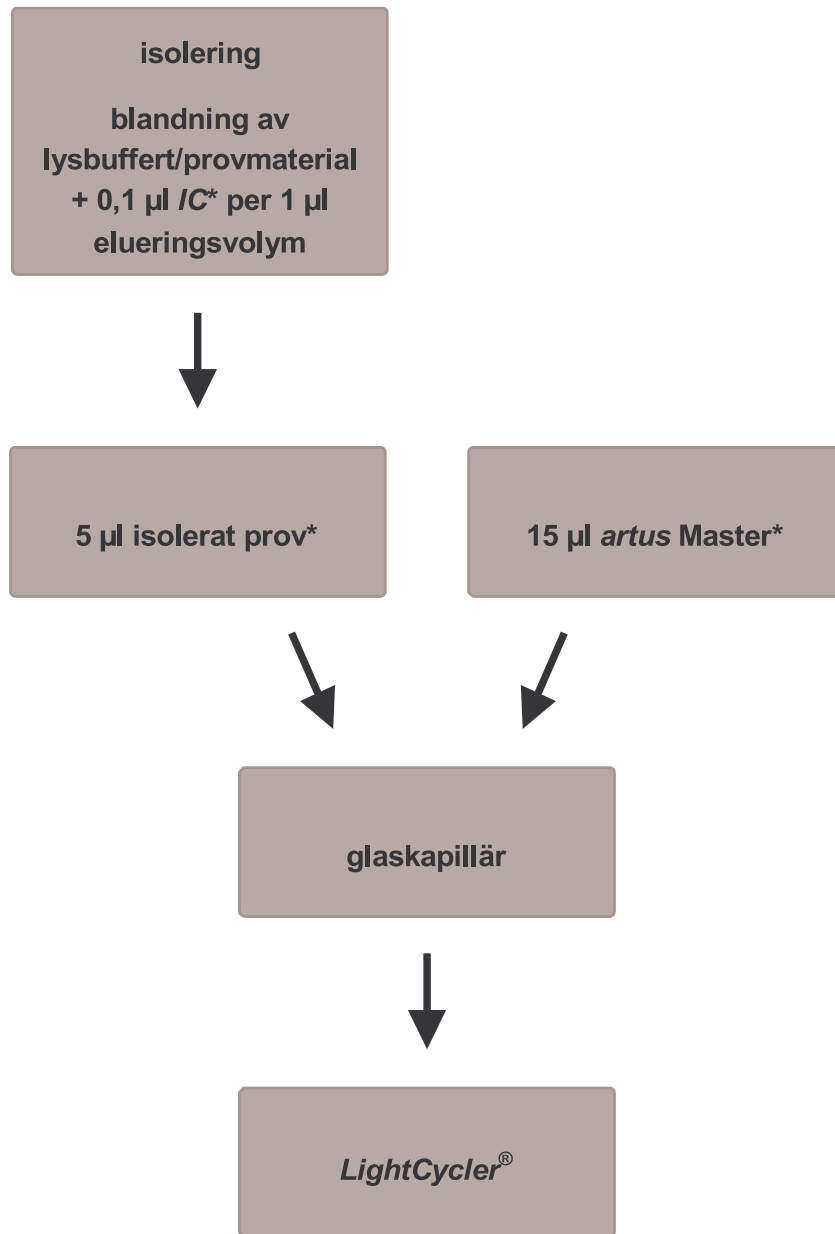


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av isolering och PCR-inhibering.

*

Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund.

Tillsats av Internkontroll till artus Master

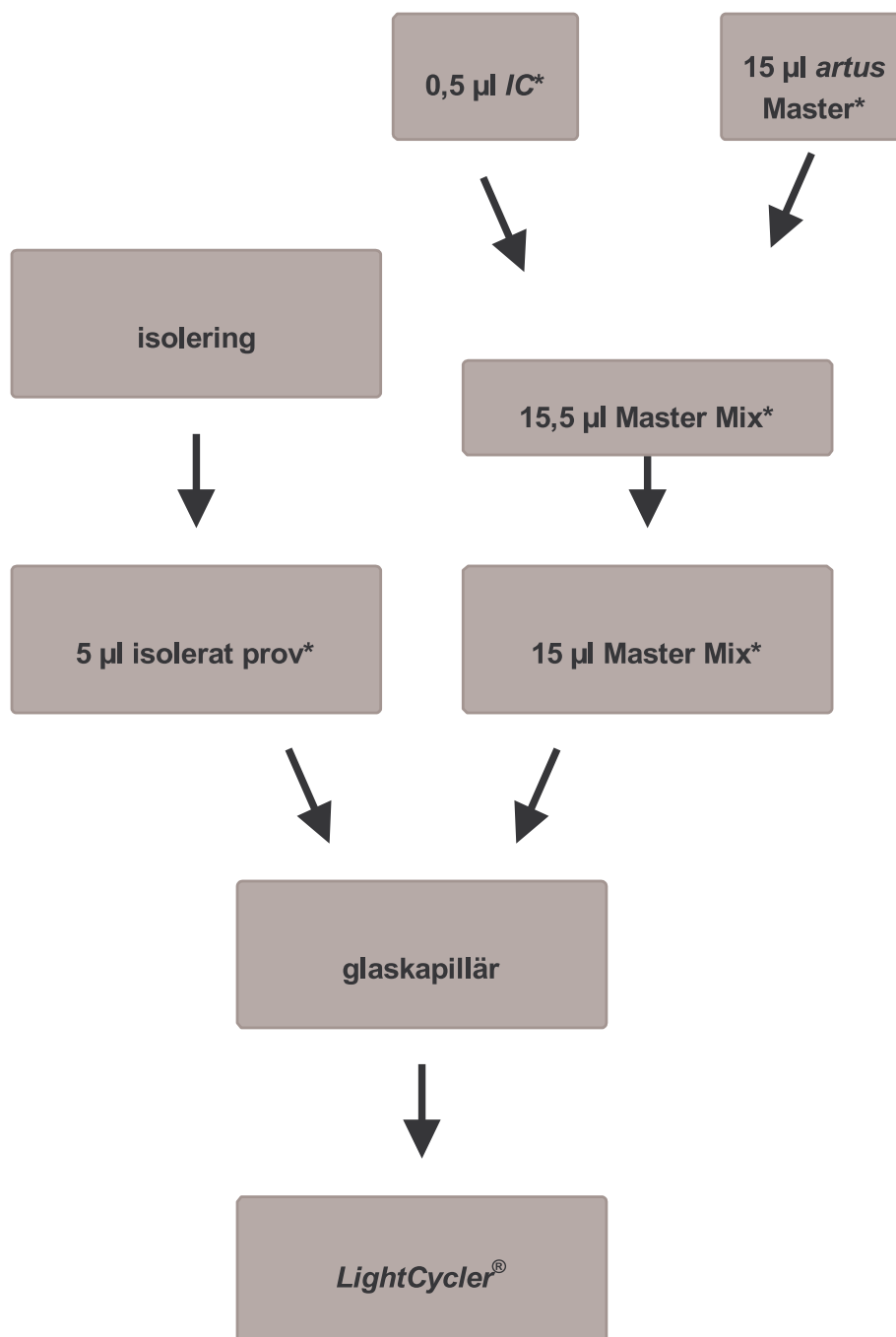


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av PCR-inhibering.

*

Vid varje pipetteringssteg är det mycket viktigt att se till att de lösningar som ska användas är helt upptinade, väl blandade och centrifugerade en kortstund.

8.5 Programmering av *LightCycler* instrumentet

För detektion av EBV-DNA programmeras en temperaturprofil på *LightCycler* instrumentet enligt dessa fem steg (se Fig. 3 - 7).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Initial aktivering av Hot-Start-enzymet | Fig. 3 |
| B. | Touch Down steg | Fig. 4 |
| C. | Amplifiering av DNA | Fig. 5 |
| D. | Smältkurva (valfritt) | Fig. 6 |
| E. | Kylning | Fig. 7 |

Observera speciellt inställningarna för *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* och *Temperature Targets*. Dessa inställningar markeras i figurerna med en svart ram. Mer information om programmering av *LightCycler* instrumentet finner du i *LightCycler Operator's Manual*. Steg D Smältkurva är **valfritt**. Det behövs endast vid differentiering mellan HSV-1 och HSV-2 vid samtida insats av *artus HSV 1/2 LC PCR Kit*.

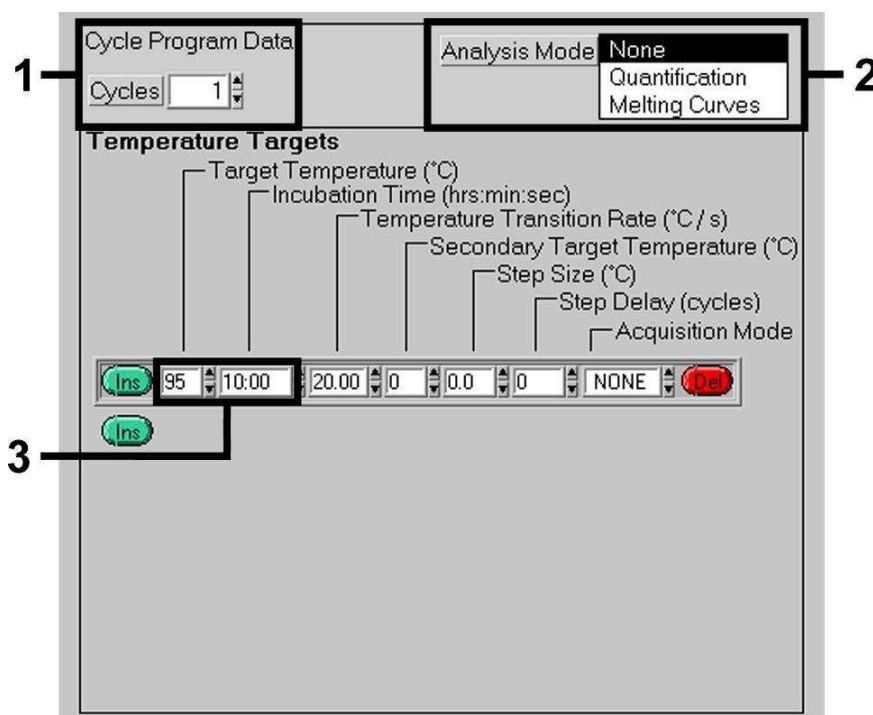


Fig. 3: Initial aktivering av Hot-Start-enzymet.

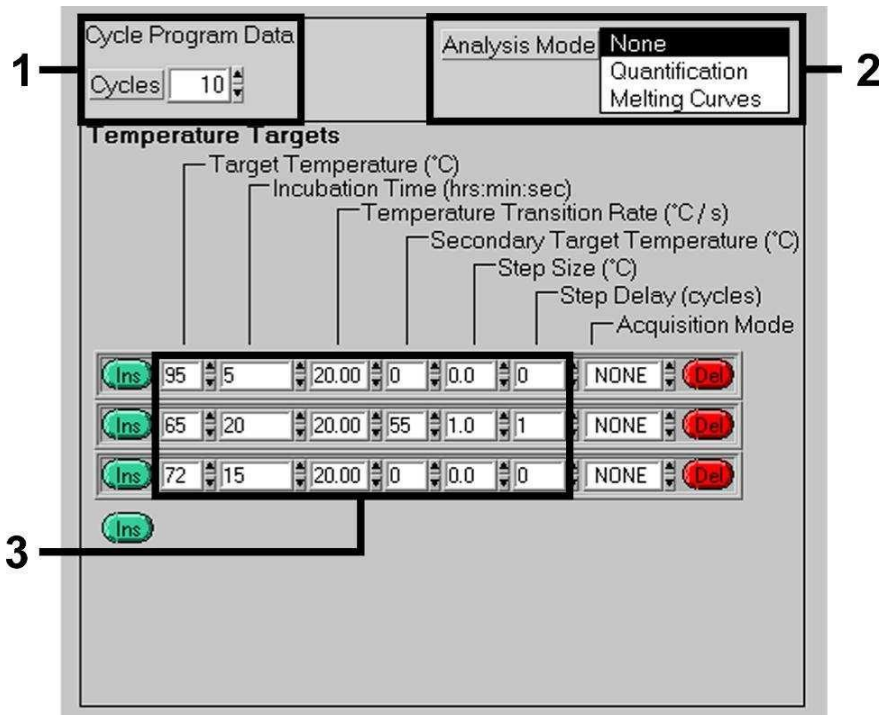


Fig. 4: Touch Down step.

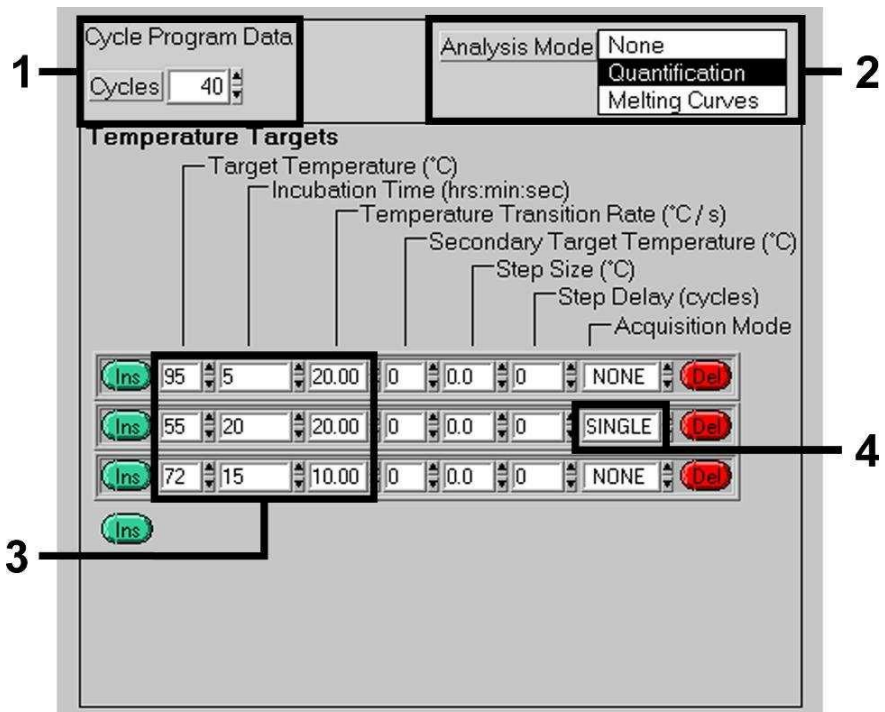


Fig. 5: Amplifying avDNA.

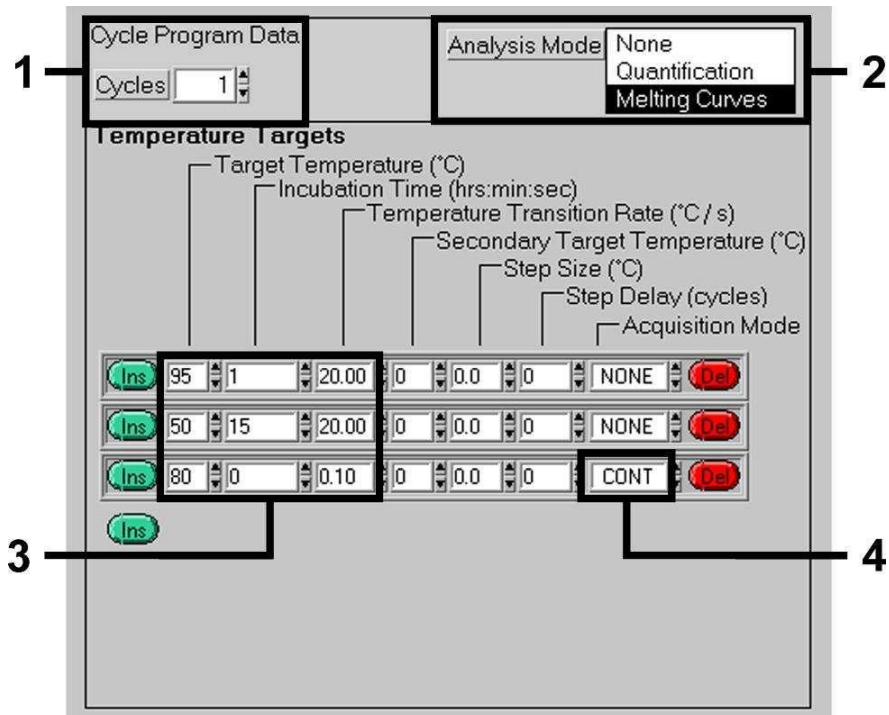


Fig. 6: Smältkurva.

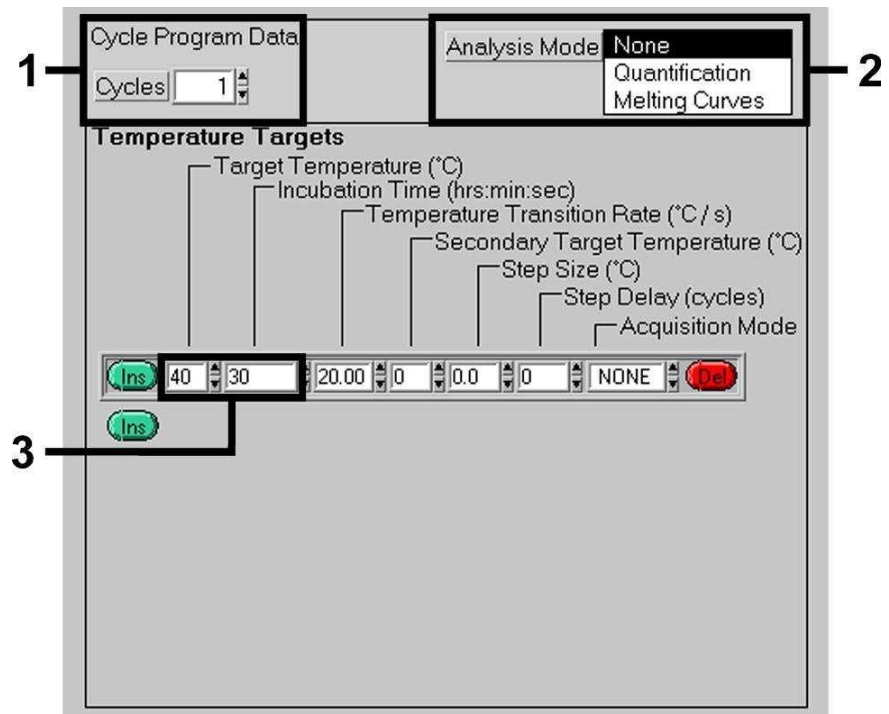


Fig. 7: Kylning.

9. Tolkning av resultat

Vid flerfärgs-analysen uppträder interferenser mellan fluorimeterkanalerna. Programvaran till *LightCycler* instrumentet innehåller en fil som benämns *Color Compensation File*, som kompenserar dessa störningar. Öppna filen innan, under eller omedelbart efter PCR-körningen genom att aktivera knappen *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Om det inte finns någon *Color Compensation File* installerad, måste du skapa filen enligt anvisningarna i *LightCycler Operator's Manual*. När du har aktiverat *Color Compensation File* visas i fluorimeterkanalerna F1, F2 och F3 skilda signaler. För analys av PCR-resultaten, vilka tas fram med *artus EBV LC PCR Kit*, väljer du displayfunktionerna F2/Back-F1 för det analytiska EBV-PCR-förfarandet resp. F3/Back-F1 för PCR-förfarandet av *Internkontrollen*. För analys av kvantitativa körningar ska du följa anvisningarna i avsnittet 8.3 Kvantifiering, samt *Technical Note for quantitation on the LightCycler Instrument* på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/.

Om mer än ett *Herpes-artus*-system är integrerat i en PCR-körning är det viktigt att EBV-proven analyseras separerade från varandra. Välj därför ut de motsvarande rotor-positionerna för tolkning av resultaten.

Följande resultat kan förekomma:

1. I fluorimeterkanalen F2/Back-F1 detekteras en signal.

Analysresultatet är positivt. Provet innehåller EBV-DNA.

I detta fall är detektion av en signal i kanalen F3/Back-F1 oväsentlig, eftersom höga initiala koncentrationer av EBV-DNA (positiv signal i kanalen F2/Back-F1) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för *Internkontrollen* i kanalen F3/Back-F1 (konkurrens).

2. I fluorimeterkanalen F2/Back-F1 detekteras ingen signal, utan endast i kanalen F3/Back-F1 (*Internkontrollens* signal).

Inget EBV-DNA kan påvisas i provet. Det kan därför anses som negativt.

Vid negativ EBV-PCR utesluter detektionen av *Internkontroll*-signalen möjligheten av en PCR-inhibering.

3. Ingen signal detekteras vare sig i kanal F2/Back-F1 eller i kanal F3/Back-F1.

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

Information om felkällor och hur dessa åtgärdas finns i **10. Felsökning**.

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner finns i Fig. 8 och Fig. 9.

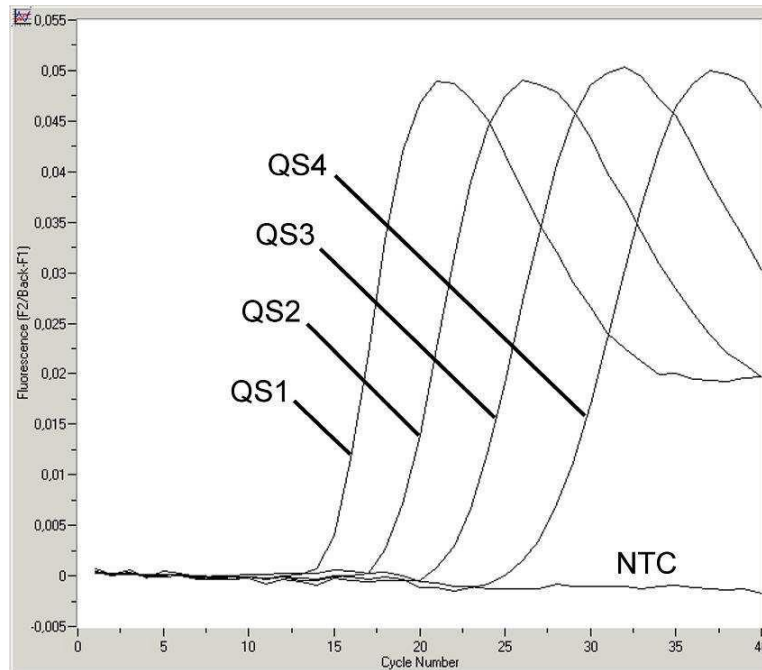


Fig. 8: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) i fluorimeterkanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativ kontroll).

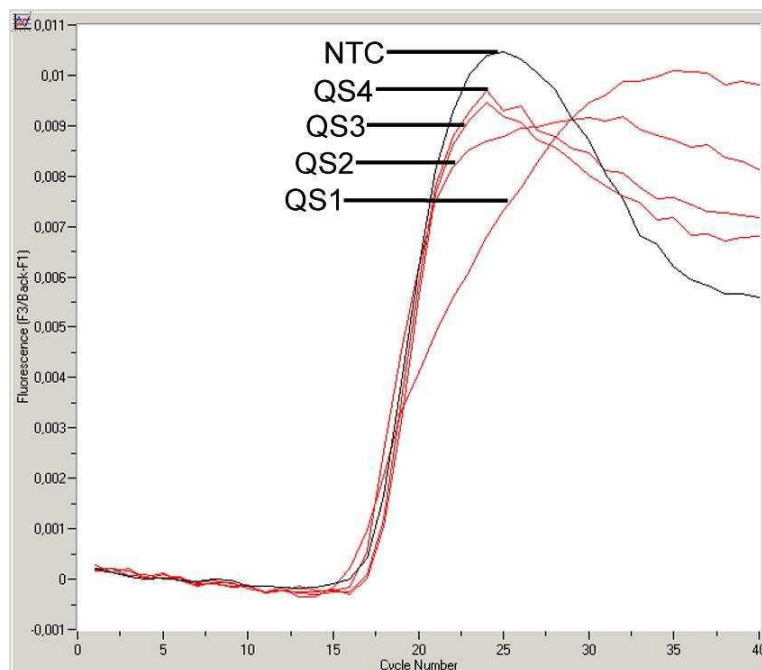


Fig. 9: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorimeterkanal F3/Back-F1 med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

10. Felsökning

Ingen signal för de positiva kontrollerna (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) i

fluorimeterkanal F2/Back-F1:

- Valet av fluorimeterkanalen vid analysen av PCR-data motsvarar inte angivelserna i protokollet.
 - ❖ Välj för analysen av data fluorimeterkanal F2/Back-F1 för analytisk EBV-PCR och fluorimeterkanal F3/Back-F1 för PCR av *Internkontrollen*.
- Programmeringen av temperaturprofilen för *LightCycler*[®] instrumentet är felaktig.
 - ❖ Jämför temperaturprofilen med angivelserna i protokollet (se **8.5 Programmering av *LightCycler* instrumentet**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontrollera arbetsstegen med hjälp av pipetteringschemat (se **8.4 Förberedelser av PCR**) och upprepa, om nödvändigt, PCRen.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus* EBV LC PCR Kit har löpt ut.
 - ❖ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Svag eller utebliven signal för *Internkontrollen* i fluorimeterkanal F3/Back-F1

tillsammans med frånvaro av signal i kanal F2/Back-F1:

- PCR-förhållandena motsvarar inte protokollet.
 - ❖ Kontrollera PCR-förhållandena (se ovan) och upprepa, om nödvändigt, PCR med korrigerade inställningar.
- PCR har inhiberats.
 - ❖ Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 DNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar exakt.

- ◆ Förvisa dig om att hos DNA-isoleringen det rekommenderade extra centrifugeringssteget för fullständigt avlägsnande av etanol-rester genomfördes innan elueringen (se **8.1 DNA-isolering**).
- Det förekommer DNA-förluster orsakade av reningsförfarandet.
 - ◆ Har *Internkontrollen* tillsatts för isolering kan en utebliven signal för *Internkontrollen* betyda att det föreligger DNA-förluster orsakade av reningsförfarandet. Kontrollera att du har använt ett reningsförfarande som rekommenderas av oss (se **8.1 DNA-isolering**) och var noga med att följa tillverkarens anvisningar.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus EBV LC PCR Kit* har löpt ut.
 - ◆ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Signal hos de negativa kontrollerna i fluorimeterkanal F2/Back-F1 i analytisk PCR.

- En kontamination föreligger under PCR förberedelserna.
 - ◆ Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.
 - ◆ Förslut de enskilda PCR-reaktionsbehållarna om möjligt direkt efter tillsats av de undersökta proverna.
 - ◆ Pipettera alltid positiv kontrollen sist.
 - ◆ Försäkra er om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.
- En kontamination orsakad av isoleringen föreligger.
 - ◆ Upprepa isoleringen och PCR av de undersökta proverna med hjälp av oanvända reagenser.
 - ◆ Försäkra er om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.

Om du skulle ha ytterligare frågor eller om andra problem uppträder, ber vi dig kontakta den tekniska servicen.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

För bestämning av den analytiska sensitiviteten för *artus* EBV LC PCR Kit utfördes en standard-spädningsserie från 50 till nominellt 0,005 EBV-kopieekvivalenter^{*}/μl som analyserades med *artus* EBV LC PCR Kit.

Undersökningarna genomfördes tre olika dagar i form av åttafaldiga bestämningar. Resultatet har tagits fram med hjälp av en probit-analys. Den grafiska utvärderingen framgår av Fig. 10. Den analytiska detektionsgränsen för *artus* EBV LC PCR Kit ligger således på 5,78 kopior/μl ($p = 0,05$). Detta innebär att med 95 % konfidens 5,78 kopior/μl kan detekteras.

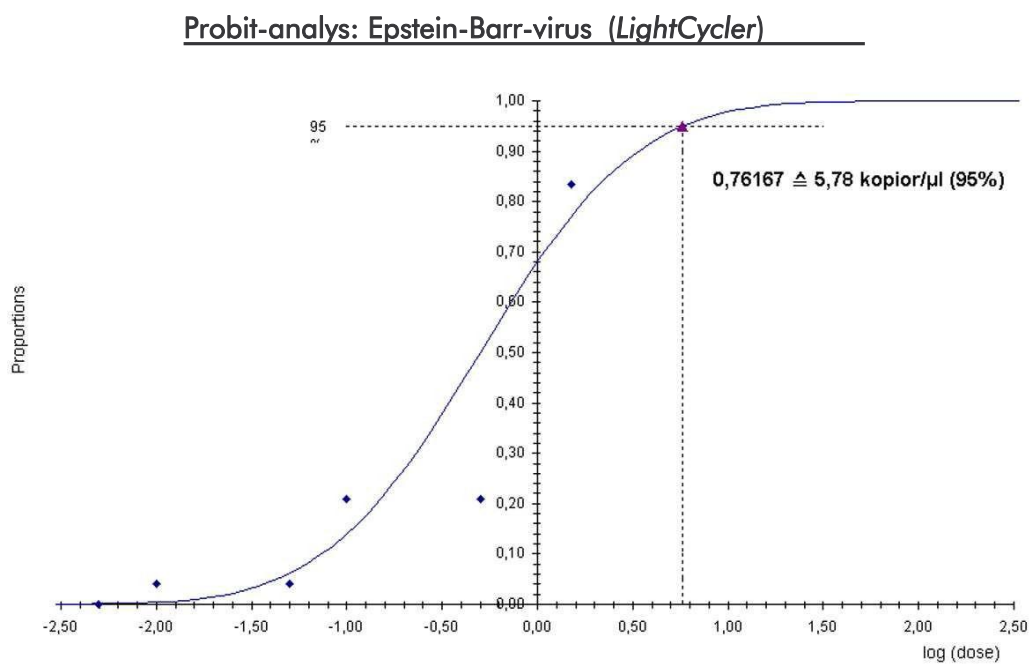


Fig. 10: Analytisk sensitivitet för *artus* EBV LC PCRKit.

^{*} Den standard som används här är en klonad PCR-produkt vars koncentration har bestämts spektral- och fluorescensfotometriskt.

11.2 Specificitet

Specificiteten för *artus* EBV LC PCR Kit garanteras i första hand genom val av primers och prober samt val av stringenta reaktionsförhållanden. Primers och prober kontrolleras med en sekvensjämförelse-analys med avseende på eventuella homologier mot alla i genbanker publicerade sekvenser. På så sätt kontrolleras även att alla relevanta genotyper detekteras.

Validering av specificiteten utfördes på sex olika serumprover vilka samtliga var negativa med avseende på EBV. Dessa genererade inte någon signal med de specifika primers och prober som är integrerade i *EBV LC Master*.

För bestämning av specificiteten av *artus* EBV LC PCR Kit undersöktes den i Tabell 1 angivna kontrollgruppen med avseende på korsreaktivitet. Ingen av de testade patogenerna var reaktiv.

Tabell 1: Kitets specificitetstest med eventuella korsreaktiva patogener.

Kontrollgrupp	EBV (F2/Back-F1)	Internkontroll (F3/Back-F1)
Humant herpesvirus 1 (Herpes-simplex-virus 1)	-	+
Humant herpesvirus 2 (Herpes-simplex-virus 2)	-	+
Humant herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-virus)	-	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Humant T-cell-leukemi-virus 1	-	+
Humant T-cell-leukemi-virus 2	-	+

11.3 Precision

Precisionsdatan för *artus* EBV LC PCR Kit tillåter framtagandet av totalvariansen av testsystemet. Denna totalvarians består av **Intra-Assay-variabilitet** (variabilitet mellan prover av samma koncentration inom en undersökningsomgång) **Inter-Assay-variabilitet** (lab-intern variabilitet på grund av att olika enskilda personer använder olika instrument av samma typ) och **Inter-Batch-variabilitet** (variabilitet under användande av olika batcher).

Därvid förmedlas standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten, såväl för det patogen-specifika som för PCR av *Internkontrollen*. Dessa data togs fram för *artus EBV LC PCR Kit* med hjälp av *Kvantifieringsstandarden* med den minsta koncentration (QS 4; 50 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes i form av åttafaldiga bestämningar. Utvärderingen av resultaten gjordes med amplifikationskurvornas Ct-värden (Ct: *threshold cycle*, Tabell 2) och de därifrån förmedlade kvantitativa värdena i kopior/ μ l (Tabell 3). Således utgör den totala spridningen hos ett godtyckligt prov med den benämnda koncentrationen 1,17 % (Ct) resp. 14,54 % (konc.) och för detektion av *Internkontrollen* 1,02 % (Ct). Dessa värden baserar på summan av alla enskilda värden av den förmedlade variabiliteten.

Tabell 2: Precisionsdata baserade på Ct-värdena.

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

Tabell 3: Precisionsdata baserade på de kvantitativa värdena (i kopior/ μ l).

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Inter-Assay-variabilitet: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Inter-Batch-variabilitet: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Totalvarians: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

11.4 Reproducerbarhet

Data för reproducerbarhet har insamlats för regelbunden utvärdering av prestanda för *artus EBV LC PCR Kit* samt för jämförelse av prestanda med andra produkter, vilket uppfylls genom deltagande i provningsjämförelser.

11.5 Diagnostisk utvärdering

artus EBV LC PCR Kit utvärderas för närvarande i ett flertal studier.

12. Särskild information om produktanvändning

- Samtliga reagenser är endast avsedda att användas för in vitro-diagnostik.
- Utförandet bör ske av personal som fått särskild undervisning och utbildning i in vitro-diagnostik-förfarandet.
- För att erhålla optimala PCR-resultat är det mycket viktigt att protokollet följs exakt.
- Beakta utgångsdatumet som finns på de enskilda komponenternas förpackningar och etiketter. Utgångna reagenser får inte användas.

13. Varningar och försiktighet

Säkerhetsinformation för *artus* EBV LC PCR Kit hittar du i tillhörande säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). Detta hittar du som kompaktoch användarvänlig PDF-fil under www.qiagen.com/support/msds.aspx.











14. Kvalitetskontroll

Enligt QIAGENs certifierade kvalitets-managment-system ISO 9001 och ISO 13485 testades varje tillverknings-sats *artus* EBV LC PCR Kit mot fastlagda specifikationer, för att garantera en enhetlig produktkvalitet.

15. Referenser

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

16. Symbolförklaring

	Används före
	Tillverkningssatsnummer
	Tillverkare
	Beställningsnummer
	Materialnummer
	Handbok
	Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)
	Innehållet räcker för <N> test
	Temperaturintervall
QS	<i>Kvantifieringsstandard</i>
IC	<i>Internkontroll</i>

artus EBV LC PCR Kit

Varumärken och friskrivningar

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

Registrerade namn, varumärken osv. som nämns i detta dokument, även de som inte är specifikt märkta som sådana anses inte oskyddade enligt lag.

artus EBV LC PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation och EZ1 DSP Virus Kit och Card är CE-märkta diagnostiska produkter i enlighet med EU-direktivet för in vitro-diagnostik 98/79/EG. Kan inte erhållas i alla länder.

QIAamp Kit är endast avsedda för allmän laboratorieanvändning. Anvisningar och beskrivningar skall inte användas som underlag för diagnos, prevention eller behandling av sjukdom.

Vid inköp av artus PCR Kit beviljas en begränsad licens för användning vid polymeras-kedjereaktion (PCR) inom human och veterinärmedicinsk in vitro-diagnostik tillsammans med en termocykel, vars användning i samband med automatiserad PCR inkluderar en up-front betalning. Denna innefattar en avgift till Applied Biosystems eller erläggs i samband med inköp av t.ex. en auktoriserad termocykel. PCR-förfarandet är skyddat av utländska motsvarigheter till U.S. patent nummer 5,219,727 och 5,322,770 och 5,210,015 och 5,176,995 och 6,040,166 och 6,197,563 och 5,994,056 och 6,171,785 och 5,487,972 och 5,804,375 och 5,407,800 och 5,310,652 och 5,994,056 ägda av F.

Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, alla rättigheter förbehålles

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

echservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

