

Ekim 2015

artus[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit El Kitabı



96

Versiyon 1
Rotor-Gene[®] Q aletleriyle kullanılmak
üzere

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, ALMANYA

1096239-TR

Distribütör: QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

Sample to Insight



İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama.....	4
Patojen bilgisi	4
İşlemin Prensipleri.....	5
Sağlanan Materyal.....	6
Kit içeriği	6
Gereken ama Sağlanmayan Malzemeler	6
Uyarılar ve Önlemler	7
Uyarılar	7
Önlemler	8
Reaktif Saklama ve Muamele.....	9
Kit bileşenleri	9
İşlem	10
DNA ekstraksiyonu.....	10
Protokol: HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA saptanması	12
Sonuçların Yorumlanması.....	23
Çalışma geçerliliği	23
Kalitatif analiz	24
Kantitatif analiz	25
Sınırlamalar.....	27
Kalite Kontrol.....	27
Performans Özellikleri	28

Analitik hassasiyet	28
Analitik özgüllük.....	29
Lineer aralık.....	30
Kesinlik.....	31
Tekrarlanabilirlik.....	33
Semboller	35
Sorun Giderme Kılavuzu.....	36
Sipariş Bilgisi	37

Kullanım Amacı

artus[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96) Herpes Simpleks Virüsü 1 (HSV-1) ve Herpes Simpleks Virüsü 2 (HSV-2) spesifik DNA'nın eş zamanlı saptama ve kantifikasyonu için real-time PCR teknolojisini temel alan bir *in vitro* diagnostik testtir.

Özet ve Açıklama

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit Rotor-Gene Q aletlerinde real-time PCR kullanılarak HSV-1 ve HSV-2 spesifik DNA saptanması için kullanıma hazır bir sistem oluşturur. Analize olası PCR inhibisyonunu tanımlamak ve kit reaktiflerinin bütünlüğünü doğrulamak üzere bir heterojen amplifikasyon sistemi (Dahili Kontrol) dahildir.

Patojen bilgisi

Herpes simpleks virüsü 1 (HSV-1) ve herpes simpleks virüsü 2 (HSV-2) *Herpesviridae* ailesinin üyeleridir ve VZV ile birlikte *Alfaherpesvirinae* olarak sınıflandırılırlar. HSV-1 ve HSV-2'nin yaklaşık 150 kbp büyüklüğünde bir lineer çift iplikli DNA genomu vardır. HSV-1 ve HSV-2, protein kodlayan bölgeleri içinde %80 üzerinde nükleotid kimliği paylaşır.

Herpes simpleks virüsü enfeksiyonları herhangi bir mevsimsel dağılım olmadan dünya çapında oluşur. Virüs, sekresyonlardaki virüsle doğrudan temas ile yayılır. HSV-1 enfeksiyonlarının prevalansı çocukluktan sonra giderek artar ve sonraki yıllarda %80 ve üstüne ulaşırken HSV-2'nin seroprevalansı adolesansa kadar düşük kalır. Çoğu HSV-1 primer enfeksiyonu subklinik veya farkedilmeyen enfeksiyonlar olarak alınırlar. HSV-2 ile primer enfeksiyonlar klasik olarak herpes genitalis şeklinde ortaya çıkar. HSV-1 veya HSV-2 ile primer enfeksiyon sonrasında dorsal kök gangliyonlarında latans durumu oluşur. Virüs zaman zaman tekrar aktive olup sinir aksonu yoluyla oral veya genital bölgelere gider ve enfeksiyöz virüsün salınması ve bazı durumlarda lezyon oluşumuyla sonuçlanır. Genellikle

asemptomatik olsa da HSV enfeksiyonları oral herpes, genital herpes, neonatal herpes, ensefalit ve oküler herpes dahil çok çeşitli klinik bulgulara yol açabilir.

İşlemin Prensibi

HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 RG Master B, HSV-1 ve HSV-2 genomları içinde hedef bölgelerin spesifik amplifikasyonu ve Rotor-Gene Q aletlerinin Cycling Green ve Cycling Red floresans kanallarında spesifik ampikonun doğrudan saptanması için reaktifler ve enzimler içerir.

Ayrıca *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'te analiz sürecindeki olası hataları tanımlamak için bir heterolog amplifikasyon sistemi vardır. Bu Rotor-Gene Q aletlerinde Cycling Yellow floresans kanalında bir Dahili Kontrol (IC) olarak saptanır.

HSV-1 DNA'sı için spesifik problar FAM™ floroforu ile etiketlenirken HSV-2 DNA'sı için spesifik problar Cy®5 ile aynı karakteristikleri gösteren bir floroforla etiketlenir. Dahili Kontrol (IC) için spesifik prob, JOE™ floroforu ile etiketlenir. Spektral olarak ayırt edilebilen floroforlarla etiketlenen problemlerin kullanılması HSV-1- ve HSV-2 spesifik DNA'larının aynı anda saptanması ve kantifikasyonunu ve ayrıca Rotor-Gene Q aletinin karşılık gelen kanallarında dahili kontrolün saptanmasını mümkün kılar.

Sağlanan Materyal

Kit içeriği

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Katalog numarası		4515265
Reaksiyon sayısı		96
Mavi	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Mor	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Yeşil	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Kırmızı	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Turuncu	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Beyaz	H ₂ O	1 x 500 µl
	El Kitabı	1

* artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit 4 HSV-1 Kantifikasyon Standardı (QS1–QS4) ve ayrıca 4 HSV-2 Kantifikasyon Standardı (QS1–QS4) içerir.

Gereken ama Sağlanmayan Malzemeler

Kullanım öncesinde aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edildiği ve kalibre edildiğinden emin olun.

Reaktifler

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN kat. no. 51304 veya 51306; bakınız "DNA ekstraksiyonu", sayfa 10)

Sarf Malzemeleri

- 0,1 ml Strip Tüpler ve Kapakları, 72 kuyulu rotor ile kullanım için (QIAGEN, kat. no. 981103 veya 981106)
- Master karışımlar hazırlamak için nükleaz içermeyen, düşük DNA bağlayan mikrosantrifüj tüpleri
- Aerosol bariyerli, nükleaz içermeyen pipet uçları

Ekipman

- Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex veya Rotor-Gene Q 6plex aleti
- Rotor-Gene Q yazılım versiyonu 2.3.1 veya üstü
- Yükleme Bloğu 72 x 0,1 ml Tüp, manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok (QIAGEN, kat. no. 9018901)
- Örnek hazırlama için belirlenmiş ayarlanabilir pipetler
- PCR master karışımı hazırlama için belirlenmiş ayarlanabilir pipetler
- Şablon DNA vermek için belirlenmiş ayarlanabilir pipetler
- Vorteks karıştırıcı
- 2 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu tezgah santrifüjü

Uyarılar ve Önlemler

In vitro diagnostik kullanım için.

Testi kullanmadan önce tüm talimatı dikkatle okuyun.

Uyarılar

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın.

Önlemler

- Bu ürünün kullanımı özellikle real-time PCR teknikleri ve *in vitro* diagnostik işlemler konusunda talimat almış ve eğitimli personelle sınırlıdır.
- Numunelere daima güvenli laboratuvar işlemleriyle uyumlu olarak bulaşıcı ve/veya biyolojik olarak tehlikeli gibi muamele edilmelidir.
- Numuneleri kullanırken koruyucu tek kullanımlık pudrasız eldivenler, bir laboratuvar önlüğü ve göz koruması kullanın.
- Numune ve kit bileşenlerinin mikrobiyal ve nükleaz (DNaz/RNaz) kontaminasyonundan kaçınin.
- Daima aerosol bariyerli, DNaz/RNaz içermeyen tek kullanımlık pipet uçları kullanın.
- Kit bileşenlerini kullanırken daima koruyucu tek kullanımlık pudrasız eldivenler kullanın.
- Numune hazırlama, reaksiyon kurulumu ve amplifikasyon/saptama aktiviteleri için daima ayrılmış ve birbirinden izole çalışma alanları kullanın. Laboratuvardaki iş akışı tek yönlü bir şekilde ilerlemelidir. Her bölgede daima tek kullanımlık eldivenler kullanın ve farklı bölgelere girmeden önce bunları değiştirin.
- Ayrı bölge alanlarına özel malzeme ve ekipman ayırın ve bunları bir bölgeden diğerine taşımayın.
- Pozitif ve/veya pozitif olabilecek materyali kitteki tüm diğer bileşenlerden ayrı saklayın.
- Amplikonlarla kontaminasyondan kaçınmak için amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüplerini/plakaları açmayın.
- Yerel, bölgesel ve/veya ulusal düzenlemeler veya akreditasyon organizasyonlarının kılavuz ilkeleri veya gerekliliklerine göre ek kontroller test edilebilir.
- Son kullanma tarihini geçmiş kit bileşenlerini kullanmayın.
- Örnek ve analiz atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize uygun olarak atın.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kit bileşenleri

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit kuru buzda gönderilir. Kit bileşenlerinin donmuş olarak gelmesi gerekir. Alındığında bir veya birkaç bileşen donmuş değilse veya sevkiyat sırasında tüpler olumsuz etkilenmişse yardım için QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun. Alındığında tüm kit bileşenlerini -30°C ila -15°C 'de saklayın.

Master reaktifleri için tekrarlanan çözme ve dondurmadan (iki kereden fazla) kaçınılmalıdır çünkü analiz performansını azaltabilir. Ara sıra kullanılacaklarsa reaktifleri alikotlar halinde dondurun. Reaktifleri 2 saatten fazla 4°C 'de saklamayın. HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 RG Master B'yi ışıktan koruyun.

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit şunları içerir:

- İki Master reaktif (HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 RG Master B)
- Şablon Dahili Kontrol (HSV-1/2 RG IC)
- Dört HSV-1 Kantifikasyon Standardı (HSV-1 QS1–QS4)
- Dört HSV-2 Kantifikasyon Standardı (HSV-2 QS1–QS4)
- PCR sınıfı su (H_2O)

HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 RG Master B reaktifleri HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA ve Dahili Kontrolün tek bir reaksiyonda amplifikasyon saptanması ve diferansiyel için tüm bileşenleri (tampon, enzimler, primerler ve proplar) içerir.

Kantifikasyon Standartları HSV-1- ve HSV-2 spesifik DNA'nın standardize konsantrasyonlarını içerir. Bunlar pozitif kontroller olarak ayrı ayrı kullanılabilir veya örnekte HSV-1- ve/veya HSV-2-spesifik DNA konsantrasyonunu belirlemek için kullanılacak bir şekilde standart bir eğri oluşturmak için birlikte kullanılabilir. Kantifikasyon Standartlarının konsantrasyonları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kantifikasyon Standartları Konsantrasyonu

Kantifikasyon Standardı	Konsantrasyon (kopya/µl)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10.000	10.000
QS2	1.000	1.000
QS3	100	100
QS4	10	10

İşlem

DNA ekstraksiyonu

HSV-1- ve HSV-2 spesifik hedef sekanslar DNA'dan amplifiye edilir. Bir tahlil performansı şablon DNA kalitesine bağlı olduğundan aşağı yönde PCR için kullanılmaya uygun DNA veren bir örnek hazırlama kiti kullandığınızdan emin olun.

QIAamp DNA Mini Kit'in (QIAGEN, kat. no. 51304 veya 51306) *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'le DNA saflaştırma için kullanılması önerilir. DNA saflaştırmayı *QIAamp DNA Mini El Kitabındaki* talimata göre yapın.

QIAamp DNA Mini Kit'teki yıkama tamponları etanol içerdiğinden elüsyon öncesinde ek bir santrifügasyon adımı gerçekleştirin. QIAamp Mini döndürme kolonunu yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirin ve eski toplama tüpü ve filtratı atın. Bir tezgah santrifüjünde 10 dakika boyunca yaklaşık 17.000 x g (~13.000 devir/dk) hızında santrifüje edin.

Önemli: Ekstraksiyon etkinliği ve ekstraksiyon yapılan nükleik asidin stabilitesi açısından taşıyıcı RNA kullanılması çok önemlidir.

Önemli: Etanol real-time bir PCR'da güçlü bir inhibitördür. Örnek hazırlama kitiniz etanol içeren yıkama tamponları kullanıyorsa, nükleik asit elüsyonu öncesinde tüm etanol izlerini giderdiğinizden emin olun.

Dahili Kontrol

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit bir PCR inhibisyon kontrolü olarak veya örnek hazırlama işlemi (nükleik asit ekstraksiyonu) için bir kontrol ve bir PCR inhibisyonu kontrolü olarak kullanılabilen heterolog bir dahili kontrol içerir.

Eğer Dahili Kontrol bir PCR inhibisyon kontrolü olarak kullanılıyorsa ve örnek hazırlama işlemi kontrolü olarak kullanılmıyorsa Dahili Kontrolü doğrudan HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 RG Master B karışımına protokolde adım 2b içinde tanımlandığı şekilde ekleyin (sayfa 13).

Nükleik asit ekstraksiyonu için hangi yöntem/sistem kullanılırsa kullanılsın Dahili Kontrol doğrudan numuneye eklenmemelidir. Dahili Kontrol daima numune/lizis tampon karışımına eklenmelidir. Numune/lizis tampon karışımına eklenecek Dahili Kontrol hacmi sadece elüsyon hacmine bağlıdır ve elüsyon hacminin %10'unu temsil eder. Örneğin QIAamp DNA Mini Kit kullanıldığında, DNA elüsyonu 60 µl Tampon AE içine yapılır. Bu nedenle her örneğin numune/lizis tampon karışımına 6 µl Dahili Kontrol ekleyin.

Önemli: Dahili Kontrol ve/veya taşıyıcı RNA'yı doğrudan numuneye eklemeyin.

Protokol: HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA saptanması

Başlamadan önce önemli noktalar

- İşleme başlamadan önce “Önlemler”, sayfa 8 kısmını okuyun.
- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q aletine aşına hale gelmek için zaman ayırın. Alet kullanıcı el kitabına bakın.
- En az bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrolün (PCR sınıfı su) her PCR çalışmasına eklendiğinden emin olun.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Soğutma bloğunun (Rotor-Gene Q aletinin aksesuarı) 2–8°C'ye önceden soğutulduğundan emin olun.
- Her kullanımdan önce tüm reaktiflerin tamamen çözülmesi, karıştırılması (tekrarlanan yukarı - aşağı pipetleme veya hızlı vorteksleme ile) ve kısa süre santrifüje edilmesi gerekir.

İşlem

1. İstenen sayıda PCR tüpünü soğutma bloğunun adaptörlerine yerleştirin.
2. Dahili Kontrolü DNA izolasyon işlemini izlemek ve olası PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2a'yı izleyin. Dahili Kontrolü sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanıyorsanız adım 2b'yi izleyin.

Dahili Kontrolü analiz edilecek tüm örnekler, kontroller ve Kantifikasyon Standartları için adım 2b'ye göre kullanın.

2a. Dahili Kontrol, izolasyona zaten eklenmiştir (bakınız “Dahili Kontrol”, sayfa 11). Bu durumda Tablo 2 uyarınca bir master karışımı hazırlayın.

Reaksiyon karışımı örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

Tablo 2. Master karışımın hazırlanması (Dahili Kontrol DNA izolasyonunu izlemek ve PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)

Bileşen	1 reaksiyon	12 reaksiyon
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Toplam hacim	20 µl	240 µl

2b. Dahili Kontrol, HSV-1/2 RG Master A ve HSV-1/2 Master B karışımına doğrudan eklenmelidir. Bu durumda Tablo 3 uyarınca bir master karışımı hazırlayın.

Reaksiyon karışımı örnek dışında PCR için gerekli tüm bileşenleri içerir.

Tablo 3. Master karışımın hazırlanması (Dahili Kontrol sadece PCR inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılıyor)

Bileşen	1 reaksiyon	12 reaksiyon
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
Toplam hacim	21 µl	252 µl

* Dahili Kontrolü eklemenin neden olduğu hacim artışı, PCR analizi hazırlanırken dikkate alınmaz. Saptama sisteminin hassasiyeti etkilenmez.

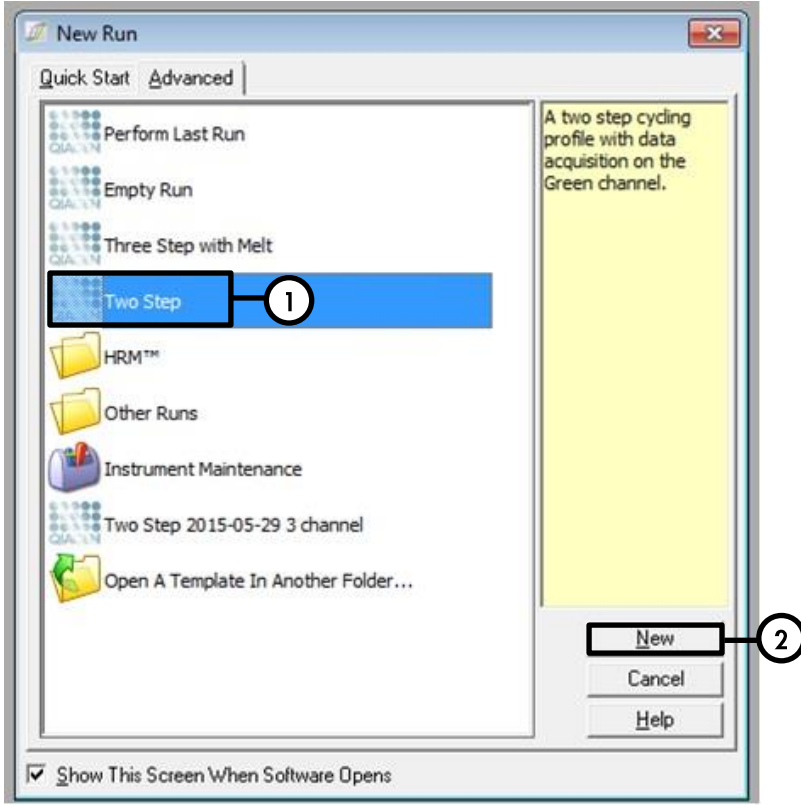
- Her PCR tüpüne ana karışımdan 20 µl pipetleyin. Sonra elüsyon yapılmış örnek DNA'sından 10 µl ekleyin ve yukarı ve aşağı tekrar tekrar pipetleyerek iyice karıştırın. Buna karşılık olarak bir pozitif kontrolden 10 µl veya bir negatif kontrol olarak Kantifikasyon Standardı veya 10 µl H₂O (PCR sınıfı su) ekleyin.
Çalışma başına en az bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol olduğundan emin olun. Kantifikasyon için 8 Kantifikasyon Standardının (HSV1 QS1–QS4 & HSV2 QS1–QS4) hepsini kullanın.
- PCR tüplerini kapatın. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene aleti aksesuarı) rotorun üstüne yerleştirildiğinden emin olun.

5. HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA saptamak için aşağıdaki adımlara göre bir sıcaklık profili oluşturun.

Genel analiz parametrelerini kurma	Şekil 1, 2, 3, 4
Hot-start enziminin bařlangıő aktivasyonu	Şekil 5
DNA amplifikasyonu	Şekil 6
Floresans kanalı hassasiyetini ayarlama	Şekil 7
Çalışmayı başlatma	Şekil 8

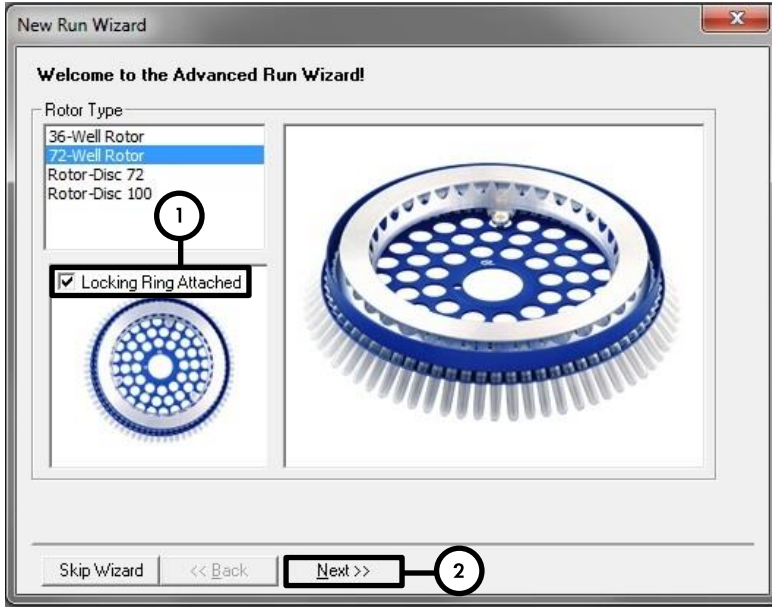
Tüm spesifikasyonlar Rotor-Gene Q yazılım versiyonu 2.3.1 ve üstü ile ilgilidir. Rotor-Gene aletlerini programlamak ile ilgili ek bilgiyi alet kullanıcı el kitabında bulabilirsiniz. Őekillerde bu ayarlar kalın siyah çerçeveyle gösterilmiştir.

6. Önce **New Run Wizard** (Yeni Çalışma Sihirbazı) diyalog kutusunu **Advanced** (Gelişmiş) versiyonla açın ve **Two Step** (İki Adım) (Şekil 1) seçin. Devam etmek için **Next** (Sonraki) kısmına tıklayın.



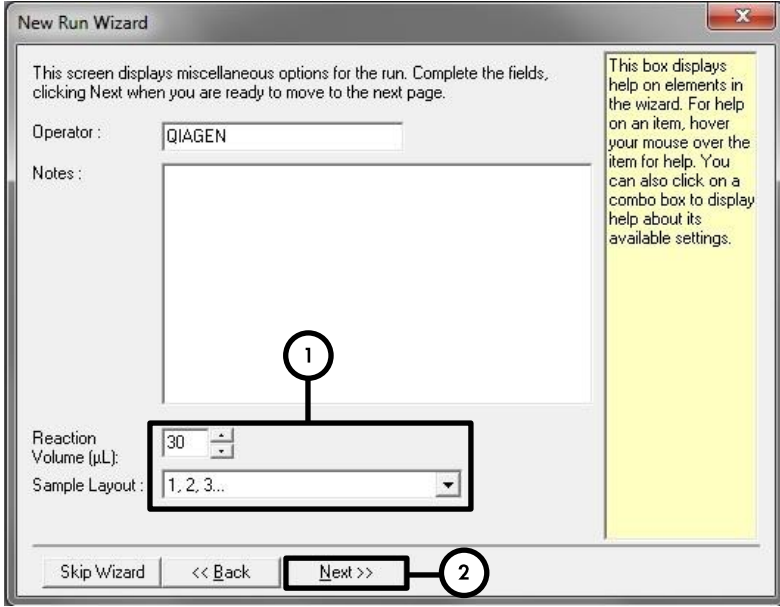
Şekil 1. New Run (Yeni Çalışma) diyalog kutusu.

7. **New Run Wizard** diyalog kutusunda (Şekil 2), **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin ve **Next** kısmına tıklayın.



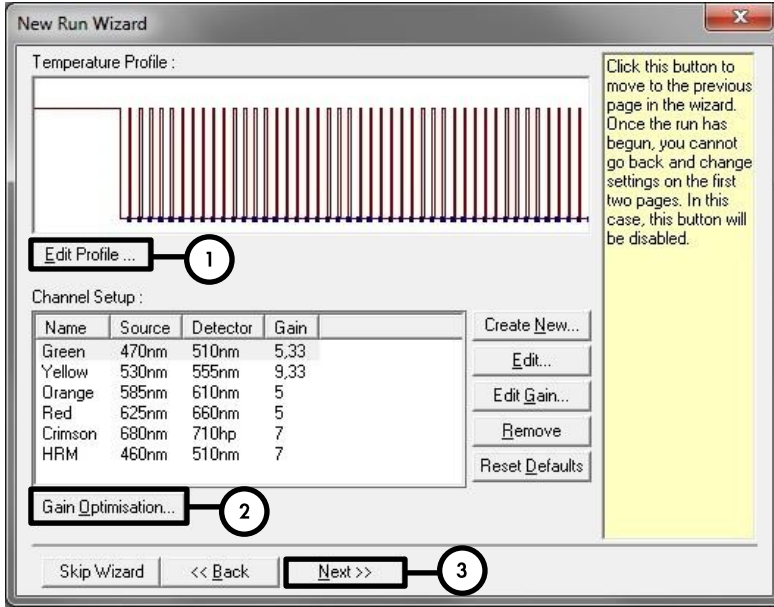
Şekil 2. New Run Wizard diyalog kutusu.

8. PCR reaksiyon hacmi için **30** seçin ve **Next** kısmına tıklayın (Şekil 3).

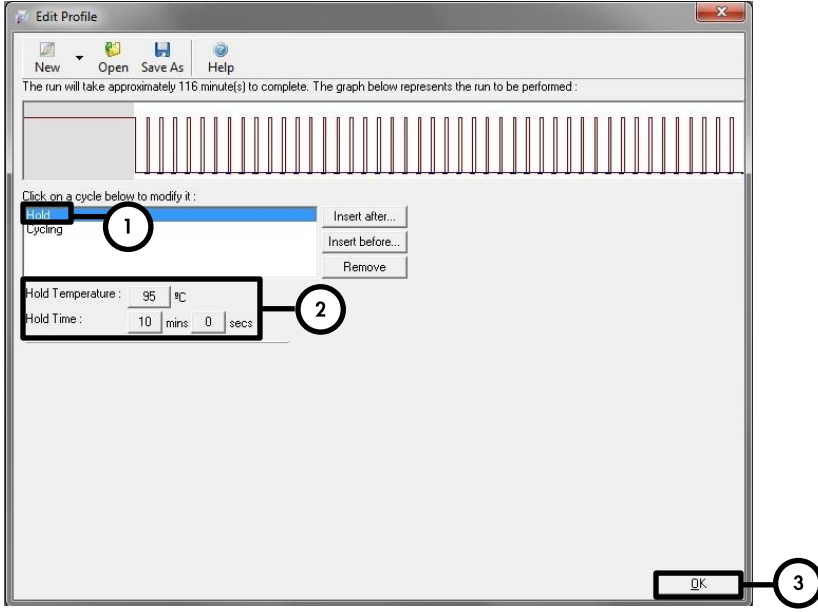


Şekil 3. Genel analiz parametrelerini kurma.

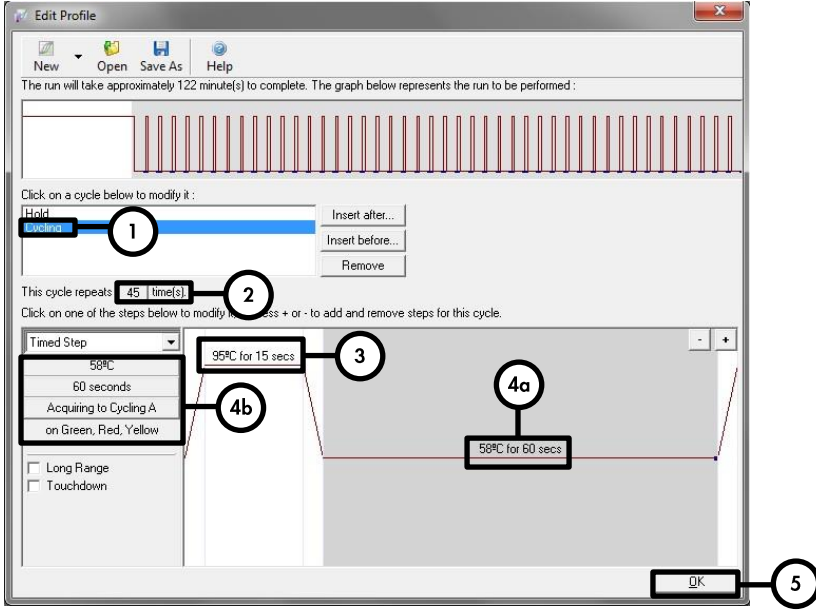
9. Sonraki **New Run Wizard** diyalog kutusunda **Edit Profile** (Profil Düzenle) düğmesine tıklayın (Şekil 4) ve sıcaklık profilini Şekil 5-6'da gösterildiği gibi programlayın.



Şekil 4. Profili düzenleme.

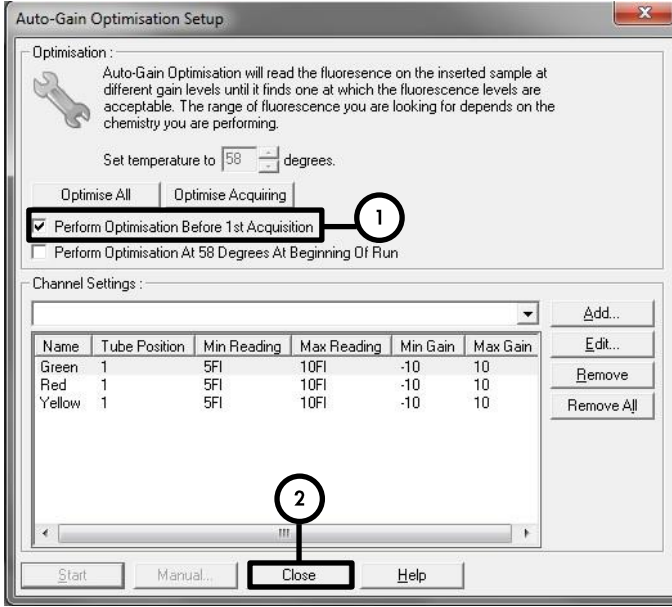


Şekil 5. Hot-start enziminin başlangıç aktivasyonu.



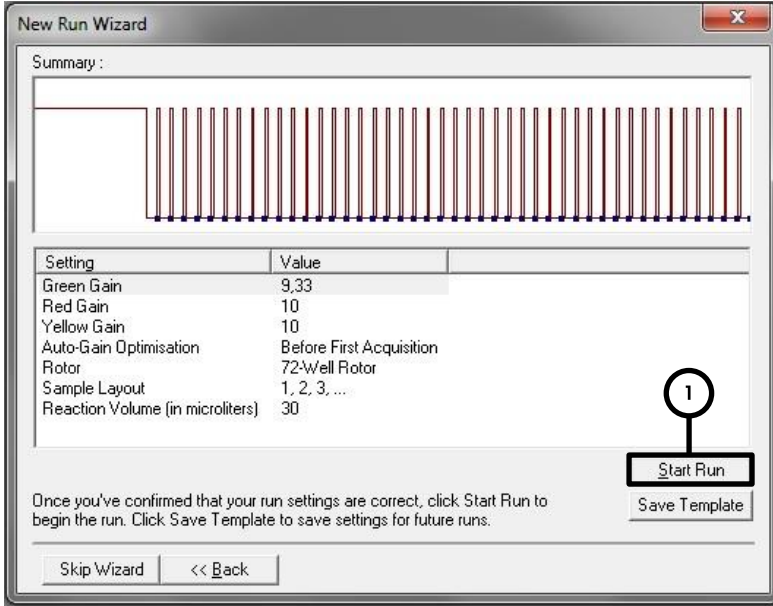
Şekil 6. DNA amplifikasyonu.

10. Floresans kanalları için saptama aralığının PCR tüplerindeki floresans şiddetlerine göre belirlenmesi gerekir. **Auto-Gain Optimisation Setup** (Otomatik Kazanç Optimizasyonu Kurulumu) diyalog kutusunu açmak için **New Run Wizard** diyalog kutusunda (bakınız Şekil 4, Adım 2) **Gain Optimisation** (Kazanç Optimizasyonu) kısmına tıklayın (Şekil 7). **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (1. Alma Öncesinde Optimizasyon Yap) kutusunu işaretleyin (Şekil 7). **Auto-Gain Optimisation** için üç kanalın (Green (Yeşil), Red (Kırmızı) ve Yellow (Sarı)) üçünün de seçildiğinden emin olun (Şekil 7). (Kanalları **Channel Settings** (Kanal Ayarları) altında aşağı açılır menüde bulun ve **Add** (Ekle) kısmına tıklayın.) Kazanç kalibrasyonu tamamlandığında **Auto-Gain Optimisation Setup** diyalog kutusunda **Close** (Kapat) kısmına tıklayın.



Şekil 7. Floresans kanalı hassasiyetini ayarlama.

11. Kanal kalibrasyonu tarafından belirlenen kazanç değerleri otomatik olarak kaydedilir ve programlama işleminin son menü penceresinde liste halinde verilir (Şekil 8). **Start Run** (Çalışmayı Başlat) kısmına tıklayın.



Şekil 8. Çalışmayı başlatma.

12. Çalışma bittiğinde verileri analiz edin (bakınız “Sonuçların Yorumlanması”, sayfa 23).

Sonuçların Yorumlanması

Çalışma geçerliliği

Geçerli kalitatif çalışma

Bir kalitatif çalışmanın geçerli olması için aşağıdaki kontrol koşullarını karşılanması gerekir (Tablo 4).

Tablo 4. Geçerli bir kalitatif çalışma için kontrol koşulları

Kontrol Kimliği	Saptama kanalı		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
HSV-1 pozitif kontrol (QS)	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF
HSV-2 pozitif kontrol (QS)	NEGATİF	POZİTİF	POZİTİF
Negatif kontrol	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF

Geçersiz kalitatif çalışma

Bir çalışma tamamlanmamışsa veya geçerli bir kalitatif çalışma için kontrol koşullarının herhangi biri karşılanmamışsa kalitatif bir çalışma geçersizdir.

Geçersiz bir kalitatif çalışma durumunda PCR'ı tekrarlayın veya herhangi bir DNA kalmadıysa orijinal örneklerden tekrar DNA ekstraksiyonu yapın.

Geçerli kantitatif çalışma

Bir kantitatif çalışma, geçerli bir kalitatif çalışma için tüm kontrol koşulları karşılandıysa geçerlidir (bakınız yukarıda Tablo 4). Ayrıca doğru kantifikasyon sonuçları için geçerli bir

standart eğrinin oluşturulması gerekir. Geçerli bir kantitatif çalışma için standart eğride şu kontrol parametresi değerleri olmalıdır (Tablo 5).

Tablo 5. Geçerli bir standart eğri için kontrol parametreleri

Kontrol parametresi	Geçerli değer
Eğim	-3,743/-2,765
PCR verimliliği	%85/%130
R kare (R^2)	>0,98

Geçersiz kantitatif çalışma

Bir çalışma tamamlanmamışsa veya geçerli bir kantitatif çalışma için kontrol koşullarının herhangi biri karşılanmamışsa kantitatif bir çalışma geçersizdir.

Geçersiz bir kantitatif çalışma durumunda PCR'i tekrarlayın veya herhangi bir DNA kalmadıysa orijinal örneklerden tekrar DNA ekstraksiyonu yapın.

Kalitatif analiz

Sonuçların yorumlanmasının bir özeti Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Sonuçların yorumlanmasının özeti

Örnek Kimliği	Saptama kanalı			Sonuçları yorumlama
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF*	HSV-1-spesifik DNA saptandı.
B	NEGATİF	POZİTİF	POZİTİF*	HSV-2-spesifik DNA saptandı.
C	NEGATİF	NEGATİF	POZİTİF	Ne HSV-1- ne HSV-2-spesifik DNA saptandı. Örnek saptanabilir miktarda HSV-1- veya HSV-2-spesifik DNA içermemektedir.
D	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	PCR inhibisyonu veya reaktif başarısızlığı. İşlemi orijinal örneği kullanarak tekrarlayın veya yeni bir örnek alıp test edin.

* Cycling Green saptama kanalında veya Cycling Red saptama kanalında pozitif sonuçlar için Dahili Kontrolün Cycling Yellow kanalında saptanması gerekli değildir. Örnekte yüksek HSV-1 veya HSV-2 yükleri, azalmış olan veya hiç olmayan Dahili Kontrol sinyallerine neden olabilir.

Kantitatif analiz

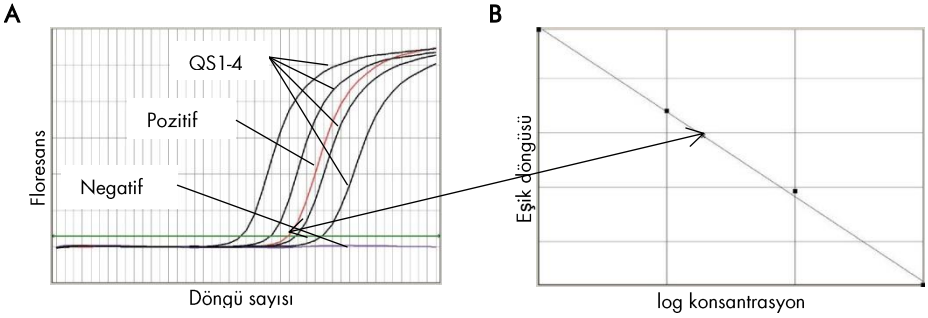
artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit 4 HSV-1 Kantifikasyon Standardı (QS) ve 4 HSV-2 Kantifikasyon Standardı (QS) içerir. Kantitatif analiz için standart bir eğri oluşturmak üzere bunların uygun konsantrasyonlarla standartlar olarak tanımlanması gerekir (bakınız Tablo 1, sayfa 10). Kantitatif analiz için standart bir eğri bilinen konsantrasyonlarda standartlar kullanılarak oluşturulabilir.

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

- C_T = Eşik döngüsü
- m = Eğim
- N_0 = Başlangıç konsantrasyonu
- b = Kesişim

Bilinmeyen konsantrasyonda pozitif örneklerin konsantrasyonları standart eğriden elde edilebilir (Şekil 9).

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



Şekil 9. Kantifikasyon Standartları, bir pozitif ve bir negatif örnek (A) bir amplifikasyon plotunda ve (B) standart eğri analizinde gösterilmiş.

Not: Örneğin konsantrasyonu kopya/ μ l olarak gösterilmiştir ve elütteki viral DNA konsantrasyonuna atıfta bulunur.

Orijinal örneğin viral yükünü belirlemek için şu formülü kullanın:

$$\text{Viral yük (örnek) [kopya/ml]} = \frac{\text{Hacim (elüt) } [\mu\text{l}] \times \text{viral yük (elüt) [kopya}/\mu\text{l}]}{\text{Örnek girdisi [ml]}}$$

Sınırlamalar

- Bu ürünün kullanımı özellikle real-time PCR teknikleri ve *in vitro* diagnostik işlemler konusunda talimat almış ve eğitimli personelle sınırlıdır.
- Bu analizin uygun şekilde yapılması için iyi laboratuvar uygulamaları şarttır.
- Kit ve reaksiyon kurulumlarının bileşenlerinin saflığını korumak için çok dikkatli olun. Tüm reaktifleri safsızlıklar ve kontaminasyon açısından yakından izleyin. Kontaminasyondan şüphelenilen herhangi bir reaktifi atın.
- Bu analizin optimum performansı için uygun numune toplama, nakil, taşıma ve işleme işlemleri gereklidir.
- Bu analizi doğrudan numune üzerinde yapmayın. Bu analizi kullanmadan önce geçerli nükleik asit ekstraksiyon işlemlerini yapın.
- PCR inhibitörlerinin bulunması yalancı negatif veya geçersiz sonuçlara neden olabilir.
- Kitte kullanılan primerler ve/veya problemlerin kapsadığı HSV-1 ve/veya HSV-2 genomu hedef bölgelerindeki olası mutasyonlar, patojenlerin varlığını saptayamayla sonuçlanabilir.
- Her diagnostik testle olduğu gibi *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'le elde edilen sonuçları tüm klinik ve laboratuvar bulgularını dikkate alarak değerlendirin.

Kalite Kontrol

Her *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak üzere önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilmiştir.

Performans Özellikleri

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in spesifik performans özellikleri bilinen konsantrasyonlarda HSV-1-spesifik DNA (ATCC® numarası: VR-1493) ve HSV-2-spesifik DNA (ATCC numarası: VR-540) kullanılarak belirlenmiştir.

Analitik hassasiyet

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in analitik hassasiyeti ≥ 95 pozitiflik oranıyla saptanabilen HSV-1- veya HSV-2-spesifik DNA konsantrasyonu (elüt μ l başına kopya) olarak tanımlanır. Analitik hassasiyet bilinen konsantrasyonda bir HSV-1 DNA ve HSV-2 DNA dilüsyon serisi analiziyle belirlenmiştir (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7. HSV-1-spesifik amplifikasyonu analitik hassasiyetini hesaplamak için kullanılan PCR sonuçları

Girdi konsantrasyonu (kopya/ μ l)	Tekrar sayısı	Pozitiflerin sayısı	Belirleme oranı (%)
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

Tablo 8. HSV-2-spesifik amplifikasyonu analitik hassasiyetini hesaplamak için kullanılan PCR sonuçları

Girdi konsantrasyonu (kopya/ μ l)	Number of replicates (Tekrar sayısı)	Pozitiflerin sayısı	Belirleme oranı (%)
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

HSV-1-spesifik DNA saptanması için probit analiziyle belirlendiği şekilde *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in analitik hassasiyeti 0,33 kopya/ μ l elüt şeklindedir (%95 güven aralğı [GA]: 0,16-1,3 kopya/ μ l) ve HSV-2-spesifik DNA'nın saptanması için analitik hassasiyet 1,2 kopya/ μ l elüt şeklindedir (%95 GA: 0,7–3,5 kopya/ μ l).

Analitik özgüllük

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in analitik özgüllüğü oligonükleotidlerin (primerler ve proplar) dikkatli seçilmesiyle sağlanır. Oligonükleotidler, sekans karşılaştırma analiziyle kamuya açık olarak bulunan sekanslarla karşılaştırılarak tüm ilgili HSV genotiplerinin saptandığından emin olmak üzere kontrol edilir. Ayrıca *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in özgüllüğü başka herpesvirüslerden veya immünyetmezlikli hastalar için ilgili diğer patojenlerden ekstraksiyonu yapılan bir genomik DNA/RNA panelinin test edilmesiyle değerlendirilmiştir (Tablo 9).

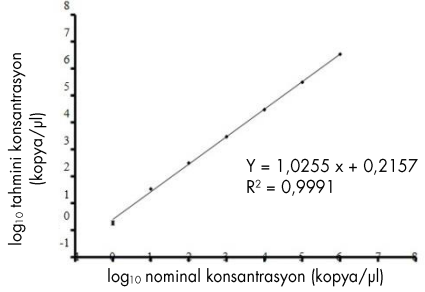
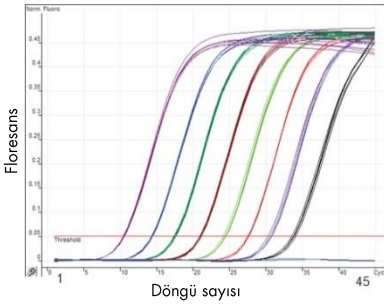
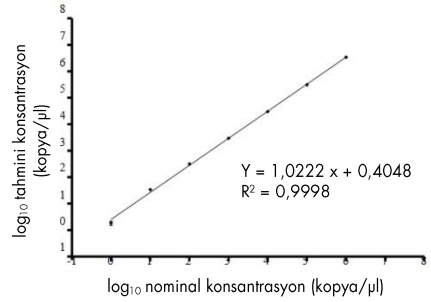
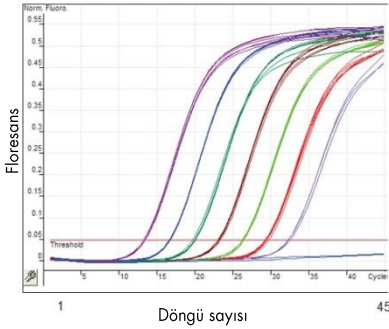
Tablo 9. Çapraz reaktivite için test edilen organizmalar

Organizma	Saptama kanalı		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Varicella-zoster virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
Epstein-Barr virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
Sitomegalovirüs	Negatif	Negatif	Geçerli
İnsan herpesvirüsü 6 (A, B)	Negatif	Negatif	Geçerli
İnsan herpesvirüsü 7	Negatif	Negatif	Geçerli
İnsan herpesvirüsü 8	Negatif	Negatif	Geçerli
BK virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
JC virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
Parvovirüs B19	Negatif	Negatif	Geçerli
Hepatit A virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
Hepatit B virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
Hepatit C virüsü	Negatif	Negatif	Geçerli
İnsan immünyetmezlik virüsü 1	Negatif	Negatif	Geçerli

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit belirlenen organizmaların herhangi biriyle çapraz reaksiyona girmemiştir.

Lineer aralık

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in lineer aralığı 10^8 kopya/ μ l ile 10 kopya/ μ l (HSV-1) (Şekil 10) ve 10^7 ile 10 kopya / μ l (HSV-2) aralığındaki konsantrasyonlar kullanılarak HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA logaritmik dilüsyon serisinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Dilüsyon başına en az 6 replikat analiz edilmiştir.

A**B**

Şekil 10. (A) HSV-1- ve (B) HSV-2-spesifik DNA'nın bir dilüsyon serisinin amplifikasyon eğrileri ve linear regresyon analizi.

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in lineer aralığı HSV-1-spesifik DNA için en az 7 büyüklük kertes aralığı boyunca ve HSV-2-spesifik DNA için en az 6 büyüklük kertes aralığı için boyunca uzanır.

Kesinlik

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in kesinliği analiz içi değişkenlik (bir deney içinde değişkenlik), analizler arası değişkenlik (farklı deneyler arası değişkenlik) ve lotlar arası değişkenlikle (farklı üretim lotları arasında değişkenlik) belirlenmiştir.

Değişkenlik verileri standart sapma, varyans ve varyasyon katsayısı açısından ifade edilmiştir. Veriler HSV-1- ve HSV-2-spesifik DNA için tanımlanmış konsantrasyonların ve dahili kontrol açısından döngü eşiği (C_T) değerlerinin kantifikasyon analizi temelindedir (Tablo 10-13). Analiz içi, analizler arası ve lotlar arası değişkenlik için örnek başına en az 6 replikat analiz edilmiştir. Toplam varyans 3 analizin kombine edilmesiyle hesaplanmıştır.

Tablo 10. HSV-1-spesifik DNA'nın amplifikasyonunun kesinliği

HSV-1-spesifik sistem	Ortalama kons. (kopya/ μ l)	Standart sapma	Varyans	Varyasyon katsayısı (%)
Analiz içi değişkenlik	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Analizler arası değişkenlik	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Lotlar arası değişkenlik	90,3	5,1	25,5	5,6
	8,7	1,2	1,5	14,2
Toplam varyans	92,7	5,5	30,7	6,0
	8,8	1,1	1,2	12,7

Tablo 11. HSV-1 için Dahili Kontrol amplifikasyonunun kesinliği

Dahili Kontrol	Ortalama eşik döngüsü (C_T)	Standart sapma	Varyans	Varyasyon katsayısı (%)
Analiz içi değişkenlik	23,0	0,05	0,003	0,23
Analizler arası değişkenlik	22,9	0,12	0,01	0,51
Lotlar arası değişkenlik	23,5	0,61	0,37	2,6
Toplam varyans	23,3	0,61	0,37	2,6

Tablo 12. HSV-2-spesifik DNA'nın amplifikasyonunun kesinliği

HSV-2-spesifik sistem	Ortalama kons. (kopya/ μ l)	Standart sapma	Varyans	Varyasyon katsayısı (%)
Analiz içi değişkenlik	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Analizler arası değişkenlik	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Lotlar arası değişkenlik	102,5	9,5	90,8	9,3
	9,0	2,0	4,0	22,2
Toplam varyans	99,6	9,0	81,7	9,1
	9,5	2,1	4,5	22,3

Tablo 13. HSV-2 için Dahili Kontrol amplifikasyonunun kesinliği

Dahili Kontrol	Ortalama eşik döngüsü (C_T)	Standart sapma	Varyans	Varyasyon katsayısı (%)
Analiz içi değişkenlik	24,0	0,1	0,004	0,43
	23,8	0,3	0,13	1,27
Lotlar arası değişkenlik	24,0	0,14	0,02	0,59
	23,9	0,25	0,06	1,03

Tekrarlanabilirlik

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in özgülüğü, hassasiyeti ve kantifikasyon doğruluğu HSV için belirlenmiş verimlilik panelleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit'in tekrarlanabilirliğini sağlamak üzere özgülük ve hassasiyet HSV-1 ve HSV-2 için belirlenmiş verimlilik panellerinin ve ayrıca karakterize edilmiş diagnostik örneklerin düzenli olarak analiz edilmesiyle değerlendirilir (Tablo 15'te bir örnek gösterilmiştir).

Tablo 15. HSV için bir verimlilik panelinin analizinin sonuçları (QCMD)

Verimlilik paneli			artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
Örnek Kimliği	Örnek içeriği	Beklenen kons. (kopya/ml)	HSV-1 saptanan kons. (kopya/ml)	HSV-2 saptanan kons. (kopya/ml)	Dahili Kontrol
HSVDNA14-01	HSV-1	5.408	2.460	–	Geçerli
HSVDNA14-02	HSV negatif	–	–	–	Geçerli
HSVDNA14-03	HSV-1	1.135	855	–	Geçerli
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Geçerli
HSVDNA14-05	HSV-1	12.794	8.490	–	Geçerli
HSVDNA14-06	HSV-2	1.982	–	1.881	Geçerli
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Geçerli
HSVDNA14-08	HSV-2	5.023	–	11.370	Geçerli
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Geçerli
HSVDNA14-10	VZV	–	–	–	Geçerli

Semboller

Bu kullanma talimatında aşağıdaki tablodaki semboller kullanılmıştır.

Sembol

Sembol tanımı



96

96 test için yeterli içerik



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici

Sembol

Sembol tanımı



Son kullanma tarihi



Materyal sayısı



Global Ticaret Madde Numarası



Kullanma talimatına başvurun

Sorun Giderme Kılavuzu

QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgi ve protokollerle ya da örnek ve/veya analiz teknolojileriyle ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplandırmaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgileri için www.qiagen.com adresini ziyaret ediniz).

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	96 reaksiyon için: Master A, Master B, 4 Kantifikasyon Standardı HSV-1, 4 Kantifikasyon Standardı HSV-2, Dahili Kontrol, H ₂ O (PCR sınıfı su)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	50 DNA işlemi için: 50 QIAamp Mini Döndürme Kolonu, Proteinaz K, Reaktifler, Tamponlar, Toplama Tüpleri (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	250 DNA işlemi için: 250 QIAamp Mini Döndürme Kolonu, Proteinaz K, Reaktifler, Tamponlar, Toplama Tüpleri (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q ve aksesuarları		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahildir	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002022

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; yazılımla birlikte Priority Package, yükleme, eğitim, parçalar ve işçilik için 3 yıllık garanti ve 3 önleme bakım ziyareti dahildir	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; yazılımla birlikte Priority Package, yükleme, eğitim, parçalar ve işçilik için 2 yıllık garanti ve 2 önleme bakım ziyareti dahildir	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahildir	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9001570

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	6 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; yazılımla birlikte Priority Package, yükleme, eğitim, parçalar ve işçilik için 3 yıllık garanti ve 3 önleme bakım ziyareti dahildir	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	6 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; yazılımla birlikte Priority Package, yükleme, eğitim, parçalar ve işçilik için 2 yıllık garanti ve 2 önleme bakım ziyareti dahildir	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahildir	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	6 kanallı (mavi, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR aleti, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9001590

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanılması ürünün herhangi bir satın alanı veya kullanıcısının şu şartları kabul ettiğini belirtir:

1. Ürün sadece ürünlere birlikte ve bu el kitabında sağlanan protokollerle uyumlu olarak ve kit içindeki bileşenlerle kullanım için kullanılabilir. QIAGEN ürünü sağlanan protokoller, bu el kitabı ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokollerde tanımlananlar dışında bu kite dahil edilmemiş herhangi bir bileşen ile kitin içindeki bileşenleri kullanma veya birleştirme açısından herhangi bir fikri mülkiyet altında bir lisans vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından iyice test edilmiş veya optimize edilmiş olmayabilir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açık olarak belirtilen lisanslar dışında QIAGEN bu kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediği konusunda garanti vermez.
3. Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açık olarak belirtilenler dışında açık veya zımni herhangi bir başka lisansı özellikle reddeder.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir mahkemede yürürlüğe koyabilir ve kit ve/veya bileşenleriyle ilişkili herhangi bir fikri mülkiyet hakkı veya bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini yürürlüğe koymak için tüm araştırma ve mahkeme masraflarını avukat masrafları dahil olmak üzere geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

Bu ürünün satın alınması, satın alanın insan *in vitro* diagnostığı için diagnostik hizmetler yapılmasında kullanılmasına izin verir. Burada satın alma ile bu spesifik kullanım hakkı dışında herhangi bir türde herhangi bir genel patent veya başka lisans verilmemektedir.

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

HB-2016-001

© 2015 Altona Diagnostics GmbH, tüm hakları saklıdır.

Sipariş www.qiagen.com/contact | Teknik Destek support.qiagen.com | Web sitesi www.qiagen.com