

Oktober 2015

Håndbok for *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit



Versjon 1
Til bruk med Rotor-Gene[®] Qinstrumenter

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, TYSKLAND

1096239-NO

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

Innhold

Bruksområde	4
Sammendrag og forklaring	4
Patogeninformasjon	4
Prosedyreprinsipp	5
Medfølgende materialer	6
Settets innhold	6
Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger	6
Advarsler og forsiktighetsregler	7
Advarsler	7
Forsiktighetsregler	8
Oppbevaring og håndtering av reagensen	9
Komponenter i settet	9
Prosedyre	10
DNA-ekstraksjon	10
Protokoll: Deteksjon av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA	12
Tolking av resultater	23
Kjøringsvaliditet	23
Kvalitativ analyse	24
Kvantitativ analyse	25
Begrensninger	27
Kvalitetskontroll	27
Ytelsesegenskaper	28

Analytisk sensitivitet	28
Analytisk spesifisitet	29
Lineært område	30
Presisjon	31
Repeterbarhet	34
Symboler	36
Feilsøkingsveiledning	37
Bestillingsinformasjon	38

Bruksområde

artus® HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96) er en *in vitro*-diagnostisk test, basert på real-time PCR-teknologi, for samtidig deteksjon og kvantifisering av Herpes Simplex-virus 1 (HSV-1) og Herpes Simplex-virus 2 (HSV-2)-spesifikt DNA.

Sammendrag og forklaring

artus HSV-1/2 RG PCR Kit utgjør et bruksklart system for deteksjon av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA ved bruk av real-time PCR på Rotor-Gene Q-instrumenter. Analysen inkluderer et heterologt forsterkningssystem (intern kontroll) for å identifisere mulig PCR-hemming og bekrefte integriteten til settreagensene.

Patogeninformasjon

Herpes simplex-virus 1 (HSV-1) og herpes simplex-virus 2 (HSV-2) er medlemmer av familien *Herpesviridae* og, sammen med VZV, er klassifisert som *Alphaherpesvirinae*. HSV-1 og HSV-2 har et lineært dobbeltrådet DNA-genom med omtrent 150 kbp. HSV-1 og HSV-2 deler over 80 % nukleotididentitet med deres proteinkodende region.

Herpes simplex-virusinfeksjoner forekommer verden over, og er ikke ulikt fordelt etter sesong. Viruset overføres via direkte kontakt med viruset i sekreter. Prevalensen av HSV-1-infeksjon øker gradvis fra barndommen av, og når med årene 80 %, mens seroprevalensen av HSV-2 holder seg lav frem til ungdomsalderen. Størsteparten av HSV-1-primærinfeksjoner erverves som subkliniske eller upåviste infeksjoner. Primærinfeksjoner med HSV-2 forekommer som regel som herpes genitalis. Primærinfeksjon med HSV-1 eller HSV-2 etterfølges av opprettelse av latens i dorsaltganglia. Av og til blir viruset reaktivert og fraktes via nevritten til munnhulen eller kjønnsorganene, hvilket fører til frisetting av smittefarlig virus og, i enkelte tilfeller, dannelse av lesjoner. Selv om HSV-infeksjoner som regel asymptomatiske, kan de

forårsake et bredt utvalg kliniske manifestasjoner, deriblant oral herpes, genital herpes, neonatal herpes, encefalitt og okulær herpes.

Prosedyreprinsipp

HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B inneholder reagenser og enzymer for den spesifikke forsterkningen av målregioner innen HSV-1- og HSV-2-genomer og for direkte deteksjon av det spesifikke ampliconet i de fluorescerende kanalene Cycling Green og Cycling Red for Rotor-Gene Q-instrumenter.

I tillegg inneholder *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit et heterologt forsterkningssystem for å identifisere mulige feil under analyseprosessen. Dette påvises som en intern kontroll (IC) i den fluorescerende kanalen Cycling Yellow for Rotor-Gene Q-instrumenter.

Prober spesifikke for HSV-1-DNA er merket med fluoroforet FAM™, mens prober spesifikke for HSV-2-DNA er merket med et fluorofor som utviser samme egenskaper som Cy[®]5. Proben spesifikk for den interne kontrollen (IC) er merket med fluoroforet JOE™. Bruken av prober merket med spektralt differensierbare fluoroforer muliggjør samtidig deteksjon og kvantifisering av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA samt deteksjon av den interne kontrollen i de tilsvarende kanalene for Rotor-Gene Q-instrumentet.

Medfølgende materialer

Settets innhold

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4515265
Antall reaksjoner		96
Blå	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Lilla	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Grønn	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Rød	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Oransje	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Hvit	H ₂ O	1 x 500 µl
	Håndbok	1

* artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit inneholder 4 HSV-1-kvantifiseringsstandarder (QS1–QS4) samt 4 HSV-2-kvantifiseringsstandarder (QS1–QS4).

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Før bruk, pass på at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAamp DNA Mini Kit) (QIAGEN kat.nr. 51304 or 51306; se "DNA-ekstraksjon", side 10)

Forbruksvarer

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (0,1 ml strimmelrør og lokk), til bruk med 72-brønns rotor (QIAGEN, kat.nr. 981103 or 981106)
- Nukleasefrie, lavt DNA-bindende mikrosentrifugerør til klargjøring av hovedblandinger
- Nukleasefrie pipettespisser med aerosolbarrierer

Utstyr

- Rotor-Gene Q MDx 5plex-, Rotor-Gene Q 5plex- eller Rotor-Gene Q 6plex-instrument
- Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.1 eller høyere
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminum block for manual reaction setup (Lasteblokk 72 x 0,1 ml rør, aluminumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett) (QIAGEN, kat.nr. 9018901)
- Dedikerte justerbare pipetter til prøveklargjøring
- Dedikerte justerbare pipetter til klargjøring av PCR-masterblanding.
- Dedikerte justerbare pipetter til dispensering av templat-DNA
- Vorteksblender
- Arbeidsbensentrifuge med rotor for 2 ml reaksjonsrør

Advarsler og forsiktighetsregler

For bruk i forbindelse med *in vitro*-diagnostikk.

Les alle instruksjonene nøye for du bruker testen.

Advarsler

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier.

Forsiktighetsregler

- Dette produktet skal kun brukes av personell med spesiell anvisning og opplæring i teknikkene for real-time PCR og *in vitro*-diagnostiske prosedyrer.
- Prøver skal alltid behandles som smittefarlige og/eller biologisk farlige i samsvar med sikre laboratorieprosedyrer.
- Bruk beskyttende puddefrie engangshansker, laboratoriefrakk og vernebriller ved håndtering av prøver.
- Unngå kontaminasjon med mikrober og nuklease (DNase/RNase) av prøven og komponentene i settet.
- Bruk alltid DNase/RNase-frie engangspipettespisser med aerosolbarrierer.
- Bruk alltid beskyttende puddefrie engangshansker ved håndtering av settkomponenter.
- Bruk separerte og segregerte arbeidsområder til prøveklargjøring, reaksjonsoppsett og forsterknings-/deteksjonsaktiviteter. Arbeidsflyten i laboratoriet skal fortsette på en ensrettet måte. Bruk alltid engangshansker i alle områder, og bytt dem før du går inn i et nytt område.
- Dediker forbruksvarer og utstyr til de separate arbeidsområdene, og flytt dem ikke fra område til område.
- Oppbevar positivt og/eller potensielt positivt materiale atskilt fra andre komponenter i settet.
- Ikke åpne reaksjonsrørene/-platene etter forsterkning for å unngå kontaminasjon med amplikoner.
- Ytterligere kontroller kan testes i samsvar med retningslinjer eller krav i lokale, statlige og/eller føderale bestemmelser eller godkjenningsorganer.
- Bruk ikke komponenter i settet som har gått ut på dato.
- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til de lokale sikkerhetsforskriftene.

Oppbevaring og håndtering av reagensen

Komponenter i settet

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit sendes på tørris. Komponentene i settet skal ankomme nedfrost. Hvis én eller flere komponenter ikke er nedfrost ved mottak, eller hvis rør har blitt forringet under forsendelse, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling for hjelp. Ved mottak må alle komponenter oppbevares ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Unngå tining og frysing av masterreagenser (mer enn to ganger), siden dette kan redusere analysens ytelse. Frys reagensene i alikvoter hvis de skal brukes på ulike tidspunkt. Ikke oppbevar reagenser ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i mer enn 2 timer. Beskytt HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B mot lys.

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

- To masterreagenser (HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B)
- Intern templatkontroll (HSV-1/2 RG IC)
- Fire HSV-1 kvantifiseringsstandarder (HSV-1 QS1–QS4)
- Fire HSV-2 kvantifiseringsstandarder (HSV-2 QS1–QS4)
- Vann av PCR-kvalitet (H_2O)

HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B-reagenser inneholder alle komponenter (bufferer, primere og prober) for forsterkning, deteksjon og differensiering av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA og den interne kontrollen i en enkel reaksjon.

Kvantifiseringsstandardene inneholder standardiserte konsentrasjoner av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA. Disse kan brukes hver for seg som positive kontroller eller sammen for å generere en standardkurve, som kan brukes for å bestemme konsentrasjonen av HSV-1- og/eller

HSV-2-spesifikt DNA i prøven. Konsentrasjonene av kvantifiseringsstandardene er oppført i tabell 1.

Tabell 1. Konsentrasjon av kvantifiseringsstandarder

Kvantifiseringsstandard	Konsentrasjon (kopier/ μ l)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10.000	10.000
QS2	1.000	1.000
QS3	100	100
QS4	10	10

Prosedyre

DNA-ekstraksjon

HSV-1- og HSV-2-spesifikke målsekvenser forsterkes fra DNA. En analyseytelse avhenger av kvaliteten på templatDNA. Sørg for å bruke et prøveklargjøringssett som produserer DNA egnet for bruk i nedstrøms PCR.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, katalognr. 51304 eller 51306) er anbefalt for DNA-rensing til bruk med *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit. Utfør DNA-rensing i samsvar med instruksjonene i *håndboken for QIAamp DNA Mini*.

Siden vaskebufferen i QIAamp DNA Mini Kit inneholder etanol, må du utføre et ekstra sentrifuge-trinn før eluering. Plasser QIAamp Mini-spinnkolonnen i et nytt 2 ml prøvetakingsrør, og kasser det gamle prøvetakingsrøret med filtratet. Sentrifuger i 10 minutter ved omtrent 17.000 x g (~13.000 rpm) på en benkesentrifuge.

Viktig: Bruken av transportør-RNA er avgjørende for ekstraksjonseffektiviteten og -stabiliteten til den ekstraherte nukleinsyren.

Viktig: Etanol er en sterk hemmer i real-time PCR. Hvis prøveklargjøringssettet bruker vaskebufferer som inneholder etanol, må du påse at alle rester av etanol fjernes før eluering av nukleinsyren.

Intern kontroll

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit inneholder en heterolog intern kontroll, som enten kan brukes som en PCR-hemmingskontroll eller som en kontroll for prøveklargjøringsprosedyren (nukleinsyreekstraksjon) og som en PCR-hemmingskontroll.

Hvis den interne kontrollen brukes som en PCR-hemmingskontroll, men ikke som en kontroll for prøveklargjøringsprosedyren, må du tilsette den interne kontrollen direkte i blandingen av HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B, som beskrevet i trinn 2b av protokollen (side 13).

Uansett hvilken metode/hvilket system som brukes til nukleinsyreekstraksjon, må ikke den interne kontrollen tilsettes direkte i prøven. Den interne kontrollen skal alltid tilsettes i prøve-/lyseringsbufferblandingen. Volumet av intern kontroll som skal tilsettes i prøve-/lyseringsbufferblandingen avhenger kun av elueringsvolumet, og utgjør 10 % av elueringsvolumet. For eksempel, ved bruk av QIAamp DNA Mini Kit, elueres DNA i 60 µl buffer-AE. Tilsett derfor 6 µl intern kontroll i prøve-/lyseringsbufferblandingen for hver prøve.

Viktig: Ikke tilsett den interne kontrollen og/eller transportør-RNA direkte i prøven.

Protokoll: Deteksjon av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA

Viktige punkter før du starter

- Før du starter prosedyren, les "Forsiktighetsregler", side 8.
- Ta deg tid til å gjøre deg kjent med Rotor-Gene Q-instrumentet før du starter protokollen. Se instrumentets brukerhåndbok.
- Påse at minst én positiv kontroll og én negativ kontroll (vann av PCR-kvalitet) inkluderes per PCR-kjøring.

Ting du skal gjøre før du starter

- Påse at nedkjølingsblokken (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) kjøles ned på forhånd til 2–8 °C.
- Før hver bruk må alle reagensene tines fullstendig, blandes (ved gjentatt pipettering opp og ned eller gjennom hurtig vorteksblending) og sentrifugeres raskt.

Prosedyre

1. Plasser det ønskede antallet PCR-rør i adapterne i nedkjølingsblokken.
2. Hvis du bruker den interne kontrollen for å overvåke DNA-isolasjonsprosedyren og for å kontrollere for mulig PCR-hemming, må du følge trinn 2a. Hvis du bruker den interne kontrollen utelukkende til kontroll av PCR-hemming, må du følge trinn 2b.
Bruk den interne kontrollen i samsvar med trinn 2b for alle prøver, kontroller og kvantifiseringsstandarder som skal analyseres.
 - 2a. Den interne kontrollen er allerede tilsatt i isolasjonen (se "Intern kontroll", side 11). I dette tilfellet må du klargjøre en masterblending i samsvar med tabell 2.
Reaksjonsblandingen inneholder alle komponentene som kreves for PCR, bortsett fra prøven.

Tabell 2. Klargjøring av masterblanding (intern kontroll brukt for å overvåke DNA-isolasjon og kontrollere for PCR-hemming)

Komponent	1 reaksjon	12 reaksjoner
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
Totalvolum	20 µl	240 µl

2b. Den interne kontrollen må tilsettes direkte i blandingen med HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B. I dette tilfellet må du klargjøre en masterblanding i samsvar med tabell 3.

Reaksjonsblandingene inneholder alle komponentene som kreves for PCR, bortsett fra prøven.

Tabell 3. Klargjøring av masterblanding (intern kontroll brukt utelukkende til kontroll av PCR-hemming)

Komponent	1 reaksjon	12 reaksjoner
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
Totalvolum	21 µl	252 µl

* Volumøkningen som forårsakes av å tilsette den interne kontrollen ignoreres når man klargjør PCR-analysen. Følsomheten til deteksjonssystemet reduseres ikke.

3. Pipetter 20 µl masterblanding i hvert PCR-rør. Tilsett deretter 10 µl av eluert prøve-DNA og bland godt ved å pipettere flere ganger opp og ned. Tilsvarende, tilsett 10 µl av en positiv kontroll eller kvantifiseringsstandard eller 10 µl H₂O (vann av PCR-kvalitet) som en negativ kontroll.

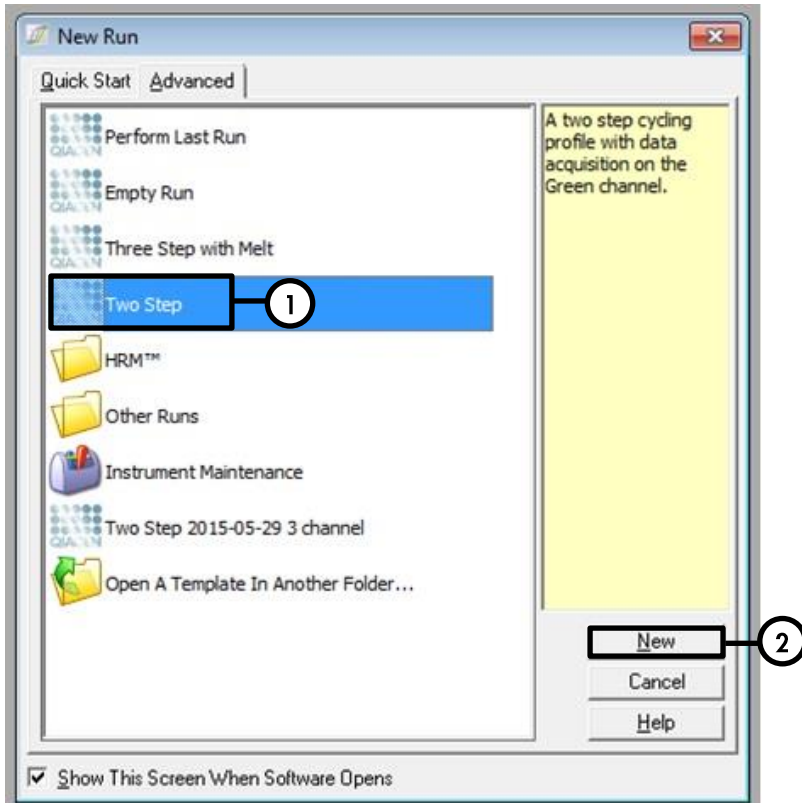
Påse at du minst har én positiv kontroll og én negativ kontroll per kjøring. Til kvantifisering, bruk alle 8 kvantifiseringsstandarder (HSV1 QS1–QS4 og HSV2 QS1–QS4).

4. Lukk PCR-rørene. Påse at låseringen (tilbehør for Rotor-Gene-instrumentet) plasseres oppå rotoren.
5. For deteksjon av HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA, opprett en temperaturprofil i samsvar med følgende trinn.

Stille inn de generelle analyseparametrene	Figur 1, 2, 3, 4
Innledende aktivering av varmstartsenzymet	Figur 5
Forsterkning av DNA	Figur 6
Justere fluorescenskanalfølsomheten	Figur 7
Starte kjøringen	Figur 8

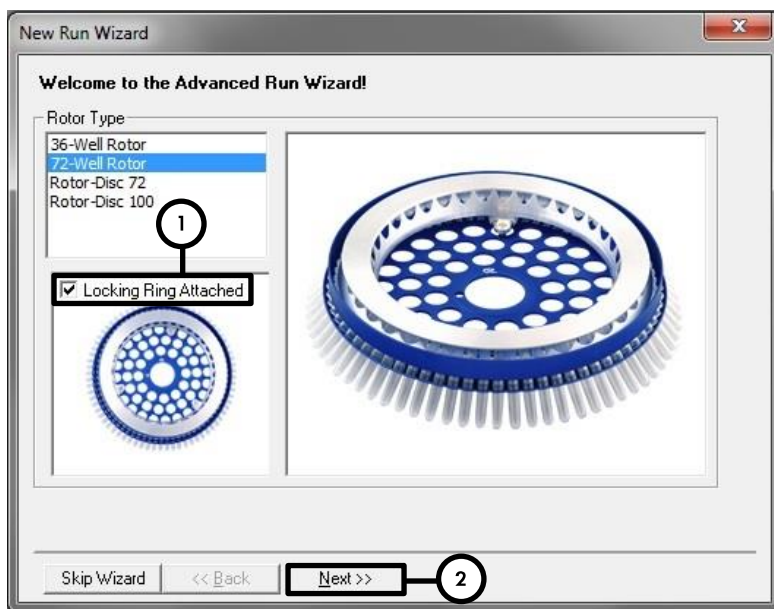
Alle spesifikasjoner henviser til Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.1 og høyere. Du finner mer informasjon om programmering av Rotor-Gene-instrumentene i instrumentets brukerhåndbok. I illustrasjonene er disse innstillingene innrammet i fet svart.

6. Først, åpne dialogboksen **New Run Wizard** (Veiviser for ny kjøring) med versjonen **Advanced** (Avansert) og velg **Two Step** (To trinn) (figur 1). Klikk på **Next** (Neste) for å fortsette.



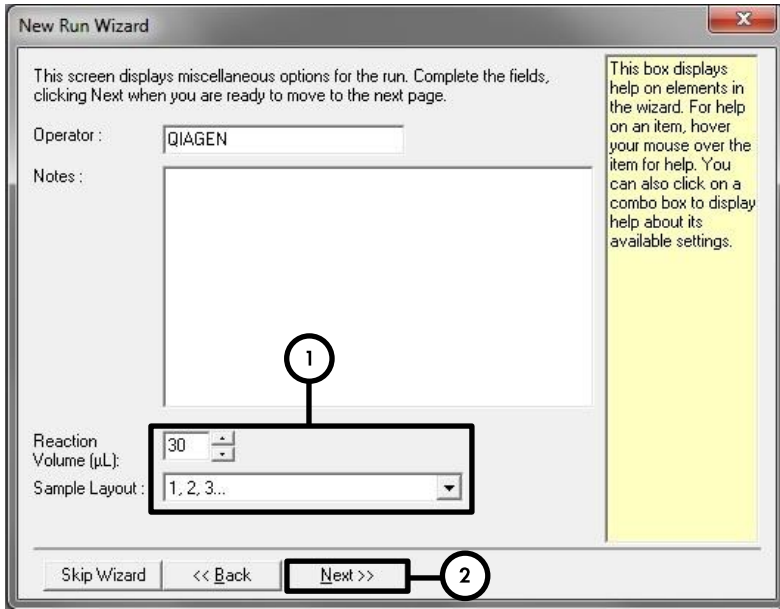
Figur 1. Dialogboksen New Run (Ny kjøring).

7. I neste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 2), merk av boksen **Locking Ring Attached** (Låsering festet) og klikk på **Next**.



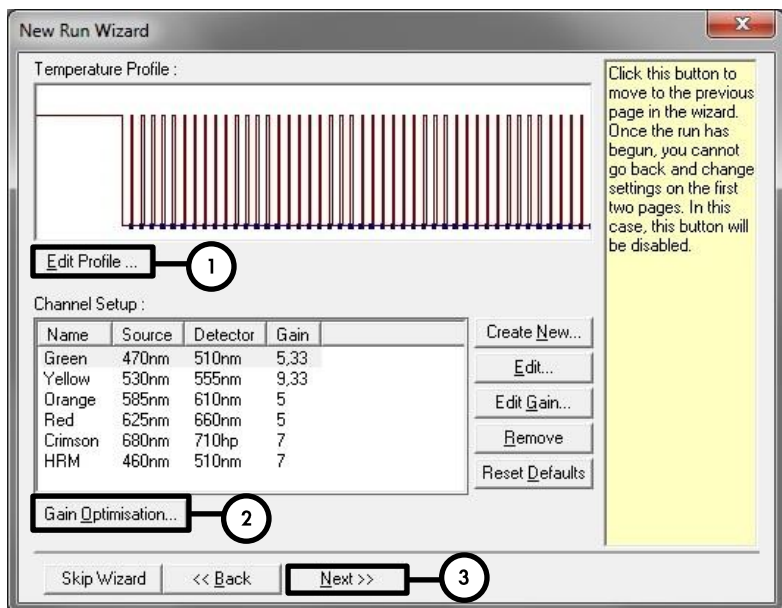
Figur 2. New Run Wizard-dialogboksen.

8. Velg **30** for PCR-reaksjonsvolumet og klikk på **Next** (figur 3).

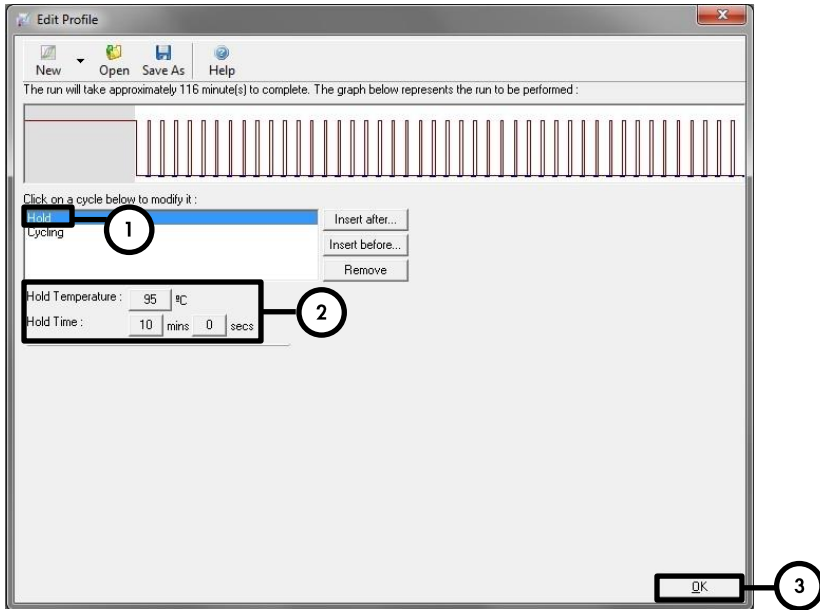


Figur 3. Stille inn de generelle analyseparametrene.

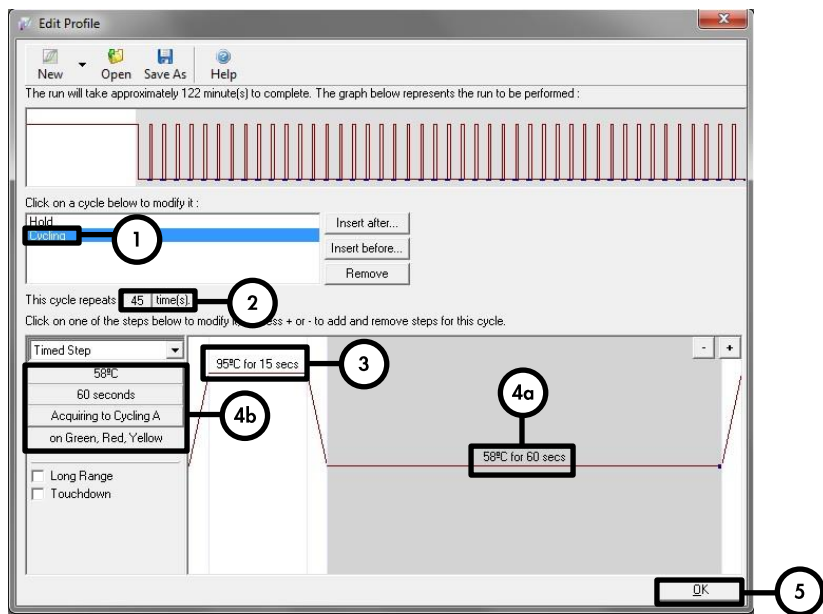
9. Klikk på knappen **Edit Profile** (Rediger profil) i neste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 4) og programmer temperaturprofilen som vist i figur 5–6.



Figur 4. Redigere profilen.

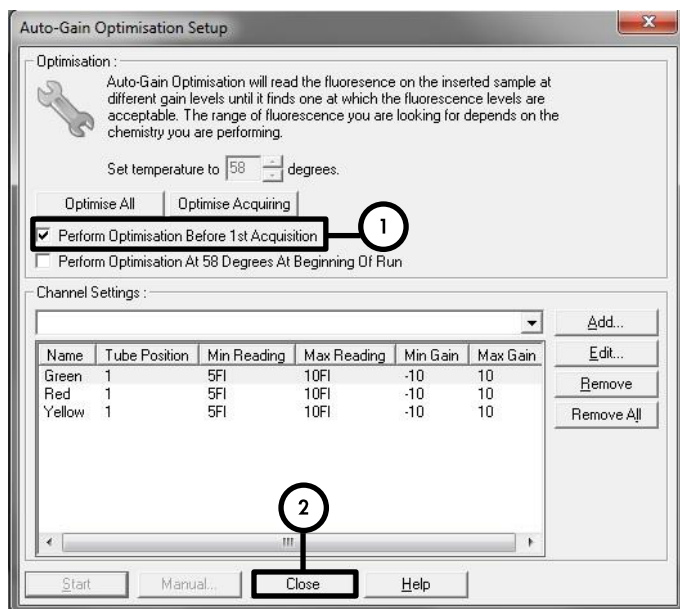


Figur 5. Innledende aktivering av varmstartsenzymet.



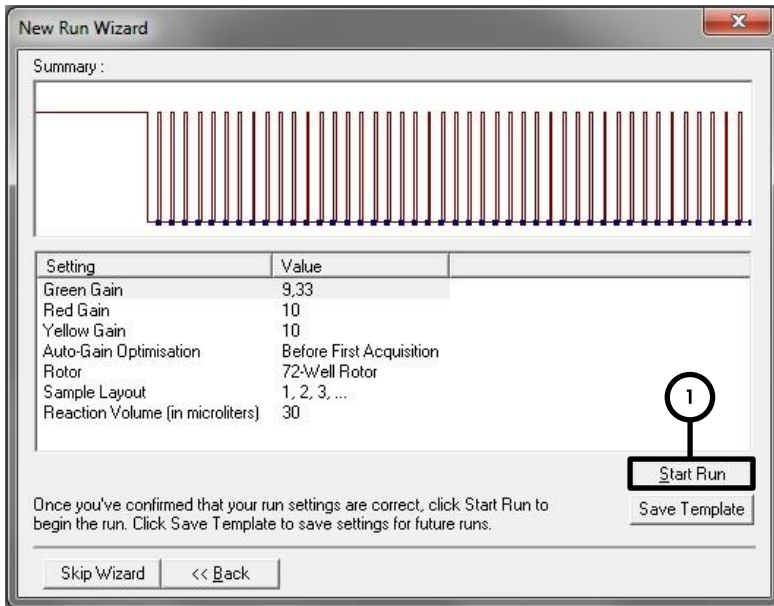
Figur 6. Forsterkning av DNA.

10. Påvisningsområdet for fluorescenskanalene må bestemmes ifølge fluorescensintensitetene i PCR-rørene. Klikk på **Gain Optimisation** (Øk optimalisering) i **New Run Wizard**-dialogboksen (se figur 4, trinn 2) for å åpne dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** (Oppsett av automatisk økning av optimalisering) (figur 7). Merk av boksen **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Utfør optimalisering før 1. innhentning) (figur 7). Påse at alle tre kanaler (grønn, rød og gul) er valgt for **Auto-Gain Optimisation** (Automatisk økning av optimalisering) (figur 7). (Finn kanaler i rullegardinmenyen under **Channel Settings** (Kanalinnstillinger) og klikk på **Add** (Legg til).) Klikk på **Close** (Lukk) i dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** når forsterkning av kalibrering er fullført.



Figur 7. Justere fluorescenskanalfølsomheten.

11. Økningsverdiene som fastsettes av kanalkalibreringen lagres automatisk og listes opp i det siste menyvinduet for programmeringsprosedyren (figur 8). Klikk på **Start Run** (Start kjøring).



Figur 8. Starte kjøringen.

12. Analyser dataene etter at kjøringen er ferdig (se "Talking av resultater", side 23).

Tolking av resultater

Kjøringsvaliditet

Gyldig kvalitativ kjøring

Følgende kontrollbetingelser må oppfylles for at en kvalitativ kjøring skal være gyldig (tabell 4).

Tabell 4. Kontrollbetingelser for en gyldig kvalitativ kjøring

Kontroll-ID	Deteksjonskanal		
	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

Ugyldig kvalitativ kjøring

En kvalitativ kjøring er ugyldig hvis kjøringen ikke er fullført eller hvis en av kontrollbetingelsene for en gyldig kvalitativ kjøring ikke er oppfylt.

Ved en ugyldig kvalitativ kjøring må du gjenta PCR eller ekstraher DNA fra originalprøvene på nytt hvis det ikke finnes mer DNA.

Gyldig kvantitativ kjøring

En kvantitativ kjøring er gyldig hvis alle kontrollbetingelser for en gyldig kvalitativ kjøring er oppfylt (se tabell 4, ovenfor). I tillegg, for nøyaktige kvantifiseringsresultater, må en gyldig

standardkurve genereres. For en gyldig kvantitativ kjøring må standardkurven ha følgende kontrollparameterverdier (tabell 5).

Tabell 5. Kontrollparametre for en gyldig standardkurve

Kontrollparameter	Gyldig verdi
Helning	-3,743/-2,765
PCR-effektivitet	85 %/130 %
Forklart varians (R^2)	>0,98

Ugyldig kvantitativ kjøring

En kvantitativ kjøring er ugyldig hvis kjøringen ikke er fullført eller hvis en av kontrollbetingelsene for en gyldig kvantitativ kjøring ikke er oppfylt.

Ved en ugyldig kvantitativ kjøring må du gjenta PCR eller ekstraher DNA fra originalprøvene på nytt hvis det ikke finnes mer DNA.

Kvalitativ analyse

En tolkning av sammendrag av resultater vises i tabell 6.

Tabell 6. Tolkning av sammendrag av resultater

Prøve-ID	Deteksjonskanal			Tolkning av resultater
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIV	NEGATIV	POSITIV*	HSV-1-spesifikt DNA detektert.
B	NEGATIV	POSITIV	POSITIV*	HSV-2-spesifikt DNA detektert.
C	NEGATIV	NEGATIV	POSITIV	Verken HSV-1- eller HSV-2-spesifikt DNA detektert. Prøven inneholder ikke påviselige mengder HSV-1- eller HSV-2-spesifikt DNA.
D	NEGATIV	NEGATIV	NEGATIV	PCR-hemming eller reagensfeil. Gjenta prosedyren ved bruk av originalprøven eller samle inn og test en ny prøve.

* Deteksjon av den interne kontrollen i Cycling Yellow-kanalen er ikke påkrevd for positive resultater enten i Cycling Green-deteksjonskanalen eller i Cycling Red-deteksjonskanalen. Høye HSV-1- og HSV-2-belastninger i prøven kan føre til reduserte eller fraværende intern kontrollsignaler.

Kvantitativ analyse

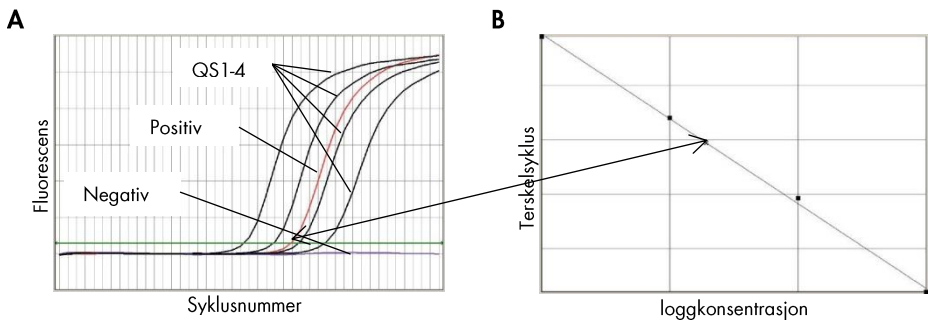
artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit inneholder 4 kvantifiseringsstandarder (QS) for HSV-1 og 4 kvantifiseringsstandarder (QS) for HSV-2. For å generere en standardkurve for kvantitativ analyse må disse defineres som standarder med passende konsentrasjoner (se tabell 1, side 10). En standardkurve for kvantitative analyser kan genereres ved bruk av standarder med kjente konsentrasjoner.

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

- C_T = Terskelsyklus
- m = Helning
- N_0 = Innledende konsentrasjon
- b = Skjæringspunkt

Konsentrasjonene av positive prøver med ukjent konsentrasjon kan utledes fra standardkurven (figur 9).

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



Figur 9. Kvantifiseringsstandarder, en positiv og en negativ prøve vist i (A) et forsterkningsplott og (B) standardkurveanalyser.

Merk: Konsentrasjonen av prøven vises i kopier/ μ l og viser til konsentrasjonen av virus-DNA i eluatet.

Bruk følgende formel for å bestemme virusbelastningen til originalprøven.

$$\text{Virusbelastning (prøve)} \left[\frac{\text{kopier}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volum (eluat)} \left[\mu\text{l} \right] \times \text{virusbelastning (eluat)} \left[\frac{\text{kopier}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Prøveinnmating} \left[\text{ml} \right]}$$

Begrensninger

- Dette produktet skal kun brukes av personell med spesiell anvisning og opplæring i teknikkene for real-time PCR og *in vitro*-diagnostiske prosedyrer.
- God laboratoriepraksis er avgjørende for riktig ytelse av analysen.
- Vær ekstremt forsiktig for å bevare renheten til komponentene i sett- og reaksjonsoppsettene. Overvåk alle reagenser nøye for urenheter og kontaminasjon. Kasser alle reagenser med mistenkt kontaminasjon.
- Egnede prosedyrer for prøvetaking, -transport, -oppbevaring og -behandling er påkrevd for optimal ytelse av denne analysen.
- Bruk ikke denne analysen direkte på prøven. Utfør relevante prosedyrer for nukleinsyreekstraksjon før bruk av denne analysen.
- Tilstedeværelsen av PCR-hemmere kan forårsake falskt negative eller ugyldige resultater.
- Potensielle mutasjoner med målregioner av HSV-1- og/eller HSV-2-genomet dekt av primerne og/eller probene brukt i settet kan føre til at patogenene ikke påvises.
- I likhet med alle diagnostiske tester må resultatene oppnådd med *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit tolkes med hensyn til alle kliniske funn og laboratoriefunn.

Kvalitetskontroll

Hvert parti med *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit testes mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Ytelsesegenskaper

De spesifikke ytelsesegenskapene til *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ble bestemt ved bruk av HSV-1-spesifikt DNA (ATCC®-nummer: VR-1493) og HSV-2-spesifikt DNA (ATCC-nummer: VR-540) med kjente konsentrasjoner.

Analytisk sensitivitet

Den analytiske sensitiviteten til *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit er definert som konsentrasjonen (kopier per μl av eluatet) for HSV-1- eller HSV-2-spesifikt DNA som kan detekteres med en positivitetsrate på $\geq 95\%$. Den analytiske sensitiviteten ble bestemt ved bruk av analyse av en fortyningsserie med HSV-1- og HSV-2-DNA for kjent konsentrasjon (tabell 7 og 8).

Tabell 7. PCR-resultater brukt for å beregne den analytiske sensitiviteten for HSV-1-spesifikk forsterkning.

Innmattingskonsentrasjon (kopier/ μl)	Antall replikater	Antall positive	Treffrate (%)
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-resultater brukt for å beregne den analytiske sensitiviteten for HSV-2-spesifikk forsterkning.

Innmatingkonsentrasjon (kopier/ μ l)	Antall replikater	Antall positive	Treffrate (%)
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 analytiske sensitiviteten til *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit, bestemt ved bruk av probitanalyse, til deteksjon av HSV-1-spesifikt DNA er 0,33 kopier/ μ l eluat (95 % konfidensintervall [KI]: 0,16–1,3 kopier/ μ l) og den analytiske sensitiviteten til HSV-2-spesifikt DNA er 1,2 kopier/ μ l eluat (95 % KI: 0,7–3,5 kopier/ μ l).

Analytisk spesifisitet

Den analytiske spesifisiteten til *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit sikrer av nøyte utvalg av oligonukleotidene (primere og prober). Oligonukleotidene kontrolleres ved bruk av sekvenssammenligningsanalyse i forhold til offentlig tilgjengelige sekvenser for å sikre at alle relevante HSV-genotyper detekteres. I tillegg ble spesifisiteten til *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit evaluert ved å teste et panel med genomisk DNA/RNA ekstrahert fra andre herpesvirus eller andre patogener som er relevante for pasienter med nedsatt immunforsvar (tabell 9).

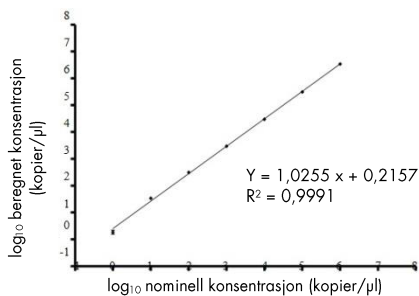
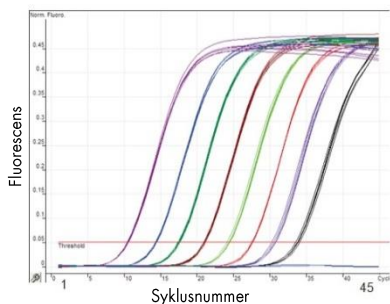
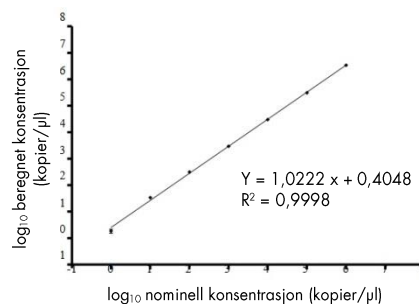
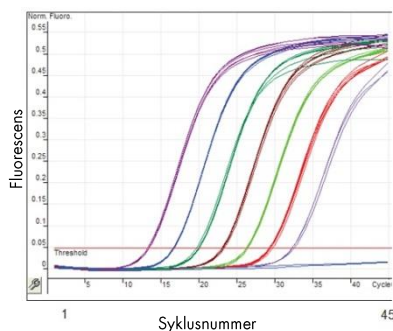
Tabell 9. Organismer testet for kryssreaktivitet

Organisme	Deteksjonskanal		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Varicella-Zoster-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Epstein-Barr-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Cytomegalovirus	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 6 (A, B)	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 7	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 8	Negativ	Negativ	Gyldig
BK-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
JC-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Parvovirus B19	Negativ	Negativ	Gyldig
Hepatiitt A-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Hepatiitt B-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Hepatiitt C-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant immunsviktivirus 1	Negativ	Negativ	Gyldig

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ikke med noen av de spesifiserte organismene.

Lineært område

Det lineære området for *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ble evaluert ved å analysere en logaritmisk fortyningsserie med HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA ved bruk av konsentrasjoner fra 10^8 kopier/ μ l til 10 kopier/ μ l (HSV-1) (figur 10) og 10^7 til 10 kopier/ μ l (HSV-2). Minst 6 replikater per fortyning ble analysert.

A**B**

Figur 10. Forsterkningskurver og lineær regresjonsanalyse av en fortyngningsserie med (A) HSV-1- og (B) HSV-2-spesifikt DNA.

Det lineære området for *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit strekker seg over et område på minst 7 størrelsesordener for HSV-1 og over et område på minst 6 størrelsesordener for HSV-2-spesifikt DNA.

Presisjon

Presisjonen til *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ble bestemt som intra-analysevariabilitet (variabilitet innen ett eksperiment), inter-analysevariabilitet (variabilitet mellom ulike eksperimenter) og inter-partivariabilitet (variabilitet mellom ulike produksjonspartier).

Variabilitetsdata uttrykkes med hensyn til standardavvik, varians og variasjonskoeffisient. Disse data er basert på kvantifiseringsanalyse av definerte konsentrasjoner av genomisk HSV-1- og HSV-2-spesifikt DNA og på terskelsyklus (C_T)-verdier med hensyn til den interne kontrollen (tabell 10–13). Minst 6 replikater per prøve ble analysert for intra-analyse-, inter-analyse- og inter-partivariabilitet. Total varians ble beregnet ved å kombinere de 3 analysene.

Tabell 10. Nøyaktighet av forsterkning av HSV-1-spesifikt DNA

HSV-1-spesifikt system	Gjennomsnittlig kons. (kopier/μl)	Standardavvik	Varians	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Inter-analysevariabilitet	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Inter-partivariabilitet	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. Nøyaktighet av forsterkning av intern kontroll for HSV-1

Intern kontroll	Gjennomsnittlig terskelsyklus (C _T)	Standardavvik	Varians	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	23,0	0,05	0,003	0,23
Inter-analysevariabilitet	22,9	0,12	0,01	0,51
Inter-partivariabilitet	23,5	0,61	0,37	2,6
Total varians	23,3	0,61	0,37	2,6

Tabell 12. Nøyaktighet av forsterkning av HSV-2-spesifikt DNA

HSV-2-spesifikt system	Gjennomsnittlig kons. (kopier/ μ l)	Standardavvik	Varians	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Inter-analysevariabilitet	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Inter-partivariabilitet	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. Nøyaktighet av forsterkning av intern kontroll for HSV-2

Intern kontroll	Gjennomsnittlig terskelsyklus (C _T)	Standardavvik	Varians	Variasjonskoeffisient (%)
Intra-analysevariabilitet	24,0	0,1	0,004	0,43
Inter-analysevariabilitet	23,8	0,3	0,13	1,27
Inter-partvariabilitet	24,0	0,14	0,02	0,59
Total varians	23,9	0,25	0,06	1,03

Repeterbarhet

Spesifisiteten, sensitiviteten og nøyaktigheten for kvantifiseringen av *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit ble evaluert ved å analysere etablerte ferdighetspaneler for HSV. For å sikre repeterbarhet av *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit evalueres spesifisitet og sensitivitet ved å analysere etablerte ferdighetspaneler for HSV-1 og HSV-2 samt karakteriserte diagnostiske prøver ved jevne mellomrom (et eksempel vises i tabell 15).







Tabell 15. Resultater fra analysen av et ferdighetspanel for HSV (QCMD)

Ferdighetspanel			<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
Prøve-ID	Prøveinnhold	Forventet kons. (kopier/ml)	Detektert kons. av HSV-1 (kopier/ml)	Detektert kons. av HSV-2 (kopier/ml)	Intern kontroll
HSVDNA14-01	HSV-1	5.408	2.460	–	Gyldig
HSVDNA14-02	HSV-negativ	–	–	–	Gyldig
HSVDNA14-03	HSV-1	1.135	855	–	Gyldig
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Gyldig
HSVDNA14-05	HSV-1	12.794	8.490	–	Gyldig

Ferdighetspanel			<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
HSVDNA14-06	HSV-2	1.982	–	1.881	Gyldig
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Gyldig
HSVDNA14-08	HSV-2	5.023	–	11.370	Gyldig
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Gyldig
HSVDNA14-10	VZV	–	–	–	Gyldig

Symboler

Symbolene i følgende tabell er benyttet i denne bruksanvisningen.

Symbol	Symboldefinisjon
	Inneholder tilstrekkelig for 96 tester
	Medisinsk enhet til <i>in vitro</i> diagnostikk
	Katalognummer
	Partinummer
	Temperaturbegrensning
	Produsent

Symbol

Symboldefinisjon



Brukes innen



Materialnummer



GTIN-artikkelnummer



Se bruksanvisningen

Feilsøkingeveiledning

Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk www.qiagen.com).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	For 96 reaksjoner: Master A, Master B, 4 kvantifiseringsstandarder HSV-1, 4 kvantifiseringsstandarder HSV-2, intern kontroll, H ₂ O (vann av PCR-kvalitet)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinase K, reagenser, buffere, prøvetakingsrør (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	For 250 DNA-klargjøringer: 250 QIAamp Mini-spinnkolonner, proteinase K, reagenser, buffere, prøvetakingsrør (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9002022

Produkt	Innhold	Katalognr.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 3-års garanti på deler og utføring; og 3 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 2-års garanti på deler og utføring; og 2 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9001570

Produkt	Innhold	Katalognr.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) inkludert bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 3-års garanti på deler og utføring; og 3 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) inkludert bærbar PC, programvare, tilbehør: inkluderer prioritetspakke med programvare, installasjon, opplæring, 2-års garanti på deler og utføring; og 2 forebyggende vedlikeholdsbesøk	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød), inkludert bærbar datamaskin, programvare, tilbehør: inkluderer 1-årig garanti for deler og utføring, installasjon og opplæring	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grønn, gul, oransje, rød, dyp rød), inkludert bærbar datamaskin, programvare, tilbehør: inkluderer 1-årig garanti for deler og utføring, installasjon og opplæring ikke inkludert	9001590

Produkt	Innhold	Katalognr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminumsblokk for manvelt reaksjonsoppsett med en enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strimler med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strimler med 4 rør og lokk til 10.000 reaksjoner	981106

Denne siden er tom med hensikt

Denne siden er tom med hensikt

Begrenset lisensavtale for *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet skal kun brukes i samsvar med protokollene som følger med produktet, og denne håndboken, og kun med komponentene som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine opphavsrettslige produkter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som følger med produktet, denne håndboken, og ytterligere protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Enkelt av disse tilleggsprotokollene er laget av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene har ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN gir ingen garantier for disse eller lovnader om at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruken av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, med unntak av tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og dets komponenter er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN fraskriver seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydte, med unntak av de som er tydelig uttrykt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i å ikke gjøre eller la andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbudene i denne begrensede lisensavtalen ved en hvilken som helst domstol, og skal få tilbakebetalt alle sine saksomkostninger, inkludert advokatkostnader, i forbindelse med håndheving av denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter knyttet til settet og/eller dets komponenter.

Du finner oppdaterte lisensvilkår på www.qiagen.com.

Innkjøpet av dette produktet gjør det mulig for kjøperen å bruke det til å utføre diagnostiktjenester for human in vitro-diagnostikk. Ingen generell patent eller annen lisens av noe annet slag enn denne spesifikke bruksrettigheten fra kjøpet garanteres.

Varemerker: 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, med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettsted www.qiagen.com