

Oktober 2015

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



Version 1
För användning med Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, TYSKLAND

1096239-SV

Distribuerad av QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

instrument

Sample to Insight



Innehåll

Användningsområde.....	4
Sammanfattning och förklaring.....	4
Information om patogen.....	4
Princip för proceduren.....	5
Material som medföljer.....	6
Kitinnehåll.....	6
Material som behövs men inte medföljer.....	6
Varningar och försiktighet.....	7
Varningar.....	7
Försiktighetsåtgärder.....	8
Förvaring och hantering av reagens.....	9
Kitkomponenter.....	9
Procedur.....	10
DNA-extrahering.....	10
Protokoll: Detektion av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA.....	12
Tolkning av resultat.....	23
Körning validitet.....	23
Kvalitativ analys.....	24
Kvantitativ analys.....	25
Begränsningar.....	27
Kvalitetskontroll.....	27
Prestandaegenskaper.....	28

Analytisk sensitivitet	28
Analytisk specificitet.....	29
Linjärt område.....	30
Precision	31
Repeterbarhet	33
Symboler	35
Felsökningshandbok.....	36
Beställningsinformation.....	37

Användningsområde

artus® HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96) är ett *in vitro*-diagnostiskt test baserat på real-time PCR-teknik för detektion, differentiering och kvantifiering av DNA specifikt för herpes simplexvirus 1 (HSV-1) och herpes simplexvirus 2 (HSV-2).

Sammanfattning och förklaring

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit utgör ett bruksfärdigt system för detektionen av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA med användning av real-time PCR i Rotor-Gene Q instrument. Analysen inkluderar ett heterogent amplifieringssystem (intern kontroll) för att identifiera eventuell PCR-inhibering och för att bekräfta integriteten för reagensen i kitet.

Information om patogen

Herpes simplexvirus 1 (HSV-1) och herpes simplexvirus 2 (HSV-2) tillhör familjen *Herpesviridae* och klassificeras, tillsammans med VZV, som *Alphaherpesvirinae*. HSV-1 och HSV-2 har ett linjärt dubbelsträngat DNA-genom på cirka 150 kbp. HSV-1 och HSV-2 delar över 80 % nukleotid identitet inom den proteinkodande regionen.

Infektioner med herpes simplex inträffar globalt utan någon säsongfördelning. Virusets sprids via direktkontakt med virus i sekret. Prevalensen för HSV-1-infektion ökar successivt från barndomen och når 80 % och mer under senare år, medan seroprevalensen för HSV-2 är låg till tonåren. De flesta primära HSV-1-infektioner förvärfas som subkliniska eller okända infektioner. Primära infektioner med HSV-2 visar sig klassiskt som herpes genitalis. Primär infektion med HSV-1 eller HSV-2 följs av latens i dorsala rotganglier. Viruset reaktiveras periodiskt och förflyttar sig via nervaxonet till orala eller genitala platser, vilket leder till frisättning av infektionsvirus och, i vissa fall, lesionsbildning. HSV-infektioner kan, även om de vanligtvis är asymtomatiska, leda till ett brett spektrum av kliniska

manifestationer, inklusive oral herpes, genital herpes, neonatal herpes, encefalit och okulär herpes.

Princip för proceduren

HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B innehåller reagenser och enzymer för den specifika amplifieringen av målregioner i HSV-1- och HSV-2-genomet, och för direkt detektion av den specifika amplikonen i fluorescenskanalerna Cycling Green och Cycling Red på Rotor-Gene Q instrument.

Dessutom innehåller *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ett heterologt amplifieringssystem för detektion av eventuella fel under analysen. Dessa detekteras som en intern kontroll (IC) i fluorescenskanalen Cycling Yellow i Rotor-Gene Q instrument.

Prober som är specifika för HSV-1 DNA är märkta med fluoroforen FAM™, medan prober specifika för HSV-2 DNA är märkta med en fluorofor som uppvisar samma egenskaper som Cy®5. Proben som är specifik för den interna kontrollen (IC) är märkt med fluoroforen JOE™. Användning av prober märkta med spektralt urskiljbara fluoroforer möjliggör simultan detektion och kvantifiering av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA samt detektion av den interna kontrollen i motsvarande kanaler i Rotor-Gene Q instrument.

Material som medföljer

Kitinnehåll

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4515265
Antal reaktioner		96
Blå	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Purpur	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Grön	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Röd	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Orange	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Vit	H ₂ O	1 x 500 µl
	Handbok	1

Dessutom innehåller *artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit* 4 HSV-1 kvantifieringsstandarder (QS1–QS4) samt 4 HSV-2 kvantifieringsstandarder (QS1–QS4).

Material som behövs men inte medföljer

Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer före användning.

Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAamp DNA Mini-kit) (QIAGEN kat. nr 51304 eller 51306; se "DNA-extrahering", sidan 10)

Förbrukningsartiklar

- 0,1 ml Strip Tubes and Caps (strip-rör och lock) för användning med 72-well rotor (72-brunnars rotor) (QIAGEN, kat.nr 981103 eller 981106)
- Nukleasfria, mikrocentrifugrör med låg DNA-bindning för beredning av masterblandningar.
- Nukleasfria pipettspetsar med aerosolbarriärer.

Utrustning

- Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex eller Rotor-Gene Q 6plex instrument
- Rotor-Gene Q programversion 2.3.1 eller högre
- Loading block (laddningsblock) 72 x 0,1 ml rör, aluminium block for manual reaction setup (aluminiumblock för manuell reaktionsinställning) (QIAGEN, kat.nr 9018901)
- Justerbara pipetter avsedda för provberedning
- Justerbara pipetter avsedda för beredning av PCR masterblandning
- Justerbara pipetter avsedda för dispensering av DNA-templat
- Vortexblandare
- Bänkcentrifug med rotor för 2 ml-reaktionsrör

Varningar och försiktighet

För *in vitro*-diagnostisk användning.

Läs alla anvisningar noga innan du använder testet.

Varningar

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Försiktighetsåtgärder

- Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i teknikerna för real-time PCR och *in vitro*-diagnostiska förfaranden.
- Prover ska alltid hanteras som smittsamma och/eller biologiskt farliga i enlighet med säkra laboratorieförfaranden.
- Använd puderfria engångshandskar, en laboratorierock och skyddsglasögon vid hantering av prover.
- Förhindra mikrobiell och nukleas (DNase/RNase) kontaminering av proverna och komponenterna i kitet.
- Använd alltid engångspipettspetsar med aerosolbarriärer fria från DNase/RNase.
- Använd alltid puderfria engångshandskar vid hantering av kitkomponenter.
- Använd separata och åtskilda arbetsområden för beredning av prover, reaktionsinställning och amplifiering/detektion. Arbetsflödet på laboratoriet ska ske i en riktning. Använd alltid engångshandskar i varje område, och byt ut dem innan du går vidare till nästa område.
- Material och utrustning ska vara avsedda för de olika arbetsområdena och inte flyttas från ett område till ett annat.
- Förvara positivt och/eller potentiellt positivt material separat från alla andra komponenter i kitet.
- Öppna inte reaktionsrör/-plattor efter amplifiering för att förhindra kontaminering med amplikoner.
- Ytterligare kontroller kan testas enligt riktlinjerna eller kraven i lokala eller nationella regelverk eller från ackrediteringsorganisationer.
- Använd inte komponenter i kitet efter utgångsdatum.
- Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Förvaring och hantering av reagens

Kitkomponenter

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit transporteras på kolsyresnö. Komponenterna i kitet ska vara frysta vid mottagandet. Om en eller flera komponenter inte är frysta vid mottagandet, eller om rören har äventyrats under transporten ska du kontakta QIAGEN:s tekniska service för hjälp. Vid mottagandet ska alla kitkomponenter förvaras vid $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Undvik upprepad tining och frysning av masterreagenser (mer än två gånger) eftersom detta kan minska analysens prestanda. Frys reagenserna i aliquoter om de ska användas då och då. Förvara inte reagenser vid $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i längre än 2 timmar. HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B är ljuskänsligt.

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit inkluderar:

- Två masterreagenser (HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B)
- Mall för intern kontroll (HSV-1/2 RG IC)
- Fyra HSV-1 kvantifieringsstandarder (HSV-1 QS1–QS4)
- Fyra HSV-2 kvantifieringsstandarder (HSV-2 QS1–QS4)
- Vatten (H_2O), PCR-kvalitet

Reagenserna HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B innehåller alla komponenter (buffert, enzymer, primrar och prober) för amplifiering och detektion av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA och den interna kontrollen i en enda reaktion.

Kvantifieringsstandarderna innehåller standardiserade koncentrationer av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA. Dessa kan användas separat som positiva kontroller eller tillsammans för att skapa en standardkurva som kan användas för att fastställa koncentrationen av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA i provet. Koncentrationerna av kvantifieringsstandarderna visas i tabell 1.

Tabell 1. Kvantifieringsstandardernas koncentration

Kvantifieringsstandard	Koncentration (kopior/ μ l)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10.000	10.000
QS2	1.000	1.000
QS3	100	100
QS4	10	10

Procedur

DNA-extrahering

De specifika målsekvenserna för HSV-1 och HSV-2 är amplifierade från DNA. Eftersom analysprestanda är beroende av kvaliteten på DNA-templaten, kontrollera att du använder ett provberedningskit som ger DNA som är lämpligt att använda vid nedströms PCR.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, kat. nr. 51304 eller 51306) rekommenderas för DNA-rening för användning med *artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit*. Utför DNA-reningen enligt anvisningarna i *handbok till QIAamp Mini* (Handbok till QiAamp DNA Mini (engelska).

Eftersom tvättbufferten i QIAamp DNA Mini Kit innehåller etanol ska ett ytterligare centrifugeringssteg utföras före eluering. Placera QIAamp Mini spinkolonn i ett nytt 2 ml provrör och kasta det gamla provröret med filtratet. Centrifugera i 10 minuter vid cirka 17.000 x g (~13.000 varv/min) i en bänkcentrifug.

Viktigt! Användningen av bärar-RNA är viktig för extraktionseffektiviteten och stabiliteten hos den extraherade nukleinsyran.

Viktigt! Etanol är en stark hämmare vid real-time PCR. Om ditt provberedningskit använder tvättbuffert som innehåller etanol, kontrollera att du tar bort alla spår av etanol före eluering av nukleinsyran.

Intern kontroll

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit innehåller en heterolog intern kontroll, som antingen kan användas som en PRC-inhiberingskontroll eller som en kontroll av provberedningsförfarandet (extrahering av nukleinsyra) och som en PCR-inhiberingskontroll.

Om den interna kontrollen används som en PCR-inhiberingskontroll, men inte som en kontroll för provberedningsförfarandet, tillsätt den interna kontrollen direkt till blandningen av HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B, enligt beskrivningen i steg 2b i protokollet (sidan 13).

Oavsett vilken metod/system som används för extrahering av nukleinsyra får den interna kontrollen inte tillsättas direkt till provet. Den interna kontrollen ska alltid tillsättas direkt till blandningen av prov/lyseringsbuffert. Volymen på den interna kontroll som ska tillsättas till blandningen prov/lyseringsbuffert beror bara på elueringsvolymen och motsvarar 10 % av elueringsvolymen. Till exempel vid användning av QIAamp DNA Mini Kit elueras DNA i 60 µl buffert AE. Tillsätt därför 6 µl intern kontroll till blandningen prov/lyseringsbuffert för varje prov.

Viktigt! Tillsätt inte den interna kontrollen och/eller bärar-RNA direkt till provet.

Protokoll: Detektion av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar förfarandet läser du "Försiktighetsåtgärder", sidan 8.
- Ta dig tid att bekanta dig med Rotor-Gene Q instrument innan du startar protokollet. Se instrumentets användarhandbok.
- Säkerställ att minst en positiv kontroll och en negativ kontroll (vatten, PCR-kvalitet) ingår i varje PCR-körning.

Saker som ska utföras före start

- Säkerställ att kylblocket (tillbehör till Rotor-Gene Q instrument) är förkylt till 2–8 °C.
- Före varje användning måste alla reagenser finas helt, blandas (pipettera upprepade gånger upp och ned eller vortex-blanda snabbt) och centrifugeras under kort tid.

Procedur

1. Placera önskat antal PCR-rör i kylblockets adaptrar.
2. Om du använder den interna kontrollen för att övervaka DNA-isoleringen och kontrollera eventuell PCR-inhibering, följ steg 2a. Om du använder den interna kontrollen uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering, följ steg 2b.

Använd den interna kontrollen enligt steg 2b för alla prov, kontroller och kvantifieringsstandarder som ska analyseras.

- 2a. Den interna kontrollen har redan tillsatts till isolatet (se "Intern kontroll", sidan 11). I detta fall ska du bereda en masterblandning enligt tabell 2.

Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 2. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används för att övervaka DNA-isolering och kontrollera PCR-inhibering)

Komponent	1 reaktion	12 reaktioner
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Total volym	20 µl	240 µl

2b. Den interna kontrollen måste tillsättas direkt till blandningen av HSV-1/2 RG Master A och HSV-1/2 RG Master B. I detta fall, bered en masterblandning enligt tabell 3. Reaktionsblandningen innehåller vanligtvis alla komponenter som behövs för PCR, förutom provet.

Tabell 3. Beredning av masterblandning (intern kontroll som används uteslutande för att kontrollera PCR-inhibering)

Komponent	1 reaktion	12 reaktioner
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
HSV-1/2 RG IC	1 µl	12 µl
Total volym	21 µl	252 µl

* Volymökningen som orsakas av tillsats av den interna kontrollen är försumbar vid förberedelse av PCR-analysen. Detektionssystemets sensitivitet försämras inte.

3. Pipettera 20 µl av masterblandningen i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 10 µl eluerat prov-DNA och blanda väl genom pipettering upp och ned flera gånger. Tillsätt på motsvarande sätt 10 µl positiv kontroll eller kvantifieringsstandard eller 10 µl H₂O (PCR-kvalitet) som negativ kontroll.

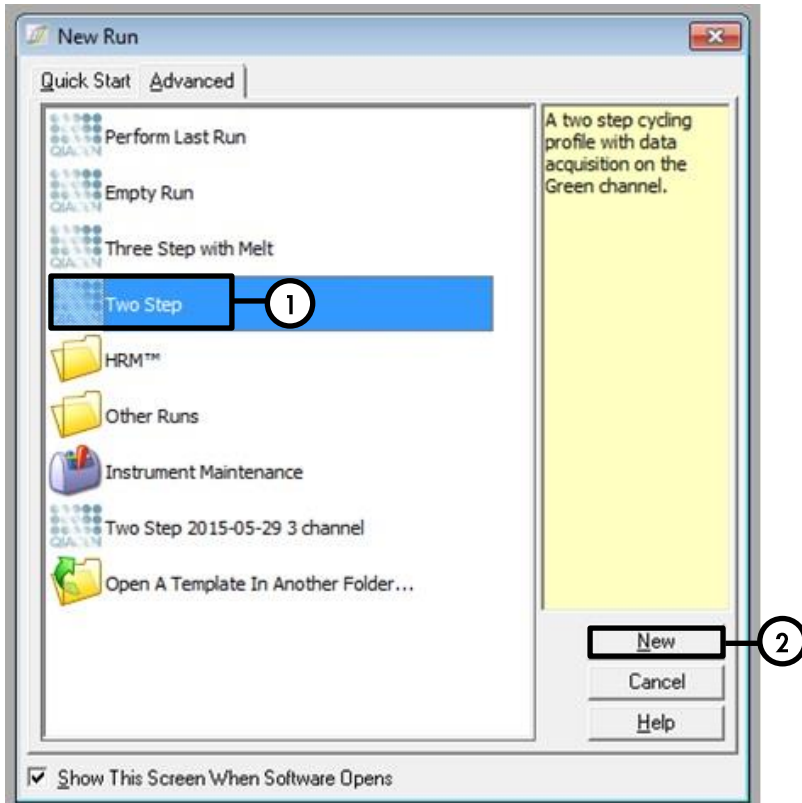
Säkerställ att minst en positiv kontroll och en negativ kontroll ingår i varje körning. Använd alla 8 kvantifieringsstandarder (HSV1 QS1–QS4 och HSV2 QS1–QS4) för kvantifiering.

4. Stäng PCR-rören. Kontrollera att låsringen (tillbehör till Rotor-Gene instrument) är placerad överst på rotorn.
5. Skapa en temperaturprofil för detektion av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA genom att utföra följande steg.

Inställning av allmänna analysparametrar	Figur 1, 2, 3, 4
Första aktivering av enzym med varmstart	Figur 5
DNA-amplifiering	Figur 6
Justering av fluorescenskanalsensitiviteten	Figur 7
Start av körningen	Figur 8

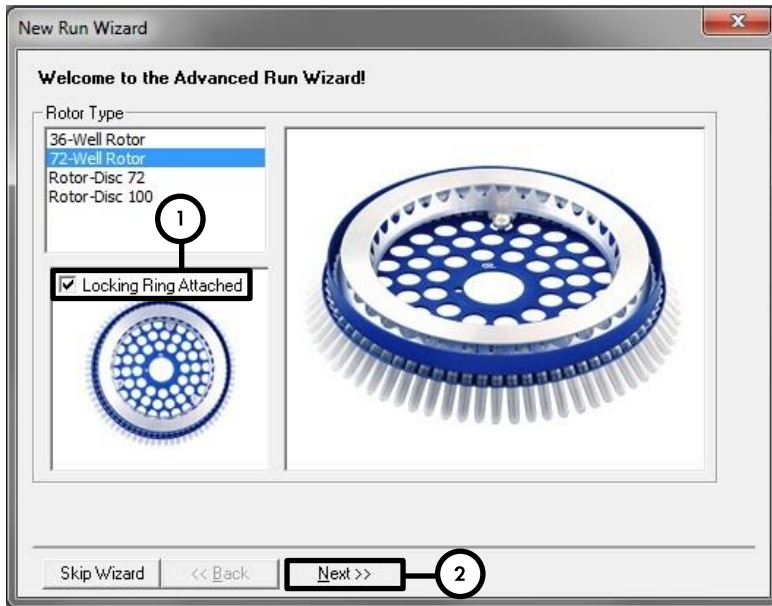
Alla specifikationer hänför sig till Rotor-Gene Q, programversion 2.3.1 och högre. Mer information om hur du programmerar Rotor-Gene Q instrument hittar du i användarhandboken till instrumentet. I illustrationerna är dessa inställningar inramade i svart fet stil.

6. Öppna först dialogrutan **New Run Wizard** (Ny körning av guide) med versionen **Advanced** (Avancerad) och välj **Two Step** (Två steg) (figur 1). Klicka på **Next** (Nästa) för att fortsätta.



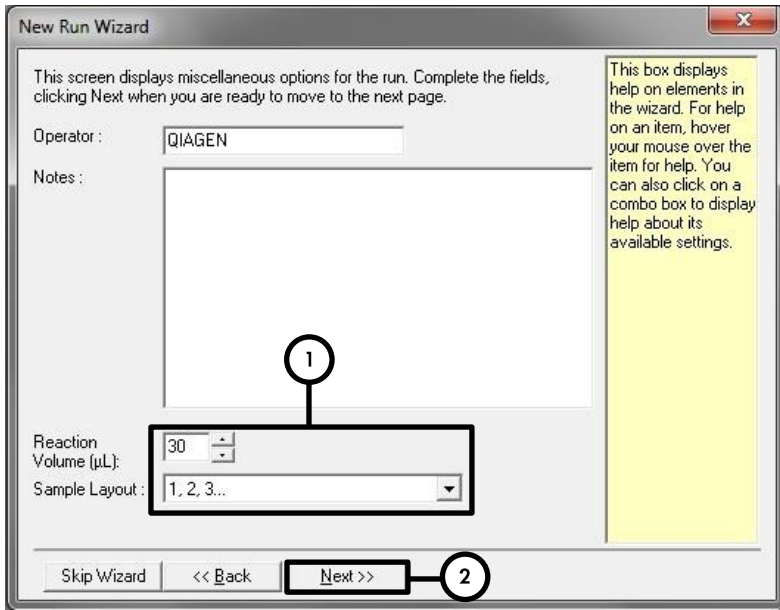
Figur 1. Dialogrutan "New Run" (ny körning).

7. Markera rutan **Locking Ring Attached** (Låsring ansluten) och klicka på **Next** i nästa dialogruta, **New Run Wizard** (figur 2).



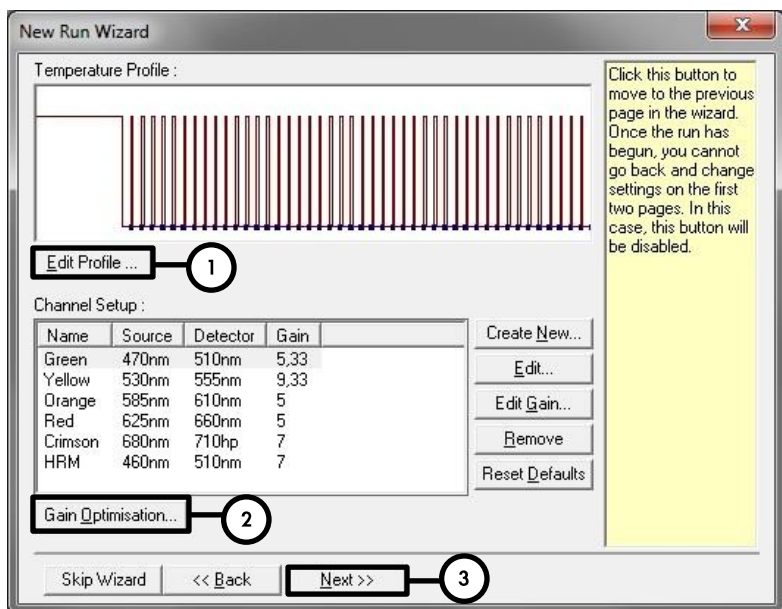
Figur 2. Dialogrutan "New Run Wizard".

8. Välj **30** för PCR-reaktionsvolymen och klicka på **Next** (figur 3).

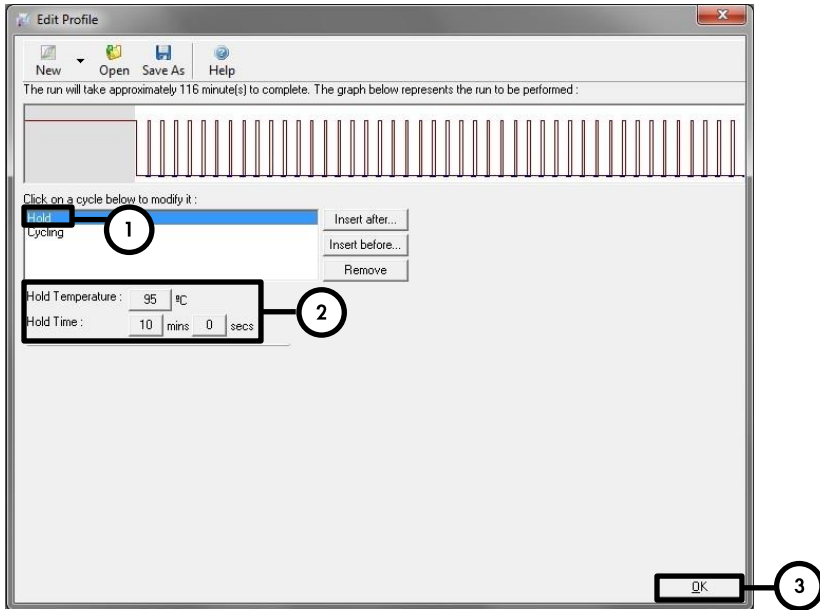


Figur 3. Inställning av allmänna analysparametrar.

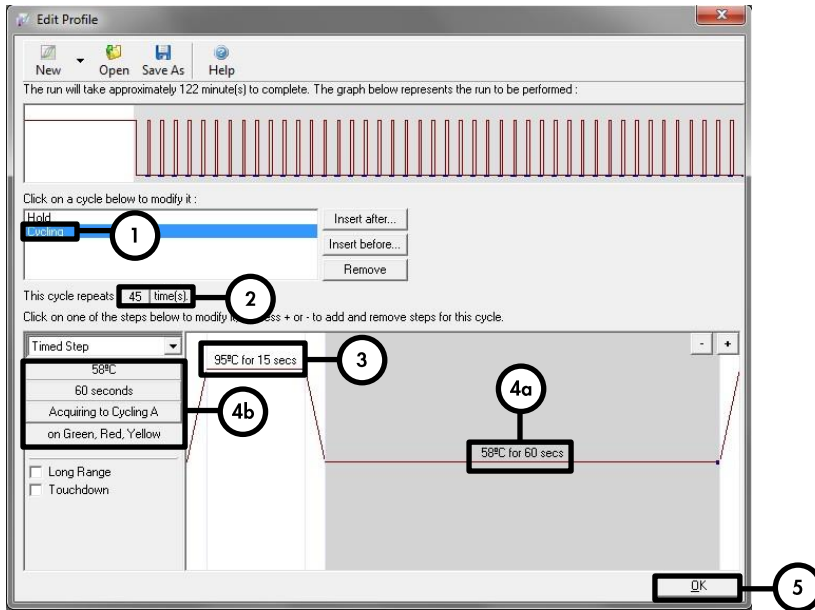
9. Klicka på knappen **Edit Profile** (Redigera profil) i nästa dialogruta, **New Run Wizard**, (figur 4), och programmera temperaturprofilen enligt bild i figur 5-6.



Figur 4. Redigering av profilen.

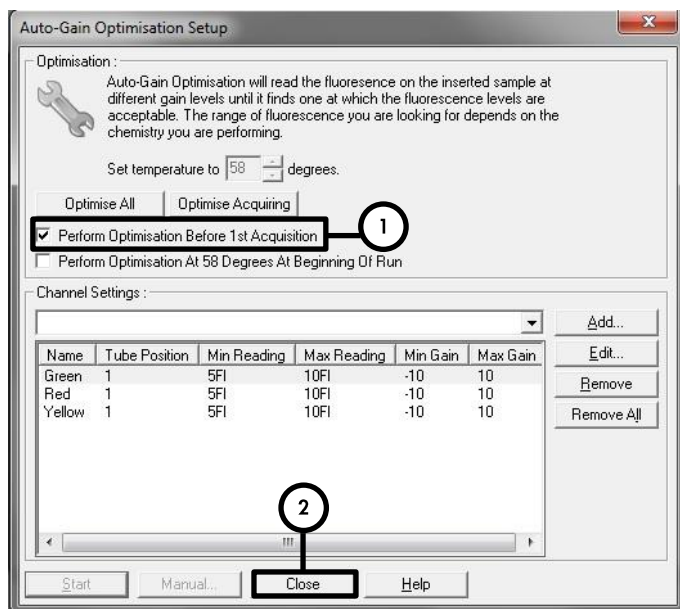


Figur 5. Första aktivering av enzym med varmstart.



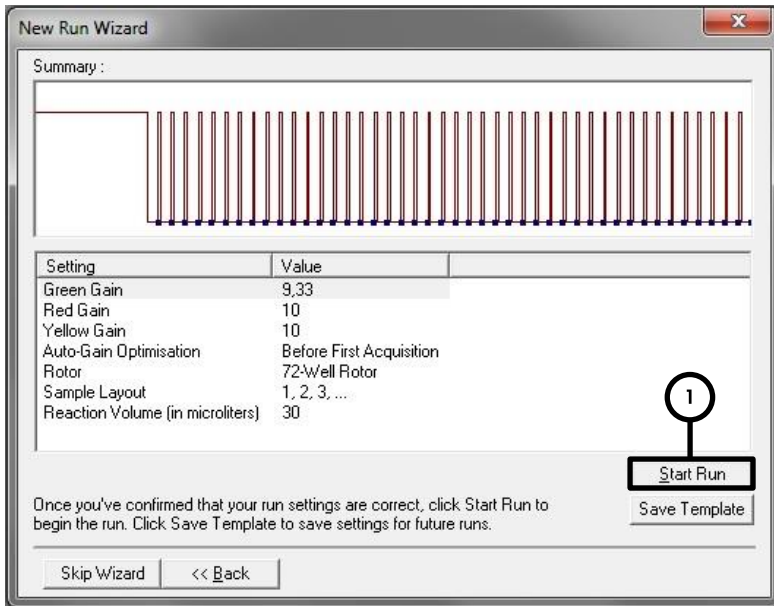
Figur 6. DNA-amplifiering.

10. Detektionsintervallet för fluorescenskanalerna måste fastställas enligt fluorescensintensiteterna i PCR-rören. Klicka på **Gain Optimisation** (Optimering av förstärkning) i dialogrutan **New Run Wizard**, (se figur 4, steg 2) för att öppna dialogrutan **Auto-Gain Optimisation Setup** (Inställningar av automatisk optimering av förstärkning) (figur 7). Markera rutan **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utför optimering före 1:a förvärv) (figur 7). Kontrollera att alla tre kanaler (grön, röd och gul) är markerade för **Auto-Gain Optimisation** (figur 7). (Hitta kanalerna i den nedrullningsbara menyn under **Channel Settings** (Kanalinställningar) och klicka på **Add** (Tillsätt).) Klicka på **Close** (Stäng) i dialogrutan **Auto-Gain Optimisation Setup** när förstärkningskalibreringen är avslutad.



Figur 7. Justering av fluorescenskanalsensitiviteten.

11. De förstärkningsvärden som fastställs av kanalkalibreringen sparas automatiskt och anges i det sista menyfönstret i programmeringsproceduren (figur 8). Klicka på **Start Run** (Starta körning).



Figur 8. Start av körningen.

12. När körningen är slutförd analyserar du uppgifterna (se "Tolkning av resultat", sidan 23).

Tolkning av resultat

Körning validitet

Giltig kvalitativ körning

Följande kontrollvillkor måste vara uppfyllda för att en kvalitativ körning ska vara giltig (tabell 4).

Tabell 4. Kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning

Kontroll-ID	Detektionskanal		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
HSV-1 positiv kontroll (QS)	POSITIV	NEGATIV	POSITIV
HSV-2 positiv kontroll (QS)	NEGATIV	POSITIV	POSITIV
Negativ kontroll	NEGATIV	NEGATIV	POSITIV

Ogiltig kvalitativ körning

En kvalitativ körning är ogiltig om körningen inte har avslutats eller om något kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning inte är uppfyllt.

Om en kvalitativ körning är ogiltig, upprepa PCR eller extrahera DNA från originalprovet igen om det inte finns något DNA kvar.

Giltig kvantitativ körning

En kvantitativ körning är giltig om alla kontrollvillkor för en giltig kvalitativ körning är uppfyllda (se tabell 4 ovan). Dessutom måste en giltig standardkurva skapas för korrekta

kvantifieringsresultat. För en giltig kvantitativ körning måste standardkurvan ha följande kontrollparametervärden (tabell 5).

Tabell 5. Kontrollparametrar för en giltig standardkurva

Kontrollparameter	Giltigt värde
Lutning	-3,743/-2,765
PCR-effektivitet	85 %/130 %
R i kvadrat (R^2)	0,98

Ogiltig kvantitativ körning

En kvantitativ körning är ogiltig om körningen inte har avslutats eller om något kontrollvillkor för en giltig kvantitativ körning inte är uppfyllt.

Om en kvantitativ körning är ogiltig, upprepa PCR eller extrahera DNA från originalprovet igen om det inte finns något DNA kvar.

Kvalitativ analys

En sammanfattning av resultattolkningen visas i tabell 6.

Tabell 6. Summering av resultattolkning

Prov-ID	Detektionskanal			Tolkning av resultat
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIV	NEGATIV	POSITIV*	HSV-1-specifikt DNA detekterat.
B	NEGATIV	POSITIV	POSITIV*	HSV-2-specifikt DNA detekterat.
C	NEGATIV	NEGATIV	POSITIV	Varken HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA detekterat. Provet innehåller inte detekterbara mängder av HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA.
D	NEGATIV	NEGATIV	NEGATIV	PCR-hämning eller reagensfel. Upprepa förfarandet med originalprov eller ta ett nytt prov och testa det.

* Detektion av den interna kontrollen i kanalen Cycling Yellow behövs inte för positiva resultat i detektionskanalen Cycling Green eller detektionskanalen Cycling Red. Höga HSV-1- eller HSV-2-belastningar i provet kan leda till minskade eller uteblivna interna kontrollsignaler.

Kvantitativ analys

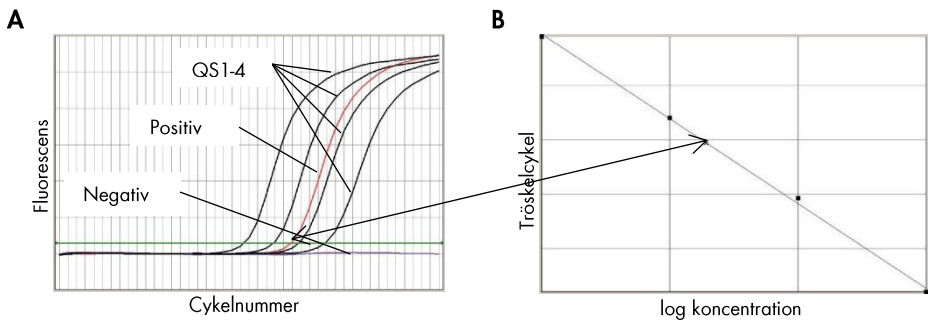
Dessutom innehåller *artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit 4* kvantifieringsstandarder (QS) för HSV-1 och 4 kvantifieringsstandarder (QS) för HSV-2. För att skapa en standardkurva för kvantitativ analys måste dessa definieras som standarder med lämpliga koncentrationer (se tabell 1, sidan 10). En standardkurva för kvantitativ analys kan skapas med hjälp av standarder för kända koncentrationer.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = Tröskelcykel
- m = Lutning
- N_0 = Initial koncentration
- b = Skärning

Koncentrationerna för positiva prov med okänd koncentration kan hämtas från standardkurvan (figur 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$



Figur 9. Kvantifieringsstandarder, ett positivt och ett negativt prov som visas i (A) en amplifieringskurva och (B) analys av standardkurva

Obs! Provets koncentration visas i kopior/ μ l och avser koncentrationen av virus-DNA i eluatet.

Använd följande formel för att fastställa virusbelastningen i originalprovet.

$$\text{Virusbelastning (prov)} \left[\frac{\text{kopior}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volym (eluat)} \left[\mu \right] \times \text{virusbelastning (eluat)} \left[\frac{\text{kopior}}{\mu \text{l}} \right]}{\text{Provinmatning} \left[\text{ml} \right]}$$

Begränsningar

- Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i teknikerna för real-time PCR och *in vitro*-diagnostiska förfaranden.
- God laboratoriepraxis är viktig för korrekt analysprestanda.
- Var extremt noggrann för att bevara renheten hos komponenterna i kitet och reaktionsinställningarna. Kontrollera alla reagenser noggrant för föroreningar och kontaminering. Kassera alla reagens som misstänks vara kontaminerade.
- Korrekt provtagning, transport, förvaring och bearbetningsförfarande krävs för optimal prestanda hos den här analysen.
- Använd inte den här analysen direkt på provet. Utför lämplig extrahering av nukleinsyra innan analysen används.
- Förekomsten av PCR-hämmare kan leda till falska negativa eller ogiltiga resultat.
- Potentiella mutationer inom målregionerna för HSV-1 och/eller HSV-2- genomet som täcks av kitets primrar och/eller prober kan leda till att det inte går att detektera förekomsten av patogenerna.
- I likhet med alla diagnostiska tester ska resultaten som erhålls med *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit tolkas genom att ta alla kliniska resultat och laboratorieresultat i beaktande.

Kvalitetskontroll

Varje lot av *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit har testats mot förutbestämda specifikationer för att garantera följdriktig produktkvalitet.

Prestandaegenskaper

De specifika prestandaegenskaperna hos *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit fastställdes med HSV-1-specifikt DNA (ATCC®-nummer: VR-1493) och HSV-2-specifikt DNA (ATCC-nummer: VR-540) för kända koncentrationer.

Analytisk sensitivitet

Den analytiska sensitiviteten hos *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit är definierad som koncentrationen (kopior per μl i eluatet) av HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA som kan detekteras med en sannolikhet på $\geq 95\%$. Den analytiska sensitiviteten fastställdes med analys av en spädningsserie av HSV-1 DNA och HSV-2 DNA med känd koncentration (tabell 7 och 8).

Tabell 7. PCR-resultat som använts för att beräkna den analytiska sensitiviteten för HSV-1-specifik amplifiering

Inmatningskoncentration (kopior/ μl)	Antal replikat	Antal positiva	Träffar (%)
3,16	12	12	100
1,0	12	12	100
0,32	12	11	91,6
0,1	12	9	75
0,03	12	6	50
0,01	12	2	16,7
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0
NTC	12	0	0

Tabell 8. PCR-resultat som använts för att beräkna den analytiska sensitiviteten för HSV-2-specifik amplifiering

Inmatningskoncentration (kopior/ μ l)	Antal replikat	Antal positiva	Träffar (%)
3,16	18	18	100
1,0	18	18	100
0,32	18	11	61,1
0,1	18	7	38,9
0,03	18	3	16,7
0,01	18	1	5,6
0,003	18	0	0
0,001	18	0	0
NTC	18	0	0

Den analytiska detektionsgränsen för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit, fastställd med probitanalys, för detektion av HSV-1-specifikt DNA är 0,33 kopior/ μ l eluat [95 % konfidensintervall (KI): 0,16-1,3 kopior/ μ l] och den analytiska sensitiviteten för detektion av HSV-2-specifikt DNA är 1,2 kopior/ μ l eluat (95 % KI: 0,7-3,5 kopior/ μ l).

Analytisk specificitet

Den analytiska specificiteten för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit garanteras genom noggrant urval av oligonukleotiderna (primrar och prober). Oligonukleotiderna kontrolleras genom sekvensjämförelseanalys mot officiellt tillgängliga sekvenser för att säkerställa att alla HSV-genotyper detekteras. Dessutom har specificiteten för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit utvärderats med test av en panel av genomiskt DNA/RNA extraherat från andra herpesvirus eller andra patogener som är relevanta för immunsupprimerade patienter (tabell 9).

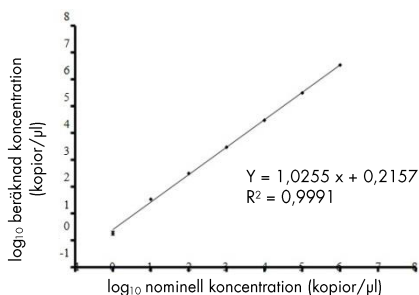
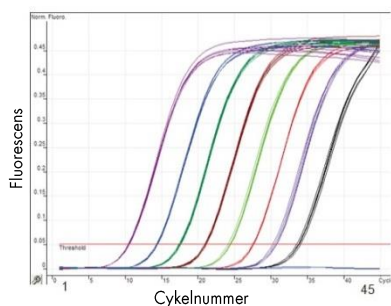
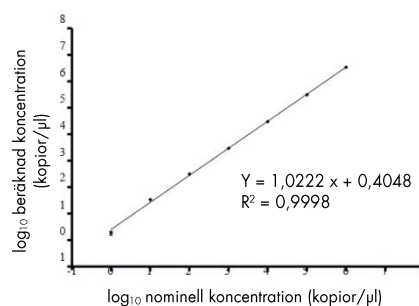
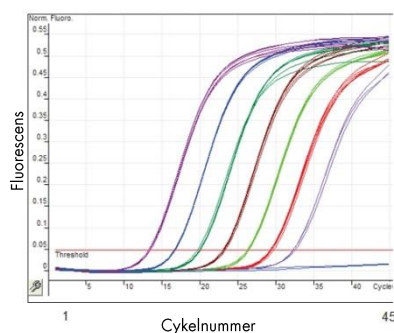
Tabell 9. Organismer som testades avseende korsreaktivitet

Organism	Detektionskanal		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Varicella-Zoster-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Epstein-Barr-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Cytomegalovirus	Negativ	Negativ	Giltig
Humant herpesvirus 6 (A, B)	Negativ	Negativ	Giltig
Humant herpesvirus 7	Negativ	Negativ	Giltig
Humant herpesvirus 8	Negativ	Negativ	Giltig
BK-virus	Negativ	Negativ	Giltig
JC-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Parvovirus B19	Negativ	Negativ	Giltig
Hepatit A-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Hepatit B-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Hepatit C-virus	Negativ	Negativ	Giltig
Humant immunbristvirus 1	Negativ	Negativ	Giltig

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit korsreagerade inte med någon av de specificerade organismerna.

Linjärt område

Det linjära området för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit fastställdes genom analys av en logaritmisk spädningsserie av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA med koncentrationer mellan 10^8 kopior/ μ l (HSV-1) (figur 10) och 10^7 och 10 kopior/ μ l (HSV-2). Minst 6 replikat per spädning analyserades.

A**B**

Figur 10. Amplifieringskurvor och linjär regressionsanalys för en spädningsserie av (A) HSV-1- och (B) HSV-2-specifikt DNA.

Det linjära intervallet för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit omfattar ett intervall av minst storleksordning 7 för HSV-1 och under ett intervall på minst storleksordning 6 för HSV-2-specifikt DNA.

Precision

Precisionen för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit fastställdes med intraanalysvariabilitet (variabilitet inom ett försök), interanalysvariabilitet (variabilitet mellan olika försök) och interlotvariabilitet (variabilitet mellan olika produktionsloter).

Variabilitetsdata uttrycks som standardavvikelse, varians och variationskoefficient. Data är baserade på kvantifieringsanalys av definierade koncentrationer av HSV-1- och HSV-2-specifikt DNA och på värden för tröskelcykel (C_T) uttryckta som intern kontroll (tabell 10-13). Minst 6 replikat per prov analyserades för intraanalys-, interanalys- och interlotvariabilitet. Total varians beräknades genom att kombinera de 3 analyserna.

Tabell 10. Amplifieringsprecision för HSV-1-specifikt DNA

HSV-1-specifikt system	Genomsnittlig konc. (kopior/μl)	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient (%)
	Intraanalysvariabilitet	91	5,3	29
	8,8	1,5	2,2	16,7
Interanalysvariabilitet	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
interlotvariabilitet	90,3	5,1	25,5	5,6
	8,7	1,2	1,5	14,2
Total varians	92,7	5,5	30,7	6,0
	8,8	1,1	1,2	12,7

Tabell 11. Amplifieringsprecision för intern kontroll för HSV-1

Intern kontroll	Genomsnittlig tröskelcykel (C _T)	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient (%)
	Intraanalysvariabilitet	23,0	0,05	0,003
Interanalysvariabilitet	22,9	0,12	0,01	0,51
interlotvariabilitet	23,5	0,61	0,37	2,6
Total varians	23,3	0,61	0,37	2,6

Tabell 12. Amplifieringsprecision för HSV-2-specifikt DNA

HSV-2-specifikt system	Genomsnittlig konc. (kopior/ μ l)	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Intraanalysvariabilitet	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Interanalysvariabilitet	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
interlotvariabilitet	102,5	9,5	90,8	9,3
	9,0	2,0	4,0	22,2
Total varians	99,6	9,0	81,7	9,1
	9,5	2,1	4,5	22,3

Tabell 13. Amplifieringsprecision för intern kontroll för HSV-2

Intern kontroll	Genomsnittlig tröskelcykel (C_t)	Standardavvikelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Intraanalysvariabilitet	24,0	0,1	0,004	0,43
Interanalysvariabilitet	23,8	0,3	0,13	1,27
Interlotvariabilitet	24,0	0,14	0,02	0,59
Total varians	23,9	0,25	0,06	1,03

Repetierbarhet

Specificitet, sensitivitet och noggrannhet för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kitet utvärderades genom analys av fastställda kvalitetspaneler för HSV. För att säkerställa repeterbarhet för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit utvärderades specificitet och sensitivitet genom analys av







fastställda kvalitetspaneler för HSV-1 och HSV-2 samt för typiska diagnostiska prover regelbundet (tabell 15).

Tabell 15. Resultat av analysen av en kvalitetspanel för HSV (QCMD)

Kvalitetspanel			artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
Prov-ID	Provinnehåll	Förväntad konc. (kopior/ml)	Detekterad konc. av HSV-1 (kopior/ml)	Detekterad konc. av HSV-2 (kopior/ml)	Intern kontroll
HSVDNA14-01	HSV-1	5.408	2.460	–	Giltig
HSVDNA14-02	HSV negativ	–	–	–	Giltig
HSVDNA14-03	HSV-1	1.135	855	–	Giltig
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Giltig
HSVDNA14-05	HSV-1	12.794	8.490	–	Giltig
HSVDNA14-06	HSV-2	1.982	–	1.881	Giltig
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Giltig
HSVDNA14-08	HSV-2	5.023	–	11.370	Giltig
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Giltig
HSVDNA14-10	VZV	–	–	–	Giltig

Symboler

Symbolerna i följande tabell används i denna bruksanvisning.

Symbol	Symboldefinition
 96	Räcker till 96 tester
	Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare

Symbol

Symboldefinition



Utgångsdatum



Materialnummer



GTINartikelnummer (Global Trade Item Number)



Se bruksanvisningen

Felsökningshandbok

Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	För 96 reaktioner: Master A, Master B, 4 kvantifieringsstandarder HSV-1, 4 kvantifieringsstandarder HSV-2, intern kontroll, H ₂ O (PCR-kvalitet)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	För 50 DNA-preparat: 50 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinas K, reagenser, buffertar, provrör (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	För 250 DNA-preparat: 250 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinas K, reagenser, buffertar, provrör (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002022

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 3 års garanti på reservdelar och arbete och 3 förebyggande underhållsbesök	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 2 års garanti på reservdelar och arbete och 2 förebyggande underhållsbesök	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	PCR-cykler i realtid med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd), laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9001570

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 3 års garanti på reservdelar och arbete och 3 förebyggande underhållsbesök	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar prioritetspaket med program, installation, utbildning, 2 års garanti på reservdelar och arbete och 2 förebyggande underhållsbesök	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	PCR-cykler i realtid med 6 kanaler (blå, grön, gul, orange, röd och karmosinröd), inklusive laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9001590

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor för fyra rör och lock för 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor för 4 rör och lock för 10.000 reaktioner)	981106

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Denna sida har med avsikt lämnats tom

Begränsat licensavtal för *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får enbart användas i enlighet med protokollen som medföljer produkten och denna handbok och får enbart användas tillsammans med komponenter som ingår i kitet. QIAGEN beviljar ingen licens under någon av företagets immateriella tillgångar för användning eller inkorporering av de medföljande komponenterna i denna sats med/i komponenter som inte ingår i denna sats, förutom vad som beskrivs i protokollen som medföljer denna produkt, denna handbok och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av dessa ytterligare protokoll har tillhandahållits av QIAGEN-användare för QIAGEN-användare. Dessa protokoll är inte noggrant testade eller optimerade av QIAGEN. QIAGEN lämnar ingen garanti för dem och garanterar heller inte att de inte utgör ett intrång på rättigheter för tredje part.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN frånsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

I och med inköpet av denna produkt kan personen använda den för diagnostiska tjänster för human *in vitro*-diagnostik. Inget allmänt patent eller annan licens av något slag förutom denna specifika användarrätt i och med inköpet beviljas härigenom.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); FAM™, JOET™ (Life Technologies Corporation); Cy® (GE Healthcare).

HB-2016-001

© 2015 altona Diagnostics GmbH, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/contact | Teknisk serve support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com