

Juni 2015

artus[®] HSV-1/2 LC PCR

Kit Handbok

 24 (Katalog nr. 4500063)

 96 (Katalog nr. 4500065)

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning tillsammans med *LightCycler*[®] instrumentet

Version 1



IVD

REF

4500063, 4500065



1046888SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046888SV



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Provberednings- och analystekniker

QIAGEN är den största leverantören av nyskapande provberednings- och analystekniker som gör det möjligt att isolera och detektera innehållet i alla typer av biologiska prov. Våra högkvalitativa produkter och tjänster grundade på spets teknologi garanterar lyckade resultat från provberedning till analysrapport.

QIAGEN är ledande inom följande områden:

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikro-RNA-forskning och RNA-interferens
- Automatiska provberednings- och analystekniker

Vår målsättning är att ge dig verktygen till att nå betydande framgång och forskningsgenombrott inom din verksamhet. Läs mer på www.qiagen.com.

Innehållsförteckning

1. Innehåll.....	4
2. Förvaring	4
3. Material och utrustning som behövs men inte medföljer	10
4. Allmänna försiktighetsåtgärder.....	10
5. Information om patogener.....	10
6. Principen för realtids-PCR	11
7. Produktbeskrivning	11
8. Protokoll	12
8.1 DNA-isolering	12
8.2 Internkontroll	15
8.3 Kvantifiering	16
8.4 Förberedelse av PCR.....	17
8.5 Programmering av LightCycler instrumentet.....	21
9. Tolkning av resultat	24
10. Felsökning.....	29
11. Specifikationer.....	31
11.1 Analytisk sensitivitet	31
11.2 Specificitet.....	33
11.3 Precision	30
11.4 Robusthet.....	33
11.5 Reproducerbarhet.....	33
11.6 Diagnostisk utvärdering	33
12. Särskild information om produktanvändning	33
13. Säkerhetsinformation.....	34
14. Kvalitetskontroll	34
15. Referenser	34
16. Symbolförklaring	35

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

För användning tillsammans med *LightCycler* instrumentet.

1. Innehåll

	Benämning och innehåll	Art. nr. 4500063 24 reaktioner	Art. nr. 4500065 96 reaktioner
Blå	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Röd	HSV1 LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV1 LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV1 LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV1 LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV2 LC/RG/TM QS 1 ^{xx} 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV2 LC/RG/TM QS 2 ^{xx} 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV2 LC/RG/TM QS 3 ^{xx} 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Röd	HSV2 LC/RG/TM QS 4 ^{xx} 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Grön	HSV LC IC ^{xx}	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Vit	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

^{xx} QS = Kvantifieringsstandard
IC = Internkontroll

2. Förvaring

Komponenterna hos *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ska förvaras vid –30 till –15 °C och är hållbara till det datum som anges på etiketten. Undvik upprepad 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 rör
- Color Compensation Set (Roche Diagnostics, kat. nr. 2 158 850) för framtagning av en Crosstalk Color Compensation-fil
- *LightCycler*-kapillärer (20 μ l)
- *LightCycler*-Cooling Block
- *LightCycler* instrument,
- *LightCycler* Capping Tool

4. Allmänna försiktighetsåtgärder

Tänk alltid på följande:

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

5. Information om patogener

Herpes-simplex-virus (HSV) påträffas i blåsvätskan, i saliv och vaginalsekret och överförs genom kontaktinfektion samt sexuellt och perinatalt. Vid de flesta av de sjukdomar som orsakas av HSV dominerar utvecklingen av blåsor på hud och slemhinnor (mun och genitalier).

HSV-infektionen kan uppträda som primärinfektion med ett asymtomatiskt förlopp i > 90 % av fallen eller recidiverande. Till de framför allt av HSV-1 utlösta primärinfektionerna räknas gingivostomatit, eczema herpeticum, keratokonjunktivit och encefalit. Som primärinfektion uppträder HSV-2 framför allt som vulvovaginit, som meningit och som generaliserad herpes hos nyfödda. Vid en recidiverande HSV- infektion förekommer framför allt blåsbildning i nasolabial- eller genitalregionen. Recidiverande keratokonjunktivit och meningit är sjukdomar på en allvarligare nivå.

6. Principen för realtids-PCR

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

7. Produktbeskrivning

artus HSV-1/2 LC PCR Kit är ett bruksfärdigt system för påvisning av herpes simplex virus-1 och -2-DNA med polymeras-kedjereaktion (PCR) och anslutande smältkurva i *LightCycler* instrumentet. HSV LC Master innehåller reagenser och enzymer för specifik amplifiering av ett 148 bp långt fragment i herpes simplex virus-genomet samt för omedelbar detektion av amplikon i fluorimeterkanalen F2 på *LightCycler* instrumentet. Dessutom innehåller *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ett andra heterologt amplifieringssystem för detektion av en eventuell PCR-inhibering. Detta detekteras som *Internkontroll (IC)* i fluorimeterkanalen F3. Därigenom blir detektionsgränsen av analytisk HSV-PCR inte negativt påverkat (se **11.1 Analytisk sensitivitet**). För påvisning av subtyperna använder systemet de specifika smälttemperaturerna från sonden, som under smältförloppet i fluorimeterkanal F2 ger en signal vid 69°C för HSV-1, vid 66°C för HSV-2.

Beroende på olika extraktionsförutsättningar och därav resulterande buffertkoncentrationer, kan 1 - 2°C variation förekomma, som emellertid fördelar sig likavärdigt för såväl HSV-1 som för HSV-2-amplikon. Externa positiva kontroller (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) medföljer ,med vars hjälp en bestämning av patogenbelastningen kan utföras. Du kan läsa mer om detta i stycket **8.3 Kvantifiering**.

Viktigt: Temperaturprofilen för detektion av herpes simplex-virus-DNA med hjälp av *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, motsvarar *artus* EBV PCR Kit, *artus* VZV LC PCR Kit och *artus* CMV LC PCR Kit. Följaktligen kan PCR- reaktionen för dessa *artus*-systemen genomföras och analyseras i en körning. Märk därvid de speciella hänvisningar för tolkning under **8.3 Kvantifiering** och under **9. Tolkning av resultat**.

8. Protokoll

8.1 DNA-isolering

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

Provmaterial	Isoleringskit	Katalog-nummer	Tillverkare	Bärar RNA
Serum, plasma, CSF (Cerebrospinalvätska), utstryk	QIAamp® UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	Ingår
	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	Ingår ej
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 eluerings buffert (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 upprepade 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 färsk blandning av lyseringsbuffert och bärrar-RNA (om nödvändigt även Internkontroll, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringsschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffer	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 bärar-RNA av isoleringskitet i 310 μl AE eller AVE buffert (eluerings buffert, slutkoncentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, använd ingen lyseringsbuffert) och portionera denna bärar-RNA-lösning till det passande antalet alikvoter du behöver, och lagra dem i -20°C . Undvik upprepad tining ($> 2 \times$) av en bärar-RNA-alikvot.
- b. Innan varje isolering påbörjas måste en färsk blandning av lyseringsbuffert och bärar-RNA (om nödvändigt även *Internkontroll*, se **8.2 Internkontroll**) tillredas enligt följande pipetteringschema.

Antal prover	1	12
Lyseringsbuffert AVL	800 μl	9.600 μl
Bärar-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 blandningen av lyseringsbuffer och bärar-RNA direkt till isoleringen. Förvaring av blandningen är inte möjlig.
- Genom användning av **QIAamp UltraSens Virus Kit** kan provet ytterligare koncentreras. Om provmaterialet inte är serum eller plasma, ska minst 50 % (v/v) negativ humanplasma tillsättas till provet.
 - Om isoleringar med **etanolhaltiga** tvättbuffertar används, ska ett ytterligare centrifugeringssteg (tre minuter, 13.000 rpm) utföras innan eluering så att eventuella etanolrester avlägsnas. Detta förhindrar eventuella PCR-inhiberingar.
 - artus HSV-1/2 LC PCR Kit* är inte lämpligt för isoleringsförfarande baserade på **fenol**.

Viktig hänvisning vid användning av EZ1 DSP Virus Kit:

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

Viktigt: Internkontrollen för *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* kan tillsättas direkt i isoleringen (se **8.2 Internkontroll**).

8.2 Internkontroll

En *Internkontroll* (HSV LC IC) medföljer. Med denna 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 μl per 1 μl elueringsvolym. Om du till exempel använder **QIAamp DNA Mini Kit** och eluerar DNA i 200 μl AE-buffert, så använder du 20 μl av *Internkontrollen*. Om du t. ex. eluerar i 100 μl , så använder du motsvarande 10 μl . Mängden använd *Internkontroll* beror **enbart** på elueringsvolymen. *Internkontroll* och bärar-RNA (se **8.1 DNA-isolering**) får endast tillsättas till

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

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

Alternativt kan *Internkontroll* användas **enbart för kontroll av en eventuell PCR-inhibering** (se Fig. 2). I så fall tillsätter du 0,5 μl *Internkontroll* och 15 μl HSV LC Master per reaktion direkt till 15 μl . För varje PCR-reaktion används 15 μl av den så tillverkade Master Mixen* varefter 5 μl av det renade provet tillsätts. Om du förbereder en körning för flera prover, ökar du den erforderliga mängden HSV LC Master och *Internkontroll* motsvarande antalet prover (se **8.4 Förberedelse av PCR**).

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

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

8.3 Kvantifiering

De medföljande Kvantifieringsstandarderna (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) behandlas på samma sätt som ett redan isolerat prov och används i samma volym (5 µl). Ta fram en standardkurva på LightCycler® instrumentet för HSV-1 och för HSV-2 genom att använda samtliga fyra medföljande Kvantifieringsstandarder, definiera dem som standarder i Sample Loading Screen och skriv in den angivna koncentrationen

(se LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Denna standardkurva kan även användas för efterföljande kvantifieringar, om minst en standard av en definierad koncentration medtas vid den aktuella testomgången. Den tidigare framtagna standardkurvan måste då importeras (se LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Tänk dock på att det vid denna form av kvantifiering kan förekomma resultatavvikelser mellan PCR-omgångarna till följd av variabiliteten.

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

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

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

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

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

8.4 Förberedelse av PCR

Kontrollera att Cooling Block med de däri ingående adaptrarna (tillbehör till *LightCycler* instrumentet) är kylt till ca +4°C. Placera det antal *LightCycler*-kapillärer som behövs för de planerade reaktionerna i Cooling Block adaptrarna. Observera att minst en *Kvantifieringsstandard* samt minst en negativ kontroll (Water, PCR grade) ska medtas vid varje PCR-körning. För framtagning av en standardkurva ska för varje PCR-körning samtliga medföljande *Kvantifieringsstandarder* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) användas. Innan testet påbörjas ska alla reagenser finas 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	<i>HSV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>HSV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Total volym	15 µl	180 µl
2. Beredning av PCR-reaktion	Master Mix	15 µl	vardera 15 µl
	Prov	5 µl	vardera 5 µl
	Total volym	20 µl	vardera 20 µl

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

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

Pipettera i plastbehållaren till varje kapillär 15 μ l av Master Mix. Tillsätt därefter 5 μ l eluat från DNA-isoleringen. På motsvarande sätt måste 5 μ l av minst en av *Kvantifieringsstandarderna* (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4) tillsättas som positiv kontroll och 5 μ l vatten (*Water, PCR grade*) som negativ kontroll. Förslut kapillärerna. För att överföra blandningen från plastbehållaren till kapillärerna, centrifugera adaptrar med kapillärer i en bordscentrifug i tio sekunder vid max. 400 x g (2.000 rpm).

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

Tillsats av Internkontroll till isolering

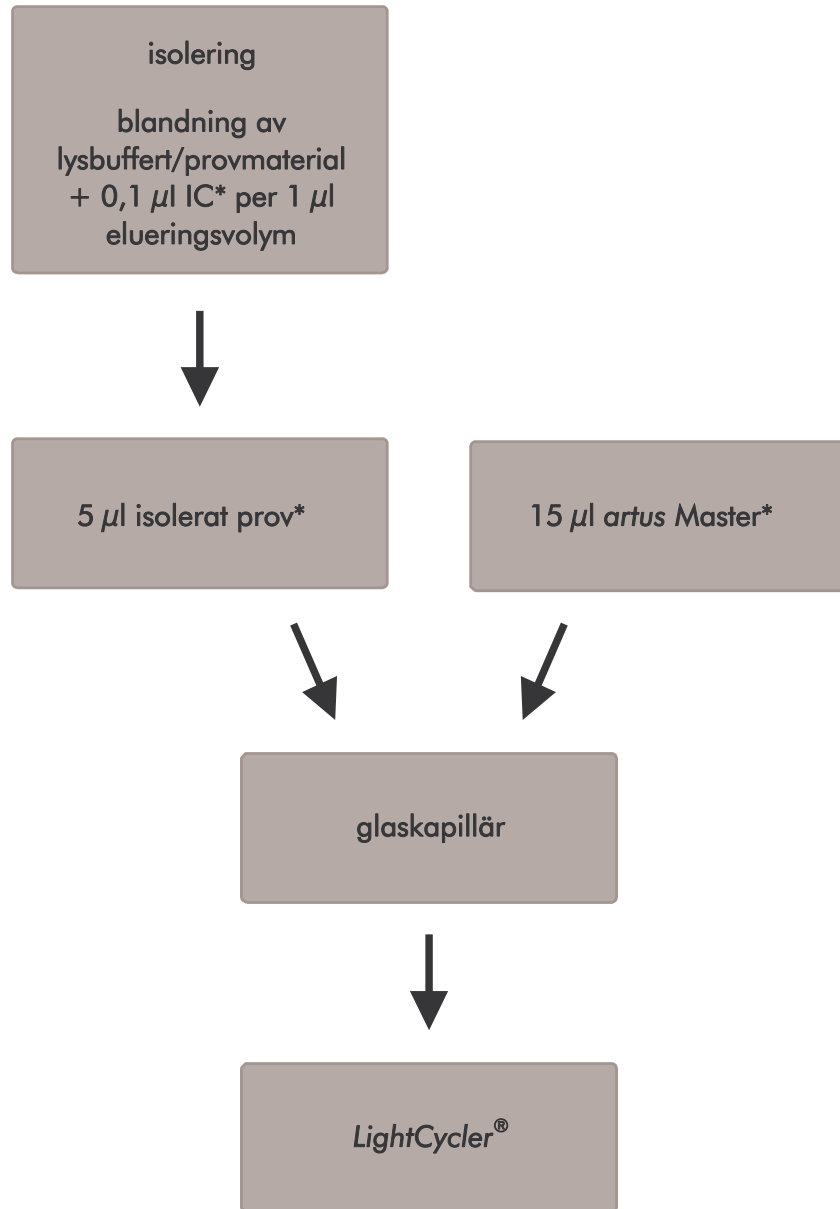


Fig. 1: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av isolering och PCR-inhibering.

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

Tillsats av Internkontroll till artus Master

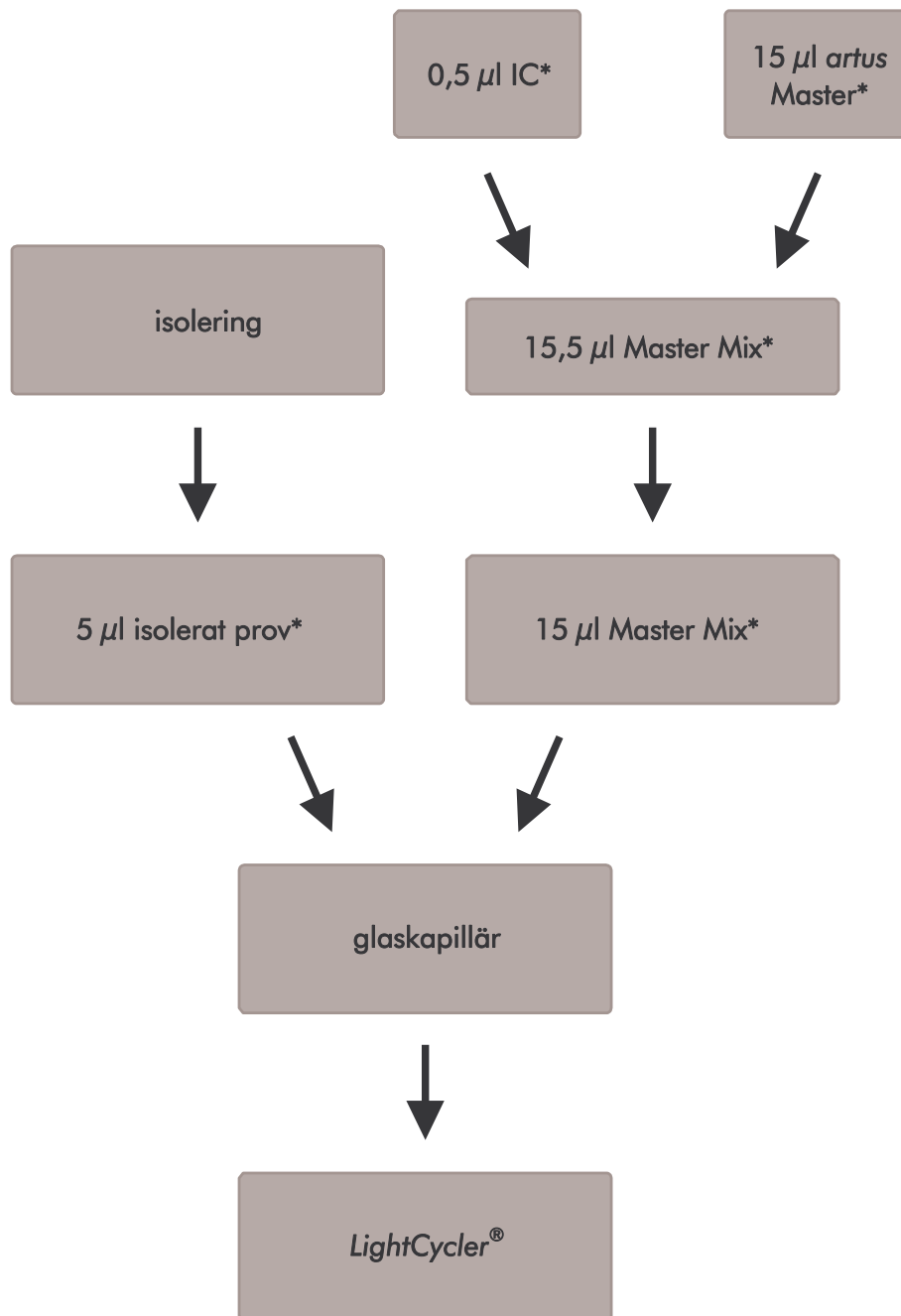


Fig. 2: Schematiskt arbetsförlopp för kontroll av PCR-inhibering.

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

8.5 Programmering av LightCycler instrumentet

För detektion av Herpes simplex virus-DNA programmeras en temperaturprofil på *LightCycler*[®] instrumentet enligt dessa fem steg (se Fig. 3 - 7).

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

Observera speciellt inställningarna för *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* och *Temperature Targets*. Dessa inställningar markeras i figurerna med en svart ram. Mer information om programmering av *LightCycler*[®] instrumentet finner du i *LightCycler Operator's Manual*.

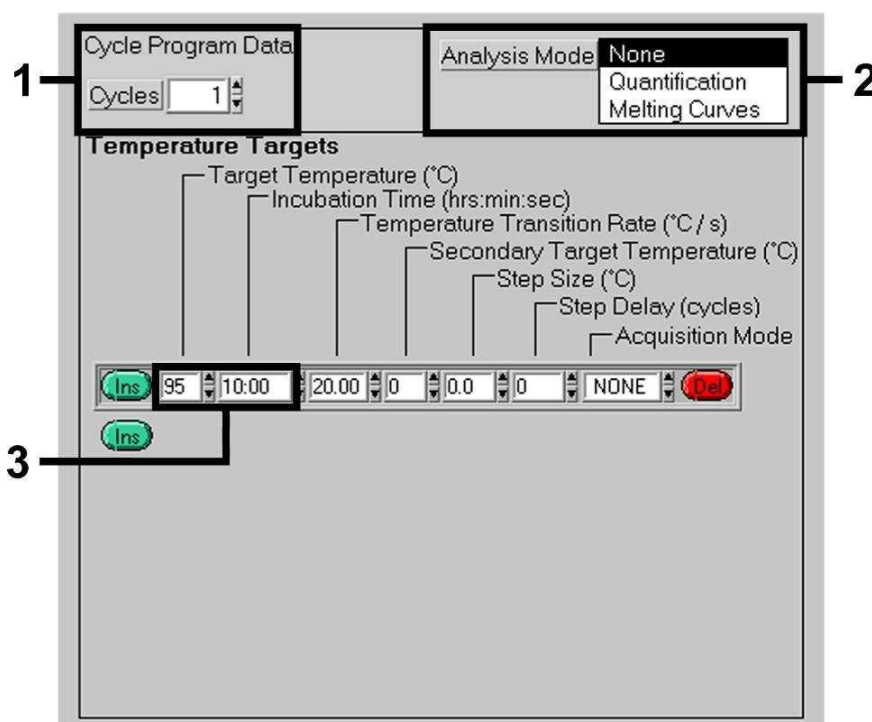


Fig. 3: Initial aktivering av Hot Start-enzymet.

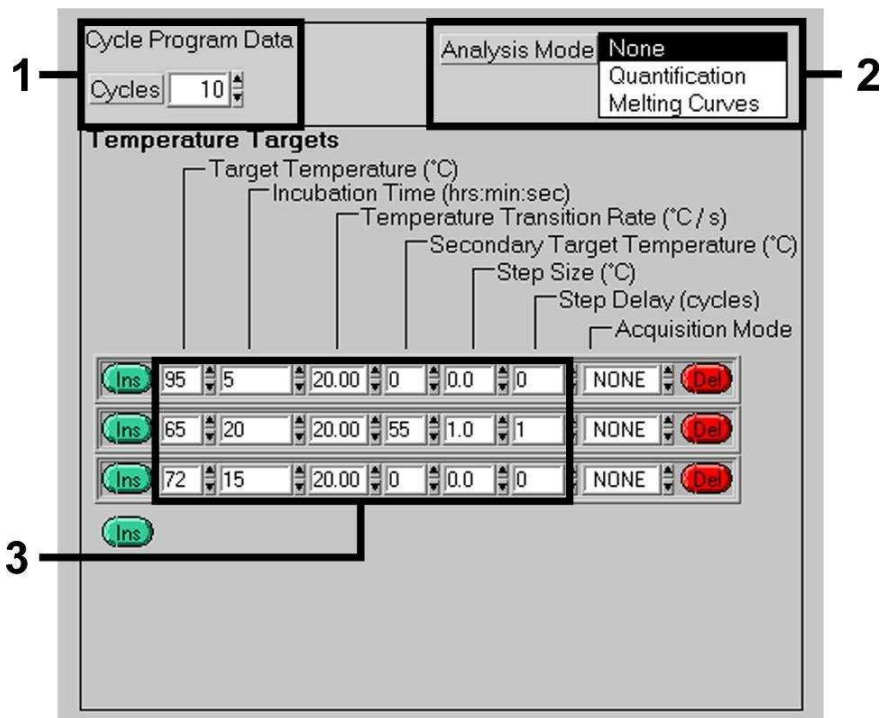


Fig. 4: Touch Down step.

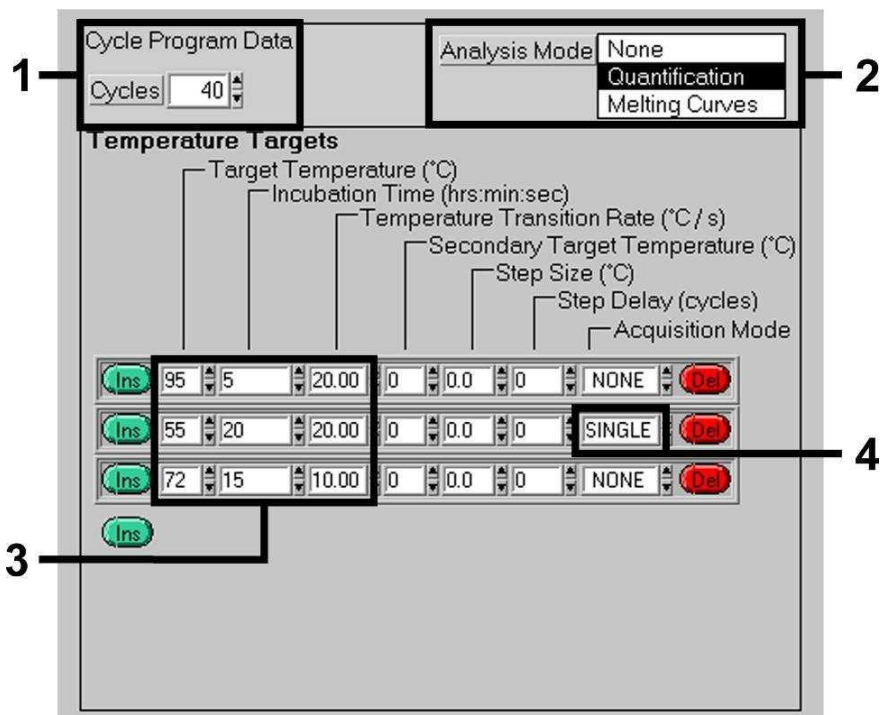


Fig. 5: Amplifying av DNA.

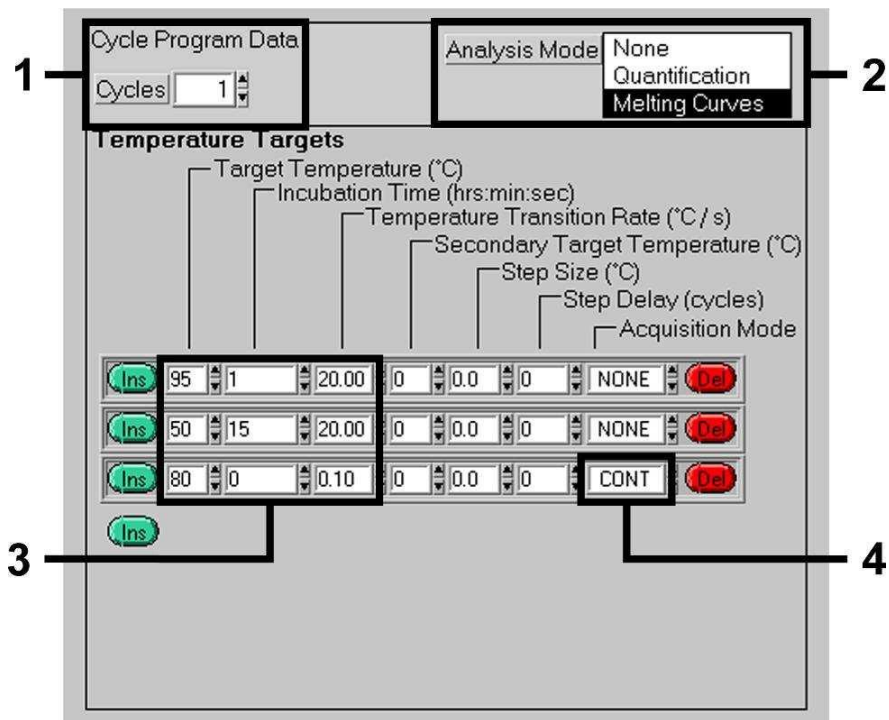


Fig. 6: Smältkurva.

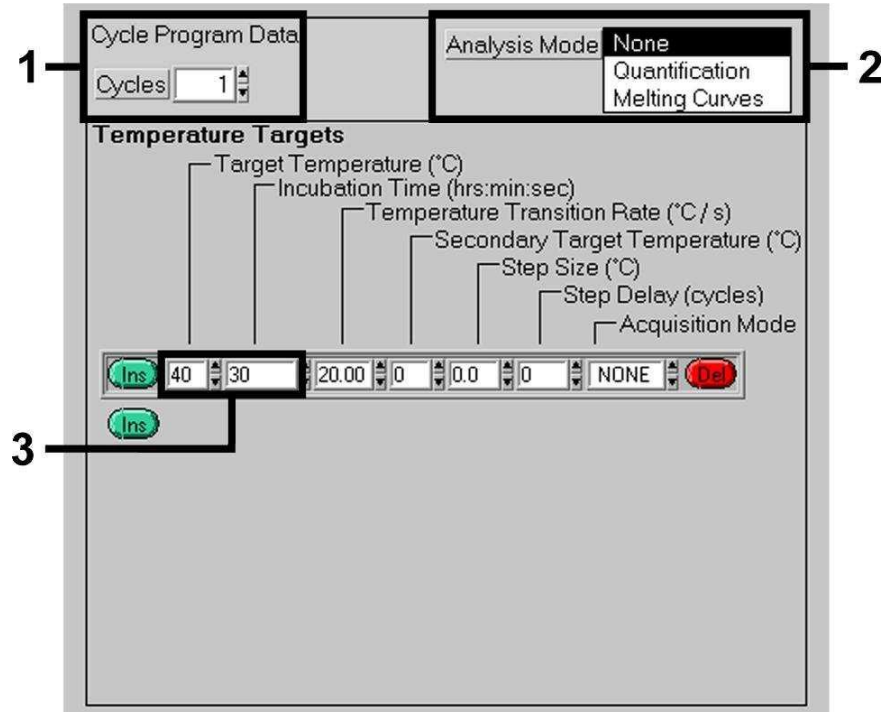


Fig. 7: Kylning.

9. Tolkning av resultat

Vid flerfärgs-analyser uppträder interferenser mellan fluorimeterkanalerna. Programvaran till *LightCycler* instrumentet innehåller en fil som benämns *Color Compensation File*, som kompenserar dessa störningar. Öppna filen innan, under eller omedelbart efter PCR-körningen genom att aktivera knappen *Choose CCC File* resp. *Select CC Data*. Om det inte finns någon *Color Compensation File* installerad, måste du skapa filen enligt anvisningarna i *LightCycler Operator's Manual*. När du har aktiverat *Color Compensation File* visas skilda signaler i fluorimeterkanalerna F1, F2 och F3. För analys av PCR-resultaten, vilka tas fram med *artus HSV-1/2 LC PCR Kit*, väljer du displayfunktionerna F2/Back-F1 för analytisk HSV-PCR, resp. F3/Back-F1 för PCR av *Internkontrollen*. För analys av kvantitativa körningar följ anvisningarna i avsnittet **8.3 Kvantifiering**, samt **Technical Note for quantitation on the *LightCycler* Instrument** på

www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX/.

Om mer än ett Herpes-*artus*-system är integrerat i en PCR-körning är det viktigt att HSV-proven och de tillhöriga standardkurvorna analyseras separerade från alla andra system. Därför är det viktigt att HSV-1-proven analyseras med standardkurvan för HSV-1-standard (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4*) och HSV-2-proven med standardkurvan för HSV-2-standard (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*).

Följande resultat kan förekomma:

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

Analysresultatet är positivt. Provet innehåller HSV-DNA.

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

Differentieringen kan genomföras vid smältpunkten 69°C (Kanal F2/Back-F1, program *Melting Curve*) för HSV-1-amplikon och vid 66°C för HSV-2-amplikon. Beroende på olika extraktionsförutsättningar och därav resulterande buffert tillstånd, kan det förekomma 1 - 2°C avvikelser i både HSV-1 och HSV-2- amplikon.

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

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

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

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

Något diagnosresultat kan inte erhållas.

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

Exempel på positiva och negativa PCR-reaktioner så som för en smältkurve-analys finns i Fig. 8 - 12.

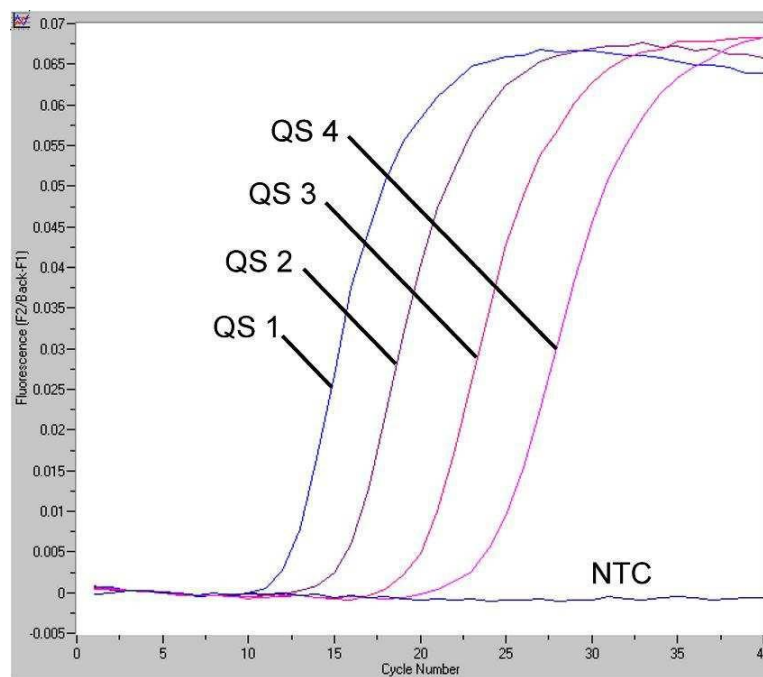


Fig. 8: Detektion av *Kvantifieringsstandarderna (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4)* i fluorimeterkanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativ kontroll).

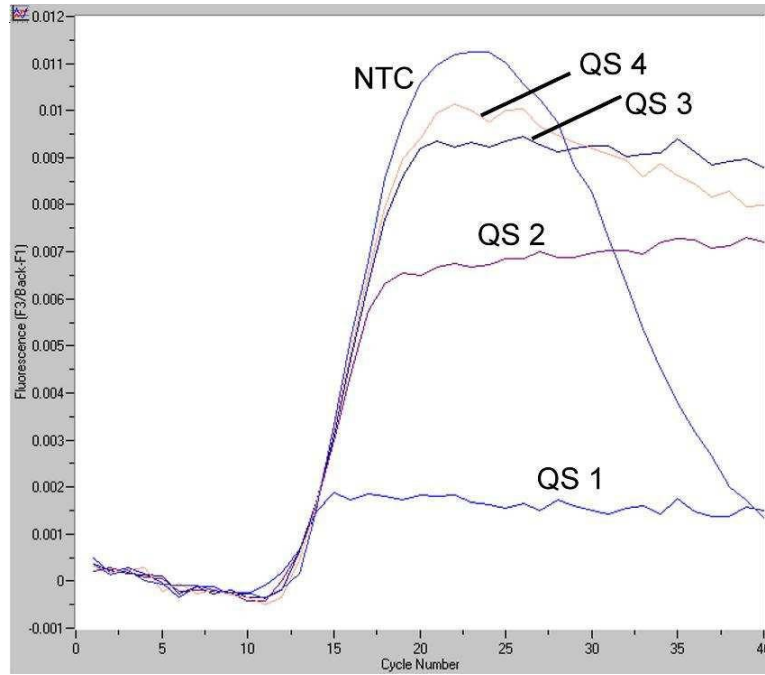


Fig. 9: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorimeterkanal F3/Back- F1 med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

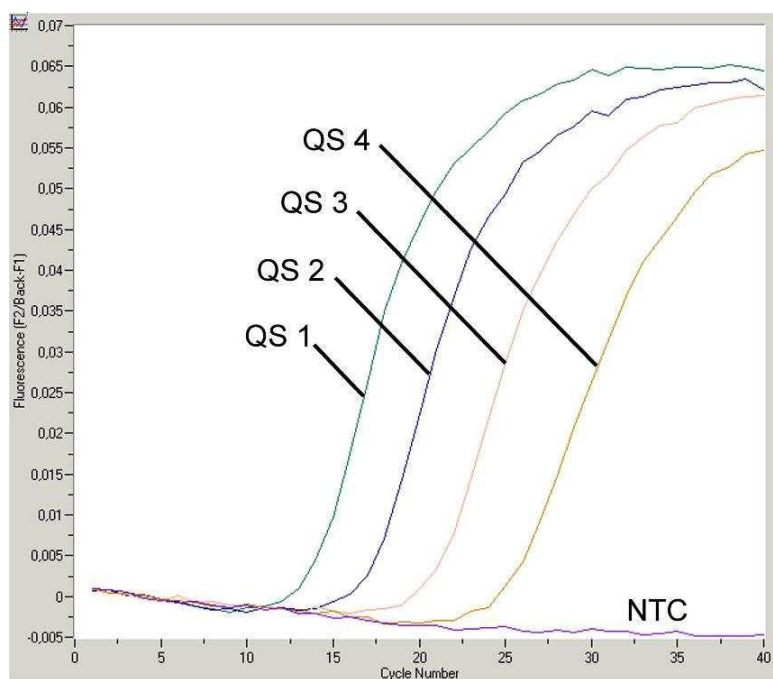


Fig. 10: Detektion av Kvantifieringsstandarderna (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4) i fluorimeterkanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (negativ kontroll).

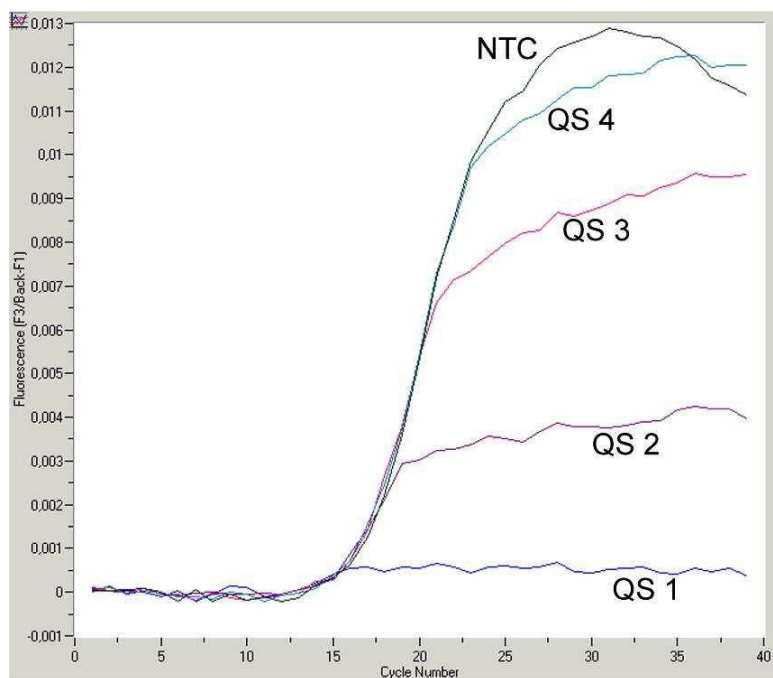


Fig. 11: Detektion av Internkontrollen (IC) i fluorimeterkanal F3/Back-F1 med samtidig amplifiering av Kvantifieringsstandarderna (*HSV2* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativ kontroll).

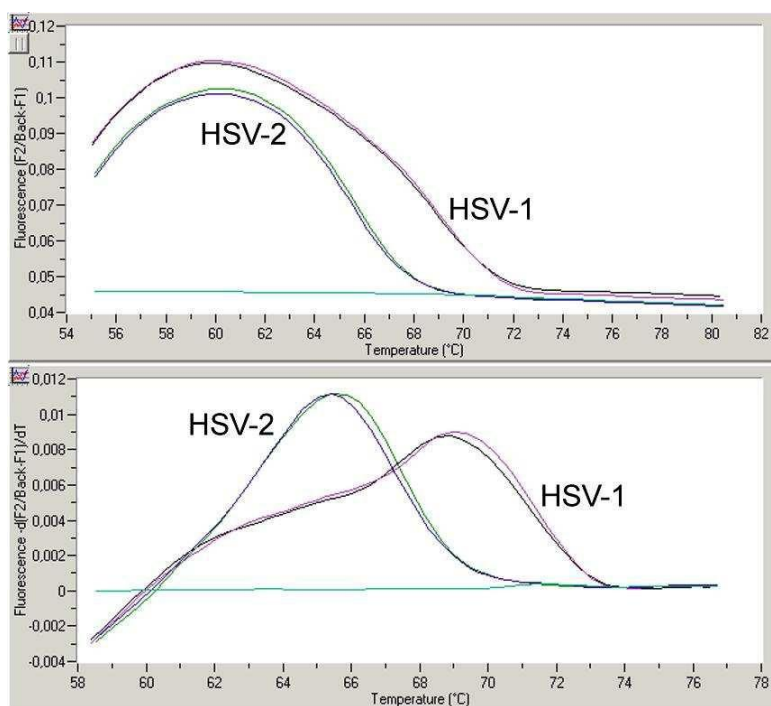


Fig. 12: Framställning av differentieringen mellan HSV-1 och HSV-2 i Fluorimeterkanal F2/Back-F1 (program *Melting Curve*).

10. Felsökning

Ingen signal för de positiva kontrollerna (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) i fluorimeterkanal Kanal F2/Back-F1:

- Valet av fluorimeterkanalen vid analysen av PCR-data motsvarar inte angivelserna i protokollet.
→ Välj för analysen av data fluorimeterkanal F2/Back-F1 för analytisk HSV-PCR och fluorimeterkanal Kanal F3/Back-F1 för PCR av *Internkontrollen*.
- Programmeringen av temperaturprofilen för *LightCycler* instrumentet är felaktig.
→ Jämför temperaturprofilen med angivelserna i protokollet (se **8.5 Programmering av *LightCycler* instrumentet**).
- Felaktig sammanställning av PCR-reaktionen.
→ Kontrollera arbetsstegen med hjälp av 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 HSV-1/2 LC PCR Kit* har löpt ut.
→ Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

Svag eller utebliven signal för *Internkontrollen* i fluorimeterkanal F3/Back-F1 tillsammans med frånvaro av signal i kanal F2/Back-F1:

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

- 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.
 - 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 HSV-1/2 LC PCR Kit* har löpt ut.
 - Kontrollera både förvaringsförutsättningarna så väl som datumet för reagenserna hållbarhet (se kit-etikett) och använd, om nödvändigt, ett nytt kit.

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

- En kontamination föreligger under PCR förberedelserna.
 - Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.
 - Förslut de enskilda PCR-reaktionsbehållarna om möjligt direkt efter tillsats av de undersökta proverna.
 - Pipettera alltid positiv kontrollen sist.
 - Försäkra dig om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet.
- En kontamination orsakad av isoleringen föreligger.
 - Upprepa isoleringen och PCR av de undersökta proverna med hjälp av oanvända reagenser.
 - Försäkra dig 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 för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit utfördes en standard-spädningsserie från 31,6 till nominellt 0,01 HSV-1- resp. HSV-2-kopieekvivalenter^{*}/μl, som analyserades med *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Undersökningarna genomfördes tre olika dagar i form av åttafaldiga bestämningar. Resultatet har tagits fram med hjälp av en probit-analys. Den grafiska utvärderingen framgår av Fig. 13 och Fig. 14. Den analytiska detektionsgränsen för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit ligger såväl för HSV-1, som för HSV-2 på 1 kopior/μl ($p = 0,05$). Detta innebär att med 95 % konfidens 1 kopior/μl kan detekteras.

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

Probit-analys: Herpes simplex virus-1 (LightCycler)

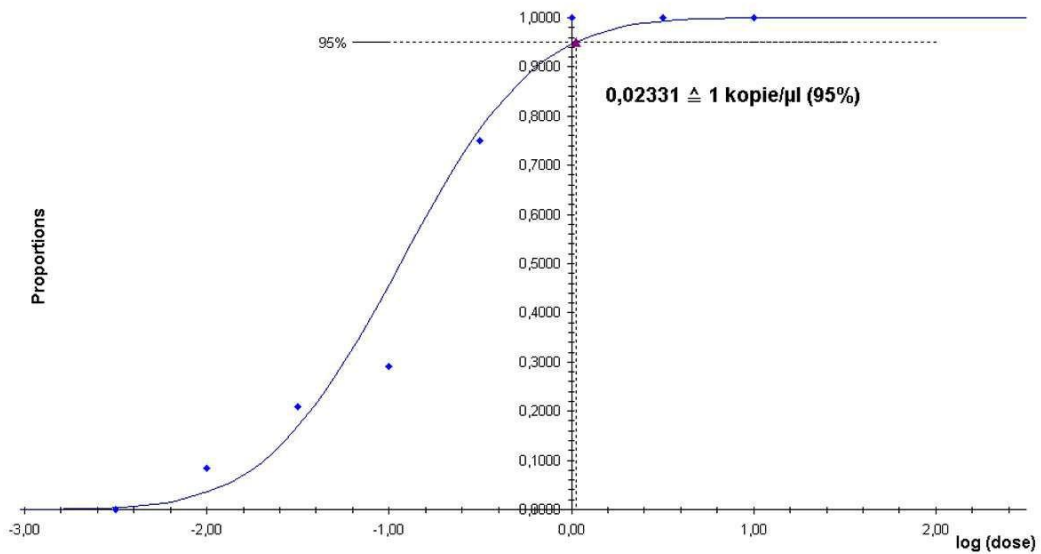


Fig. 13: Analytisk sensitivitet för artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-1).

Probit-analys: Herpes simplex virus-2 (LightCycler)

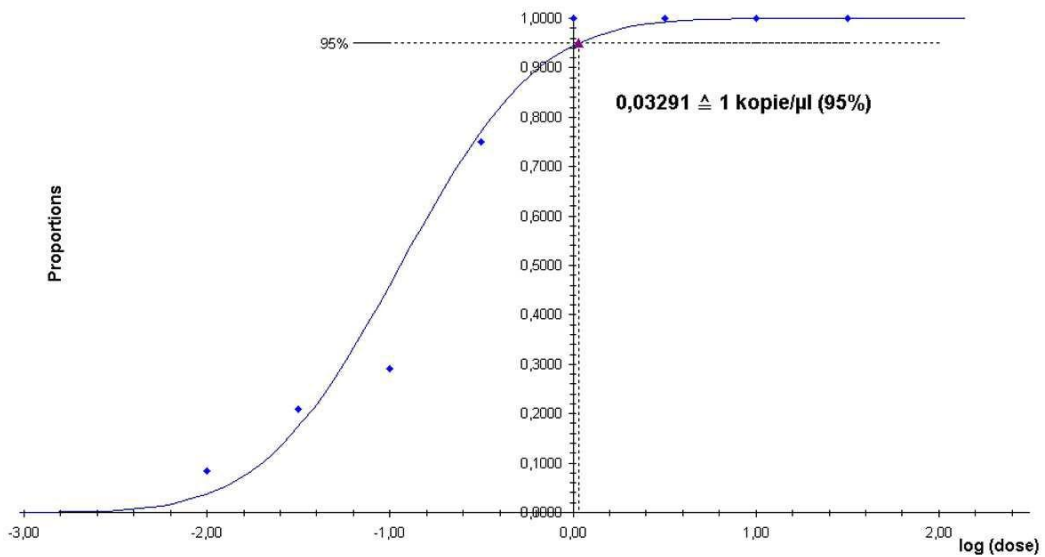


Fig. 14: Analytisk sensitivitet för artus HSV-1/2 LC PCR Kit (HSV-2).

11.2 Specificitet

Specificitet för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit garanteras i första hand genom val av primers och prober samt val av stringenta reaktionsförhållanden. Primers och prober kontrolleras med en sekvensjämförelse-analys med avseende på eventuella homologier mot alla i genbanker publicerade sekvenser. På så sätt kontrolleras även att alla relevanta stammar kan detekteras.

Valideringen av specificiteten genomfördes även på 30 olika CSF (Cerebrospinalvätska) prover vilka samtliga var negativa med avseende på HSV. Dessa genererade inte någon signal med de HSV-specifika primers och prober som är integrerade i *HSV LC Master*.

För bestämning av specificiteten av *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit undersöktes den i Tabell 1 angivna kontrollgruppen med avseende på korsreaktivitet. Ingen av de testade patogenerna var reaktiv.

Tabell 1: Kitets specificitetstest med eventuella korsreaktiva patogener.

Kontrollgrupp	HSV-1/2 (F2/Back-F1)	Internkontroll (F3/Back-F1)
Humant herpesvirus 3 (Varicella Zoster virus)	-	+
Humant herpesvirus 4 (Epstein-Barr virus)	-	+
Humant herpesvirus 5 (Cytomegalievirus)	-	+
Humant herpesvirus 6 A	-	+
Humant herpesvirus 6 B	-	+
Humant herpesvirus 7	-	+
Humant herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	-	+

11.3 Precision

Precisionsdatan för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit tillåter framtagandet av totalvariansen av testsystemet. Denna totalvarians består av **Intra-Assay-variabilitet** (variabilitet mellan prover av samma koncentration inom en undersökningsomgång). **Inter-Assay-variabilitet** (lab-intern variabilitet på grund av att olika enskilda personer använder olika instrument av samma typ) och **Inter-Batch-variabilitet** (variabilitet under användande av olika batcher). Därvid förmedlas standardavvikelsen, variansen och variationskoefficienten, såväl för det patogen-specifika som för PCR av Internkontrollen.

Dessa data togs fram för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit med hjälp av *Kvantifieringsstandard* med den minsta koncentration (QS 4; 10 kopior/ μ l). Undersökningarna utfördes i form av åttafaldiga bestämningar. Utvärderingen av resultaten gjordes med amplifikationskurvornas Ct-värden (Ct: *threshold cycle*, Tabell 2/Tabell 4) och de därifrån förmedlade kvantitativa värdena togs fram i kopior/ μ l (Tabell 3/Tabell 5). Således utgör den totala spridningen hos ett godtyckligt prov med den benämnda koncentrationen 1,67 % (Ct, HSV-1) och 1,95 % (Ct, HSV-2) resp. 20,66 % (konc., HSV-1) och 22,42 % (konc., HSV-2), för detektion av *Internkontrollen* 1,23 % (Ct, HSV-1) och 1,04 % (Ct, HSV-2). Dessa värden baserar på summan av alla enskilda värden av den förmedlade variabiliteten.

Tabell 2: Precisionsdata för HSV-1 baserade på Ct-värdena.

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay variabilitet: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Intra-Assay variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,03	0,00	0,23
Inter-Assay variabilitet: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Inter-Assay variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,12	0,01	0,99
Inter-Batch variabilitet: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Inter-Batch variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,17	0,03	1,40
Totalvarians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Totalvarians: <i>Internkontroll</i>	0,15	0,02	1,23

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

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay variabilitet: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Inter-Assay variabilitet: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Inter-Batch variabilitet <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Totalvarians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Tabell 4: Precisionsdata för HSV-2 baserade på Ct-värdena.

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay variabilitet: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Intra-Assay variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,04	0,00	0,33
Inter-Assay variabilitet: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Inter-Assay variabilitet <i>Internkontroll</i>	0,12	0,01	0,98
Inter-Batch variabilitet <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Inter-Batch variabilitet: <i>Internkontroll</i>	0,14	0,02	1,12
Totalvarians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Totalvarians <i>Internkontroll</i>	0,13	0,02	1,04

Tabell 5: Precisionsdata för HSV-2 baserade på de kvantitativa värdena (i kopior/ μ l).

	Standard- avvikelse	Varians	Variations- koefficient [%]
Intra-Assay variabilitet: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Inter-Assay variabilitet: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Inter-Batch variabilitet <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Totalvarians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

11.4 Robusthet

Undersökningen av robustheten tjänar syftet att förmedla den totala felfrekvensen för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. För detta ändamål blandades 30 HSV negativa Cerebrospinalvätska-prover med vardera 3 kopior/ μ l elutionsvolym HSV-1-kontroll-DNA (trefaldig koncentration av den analytiska sensitivitetsgränsen), isolerades med QIAamp DNA Mini Kit (se **8.1 DNA-isolering**) och analyserades med *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. På samma sätt genomfördes undersökningen för HSV-2 (30 Cerebrospinalvätska-prover; 3 kopior/ μ l HSV-2 kontroll-DNA). Felfrekvensen för såväl HSV-1 som för HSV-2 var 0 % för alla proven. *Internkontrollens* robusthet prövades dessutom genom isolering och analys av vardera 30 HSV negativa Cerebrospinalvätska-prover. Felfrekvensen var 0 %. Inhibering kunde inte iaktas. Robustheten för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit är således ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhet

Data för reproducerbarhet har insamlats för regelbunden utvärdering av prestanda för *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit samt för jämförelse av prestanda med andra produkter, vilket uppfylls genom deltagande i provningsjämförelser.

11.6 Diagnostisk utvärdering

artus HSV-1/2 LC PCR Kit utvärderas för närvarande i ett flertal studier.

12. Särskild information om produktanvändning

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

13. Säkerhetsinformation

Säkerhetsinformation för *artus* HSV-1/2 LC 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-managment-system ISO 9001 och ISO 13485 testades varje tillverkningsats *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit mot fastlagda specifikationer, för att garantera en enhetlig produktkvalitet.

15. Referenser

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 – 767.

16. Symbolförklaring



Används före



Tillverkningssatsnummer



Tillverkare



Beställningsnummer



Materialnummer



Handbok



Medicinteknisk product för in vitro-diagnostik



Etanol



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



<N>

Innehållet räcker för <N> test



Temperaturintervall

QS

Kvantifieringsstandard

IC

Interkontroll

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Varumärken och friskrivningar

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

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

artus HSV-1/2 LC PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation och EZ1 DSP Virus Kit och Card är CE-märkta diagnostiska produkter i enlighet med EU-direktivet för in vitro-diagnostik 98/79/EG. Kan inte erhållas i alla länder.

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

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

© 2007-2015 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

