

artus[®] VZV TM PCR Kit

Handbok



24 (Katalog nr. 4502163)



96 (Katalog nr. 4502165)

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning tillsammans med

ABI PRISM[®] 7000, 7700 och 7900HT Sequence Detection Systems

Version 1



4502163, 4502165



1046901SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046901SV



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	7
5. Information om patogener	7
6. Principen för realtids-PCR	7
7. Produktbeskrivning.....	8
8. Protokoll.....	8
8.1 DNA-isolering	8
8.2 Internkontroll.....	11
8.3 Kvantifiering.....	12
8.4 Förberedelse av PCR	13
8.5 Programmering av <i>ABI PRISM SDS</i>	18
9. Tolkning av resultat.....	36
10. Felsökning	41
11. Specifikationer.....	43
11.1 Analytisk sensitivitet.....	43
11.2 Specificitet	44
11.3 Precision.....	45
11.4 Robusthet	47
11.5 Reproducerbarhet.....	47
11.6 Diagnostisk utvärdering	47

12. Särskild information om produktanvändning.....	47
13. Varningar och försiktighet	48
14. Kvalitetskontroll	48
15. Referenser.....	48
16. Symbolförklaring	49

artus VZV TM PCR Kit

För användning tillsammans med ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT Sequence Detection Systems.

Obs! artus VZV TM PCR Kit kan inte användas tillsammans med vare sig GeneAmp® 5700 SDS eller plattformat 384 för ABI PRISM 7900HT SDS.

1. Innehåll

	Benämning och innehåll	Art. nr. 4502163 24 reaktioner	Art. nr. 4502165 96 reaktioner
Blå	VZV TM Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Röd	VZV LC/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	VZV LC/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grön	VZV TM 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 VZV TM 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. Reagenser som inte används regelbundet bör därför frysas i portioner. Om det är nödvändigt kan komponenterna förvaras vid +4°C i högst fem timmar.

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 reaktionsrör
- Centrifug med rotor för mikrotiterplattor (tillval)
- 96-brunnars reaktionsplatta/reaktionsrör för optiska mätningar med motsvarande optiskt förslutningsmaterial* (se **8.4 Förberedelse av PCR**)
- 96-brunnars tvådelad fästam för användning av optiska reaktionsrör (*96-Well Tray/Retainer Set*, kat. nr. 403 081, Applied Biosystems), se **8.4 Förberedelse av PCR**
- Kompressionsdyna för användning tillsammans med optisk självhäftande folie (*Optical Cover Compression Pads*, kat. nr. 4 312 639, Applied Biosystems), se **8.4 Förberedelse av PCR**
- Applikator för förslutning av reaktionsplattor vid användning av optisk självhäftande folie (*Adhesive Seal Applicator Kit*, kat. nr. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000, 7700* eller *7900HT SDS*

Obs!: Innan instrumenten tas i drift krävs en kalibrering av fluoroforerna (*Pure Spectra Component File*) och bakgrunden (*Background Component File*).

* Användningen av reaktionsrör för optiska mätningar med välvda lock är endast möjligt för *ABI PRISM 7700 SDS* och kräver en justering av exponeringstiden (se **8.5.2 Programmering av ABI PRISM 7700 SDS, 8.5.2.5 Viktiga extrainställningar**).

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 kylblock.

5. Information om patogener

Överföring av varicella-zoster-virus (VZV) sker från människa till människa som droppinfektion eller genom direkt kontakt. Infektion med VZV ger lätt feber och måttlig påverkan av allmäntillståndet. Karakteristiskt för sjukdomen är det polymorfa exantemet med knottor, blåsor och skorpor i kombination med kraftig klåda (vattkoppor). VZV-infektion med svåra förlopp ses ofta hos immunsupprimerade patienter med lung- och hjärninflammationer som hotande komplikation. Efter den akuta infektionen finns patogenen kvar i de sensoriska spinalganglierna och i hjärnnervernas ganglier. Vid nedsatt immunitet kan exacerbationer uppträda (t. ex. läppherpes, bältros).

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 fluorofores. 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 VZV TM PCR Kit är ett bruksfärdigt system för påvisning av VZV-DNA med polymeras-kedjereaktion (PCR) i *ABI PRISM 7000, 7700* och *7900HT Sequence Detection System*. *VZV TM Master* innehåller reagenser och enzymer för specifik amplifiering av ett 82 bp långt fragment i VZV-genomet. Detektion av amplikon sker genom mätning av FAM-fluorescens i *ABI PRISM SDS*. Dessutom innehåller *artus* VZV TM PCR Kit ett andra heterologt amplifieringssystem för detektion av en eventuell PCR-inhibering. Detta påvisas som *Internkontroll (IC)* genom mätning av VIC-fluorescens.

Däriigenom blir detektionsgränsen av det analytiska VZV-PCR-förfarandet inte negativt påverkat (se 11.1 **Analytisk sensitivitet**). Externa positiva kontroller (*VZV LC/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.

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), utstryk	QIAamp [®] UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	Ingår
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Ingår e
CSF (Cerebrospinalvätska)	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 och QIAamp DNA Mini Kit:

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

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

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

- c) Tillsätt den färskt tillredda blandningen av lyseringsbuffert och bärrar-RNA direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.

- Tillsatsen av **bärrar-RNA** är till för isoleringens effektivitet och därmed av avgörande betydelse för utvinningen av DNA-/RNA. För att uppnå en högre stabilitet av det bärrar-RNA som medföljer QIAamp UltraSens Virus Kit, rekommenderar vi följande tillvägagångssätt, vilket frångår angivelserna i isoleringskitets handbok:
 - a. Innan första användningen resuspendera de frystorkade bärrar-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 bärrar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C . Undvik upprepad tining ($> 2 \times$) av en bärrar-RNA-alikvot.
 - b. Innan varje isolering påbörjas måste en färskt blandning av lyseringsbuffert och bärrar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert AC	800 μl	9.600 μl
Bärrar-RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	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 Kits** kan provet ytterligare koncentreras. Om provmaterialet inte är serum eller plasma, ska minst 50 % (v/v) negativ humanplasma tillsättas till provet.
 - Om isoleringar med **etanolhaltiga** tvättbuffertar används, ska innan eluering ytterligare ett centrifugeringssteg utföras (tre minuter, 13.000 rpm) så att eventuella etanolrester avlägsnas. Detta förhindrar eventuella PCR-inhiberingar.
 - *artus* VZV TM PCR Kit är inte lämpligt för isoleringsförfarande baserade på **fenol**.

Viktig hänvisning vid användning av EZ1 DSP Virus Kit:

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

Viktigt: *Internkontrollen* för *artus VZV TM PCR Kit* kan tillsättas direkt i isoleringen (se **8.2 Internkontroll**).

8.2 Internkontroll

En *Internkontroll* (VZV TM 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** 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 bärrar-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 bärrar-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 bärrar-RNA direkt till provmaterialet.

Alternativt kan *Internkontroll* användas **endast för kontroll av en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 2 μl *Internkontroll* per reaktion direkt till 30 μl *VZV TM Master*. Använd för varje PCR-reaktion 30 μl av den så tillverkade *Master Mixen** och tillsätt 20 μl av det isolerade provet. Om du förbereder en körning för flera prover, ökar du mängden *VZV TM Master* och *Internkontroll* motsvarande antalet prover (se **8.4 Förberedelse av PCR**).

8.3 Kvantifiering

De medföljande *Kvantifieringsstandarderna* (*VZV LC/TM QS 1 - 4*) behandlas på samma sätt som ett redan isolerat prov och används i samma volym (20 μl). Ta fram en standardkurva på *ABI PRISM Sequence Detection System* genom att använda samtliga fyra medföljande *Kvantifieringsstandarder*, definiera dem som standarder och skriv in den angivna koncentrationen (se **8.5 Programmering av ABI PRISM SDS**). Import av standardkurvor från tidigare körningar är inte möjligt med programvaran *ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS*.

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

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

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).

* Volymökningen till följd av tillsats av *Internkontroll* ignoreras vid beredning av PCR-reaktionen. Sensitiviteten hos detektionssystemet påverkas inte.

Viktigt: Riktlinjer för att underlätta tolkning av kvantitativa resultat för *artus*-systemen på *ABI PRISM 7000 SDS* finns på www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/ (Technical Note for quantitation on the *ABI PRISM 7000 SDS*).

8.4 Förberedelse av PCR

Förbered erforderligt antal reaktionsrör eller en 96-brunnars reaktionsplatta för de planerade reaktionerna. I efterföljande tabell anges de material som rekommenderas:

Artikel	Benämning	Katalog-nummer	Tillverkare	Fäst-ram	Kompressions-dyna
96-brunnars optisk reaktionsplatta	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nej	-
Optisk självhäftande folie	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	ja
Optiska reaktions-behållare	<i>ABI PRISM</i> Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	ja	-
Optiska reaktions-behållare	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ja	-
Optiska lock (platta)	<i>ABI PRISM</i> Optical Caps, 8	4 323 032	Applied Biosystems	-	nej

Obs!: Användningen av reaktionsrör för optiska mätningar med välvda lock är endast tillåtet för *ABI PRISM 7700 SDS*-instrumentet och kräver en justering av exponeringstiden (se **8.5.2 Programmering av *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.5.2.5 Viktiga extrainställningar**).

Vid användning av en tvådelad fäst-ram måste reaktionsrör öppnas när de sätts in och tas ut. För att undvika kontaminationer härvid ska endast den undre delen av fäst-ramen användas.

Observera att vid beredning av PCR, 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* (*VZV LC/TM QS 1 - 4*) användas. Innan testet påbörjas ska alla reagenser tinas 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 *Internkontroll* 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	VZV TM Master	30 µl	360 µl
	VZV TM IC	0 µl	0 µl
	Total volym	30 µl	360 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	30 µl	vardera 30 µl
	Prov	20 µl	vardera 20 µl
	Total volym	50 µl	vardera 50 µl

Om du vill använda *Internkontroll* **enbart för kontroll av en PCR-inhibering**, ska du tillsätta den direkt till *VZV TM 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	VZV TM Master	30 µl	360 µl
	VZV TM IC	2 µl	24 µl
	Total volym	32 µl*	384 µl*
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	30 µl*	vardera 30 µl*
	Prov	20 µl	vardera 20 µl
	Total volym	50 µl	vardera 50 µl

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

Pipettera i varje reaktionsrör eller i varje fördjupning på 96-brunnars reaktionsplattan 30 μ l av Master Mix. Tillsätt därefter 20 μ l eluat från DNA-isoleringen. Se till att båda lösningarna blandas väl genom att pipettera upp och ned flera gånger. Förslut reaktionsrören med tillhörande lock resp. vid användning av en 96-brunnars reaktionsplatta med optiska självhäftande folier (*Optical Adhesive Covers*). Samla den beredda reaktionsvolymen till botten av rör eller plattor genom att centrifugera reaktionsrören (i ett förvaringsrack avsett för PCR-rör) resp. 96-brunnars reaktionsplattan i en centrifug med mikrotiterplattrotor i 30 sekunder vid 1.780 x g (4.000 rpm). Om du inte har tillgång till en sådan centrifug ska du vid beredning av PCR-reaktionerna se till att pipettera såväl Master Mix som provvolymerna på botten av reaktionsrör eller reaktionsenheter (well). Lagra reaktionsberedningarna i +4°C tills **ABI PRISM SDS**-instrumentet är programmerat (se **8.5 Programmering av ABI PRISM SDS**) och överför sedan dessa till instrumentet.

Obs!

- Vid användning av optiska reaktionsrör i kombination med optiska lock ska en fästram sättas in (*96-Well Tray/Retainer Set*) i instrumentet (*ABI PRISM 7000 SDS, 7700 SDS och 7900HT SDS*). Vid användning av en tvådelad fästram måste reaktionsbehållarna öppnas när de sätts in och tas ut. För att undvika kontamination ska endast den undre delen av fästramen användas.
- Vid användning av 96-brunnars optiska reaktionsplattor i kombination med optisk självhäftande folie krävs en kompressionsdyna (*Optical Cover Compression Pads*).

Tillsats av Internkontroll till isolering

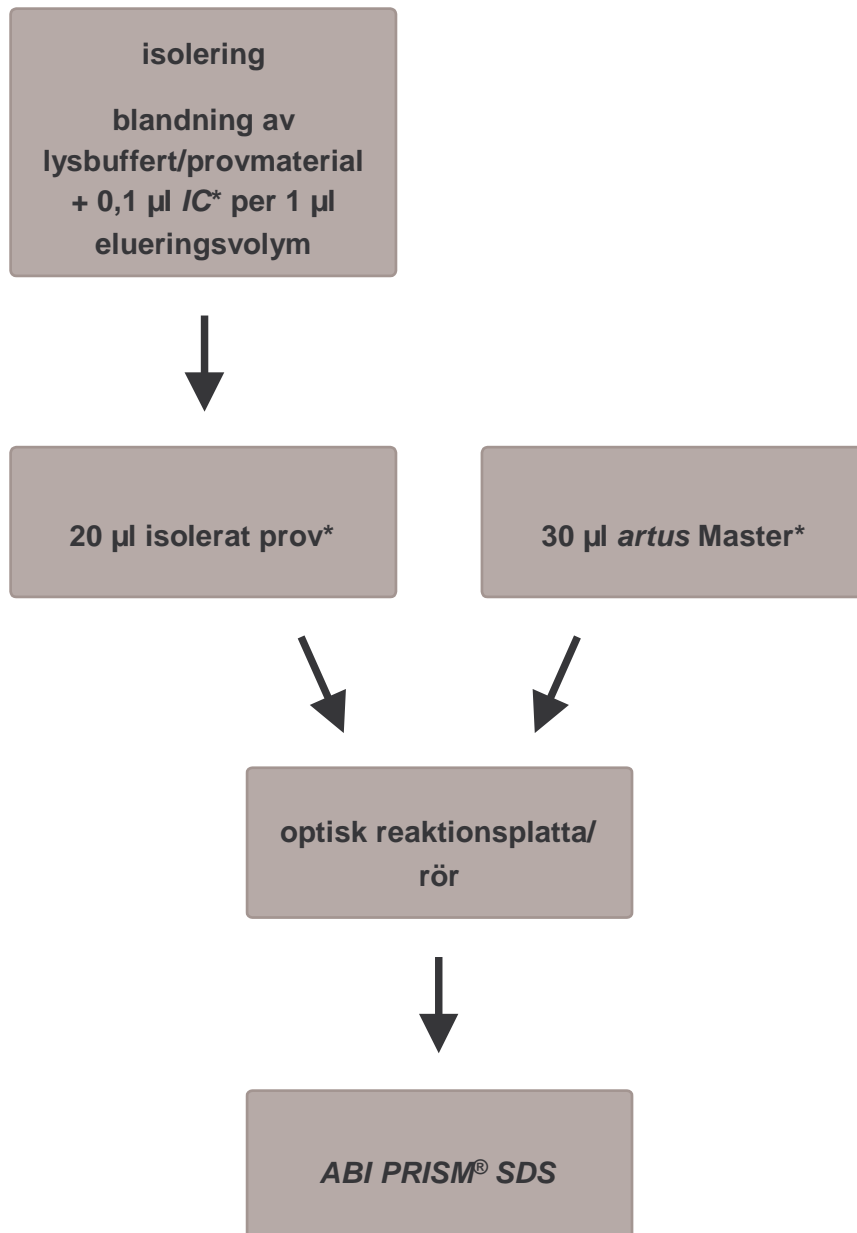


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av isolering och PCR-inhibering.

*

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

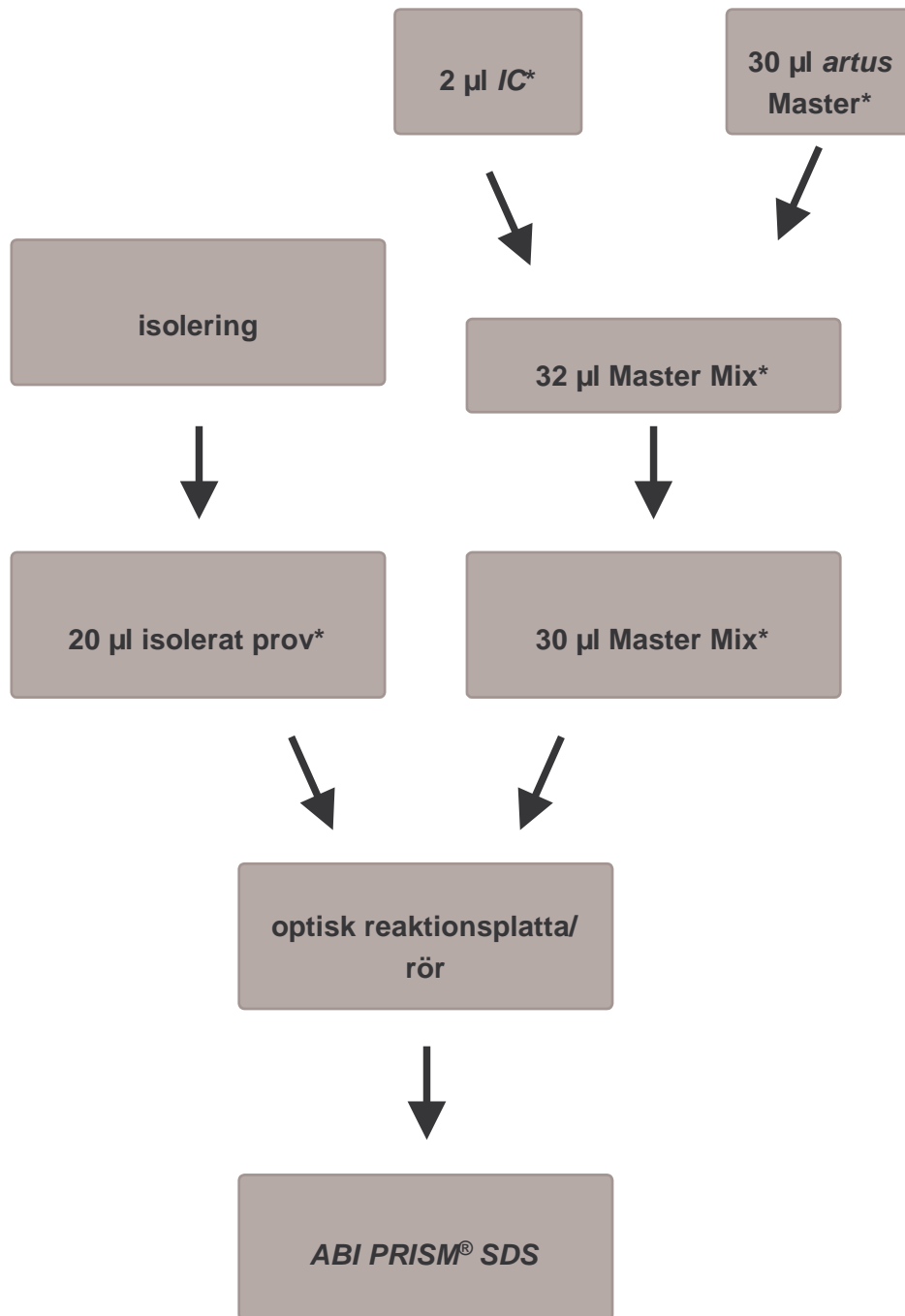


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av PCR-inhibering.

*

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 **ABI PRISM SDS**

Programvaran *ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT Sequence Detection Systems (SDS)* kräver ytterligare information innan PCR-körningen startas. Tillvägagångssättet vid programmeringen av instrumenten skiljer sig åt, och behandlas därför i olika kapitel.

8.5.1 Programmering av **ABI PRISM 7000 SDS**

För detektion av VZV-DNA programmerar du en profil på *ABI PRISM 7000 SDS* enligt följande sex arbetssteg (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Alla uppgifter hänför sig till *ABI PRISM 7000 SDS Software Version 1.0.1*. Ytterligare information om programmering av *ABI PRISM 7000 SDS* finns i *ABI PRISM 7000 SDS User Guide*. För att få en bättre översikt är de inställningar som ska göras markerade med en svart ram i figurerna.

8.5.1.1 Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning

Välj i *ABI PRISM 7000 SDS* under *File* menypunkten *New* och gör följande grundinställningar för det nya dokumentet (se Fig. 3). En tidigare sparad mall (*SDS Template (*.sdt)*) finns till förfogande i *Template*-listan eller genom att välja med *Browse*-funktionen (se 8.5.1.5 *Spara PCR-körningen*). Bekräfta uppgifterna (OK).

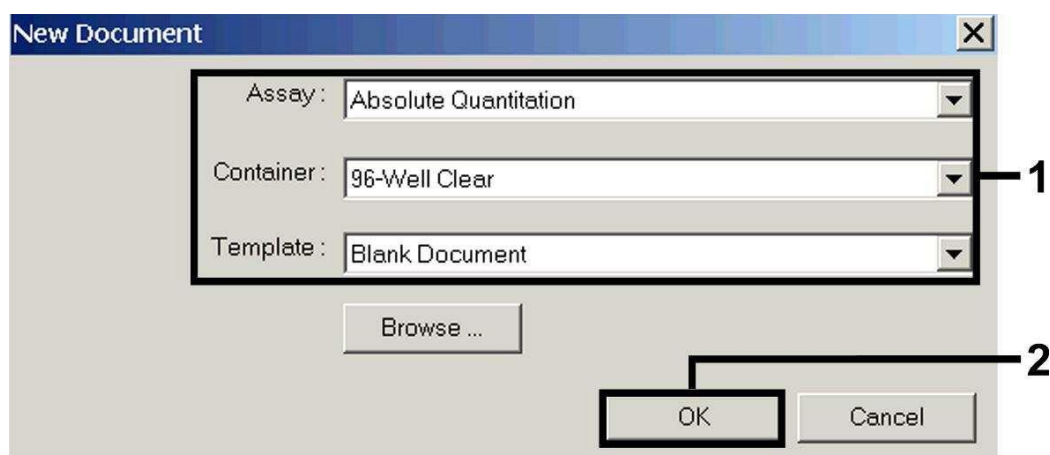


Fig. 3: Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning (*New Document*).

8.5.1.2 Framtagning/val av detektorer

Med hjälp av undermenyn *Detector Manager* under *Tools* tilldelar du dokumentet motsvarande detektorfluoroforer. För detektion av VZV-DNA samt *Internkontroll* med hjälp av *artus VZV TM PCR Kit* ska de Reporter/Quencher som anges i följande tabell definieras:

Detektion	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Internkontroll (VZV TMIC)</i>	VIC	none

För framtagning av de här detektorerna väljer du i *Detector Manager* nere till vänster alternativet *File* och därefter alternativet *New*.

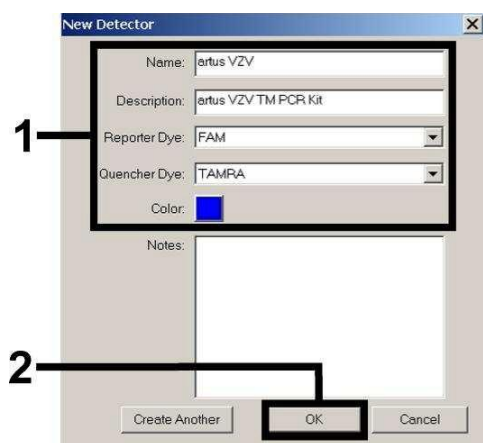


Fig. 4: Framtagning av VZV-specifik detektor (*Detector Manager*).

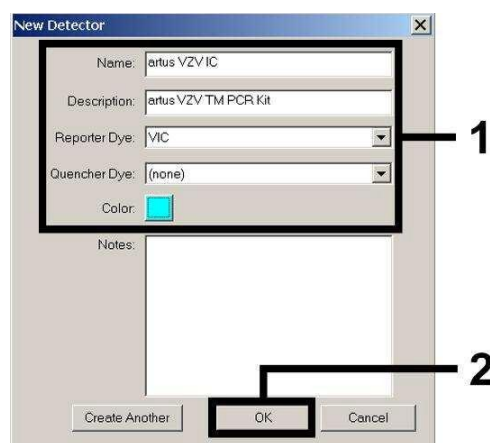


Fig. 5: Framtagning av IC-specifik detektor (*Detector Manager*).

I det fönster som nu visas definierar du (motsvarande Fig. 4 och Fig. 5) för detektion av VZV-DNA Reporter/Quencher-kombinationen **FAM/TAMRA**, för detektion av *Internkontroll* väljer du kombinationen **VIC/none**. Genom att bekräfta uppgifterna (OK) kommer du tillbaka till *Detector Manager*. Markera de framtagna detektorerna och för över varje val till *Well Inspector* (se Fig. 6) genom att klicka på alternativet *Add to Plate Document*. Stäng fönstret (*Done*).

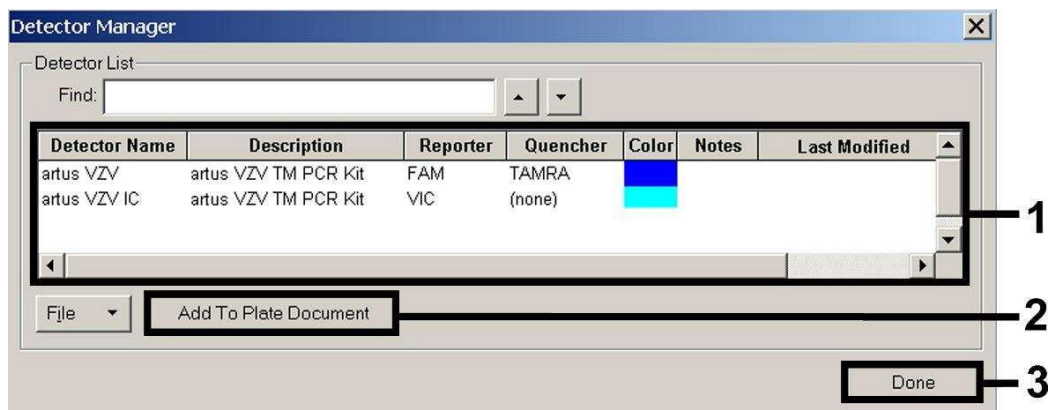


Fig. 6: Val av detektorer (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Tilldelning av nödvändig information till plattpositioner

Öppnar du nu under *View* alternativet *Well Inspector*, så hittar du detektorerna som du valde under 8.5.1.2 (se Fig. 7).

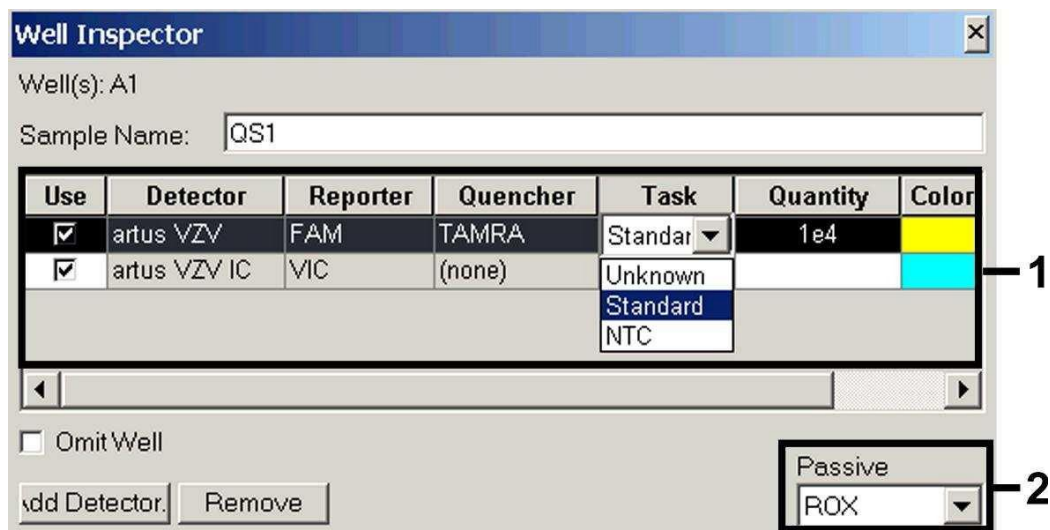


Fig. 7: Tilldelning av nödvändig information till plattpositionerna (*Well Inspector*).

Markera de reserverade plattpositionerna för detektionen av VZV-DNA. Tilldela dessa positioner de valda detektorerna genom att aktivera *Use*-alternativet, genom att klicka på det, för båda detektorerna. En liten hake visas. För benämning av de olika reaktionsberedningarna väljer du motsvarande position på plattan och anger namnet under *Sample Name*.

Tänk på att beredningar med identisk *Sample Name* och identisk detektortilldelning identifieras som replikat av programvaran och ett genomsnittsvärde på kvantifierade patogenbelastning beräknas. Välj för varje provtyp motsvarande funktion (*Task*) enligt följande tabell:

Provtyp	Funktion (<i>Task</i>)	Koncentration (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
Prov	Unknown	-	FAM	TAMRA
Negativ kontroll	NTC	-	FAM	TAMRA
Standard	Standard	se 1. Innehåll	FAM	TAMRA

För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder* (VZV LC/TM QS 1 - 4) användas och tillhörande koncentrationer (se 1. Innehåll) ska anges för varje enskild standard (*Quantity*). Tänk på att **ROX** måste vara inställd som passiv referens (*Passive Reference*) för en PCR-körning med *artus VZV TM PCR Kit*. En jämn fördelning av ROX-fluoroforer på alla PCR-beredningar i ett parti genom blandning av *VZV TM Master* säkerställer igenkänning och att *tube-to-tube*-variationer (skillnader i fluorescens mellan olika PCR-beredningar) avräknas genom *Sequence Detection Software* (normalisering).

8.5.1.4 Framtagning av temperaturprofilen

För att ange temperaturprofilen växlar du i programvaran från *Setup*-planet till *Instrument*-planet. Ange motsvarande Fig. 8 den giltiga temperaturprofilen för detektion av VZV-DNA. Om du vill ta bort de sparade 50°C-stegen i förinställningarna markerar du dessa med hjälp av vänster musknapp med samtidigt nedtryckt *Shift*-knapp och radera sedan med hjälp av *Backspace*-knappen. Kontrollera att reaktionsvolymen är inställd på 50 µl. Alternativet *9600 Emulation* ska vara aktiverat och förinställningarna för *Auto Increment* vara oförändrade (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

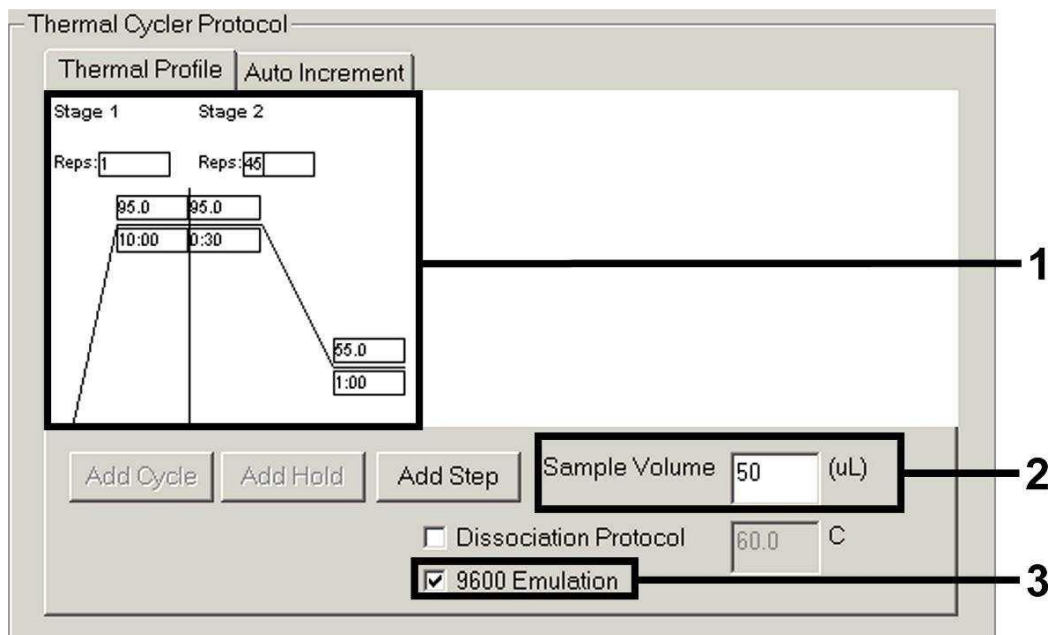


Fig. 8: Framtagning av temperaturprofilen.

8.5.1.5 Spara PCR-körningen

Här kan du spara de angivna inställningarna (*Setup*) som mall, för att kunna använda dem senare i förändrad eller oförändrad form. Genom att spara inställningarna som *SDS Template (*.sdt)* i mappen *Template Directory (Local Disk [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 SDS \Templates, förinställd av Applied Biosystems)*, kan denna fil väljas direkt från *Template Drop-down-listan* i *New Document*-fönstret. Mallar som sparats i andra mappar måste öppnas via *Browse*. Innan du startar PCR-körningen måste du spara den på nytt som *SDS Document (*.sds)*. Därmed säkerställer du att även de data som tillkommer under loppet av PCR-körningen sparas.

8.5.1.6 Starta PCR-körningen

Starta PCR-körningen genom att välja alternativet *Start* under menypunkten *Instrument* eller fältet *Start* på *Instrument*-planet.

8.5.2 Programmering av ABI PRISM 7700 SDS

För detektion av VZV-DNA programmerar du en profil på ABI PRISM 7700 SDS enligt följande sju arbetssteg (8.5.2.1 - 8.5.2.7). Alla uppgifter hänför sig till ABI PRISM 7700 SDS Software Version 1.9.1. Ytterligare information om programmering av ABI PRISM 7700 SDS finns i ABI PRISM 7700 SDS *User's Manual*. För att få en bättre översikt är de inställningar som ska göras markerade med en svart ram i figurerna.

8.5.2.1 Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning

Välj i ABI PRISM 7700 SDS under *File* menypunkten *New Plate* och gör följande grundinställningar för det nya dokumentet (se Fig. 9). Bekräfta uppgifterna (OK).

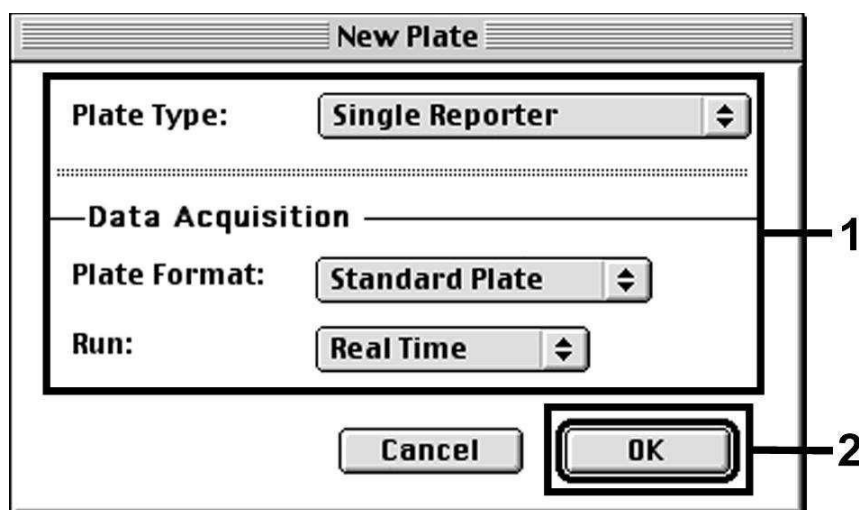


Fig. 9: Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning (*New Plate*).

8.5.2.2 Val av fluoroforer och tilldelning av provtyp

Med hjälp av *Sample Type Setup* (*Setup*-planet: *Sample Type/Sample Type Setup*) tilldelar du dokumentet motsvarande detektorfluoroforer och provtyp. För detektion av VZV-DNA samt *Internkontroll* med hjälp av *artus VZV TM PCR Kit* ska de Reporter/Quencher som anges i följande tabell definieras:

Detektion	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Internkontroll (VZV TMIC)</i>	VIC	TAMRA

För mätning av VZV-DNA med hjälp av *artus VZV TM PCR Kit* väljer du enligt tabellen för Reporter-färgämne **FAM**. Detta gäller för både standarder (STND), prover (UNKN) och negativa kontroller (UNKN). För mätning av *Internkontrollen (IPC+)* definierar du **VIC** som Reporter. Ställ in **TAMRA** som Quencher. Tilldelningen av fluoroforer och provtyper i fönstret *Sample Type Setup* visas i Fig. 10.

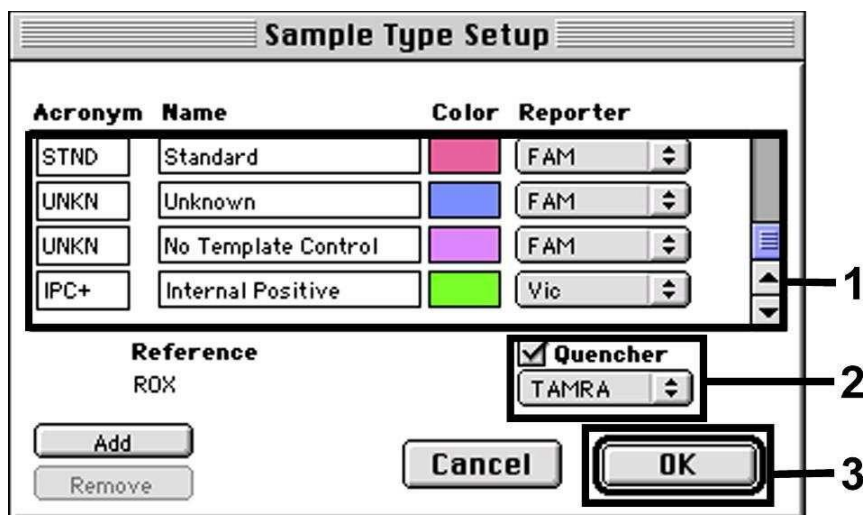


Fig. 10: Val av fluoroforer och tilldelning av provtyp (*Sample Type Setup*).

Tilldelning av provtyp till en motsvarande funktion (*Acronym*) sker enligt följandetablell:

Provtyp	Funktion	Koncentration	Reporter	
Prov	UNKN	-	FAM	TAMRA
Negativ kontroll	UNKN	-	FAM	TAMRA
Standard	STND	se 1. Innehåll	FAM	TAMRA

8.5.2.3 Tilldelning av nödvändig information till plattpositioner

När du tilldelar detektorer och provtyper till enskilda plattpositioner väljer du motsvarande fält. Öppna sedan dialogrutan *Dye Layer* på *Setup*-planet och tilldela lämplig Reporter. Aktiverar du nu popup-menyn *Sample Type*, så hittar du i listan som visas de provtyper som tilldelats Reporter i *Sample Type Setup* (se Fig. 11). Välj ut passande provtyp (se tabell under 8.5.2.2) och bestäm med hjälp av *Dye Layers* och menyn *Sample Type* tilldelningen till de övriga plattpositionerna. I fältet *Sample Name* kan varje prov tilldelas ett namn. För fält som är definierade som *Replicate* (angivandet av referensprovets namn i kolumnen *Replicate*) blir ett genomsnittsvärde på den kvantifierade patogenbelastningen och dess standardavvikelse beräknad av programvaran.

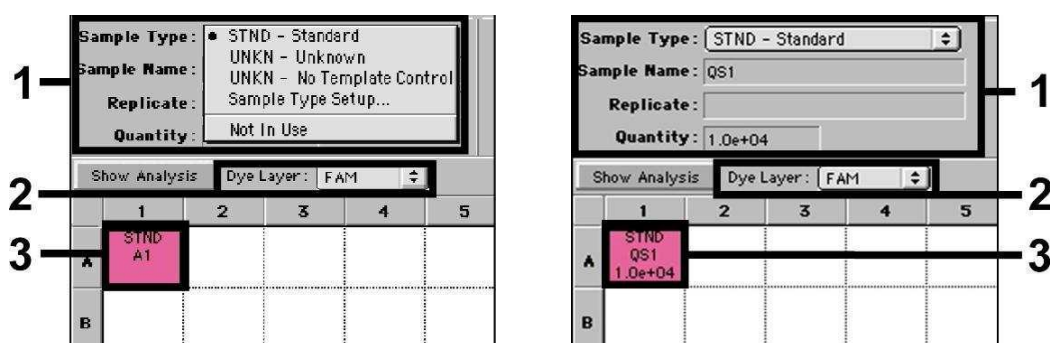


Fig. 11/12: Tilldelning av nödvändig information till plattpositionerna.

För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder* (VZV LC/TM QS 1 - 4) användas och tillhörande koncentrationer (se 1. **Innehåll**) ska anges för varje enskild standard (*Quantity*, se Fig. 12). Detta är dock endast möjligt om positionerna med standard först har definierats som sådana med hjälp av menyn *Sample Type*.

8.5.2.4 Framtagning av temperaturprofilen

Om du vill ange temperaturprofil växlar du till *Thermal Cycler Conditions*-menyn på *Setup*-ytan. Ange motsvarande Fig. 13 den giltiga temperaturprofilen för detektion av VZV-DNA. Kontrollera att reaktionsvolymen är inställd på 50 μL . Förinställningarna av *Ramp*-tider och *Auto Increment* förblir oförändrade (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0Seconds).

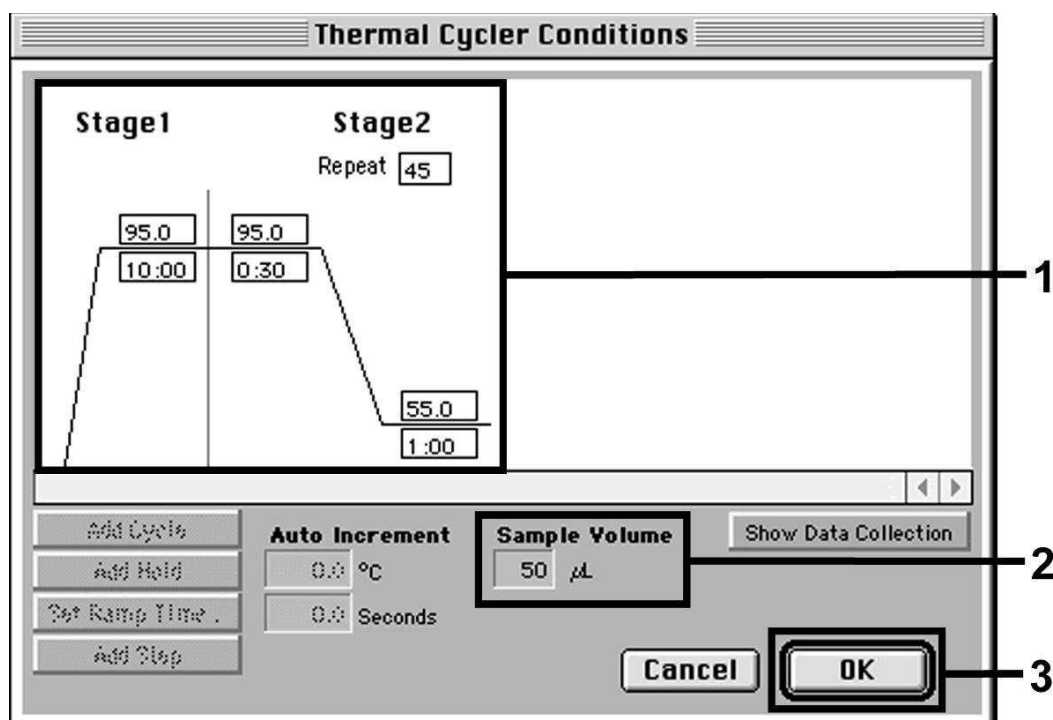


Fig. 13: Framtagning av temperaturprofilen.

Vidare finns i *Thermal Cycler Conditions*-menyn alternativet *Show Data Collection*. Om du väljer det här alternativet kommer du till fönstret som visas i Fig. 14. Varje *Ramp*- och *Plateau*-temperatur är försedd med en symbol för datainsamling (*Data Collection Icon*), som visar insamlingen av data för den aktuella tidpunkten under körningen. Ta bort alla symboler fram till tidpunkten för *Annealing- Extension* -steget (*Stage2/Step2*) genom att klicka på dem, för att slippa onödiga fluorescensmätningar. Genom detta hålls körningstiden och datamängden så liten som möjligt.

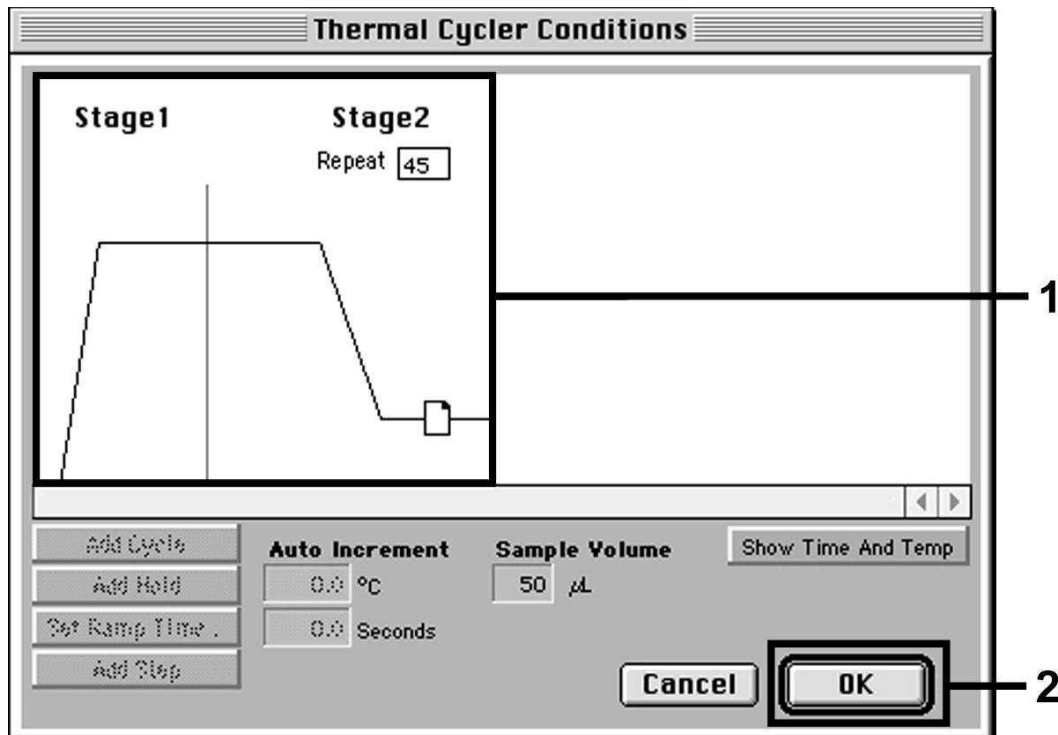


Fig. 14: Datainsamling (Data Collection).

8.5.2.5 Viktiga extrainställningar

För inställning av exponeringstiden (excitation av fluoroforer) samt för val av *Pure Spectra/Background*-filer växlar du från *Setup*-planet till *Analysis*-planet. Välj den nu aktiverade underpunkten *Advanced Options*, som finns i menyn *Instrument* under *Diagnostics*. Utför inställningarna enligt Fig. 15. Genom att inaktivera valfunktionen *Spectra Components (Analysis)* används vid en ny utvärdering av analyserade körningar automatiskt de kalibreringsdata som vid tidpunkten för datagenerering finns i mappen *Spectra Components*. För en analys av gamla körningar med hjälp av nya inlästa *Spectra Components* aktiverar du de båda fälten. Tänk på att **ROX** måste vara inställd som passiv referens (*Reference*) för en PCR-körning med *artus VZV TM PCR Kit*. En jämn fördelning av ROX-fluoroforer på alla PCR-beredningar i ett parti genom blandning av *VZV TM Master* säkerställer igenkänning och att *tube-to-tube*-variationer (skillnader i fluorescens mellan olika PCR-beredningar) avräknas genom *Sequence Detection Software* (normalisering).

Obs! Exponeringstiden (*Exposure Time*) vid användning av 96-brunnars reaktionplattor för optiska mätningar tillsammans med optisk självhäftande folie (*Optical Adhesive Covers*) eller optiska reaktionsrör med platt lock uppgår till tio millisekunder. Om du använder **optiska reaktionsrör med välvda lock**, ska du ställa om tidsangivelsen till **25 millisekunder**.

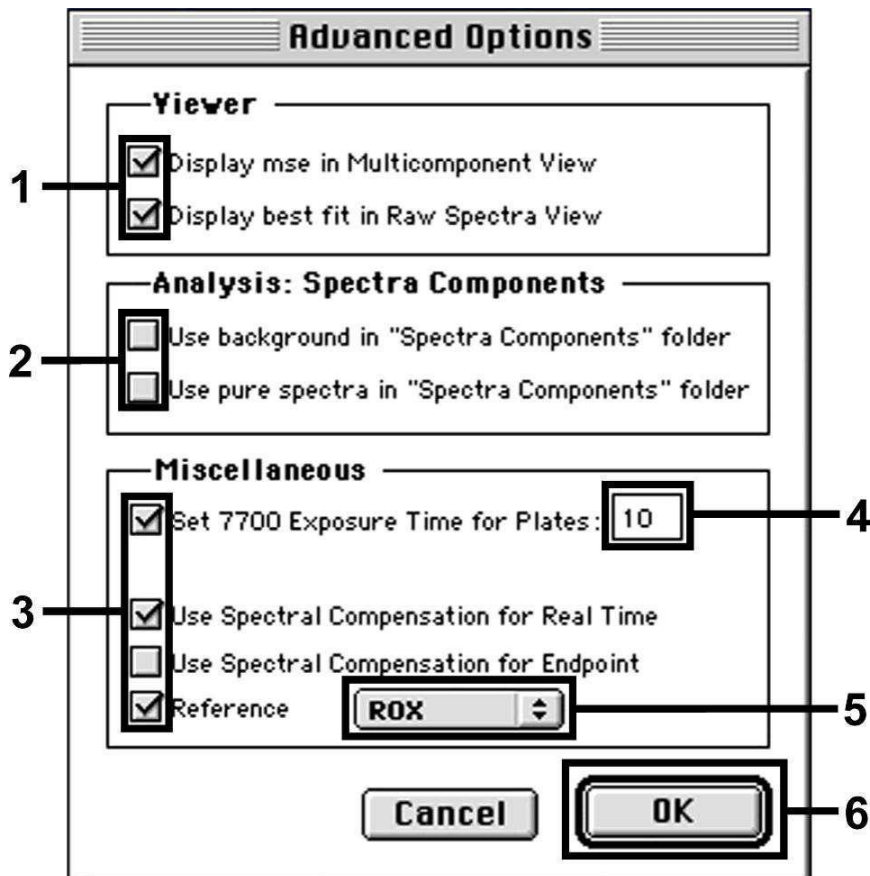


Fig. 15: Viktiga extrainställningar (*Advanced Options*).

8.5.2.6 Spara PCR-körningen

Här kan du spara de angivna inställningarna (*Setup*) som mall, för att kunna använda dem senare i förändrad eller oförändrad form. Spara den här filen i *Stationary File Format*. Innan du startar den aktuella programmerade PCR-körningen måste du spara den på nytt i *Normal File Format*. Därmed säkerställer du att även de data som tillkommer under loppet av PCR-körningen sparas.

8.5.2.7 Starta PCR-körningen

Starta PCR-körningen genom att välja alternativet *Run* under menypunkten *Instrument* eller fältet *Run* på *Analysis*-planet.

8.5.3 Programmering av *ABI PRISM 7900HT SDS*

För detektion av VZV-DNA programmerar du en profil på *ABI PRISM 7900HT SDS* enligt följande sex arbetssteg (8.5.3.1 - 8.5.3.6). Alla uppgifter hänför sig till *ABI PRISM 7900HT SDS Software Version 2.1*. Ytterligare information om programmering av *ABI PRISM 7900HT SDS* finns i *ABI PRISM 7900HT SDS User Guide*. För att få en bättre översikt är de inställningar som ska göras markerade med en svart ram i figurerna.

8.5.3.1 Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning

Välj i *ABI PRISM 7900HT SDS* under *File* menypunkten *New* och gör följande grundinställningar för det nya dokumentet (se Fig. 16). En tidigare sparad mall (*ABI PRISM SDS Template Document [*].sdt*) finns till förfogande i *Template*-listan eller genom val med *Browse*-funktionen (se

8.5.3.5 *Spara PCR-körningen*). Bekräfta uppgifterna (OK).

Obs!: *artus VZV TM PCR Kit* kan inte användas tillsammans med plattformat 384 för *ABI PRISM 7900HT SDS*.

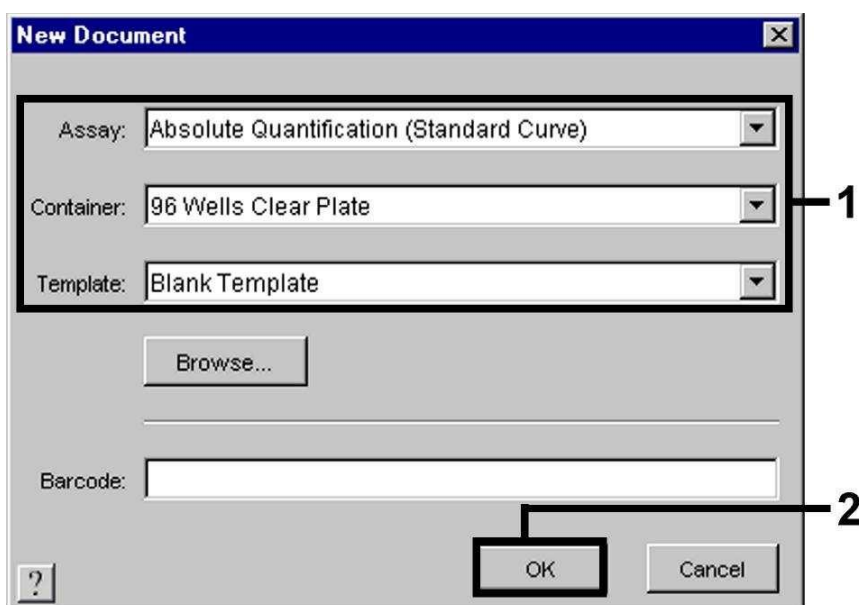


Fig. 16: Förinställningar vid framtagning av en ny PCR-körning (*New Document*).

8.5.3.2 Framtagning/val av detektorer

Med hjälp av undermenyn *Detector Manager* under *Tools* (alternativt: välj *Setup*-planet/*Add Detector*-funktion) tilldelar du dokumentet motsvarande detektorfluoroforer. För detektion av VZV-DNA samt *Internkontroll* med hjälp av *artus VZV TM PCR Kit* ska de Reporter/Quencher som anges i följande tabell definieras:

Detektion	Reporter	Quencher
VZV-DNA	FAM	TAMRA
<i>Internkontroll (VZV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

För framtagning av de här detektorerna väljer du i *Detector Manager* nere till vänster alternativet *New*.

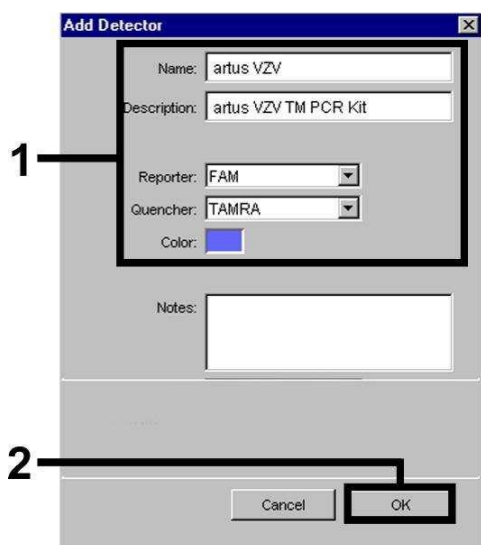


Fig. 17: Framtagning av VZV-specifik detektor (*Detector Manager*).

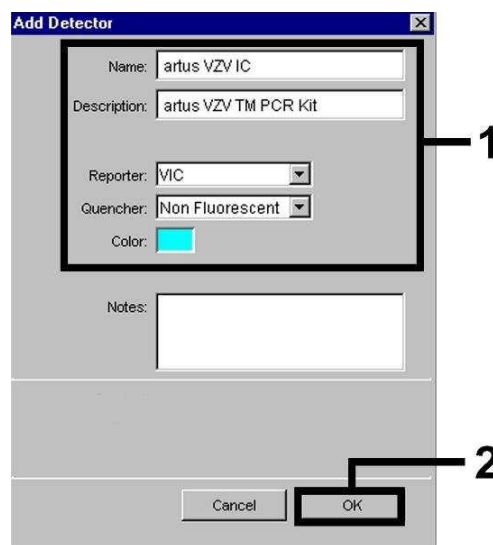


Fig. 18: Framtagning av IC-specifik detektor (*Detector Manager*).

I det fönster som nu visas definierar du (enligt Fig. 17 och Fig. 18) för detektion av VZV-DNA Reporter/Quencher-kombinationen **FAM/TAMRA**, för detektion av *Internkontroll* väljer du kombinationen **VIC/Non Fluorescent**. Genom att bekräfta uppgifterna (OK) kommer du tillbaka till *Detector Manager*. Markera de framtagna detektorerna och för över varje val till *Setup*-planet (se Fig. 19) genom att klicka på alternativet *Copy to Plate Document*. Stäng fönstret (*Done*).

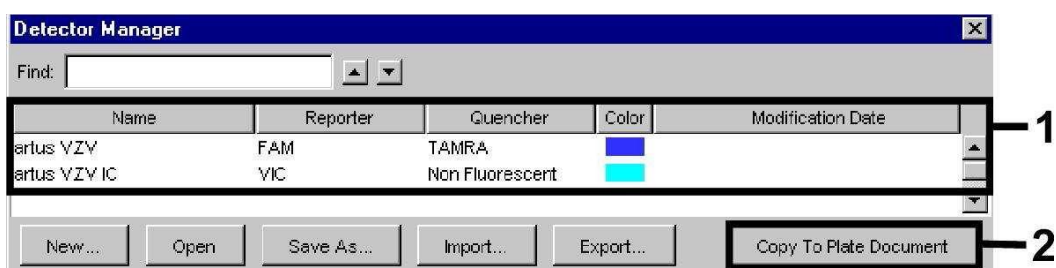


Fig. 19: Val av detektorer (*Detector Manager*).

8.5.3.3 Tilldelning av nödvändig information till plattpositioner

När du stängt *Detector Manager* (*Done*) hittar du de detektorer som du valt under 8.5.3.2 i tabellform på *Setup*-planet (*Well Inspector*) (se Fig. 20).

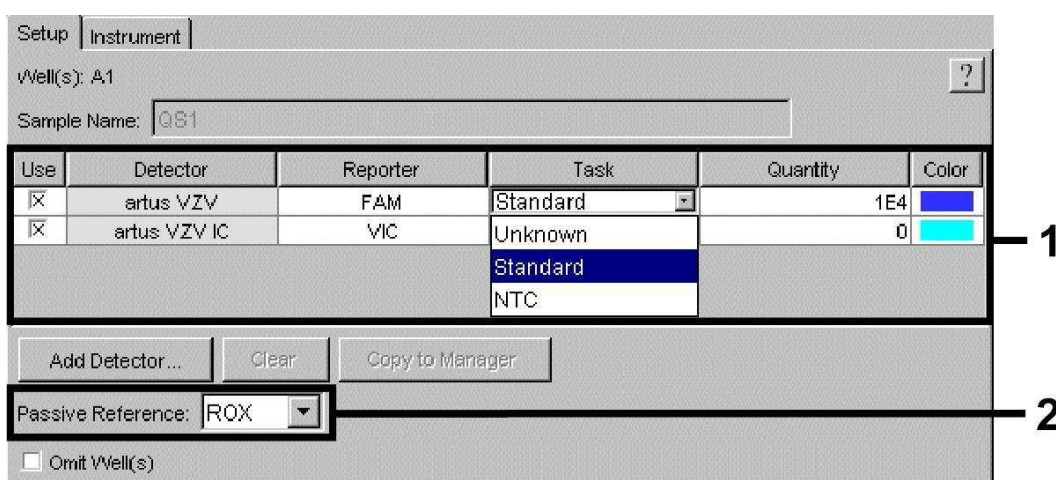


Fig. 20: Tilldelning av nödvändig information till plattpositionerna.

Markera de reserverade plattpositionerna för detektionen av VZV-DNA. Tilldela dessa positioner de valda detektorerna genom att aktivera *Use*-alternativet för båda detektorerna. Ett kryss visas. För benämning av de olika reaktionsberedningarna väljer du motsvarande position på plattan och anger namnet under *Sample Name*. Tänk på att beredningar med identiska *Sample Name* och identisk detektortilldelning identifieras som replikat av programvaran och ett genomsnittsvärde på den kvantifierade patogenbelastning beräknas. Välj för varje provtyp motsvarande funktion (*Task*) enligt följande tabell:

Provtyp	Funktion (<i>Task</i>)	Koncentration (<i>Quantity</i>)	Reporter	Quencher
Prov	Unknown	-	FAM	TAMRA
Negativ kontroll	NTC	-	FAM	TAMRA
Standard	Standard	se 1. Innehåll	FAM	TAMRA

För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder* (VZV LC/TM QS 1 - 4) användas och de tillhörande koncentrationerna (se **1. Innehåll**) ska anges för varje enskild standard i fältet (*Quantity*). Tänk på att **ROX** måste vara inställd som passiv referens (*Passive Reference*) för en PCR-körning med *artus VZV TM PCR Kit*. En jämn fördelning av ROX-fluoroforer på alla PCR-beredningar i ett parti genom blandning av *VZV TM Master* säkerställer igenkänning och att *tube-to-tube*-variationer (skillnader i fluorescens mellan olika PCR-beredningar) avräknas genom *Sequence Detection Software* (normalisering).

8.5.3.4 Framtagning av temperaturprofilen

För att ange temperaturprofilen växlar du i programvaran från *Setup*-planet till *Instrument*-planet. Ange motsvarande Fig. 21 den giltiga temperaturprofilen för detektion av VZV-DNA. Kontrollera att reaktionsvolymen är inställd på 50 µl. Alternativet *9600 Emulation* ska vara aktiverat, förinställningarna för *Ramp-tid* och *Auto Increment* vara oförändrade (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

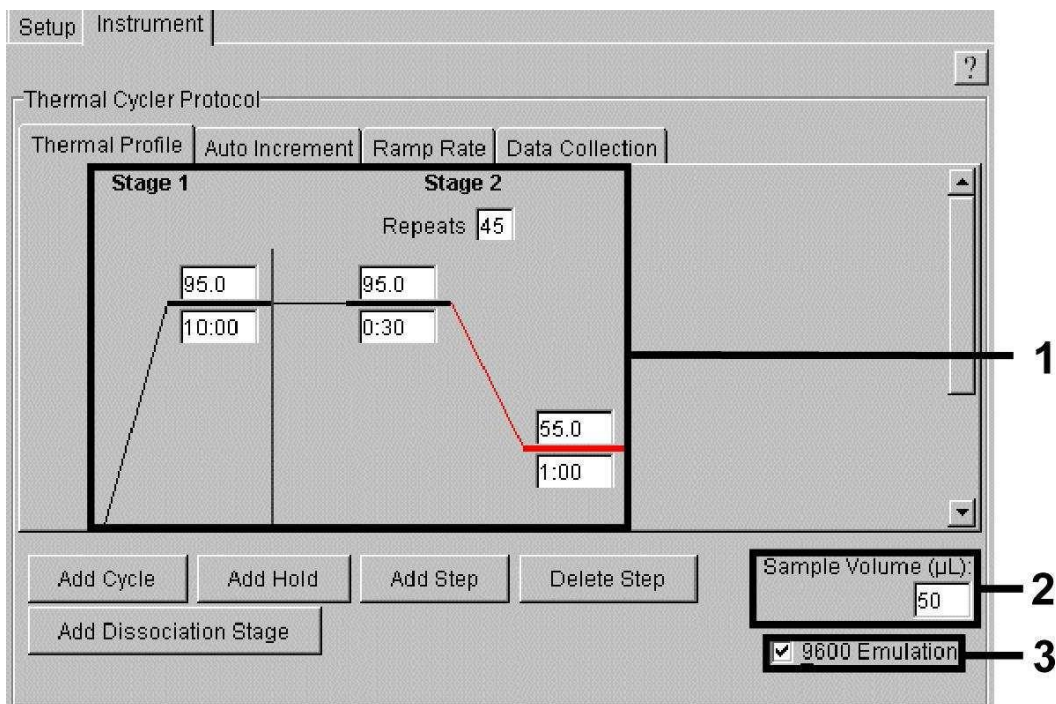


Fig. 21: Framtagning av temperaturprofilen.

Vidare finns på *Instrument*-planet alternativet *Data Collection*. Om du väljer det här alternativet kommer du till fönstret som visas i Fig. 22. Varje *Ramp*- och *Plateau*-temperatur är försedd med en symbol för datainsamling (*Data Collection Icon*), som visar insamlingen av data för den aktuella tidpunkten under körningen. Ta bort alla symboler genom att klicka på dem, fram till tidpunkten för *Annealing-Extension*-steget (*Stage2/Step2*), för att slippa onödiga fluorescensmätningar och därigenom göra körningstiden och datamängden så liten som möjligt.

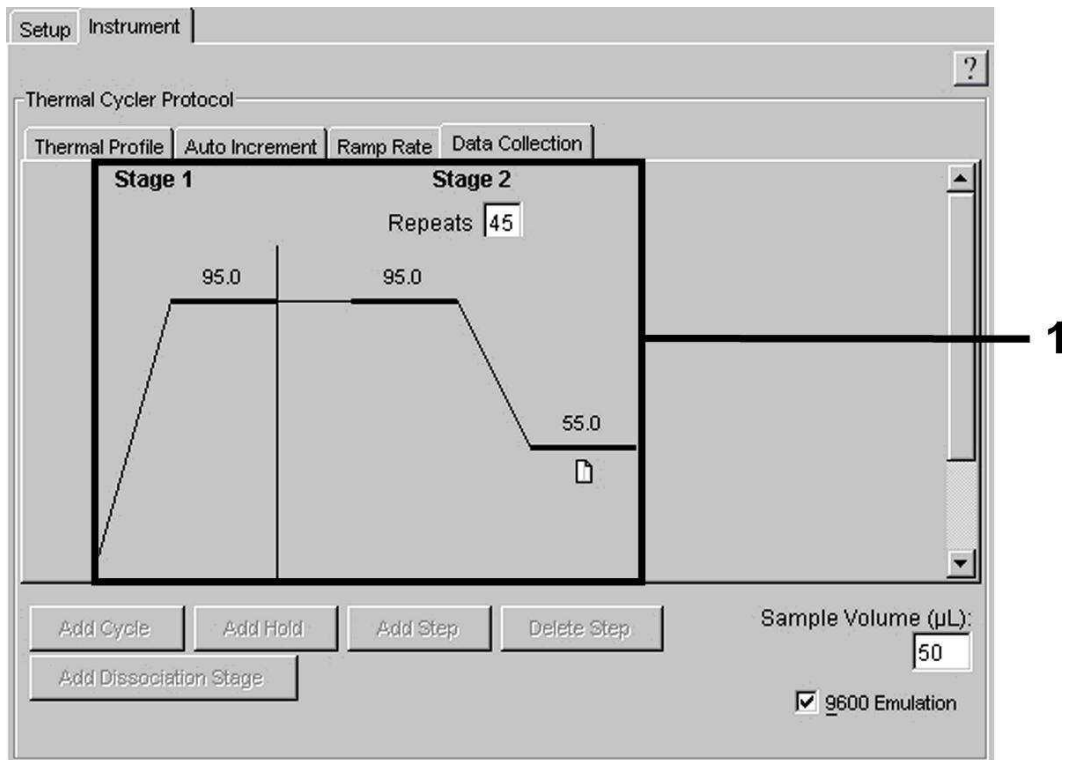


Fig. 22: Datainsamling (Data Collection).

8.5.3.5 Spara PCR-körningen

Här kan du spara de angivna inställningarna (*Setup*) som mall, för att kunna använda dem senare i förändrad eller oförändrad form. Genom att spara *Template*-filen som *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* i mappen *Template Directory* ([D:]\Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates, förinställd av Applied Biosystems), kan denna fil väljas direkt från *Template*-listan i *New Document*-fönstret. Mallar som sparats i andra mappar måste öppnas via *Browse*. Innan du startar PCR-körningen måste du spara den på nytt som *ABI PRISM SDS Document (*.sds)*. Därmed säkerställer du att även de data som tillkommer under loppet av PCR-körningen sparas.

8.5.3.6 Starta PCR-körningen

Starta PCR-körningen genom att välja alternativet *Start* under menypunkten *Instrument*.

9. Tolkning av resultat

En föreliggande giltig kalibrering av färgerna (*Pure Spectra Component File*) och bakgrunden (*Background Component File*) krävs ovillkorligen innan instrumentet tas i drift. Följande kalibreringsfilerna är nödvändiga för en exakt beräkning av resultaten:

Samtliga instrumentrelaterade störsignaler som påverkar mätningen elimineras av *Sequence Detection Software* från *ABI PRISM Sequence Detection Systems* med hjälp av *Background Component Files*.

Därtill uppträder vid flerfärgs-analyser interferenser mellan emissionsspektran av de enskilda fluorescensfärgerna. Programvaran *ABI PRISM SDS* kompenserar dessa interferenser genom en beräkning med de spektraldata för de individuella färgerna som sparats i *Pure Spectra Component File*. Tilldelningen av de fluorescensdata som samlats i det totala mätbara spektrat under PCR-förloppet till de programmerade detektorerna utför mjukvaran även med hjälp av *Pure Spectra Components*. Därefter delas förmedlade fluorescensdata för de enskilda färgerna för att avräkna *tube-to-tube*-variationer (fluorescensskillnader mellan olika PCR-beredningar) genom signalen för passiv referens (ROX). De på detta sätt normaliserade signalerna kan utvärderas med hjälp av *Amplification Plot*.

De kalibreringsfiler som används vid en utvärdering av en PCR-körning sparas automatiskt när du sparar körningen. Om inga **kalibreringsfiler** finns installerade skapar du dessa filer enligt instruktionerna i *ABI PRISM SDS User Guide/Manual*.

Om du har fler än ett *artus*™ PCR-system integrerat i din PCR-körning (**beakta temperaturprofil**), ska dessa testsystem analyseras separat. Prover med identisk benämning (*Sample Name*) och detektortilldelning identifieras automatiskt som replikat av *ABI PRISM 7000 SDS* och *7900HT SDS Software* och ett genomsnittsvärde på kvantifierad patogenbelastning beräknas.

Följande resultat kan förekomma:

1. En FAM-fluorescenssignal detekteras.

Analysresultatet är positivt. Provet innehåller VZV-DNA.

I detta fall är detektion av en VIC-fluorescenssignal (*Internkontroll*) oväsentlig, eftersom höga initiala koncentrationer av VZV-DNA (positives FAM-fluorescenssignal) kan leda till en reducerad eller utebliven fluorescenssignal för *Internkontrollen* (konkurrens).

2. Ingen FAM-fluorescenssignal detekteras, utan endast en VIC-fluorescenssignal (signal för *Internkontroll*).

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

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

3. Varken en FAM-fluorescenssignal eller en VIC-fluorescenssignal detekteras.

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 figurerna 23/24 (*ABI PRISM 7000 SDS*), 25/26 (*ABI PRISM 7700 SDS*) och 27/28 (*ABI PRISM 7900HT SDS*).

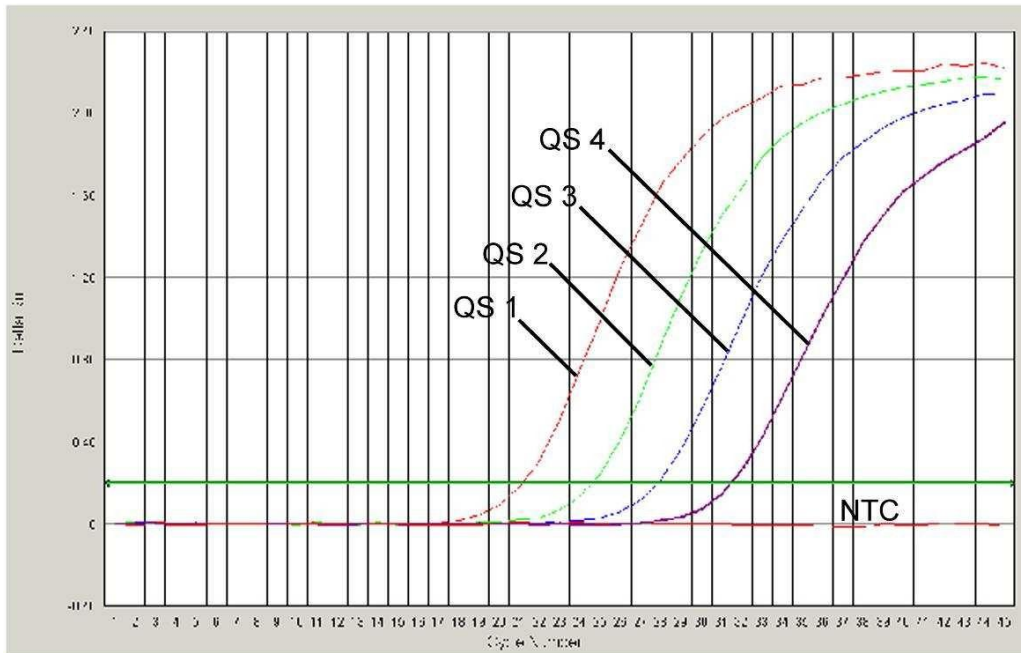


Fig. 23: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) genom detektion av en FAM-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7000 SDS**). NTC: non-template control (negativ kontroll).

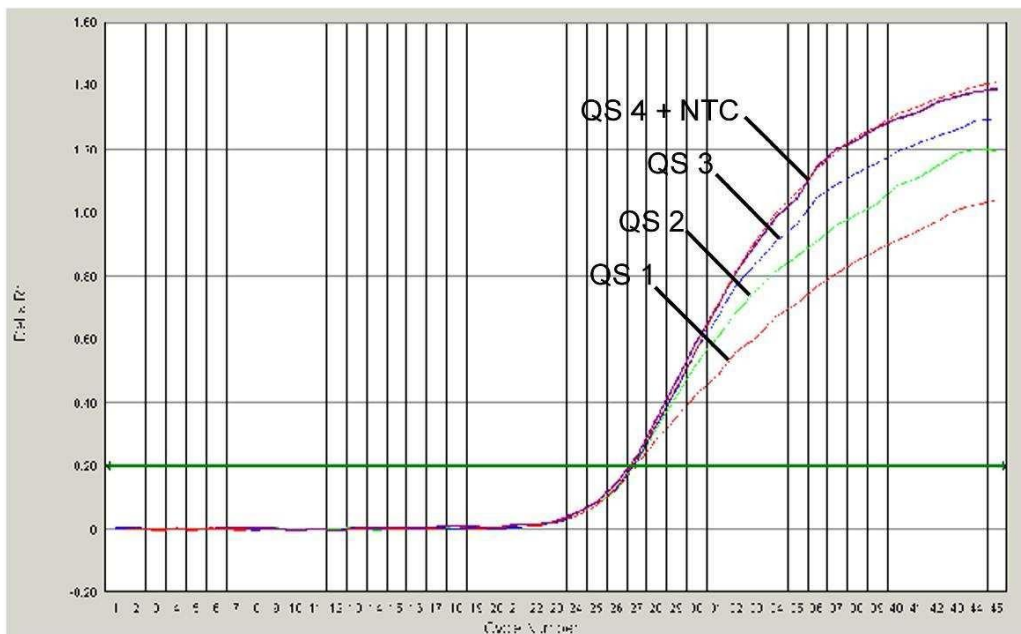


Fig. 24: Detektion av Internkontrollen (IC) genom detektion av en VIC-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7000 SDS**) med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

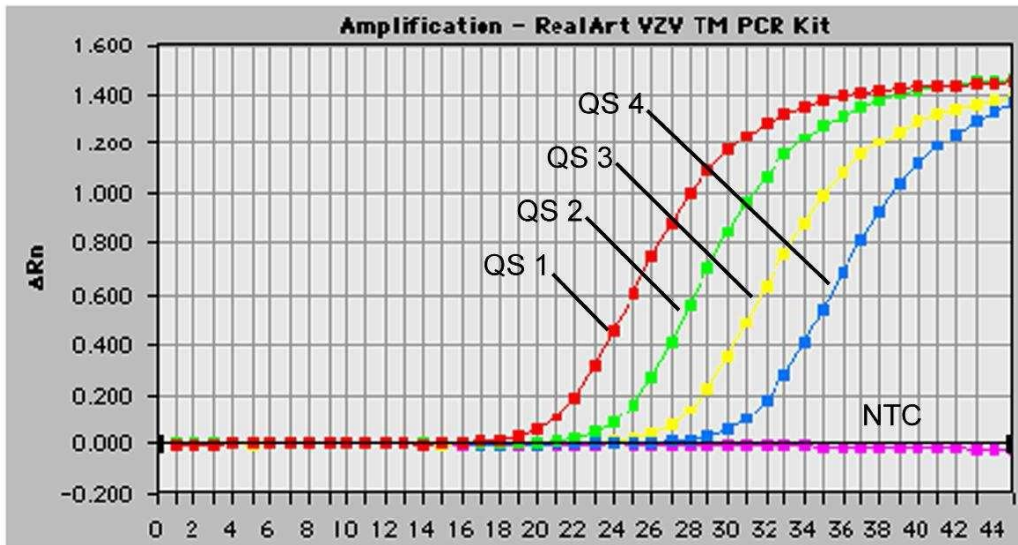


Fig. 25: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) genom detektion av en FAM-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7700 SDS**). NTC: non-template control (negativ kontroll).

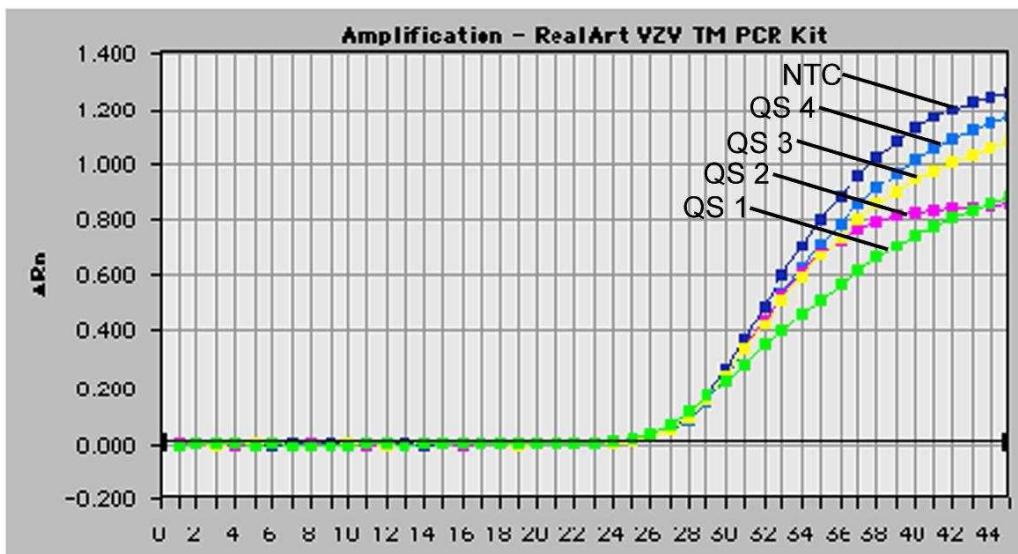


Fig. 26: Detektion av Internkontrollen (IC) genom detektion av en VIC-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7700 SDS**) med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

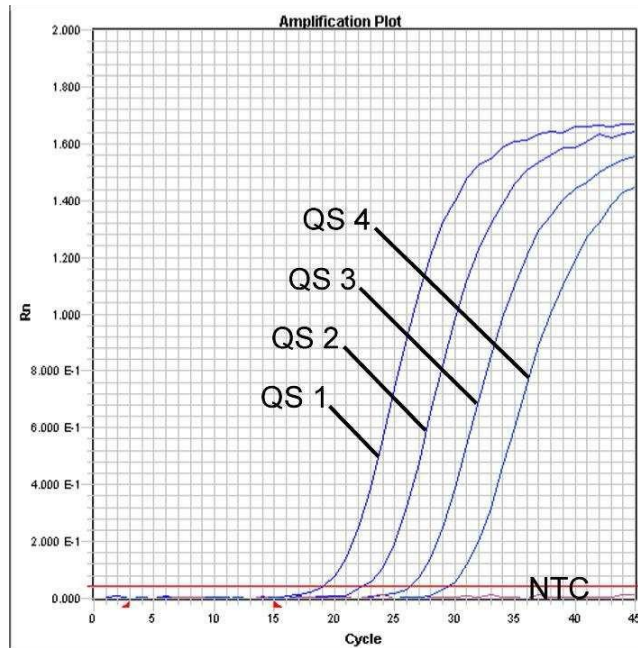


Fig. 27: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4) genom detektion av en FAM-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7900HT SDS**). NTC: non-template control (negativ kontroll).

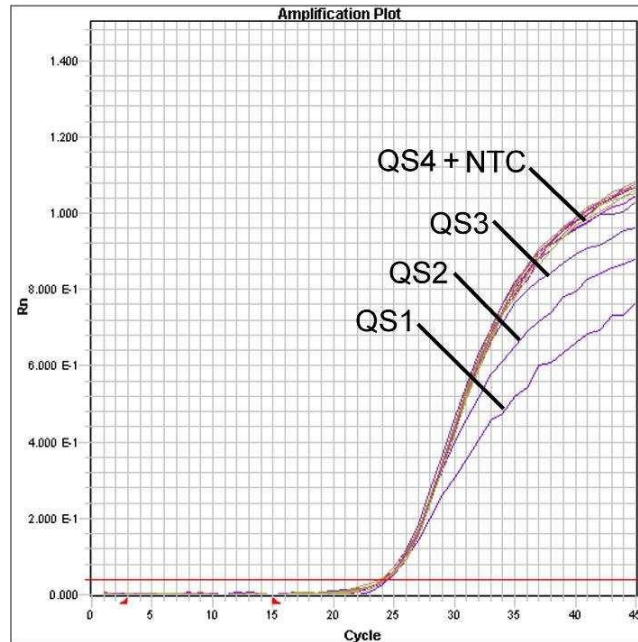


Fig. 28: Detektion av Internkontrollen (IC) genom detektion av en VIC-fluorescenssignal (**ABI PRISM 7900HT SDS**) med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (VZV LC/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

10. Felsökning

Ingen FAM-fluorescenssignal för de positiva kontrollerna (VZV LC/TM QS 1-4):

- Valet av detektorfärgämnen vid analysen av PCR-data motsvarar inte angivelserna i protokollet.
 - ❖ Välj för analysen av data detektorfärgämnet FAM för analytisk VZV-PCR och detektorfärgämnet VIC för PCR av *Internkontrollen*.
- Inställningen under *Options* för de data som ska utvärderas (*Extension Phase Data Extraction*) stämmer inte överens med inställningarna för *Data Collection* (för *ABI PRISM 7700 SDS* se **8.5.2.4 Framtagning av temperaturprofilen**, för *ABI PRISM 7900 HT SDS* se **8.5.3.4 Framtagning av temperaturprofilen**).
 - ❖ Analysera PCR-körningen med korrigerade inställningar och upprepa utvärderingen (*Analysis*).
- Programmeringen av temperaturprofilen för *ABI PRISM Sequence Detection Systems* var felaktig.
 - ❖ Jämför temperaturprofilen med angivelserna i protokollet (se **8.5 Programmering av ABI PRISM® SDS**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontrollera arbetsstegen med hjälp av pipetteringsschemat (se **8.4 Förberedelser av PCR**) och upprepa, om nödvändigt, PCR.
- Förvaringsanvisningarna för en eller flera av kit-komponenterna har inte följts enligt föreskrifterna i **2. Förvaring**, eller hållbarhetsdatumet för *artus VZV TM 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* (VIC-fluorescenssignal) vid samtidig frånvaro av en FAM-fluorescenssignal för specifik VZV-PCR:

- 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.
 - ◆ Förvissa 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 VZV TM 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.

De negativa kontrollerna har en FAM-fluorescenssignal i analytisk PCR.

- En kontamination föreligger under PCR förberedelserna.
 - ◆ Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.
 - ◆ Förslut de enskilda PCR-reaktionsrören 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 PCRen 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 vår tekniska service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

För bestämning av den analytiska sensitiviteten hos *artus VZV TM PCR Kit* bereddes en standard-spädningsserie från 60 till nominellt 0,019 VZV-kopieekvivalent*/ μl . Denna analyserades sedan med hjälp av *artus VZV TM PCR Kit* med *ABI PRISM 7000*, *7700* och *7900HT Sequence Detection Systems*. Undersökningarna genomfördes för varje instrument under tre olika dagar i form av åttafaldiga bestämningar. Resultaten har tagits fram med hjälp av en probit-analys. Den grafiska utvärderingen (*ABI PRISM 7700 SDS*) framgår av Fig.29.

Detektionsgräns ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,4 kopior/ μl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,6 kopior/ μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,3 kopior/ μl

Detta innebär att vid 95 % konfidens 0,4 kopior/ μl (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,6 kopior/ μl (*ABI PRISM 7700 SDS*) resp. 0,3 kopior/ μl (*ABI PRISM 7900HT SDS*) kan detekteras.

* För den standard som används här rör det sig om en klonad PCR-produkt, vars koncentration har bestämts spektral- och fluorescensfotometriskt.

Probit-analys: Varizella-zoster-virus (ABI PRISM 7700 SDS)

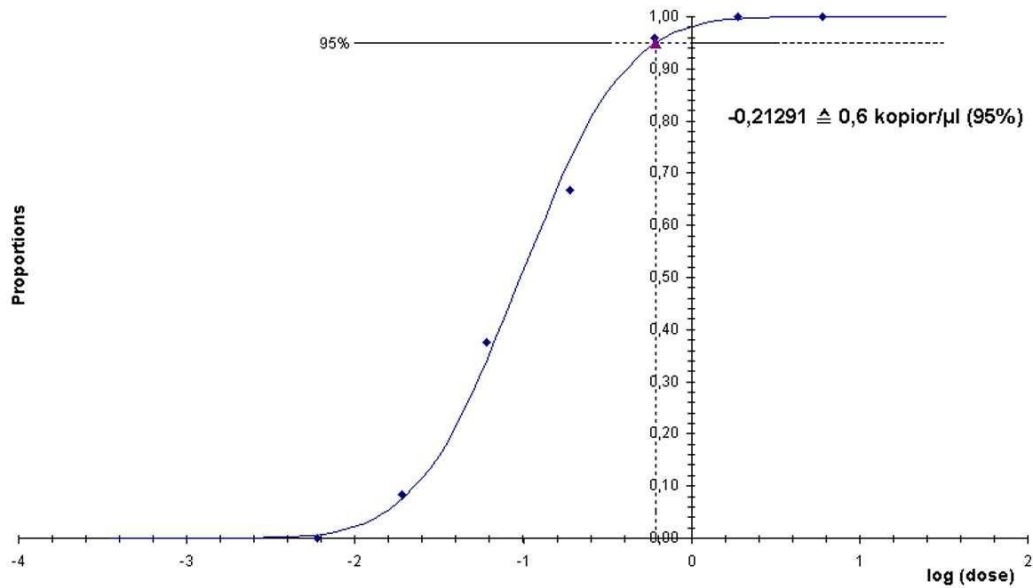


Fig. 29: Analytisk sensitivitet för *artus* VZV TM PCR Kit (ABI PRISM 7700 SDS).

11.2 Specificitet

Specificiteten för *artus* VZV TM 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 stammar detekteras.

Valideringen av specificiteten genomfördes även på 30 olika VZV negativa CSF (Cerebrospinalvätska) vilka inte genererade någon signal med de VZV specifika primers och prober som finns i *VZV TM Master*.

För bestämning av specificiteten av *artus* VZV TM 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	VZV (FAM)	Internkontroll (VIC)
Humant herpesvirus 1 (Herpes-simplex-virus 1)	-	+
Humant herpesvirus 2 (Herpes-simplex-virus 2)	-	+
Humant herpesvirus 4 (Epstein-Barr-virus)	-	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalievirus)	-	+
Humant herpesvirus 6A	-	+
Humant herpesvirus 6B	-	+
Humant herpesvirus 7	-	+
Humant herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

11.3 Precision

Precisionsdatan för *artus* VZV TM PCR Kit tillåter framtagandet av totalvariansen (total variabilitet) av testsystemet. Denna totalvarians består av **Intra-Assay-variabilitet** (variabilitet mellan prover av samma koncentration inom en undersökningsomgång), **Inter-Assay-variabilitet** (variabilitet av analysresultat genererade på olika instrument av samma typ av olika användare inom ett laboratorium) och **Inter-Batch-variabilitet** (variabilitet av analysresultat vid användning av olika batcher). Därvid beräknas standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten, såväl för det patogen-specifika som för PCR av *Internkontrollen*.

Dessa data togs fram för *artus* VZV TM PCR Kit med hjälp av *Kvantifieringsstandard* med den lägsta koncentrationen (QS 4; 10 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes i form av åttafaldiga bestämningar. Utvärderingen av resultaten gjordes med amplifikationskurvornas Ct-värden (Ct: *threshold cycle*, se Tabell 2) och de därifrån förmedlade kvantitativa värdena i kopior/ μ l (se Tabell 3). Således utgör den totala statistiska spridningen hos ett godtyckligt prov med den benämnda koncentrationen 0,72 % (Ct) alt. 8,33 % (konc.), för detektion av *Internkontrollen* 1,40 % (Ct). Dessa värden baseras på summan av alla enskilda bestämda variabiliteter.

Tabell 2: Precisionsdata baserade på Ct-värdena.

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,13	0,02	0,42
Intra-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,08	0,01	0,25
Inter-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,13	0,02	0,40
Inter-Assay-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,20	0,04	0,64
Inter-Batch-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,30	0,09	0,93
Inter-Batch-variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,61	0,37	1,98
Totalvarians: VZV LC/TM QS 4	0,23	0,05	0,72
Totalvarians: <i>Internkontroll</i>	0,43	0,18	1,40

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

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,95	0,91	9,48
Inter-Assay-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,70	0,48	6,93
Inter-Batch-variabilitet: VZV LC/TM QS 4	0,96	0,91	9,52
Totalvarians: VZV LC/TM QS 4	0,84	0,70	8,33

11.4 Robusthet

Undersökningen av robustheten tjänar syftet att förmedla den totala felfrekvensen för *artus* VZV TM PCR Kit. För detta ändamål blandades 30 VZV negativa CSF (Cerebrospinalvätska) prover med vardera 1,8 kopior/ μ l elutionsvolym VZV-kontroll-DNA (trefaldig koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen), isolerades med QIAamp DNA Mini Kit (se **8.1 DNA-isolering**) och analyserades med *artus* VZV TM PCR Kit. Felfrekvensen för VZV var 0 % för alla proven. *Internkontrollens* robusthet prövades dessutom genom isolering och analys av vardera 30 VZV negativa CSF (Cerebrospinalvätska) prover. Felfrekvensen var 0 %. Inhibering kunde inte iaktas. Robustheten för *artus* VZV TM PCR Kit är således ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhet

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

11.6 Diagnostisk utvärdering

artus VZV TM 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* VZV TM PCR Kit hittar du i tillhörande säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). Detta hittar du som kompakt och användarvänlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.









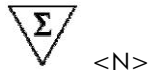

14. Kvalitetskontroll

Enligt QIAGENs certifierade kvalitets-management-system ISO 9001 och ISO 13485 testades varje tillverkningsats *artus* VZV TM 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 VZV TM PCR Kit

Varumärken och friskrivningar

QIAGEN[®], QIAamp[®], artus[®], BioRobot[®], EZ1[®], UltraSens[®] (QIAGEN Group); AB/ PR/SM[®]; MicroAmp[®], GeneAmp[®] (Life Technologies Corporation).

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

artus VZV TM 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

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

