

artus[®] HSV-1/2 TM PCR Kit

Handbog



24 (katalog nr. 4500163)



96 (katalog nr. 4500165)

Kvantitativ in vitro diagnostik

Til anvendelse med

AB/PR/SM[®] 7000, 7700 og 7900HT Sequence Detection Systems

version 1



4500163, 4500165



1046890DA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2

MAT

1046890DA



QIAGEN prøve- og analyse-teknologier

QIAGEN er den førende leverandør af innovative prøve- og analyse-teknologier, der muliggør isolation og påvisning af indholdet i enhver biologisk prøve. Vore avancerede højkvalitetsprodukter og -service garanterer succes fra prøve til resultat.

QIAGEN sætter standarder i:

- Oprensning af DNA, RNA og proteiner
- Nucleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-undersøgelser og RNAi
- Automatisering af prøve- og analyse-teknologier

Vor opgave er at bringe Dem i stand til at opnå enestående succes og gennembrud. For yderligere information, se www.qiagen.com.

Indholdsfortegnelse

Inhalt

1. Indhold	5
2. Opbevaring	6
3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter	6
4. Almindelige sikkerhedsregler.....	7
5. Information om smittefare	7
6. Princip for Real-Time PCR	8
7. Produktbeskrivelse	8
8. Protokol.....	10
8.1 DNA-isolering	10
8.2 Intern Kontrol	13
8.3 Kvantificering	14
8.4 Forberedelse af PCR	15
8.5 Programmering af <i>ABI PRISM SDS</i>	20
8.5.1 Programmering af <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>.....	20
8.5.1.1 Forindstillinger ved oprettelsen af en ny PCR-kørsel.....	20
8.5.1.2 Oprettelse/valg af detektorer.....	20
8.5.1.3 Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne.	22
8.5.1.4 Oprettelse af en temperaturprofil	23
8.5.1.5 Arkivering af PCR-kørslen.....	24
8.5.1.6 Start af PCR-kørslen.....	24
8.5.2 Programmering af <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>.....	25
8.5.2.1 Forindstillinger ved oprettelsen af en ny PCR-kørsel	25

8.5.2.2 Oprettelse/valg af detektorer.....	26
8.5.2.3 Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne.....	28
8.5.2.4 Oprettelse af en temperaturprofil	29
8.5.2.5 Arkivering af PCR-kørslen.....	31
8.5.2.6 Start af PCR-kørslen.....	31
9. Analyse	32
10. Fejlkilder	38
11. Specifikationer.....	40
11.1 Analytisk sensitivitet.....	40
11.2 Specificitet	42
11.3 Præcision.....	43
11.4 Robusthed	46
11.5 Reproducerbarhed.....	46
11.6 Diagnostisk evaluering.....	46
12. Særlige anvisninger til brug af produktet.....	46
13. Advarsler og forholdsregler	47
14. Kvalitetskontrol	47
15. Litteratur	47
16. Symbolforklaring.....	48

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Til anvendelse med ABI PRISM 7000 og 7900HT Sequence Detection Systems.

Bemærk: artus HSV-1/2 TM PCR Kit kan hverken bruges sammen med GeneAmp 5700 SDS eller med 384'er pladeformatet af ABI PRISM 7900HT SDS.

1. Indhold

	Påskrift og indhold	Art. Nr. 4500163 24 reaktioner	Art. Nr. 4500165 96 reaktioner
Blå	HSV TM Master	2 x 12 reaktioner	8 x 12 reaktioner
Gul	HSV TM Mg-Sol [☐]	1 x 1.200 µl	1 x 1.200 µl
Rød	HSV1 LC/RG/TM QS 1 [☐] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV1 LC/RG/TM QS 2 [☐] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV1 LC/RG/TM QS 3 [☐] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV1 LC/RG/TM QS 4 [☐] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV2 LC/RG/TM QS 1 [☐] 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV2 LC/RG/TM QS 2 [☐] 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV2 LC/RG/TM QS 3 [☐] 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rød	HSV2 LC/RG/TM QS 4 [☐] 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grøn	HSV TM IC [☐]	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Hvid	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

☐ QS = Kvantificeringsstandard
IC = Intern Kontrol
Mg-Sol = Magnesium-løsning

2. Opbevaring

artus HSV-1/2 TM PCR Kit opbevares ved –30 til –15 °C og er holdbart indtil datoen, der er angivet på etiketten. Gentagen optøning og nedfrysning (> 2 x) bør undgås, da sensitiviteten derved forringes. Ved uregelmæssig brug skal reagenserne derfor aliquoteres. Hvis det er nødvendigt at opbevare kittet ved +4°C, må dette tidsrum ikke vare længere end fem timer.

3. Nødvendige ekstra-materialer og instrumenter

- Pudderfri engangs laboratoriehandsker
- DNA-isoleringskit (se **8.1 DNA-isolering**)
- Pipetter (justerbare)
- Sterile pipettespidser med filter
- Vorteks-mixer
- Bordcentrifuge med rotor til 2 ml-reaktionsbeholdere
- Centrifuge med rotor til mikrotiterplader (valgfri)
- 96-brønds reaktionsplade/reaktionsbeholdere til optiske målinger med tilhørende optiske lukkematerialer (se **8.4 Forberedelse af PCR**)
- 96-brønds todelt opbevaringsrack til anvendelse med optiske reaktionsbeholdere (96-Well Tray/RetainerSet, kat.-nr. 403 081, Applied Biosystems), se **8.4 Forberedelse af PCR**
- Kompressionsmåtte til anvendelse med selvklæbende optiske folier (Optical Cover Compression Pads, kat.-nr. 4 312 639, Applied Biosystems), se **8.4 Forberedelse af PCR**
- Applikator til lukning af reaktionspladerne ved anvendelse af selvklæbende optiske folier (Adhesive Seal Applicator Kit, kat.-nr. 4 333 183, Applied Biosystems)
- ABI PRISM 7000 eller 7900HT SDS

Bemærk: Inden instrumentet sættes igang, kræves en korrekt kalibrering af farvestofferne (*Pure Spectra Component File*) og baggrunden (*Background Component File*).

4. Almindelige sikkerhedsregler

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Brug sterile pipettespidser med filter.
- Positivt materiale (prøver, kontroller, amplifikater) skal opbevares, oprenses og tilsættes reaktionsblandingen i et separat rum, adskilt fra de øvrige reagenser.
- Optø alle komponenter fuldstændigt ved stuetemperatur, inden testen startes.
- Bland komponenterne grundigt og centrifuger kort.
- Der bør arbejdes hurtigt på is eller i køleblokken.

5. Information om smittefare

Herpes simplex virus (HSV) findes i blærevæske, i spyt og i vaginalsekret og overføres via kontaktinfektion, ved samleje og perinatalt. Ved størstedelen af HSV-betingede sygdomme dominerer billedet af blæredannelser på huden og slimhinderne (mund og genitalier). HSV-infektionen kan optræde som primærinfektion, som forløber asymptomatisk i > 90 % af tilfældene, eller som recidiv. Til primærinfektionerne, som især udløses af HSV-1, hører gingivostomatitis, eksemet herpeticum, keratokonjunktivitis og encefalitis. HSV-2 optræder som primærinfektion, især som vulvovaginitis, som meningitis og som generaliseret herpes hos nyfødte. Som recidiv af HSV-infektionen opstår der især blæredannelse i nasolabial- eller genitalregionen. Recidiver for keratokonjunktivitis og meningitis er af farligere kategori.

6. Princip for Real-Time PCR

Ved patogen diagnostik ved hjælp af polymerase kædereaktion (eng. Polymerase Chain Reaction = PCR) bliver specifikke områder af smitstof-genomet amplificeret. Detektionen foregår via Real-Time PCR ved hjælp af fluorescensfarver. Disse er som regel koblet til oligonukleotid-prober, som binder sig specifikt til PCR-produktet. Detektionen af fluorescensintensiteten i Real-Time PCR-kørslen gør det muligt at påvise og kvantificere produkterne, uden at skulle åbne prøverørene igen efter PCR-kørslen (Mackay, 2004).

7. Produktbeskrivelse

artus HSV-1/2 TM PCR Kit er et brugsklart system til detektion af herpes simplex virus-1 og -2-DNA ved hjælp af polymerase kædereaktion (PCR) i *ABI PRISM 7000* og *7900HT Sequence Detection System*. *HSV TM Master* indeholder reagenser og enzymer til den specifikke amplifikation af en 148 bp lang sekvens af herpes simplex virus-genomet. Detektionen af amplifikatet foregår ved måling af FAM-fluorescensen (HSV1) og NED-fluorescensen (HSV2) i *ABI PRISM SDS*. Derudover indeholder *artus HSV-1/2 TM PCRKit* et andet heterologt amplifikationssystem, som bruges til detektion af en eventuel PCR-inhibition. Denne bliver påvist som *Intern Kontrol (IC)* via måling af VIC-fluorescensen. Detektionsgrænsen for den analytiske HSV-PCR (se **11.1 Analytisk sensitivitet**) bliver derved ikke reduceret. Der vedlægges eksterne positive kontroller (*HSV-1 LC/RG/TM QS 1 – 4* og *HSV- 2 LC/RG/TM QS 1 – 4*) som bruges til kvantificering af smitstoffet. Læs dertil afsnittet **8.3 Kvantificering**.

8. Protokol

8.1 DNA-isolering

DNA-isoleringskits tilbydes af forskellige producenter. Prøvevolumener til DNA-isoleringsproceduren afhænger af den benyttede protokol. Tilsæt den anbefalede prøvemængde til oprensningen og udfør DNA-isoleringen efter producentens forskrift. Følgende isoleringskits anbefales:

Prøve-materiale	Oprensningskit	Katalog-nummer	Producent	Carrier-RNA
Serum, plasma, CSF (cerebrospinal-væske), podninger	QIAamp [®] UltraSens [®] Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	indeholdt
	QIAamp DNA Mini	51 304	QIAGEN	ikke indeholdt
CSF	EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	indeholdt

*Anvendes sammen med BioRobot[®] EZ1 DSP Workstation (Kat. Nr. 9001360) og EZ1 DSP Virus Card (Kat. Nr. 9017707)

Vigtige henvisninger vedrørende anvendelsen af QIAamp UltraSens Virus Kit og QIAamp DNA Mini Kit:

- Anvendelsen af **carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Hvis det anvendte isoleringskit ikke indeholder carrier-RNA, anbefales der ved oprensningen af nukleinsyrer af cellefri kropsvæsker eller materialer med ringe DNA/RNA-indhold (f.eks. CSF/liquor), en tilsætning af carrier-RNA (RNA-homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat.-nr. 27-4110-01). Følg så venligst den følgende fremgangsmåde:

- Hertil resuspenderes den lyophiliserede carrier-RNA i elueringsbufferen (ikke i lysisbuffer) af isoleringskittet (f.eks. AE-buffer fra QIAamp DNA Mini Kit) og fremstilles en fortynding med en koncentration på 1 µg/µl. Lav derefter af carrier-RNA-løsningen et for Deres egne krav passende antal aliquoter, som skal opbevares ved

-20°C. Undgå gentagen optøning (> 2 x) af carrier-RNA-aliquoten.

8.2 Per oprensning skal der tilsættes 1 µg carrier-RNA per 100 µl

lysisbuffer. Bestemmer ekstraktionsprotokollen f.eks. 200 µl peroprenset

prøve, tilsættes 2 µl af carrier-RNA (1 µg/µl) direkte tillysisbufferen.

Før begyndelsen af oprensningen skal blandingen af lysisbuffer og

carrier-RNA (og i givent tilfælde *Intern Kontrol*, se 8.2 **Intern Kontrol**)

fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer	f.eks. 200 µl	f.eks. 2.400 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Samlet volumen	202 µl	2.424 µl
Volumen for oprensningen	200 µl	for hver 200 µl

- c) Den frisk fremstillede blanding af lysisbuffer og carrier-RNA skal tilsættes oprensningen med det samme. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.
- Anvendelsen af **carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. For at få en højere stabilitet hos den i QIAamp UltraSens Virus Kit vedlagte carrier-RNA, anbefaler vi følgende fremgangsmåde, som afviger fra angivelserne i håndbogen til isoleringskittet:
 - Resuspender den lyophiliserede carrier-DNA før den første brug af isoleringskittet i 310 µl af elueringsbufferen, som er indeholdt i kittet (slutkoncentration 1 µg/µl, anvend ikke lysisbuffer), og lav af carrier-RNA-løsningen et for Deres egne krav passende antal aliquoter, som skal opbevares ved -20°C. Undgå gentagen optøning (>2 x) af carrier-RNA-aliquoten.
 - Før begyndelsen af enhver oprensning skal blandingen af lysisbuffer og carrier-RNA (og i givent tilfælde *Intern Kontrol*, se **8.2 Intern Kontrol**) fremstilles frisk efter det følgende pipetteringsskema.

Antal prøver	1	12
Lysisbuffer AC	800 µl	9.600 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Samlet volumen	805,6 µl	9.667,2 µl
Volumen for oprensningen	800 µl	for hver 800 µl

- c. Den frisk fremstillede blanding af lysisbuffer og carrier-RNA skal tilsættes oprensningen med det samme. Det er ikke muligt at opbevare blandingen.
- Der kan opnås en opkoncentrering af prøven ved tilsætning af **QIAamp UltraSens Virus Kit**. Hvis prøvematerialet ikke består af serum eller plasma, skal der tilføjes minimum 50 % (v/v) negativt humanplasma til prøven.
 - Bruger man en oprensningsprotokol med **ethanolholdige** vaskebuffer, anbefales det, at man udfører et ekstra centrifugeringstrin (tre minutter, 13.000 rpm) for at fjerne ethanolrester. Dette forhindrer eventuelle PCR-inhibitioner.
 - *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit er ikke egnet til oprensningskørsler, som arbejder på basis af **phenol**.

Vigtig henvisning vedrørende anvendelsen af EZ1 DSP Virus Kit:

- Anvendelsen af **Carrier-RNA** er af afgørende betydning for oprensningens effektivitet og dermed for DNA-/RNA-udbyttet. Tilsæt derfor venligst den passende mængde carrier-RNA til hver oprensning ved at følge instruktionerne i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

Vigtigt: Den *Interne Kontrol* til *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit kan anvendes direkte i oprensningen (se **8.2 Intern Kontrol**).

8.2 Intern Kontrol

Der vedlægges en *Intern Kontrol* (HSV TM IC). Med denne er det muligt at kontrollere **både oprensningen af DNA og en mulig inhibition af PCR** (se Fig. 1). Ved anvendelsen af **EZ1 DSP Virus Kit** i oprensningen skal den *Interne Kontrol* tilsættes analogt til angivelserne i *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Ved **QIAamp UltraSens Virus Kit** eller ved **QIAamp DNA Mini Kit** tilsættes den *Interne Kontrol* i et forhold der svarer til 0,1 µl pr. 1 µl elueringsvolumen til oprensningen. Hvis De for eksempel anvender QIAamp DNA Mini Kit og eluerer DNA i 200 µl AE-buffer, skal der tilsættes 20 µl af den *Interne Kontrol*. Hvis De f.eks. eluerer i 100 µl, skal der tilsvarende tilsættes 10 µl. Mængden af den anvendte *Interne Kontrol* er **kun** afhængig af elueringsvolumenet. Den *Interne Kontrol* og carrier-RNA (se **8.1 DNA-isolering**) må kun tilsættes)

- til blandingen af lysisbuffer og prøvemateriale eller
- direkte til lysisbufferen.

Den *Interne Kontrol* må ikke tilsættes direkte til prøvematerialet. Ved tilsætningen til lysisbufferen skal der sørges for, at blandingen af den *Interne Kontrol* og lysisbuffer/carrier-RNA forberedes frisk og tilsættes med det samme (at opbevare blandingen ved stuetemperatur eller i køleskabet kan allerede efter få timer føre til fravær af den *Interne Kontrol* og til en reduceret oprensningseffektivitet). Pipetter den *Interne Kontrol* og carrier-RNA **ikke** direkte i prøvematerialet.

Optionalt kan den *Interne Kontrol* anvendes **udelukkende til kontrol af en mulig PCR-inhibition** (se Fig. 2). Til denne anvendelse tilsættes pr. testblanding 2 µl af den *Interne Kontrol* og 10 µl HSV TM Mg-Sol direkte til 20 µl HSV TM Master. Brug til hver PCR-reaktion 30 µl af den således fremstillede Master Mix*, og tilsæt derefter 20 µl af den oprensede prøve.

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af tilsætningen af den *Interne Kontrol*, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

Ved udførelsen af en kørsel med flere prøver, er det nødvendigt at øge de krævede mængder af *HSV TM Master*, af *HSV TM Mg-Sol* og den *Interne Kontrol* svarende til prøvetallet (se **8.4 Forberedelse af PCR**).

8.3 Kvantificering

De vedlagte *Kvantificeringsstandarder* (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*) behandles som en allerede oprenset prøve og anvendes i samme volumen (20 µl). Tilsæt alle fire vedlagte *Kvantificeringsstandarder* for både HSV1 og HSV2 for at udarbejde en standardkurve i et *ABI PRISM Sequence Detection System*. Definér disse som standarder under angivelse af de tilsvarende koncentrationer (se **8.5 Programmering af ABI PRISM SDS**). Importen af standardkurver fra tidligere kørsler er med *ABI PRISM® 7000* og *7900HT SDS* software ikke muligt.

Bemærk: *Kvantificeringsstandarderne* er defineret som kopier/µl. Til omregning af værdierne, der blev udarbejdet på baggrund af standardkurven i kopier/ml prøvemateriale, sk al følgende formel anvendes:

$\text{Resultat (kopier/ml)} = \frac{\text{Resultat (kopier/}\mu\text{l)} \times \text{Elueringsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Prøvevolumen (ml)}}$
--

Bemærk, at der principielt skal tilsættes det oprindelige prøvevolumen i den ovennævnte formel. Dette skal tages i betragtning, hvis prøvevolumenet blev forandret før nukleinsyre-oprensningen (f.eks. at den blev indsnævret ved centrifugering eller forhøjet ved at den blev fyldt op på det volumen, som kræves for oprensningen).

Vigtigt: For simplificering af den kvantitative analyse med med *artus*-systemer på *ABI PRISM 7000 SDS* findes under www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX en vejledning (**Technical Note for Quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS**).

8.4 Forberedelse af PCR

Gør det nødvendige antal reaktionsbeholdere eller en 96-brønds reaktionsplade klar til de planlagte reaktioner. I den følgende tabel findes en liste over anbefalede materialer:

Artikel	Betegnelse	Katalog-nummer	Producent	Opbevarings rack	Kompressionsmål
96-brønds optisk reaktionsplade	96-Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	nej	-
Selvkæben de optiske folier	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	-	ja
Optiske reaktionsbeholdere	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	ja	-
Optiske reaktionsbeholdere	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	ja	-
Optiske låg (flade)	ABI PRISM Optical Caps, 8 Caps/Strip	4 323 032	Applied Biosystems	-	nej

Bemærk ved opsætningen af PCR'en, at hver PCR-kørsel medføres mindst en kvantificeringsstandard samt en negativ kontrol (*Water, PCR grade*). Til udarbejdelsen af en standardkurve anvendes pr. PCR-kørsel alle Kvantificeringsstandarder (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*). Alle reagenser skal, inden testen startes, tøs helt op ved stuetemperatur, blandes godt (gentagen pipettering eller kort vorteksen) og centrifugeres kort.

For tilfældet, at De **både** vil kontrollere **oprensningen af DNA og en eventuel inhibition af PCR**, skal den *Interne Kontrol* tilsættes oprensningen i forvejen (se **8.2 Intern Kontrol**). Brug dertil følgende pipetteringsskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 1):

* Det er nødvendigt at åbne reaktionsbeholderne når de sættes ind og tages ud af det todelte opbevaringsrack. Brug udelukkende den nederste del af rack'et for at undgå kontaminationer.

	Antal prøver	1	12
1. Opsætning af Master Mix	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	0 μ l	0 μ l
	Samlet volumen	30 μ l	360 μ l
2. Opsætning af PCR-reaktion	Master Mix	30 μ l	for hver 30 μ l
	Prøve	20 μ l	for hver 20 μ l
	Samlet volumen	50 μ l	for hver 50 μ l

Hvis De **udelukkende** vil anvende den *Interne Kontrol* til kontrol af en PCR-inhibition, skal den tilsættes direkte til HSV TM Master. Brug dertil følgende pipetteringsskema (se endvidere skematisk oversigt i Fig. 2):

	Antal prøver	1	12
1. Opsætning af Master Mix	HSV TM Master	20 μ l	240 μ l
	HSV TM Mg-Sol	10 μ l	120 μ l
	HSV TM IC	2 μ l	24 μ l
	Samlet volumen	32 μ l*	384 μ l*
2. Opsætning af PCR-reaktion	Master Mix	30 μ l*	for hver 30 μ l*
	Prøve	20 μ l	for hver 20 μ l
	Samlet volumen	50 μ l	for hver 50 μ l

Pipetter 30 μ l af Master Mix i hver reaktionsbeholder hhv. i hver fordybning i 96 brønds-reaktionspladen. Derefter tilsættes 20 μ l af eluatet fra DNA-isoleringen. Sørg for, at begge opløsninger blandes godt igennem ved at afpipettere og opsuge dem flere gange. Luk reaktionsbeholderne med de tilhørende låg, eller hvis der anvendes en 96-brønds-reaktionsplade ved hjælp af selvklæbende optiske folier (*Optical Adhesive Covers*). For at samle opsætningsvolumenet i rør- eller pladebunden centrifugeres reaktionsbeholderne (i en til PCR-rør egnet opbevaringsrack), hhv.

* Volumenforhøjelsen, som opstår på grund af tilsætning af den *Interne Kontrol*, er irrelevant. Sensitiviteten for detektionssystemet påvirkes ikke.

96-brønds- reaktionspladen i en centrifuge med mikrotiterplade-rotor i 30 sekunder ved 1.780 x g (4.000 rpm). Hvis De ikke har en sådan centrifuge, så sørg ved opsætningen af PCR-reaktionerne for, at pipettere både Master Mix og prøveløbet på bunden af reaktionsbeholderne hhv. reaktionsenhederne (brønd). Opbevar reaktionspåsætningerne ved +4°C indtil *ABI PRISM SDS* Instrument er programmeret (se **8.5 Programmering af *ABI PRISM SDS***), og overfør dem derefter til apparatet.

Bemærk:

- Sæt ved brug af optiske reaktionsbeholdere sammen med optiske låg altid et holdningsstativ ind (*96-Well Tray/Retainer Set*) i instrumentet (*ABI PRISM 7000* og *7900HT SDS*). Ved anvendelsen af det todelte holdningsstativ er det nødvendigt at åbne reaktionsbeholderne ved indsætningen og udtagningen. Brug udelukkende den nederste del af rack'et for at undgå kontaminationer i forbindelse med dette.
- Ved benyttelse af 96-brønds optiske reaktionsplader sammen med selvklæbende optiske folier, er det nødvendigt, at der lægges en kompressionsmåtte på (*Optical Cover Compression Pads*).

Tilsætning af *Intern Kontrol* til oprensningen

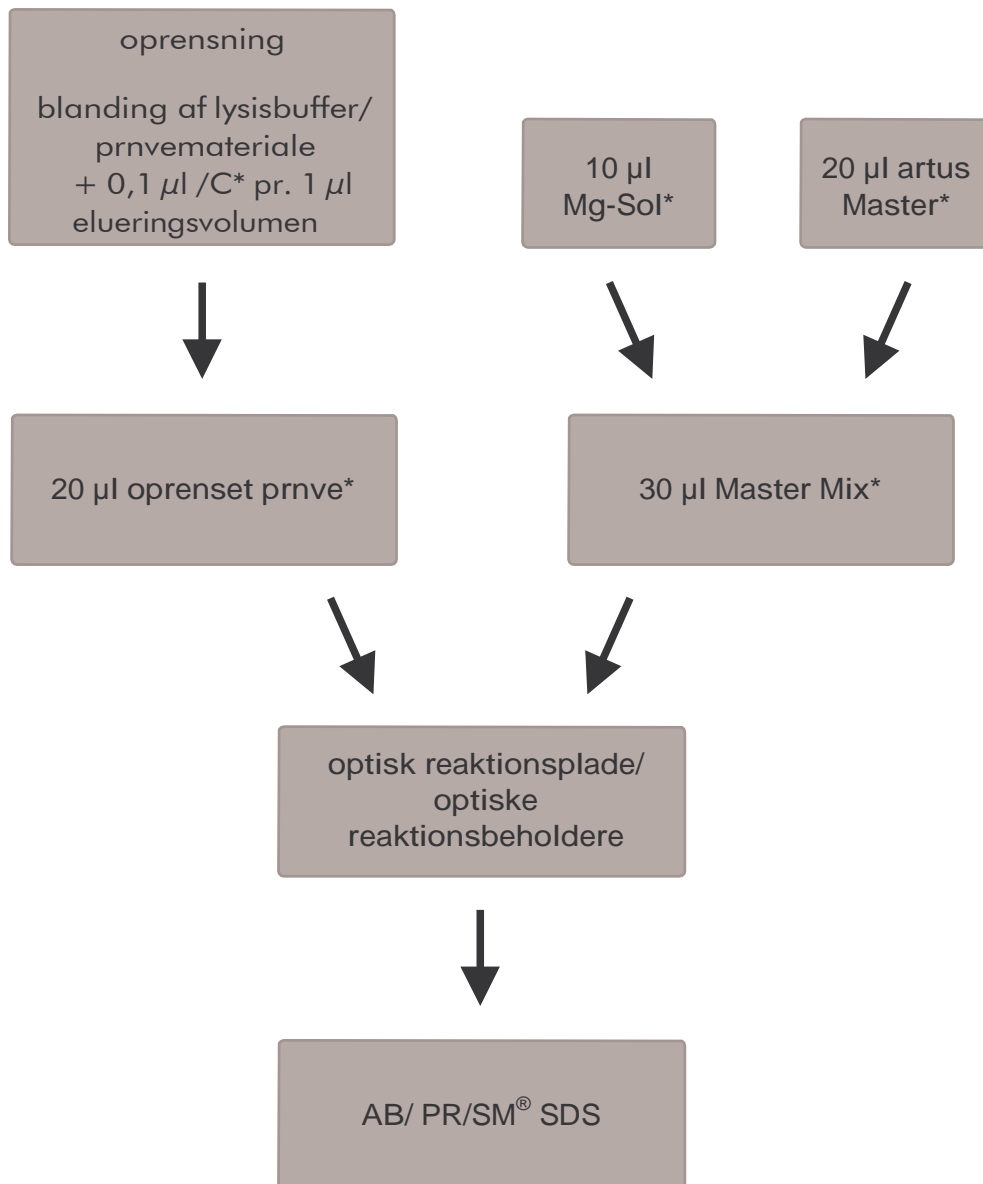


Fig. 1: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af oprensning og PCR-inhibition.

*Det er yderst vigtigt at sørge for, at de anvendte opløsninger er fuldstændigt optøet, blandet godt og centrifugeret kort.

Tilsætning af *Intern Kontrol* til *artus Master*

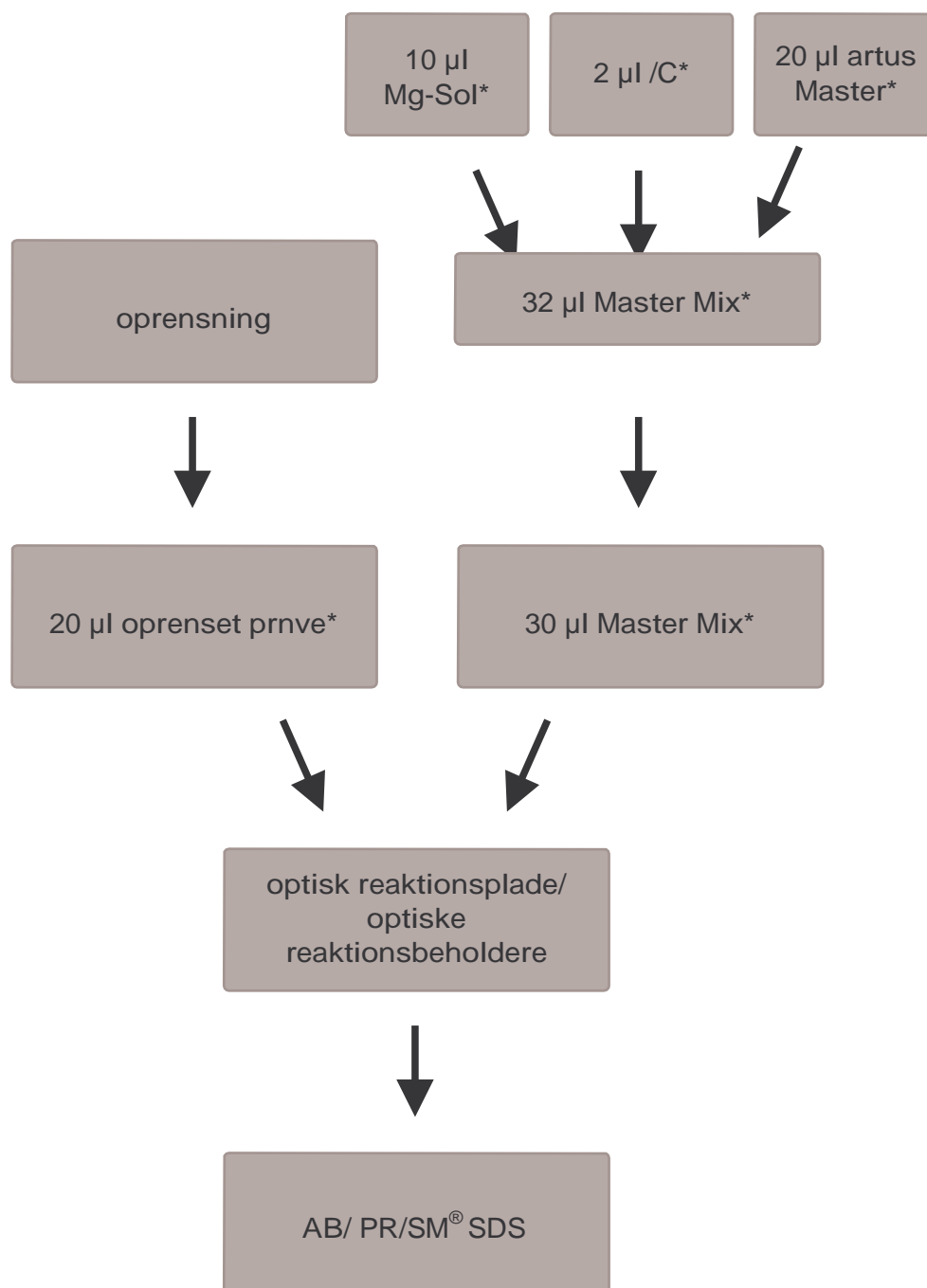


Fig. 2: Skematisk arbejdsforløb til kontrol af PCR-inhibition.

*Det er yderst vigtigt at sørge for, at de anvendte opløsninger er fuldstændigt optøet, blandet godt og centrifugeret kort.

8.5 Programmering af ABI PRISM SDS

Softwaren til ABI PRISM 7000 og 7900HT Sequence Detection Systems (SDS) kræver nogle ekstrainformationer, inden PCR-kørslen kan startes. Fordi fremgangsmåden ved programmeringen af de enkelte instrumenter er forskellig, behandles de i separate kapitler.

8.5.1 Programmering af ABI PRISM 7000 SDS

Udarbejd til detektion af HSV-DNA en profil på Deres ABI PRISM 7000 SDS efter de følgende seks arbejdsstrin (8.5.1.1 - 8.5.1.6). Alle angivelser refererer til ABI PRISM 7000 SDS software version 1.0.1. Enkeltheder vedrørende programmering af ABI PRISM 7000 SDS kan læses i ABI PRISM 7000 SDS *User Guide*. Af hensyn til overskueligheden er indstillingerne, der skal foretages, fremhævet med sorte rammer i figurene.

8.5.1.1 Forindstillinger ved oprettelsen af en ny PCR-kørsel

Vælg på ABI PRISM 7000 SDS menupunktet *New*, som befinder sig under *File*, og indstil for det nye dokument følgende grundindstillinger (se Fig. 3). Et i forvejen gemt template (SDS Template [*.sdt]) findes i *Template*-listen, eller ved hjælp af *Browse*-funktionen (se 8.5.1.5 Arkivering af PCR-kørslen). Bekræft indtastninger (OK).

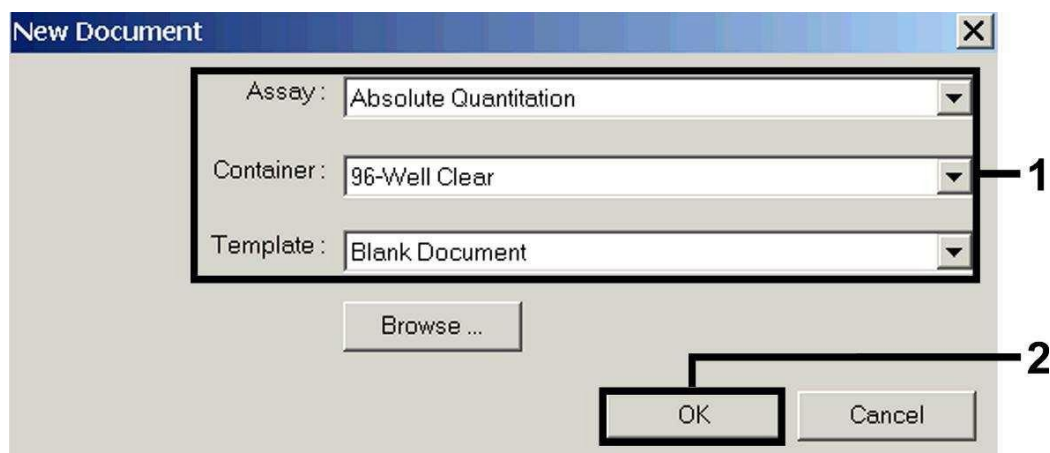


Fig. 3: Forindstillinger ved oprettelsen af en ny PCR-kørsel (New Document).

8.5.1.2 Oprettelse/valg af detektorer

Ved hjælp af den separate menu *Detector Manager*, som befinder sig under *Tools*, tildeles dokumentet de tilsvarende detektorfarvestoffer. Til detektion af HSV-DNA såvel som den *Interne Kontrol* ved hjælp af *artus HSV- 1/2 TM PCR Kit*, skal reporterne/quencherne, som er angivet i den følgende tabel, defineres:

Detektion	Reporter	Quencher
HSV1-DNA	FAM	none
HSV2-DNA	NED	none
<i>Intern Kontrol (HSV TMIC)</i>	VIC	none

Vælg til udarbejdelse af disse detektorer i *Detector Manager* den forneden til venstre lokaliserede option *File* og derefter optionen *New*.

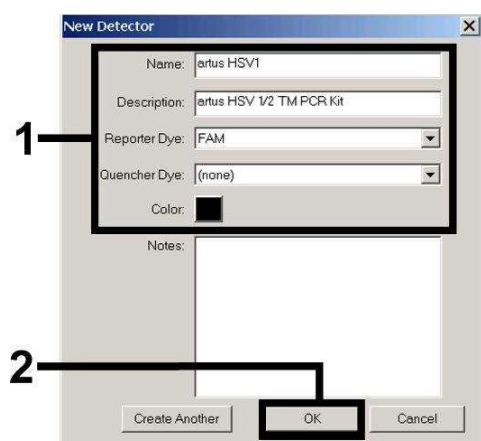


Fig. 4: Udarbejdelse af den HSV1-specifikke detektor (*Detector Manager*).

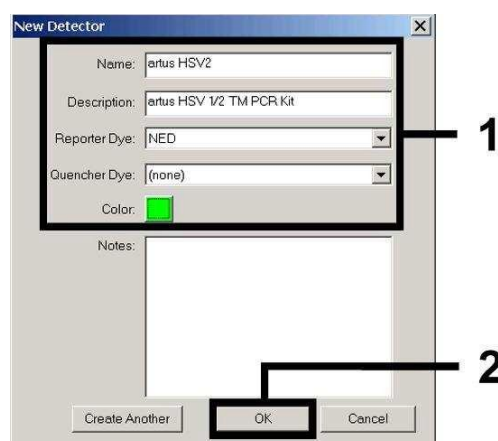


Fig. 5: Udarbejdelse af den HSV2-specifikke detektor (*Detector Manager*).

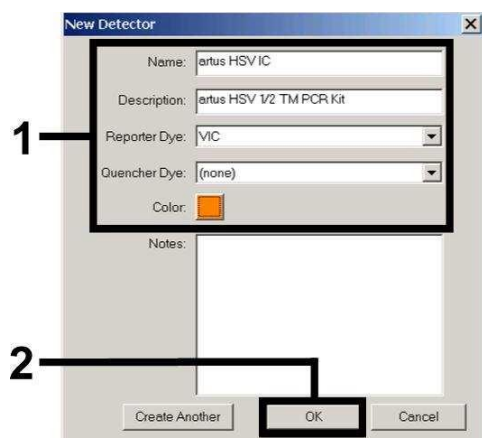


Fig. 6: Udarbejdelse af den *Interne Kontrol*-specifikke detektor (*Detector Manager*).

Definér i vinduet, som nu kommer frem, reporter/quencher-kombinationen **FAM/none** hhv. **NED/none** (tilsvarende Fig. 4 – Fig. 6) for at påvise HSV1-DNA hhv. HSV2-DNA. Vælg til detektion af den *Interne Kontrol*, kombinationen **VIC/none**. Ved bekræftelsen af indtastningerne (OK) vender De tilbage til *Detector Manager*. Markér de lige oprettede detektorer, og transferer hvert udvalg, ved at klikke på optionen *Add to Plate Document*, til *Well Inspector* (se Fig. 7). Luk vinduet (*Done*).

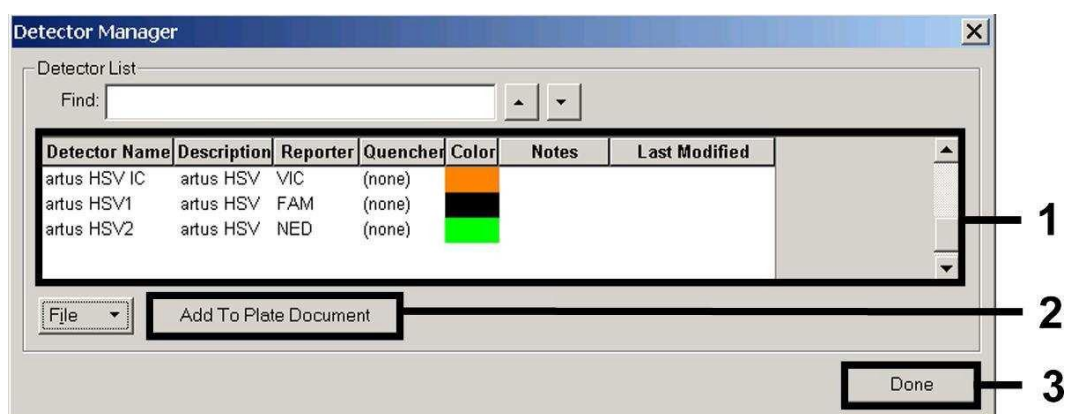


Fig. 7: Valg af detektorer (*Detector Manager*).

8.5.1.3 Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne

Åbn optionen *Well Inspector*, som befinder sig under *View* til at finde de detektorer, som De allerede har valgt under 8.5.1.2 (se Fig. 8-Fig. 9).

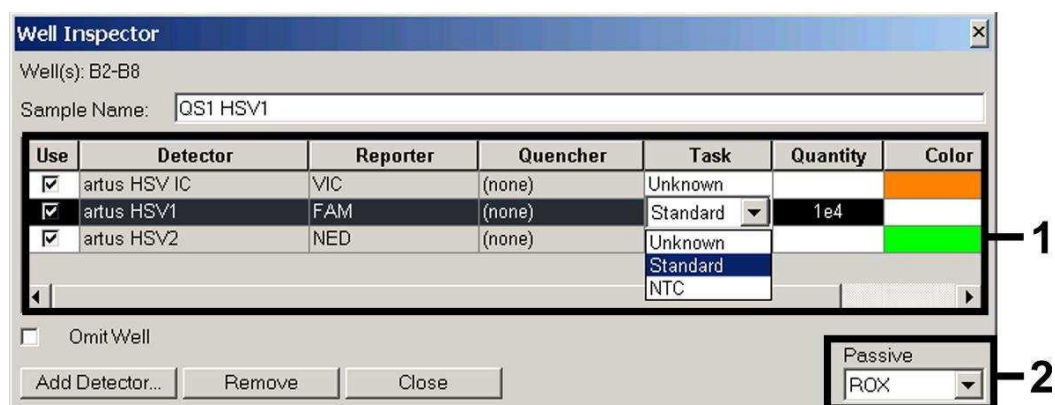


Fig. 8: Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne (*Well Inspector*).

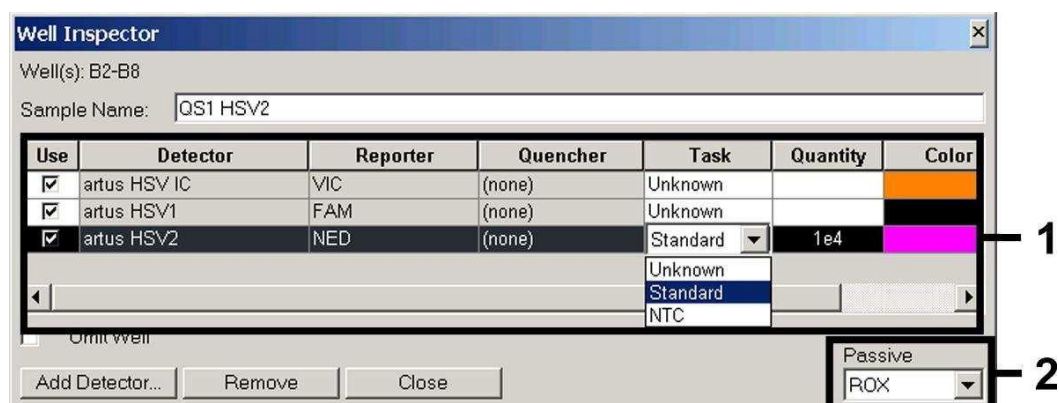


Fig. 9: Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne (*Well Inspector*).

Markér de til detektion af HSV-DNA belagte pladepositioner. Tildel de udvalgte detektorer til positionerne, og aktivér *Use*-optionen for begge detektorer ved at klikke på dem. Der dukker et hak op. For at navngive de enkelte reaktionsopsætninger, vælg den tilhørende position på pladen og indtast navnet under *Sample Name*. Bemærk, at opsætninger med identisk *Sample Name* og identisk detektortilvisning identificeres af softwaren som replikat og, at der vedrørende deres kvantificerede smitstofbelastning

beregnes en gennemsnitsværdi. Vælg dernæst den tilsvarende funktion (*Task*) for hver prøvetype ifølge den nedenstående tabel:

Prøvetype	Funktion (<i>Task</i>)	Koncentration (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV1	Reporter HSV2	Quencher
Prøve	Unknown	-	FAM	NED	none
Negativ kontrol	NTC	-	FAM	NED	none
Standard	Standard	se 1. Indhold	FAM	NED	none

Til udarbejdelsen af en standardkurve anvendes alle vedlagte *Kvantificeringsstandarder (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)* pr. PCR-kørsel. Indtast de tilhørende koncentrationer (se **1. Indhold**) for hver enkel standard, i feltet *Quantity*. Bemærk, at **ROX** til en PCR-kørsel med *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* skal indstilles som passiv reference (*Passive Reference*). En jævn fordeling af ROX-farvestoffet på alle PCR-opsætninger af et lot, ved en gennemblending af *HSV TM Master*, sikrer genkendelsen og beregningen af *tube-to-tube*-variationer (fluorescensforskelle mellem forskellige PCR-opsætninger) via *Sequence Detection Software* (normalisering).

8.5.1.4 Oprettelse af en temperaturprofil

Skift, for at indtaste temperaturprofilen, i softwaren fra *Setup*-planen til *Instrument*-planen. Indtast nu, tilsvarende Fig. 10, den til detektion af HSV-DNA gyldige temperaturprofil. For at fjerne det i forindstillingerne gemte 50°C-trin, markeres dette ved hjælp af venstre musetast mens *Shift*-tasten holdes nede, og slettes derefter med *Backspace*-tasten. Kontrollér, at reaktionsvolumenet er indstillet til 50 µl. Optionen *9600 Emulation* skal aktiveres. Forindstillingerne til *Auto Increment* forbliver uforandret (*Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).

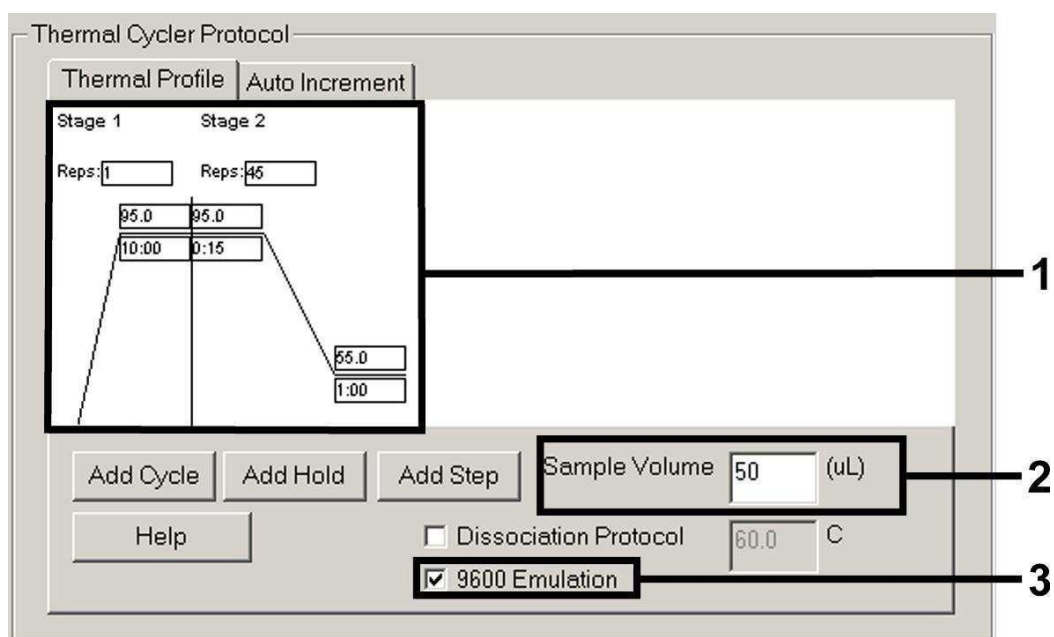


Fig. 10: Oprettelse af en temperaturprofil.

8.5.1.5 Arkivering af PCR-kørslen

Gem de indtastede indstillinger (*Setup*) som maske, så de kan benyttes til senere anvendelser i ændret eller uændret form. Ved at arkivere indstillingerne som *ABI PRISM® SDS Template (*.sdt)* i det af Applied Biosystems oprettede *Template Directory (Local Disk [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates)* kan dette dokument vælges direkte ud fra *Template* drop-down-listen i *New Document*-vinduet. Forlæg, som er gemt i andre mapper, skal åbnes via *Browse*. Sørg altid for at gemme den aktuelt programmerede PCR-kørsel en gang til som *SDS Document (*.sds)* inden testen startes. Dermed sikres arkiveringen af de data, der har samlet sig under PCR-kørslen.

8.5.1.6 Start af PCR-kørslen

Start PCR-kørslen ved at vælge optionen *Start* under menupunktet *Instrument* eller via feltet *Start* på *Instrument*-planen.

8.5.2 Programmering af ABI PRISM 7900HT SDS

Udarbejd til detektion af HSV-DNA en profil på Deres ABI PRISM 7900HT SDS efter de følgende seks arbejdsstrin (8.5.2.1 - 8.5.2.6). Alle angivelser refererer til ABI PRISM 7900HT SDS software version 2.1. Enkeltheder vedrørende programmeringen af ABI PRISM 7900HT SDS kan læses i ABI PRISM 7900HT SDS User Guide. Af hensyn til overskueligheden er indstillingerne, der skal foretages, fremhævet med sorte rammer i figurerne.

8.5.2.1 Forindstillinger ved oprettelsen af en ny PCR-kørsel

Vælg på ABI PRISM 7900HT SDS menupunktet New, som befinder sig under File, og indstil for det nye dokument følgende grundindstillinger (se Fig. 11). Et i forvejen gemt template (ABI PRISM SDS Template Document [*.sdt]) findes i Template-listen eller ved hjælp af Browse-funktionen (se 8.5.2.5 Arkivering af PCR-kørslen). Bekræft indtastningerne (OK).

Bemærk: artus HSV-1/2 TM PCR Kit kan ikke anvendes i forbindelse med 384'er pladeformatet af ABI PRISM 7900HT SDS.

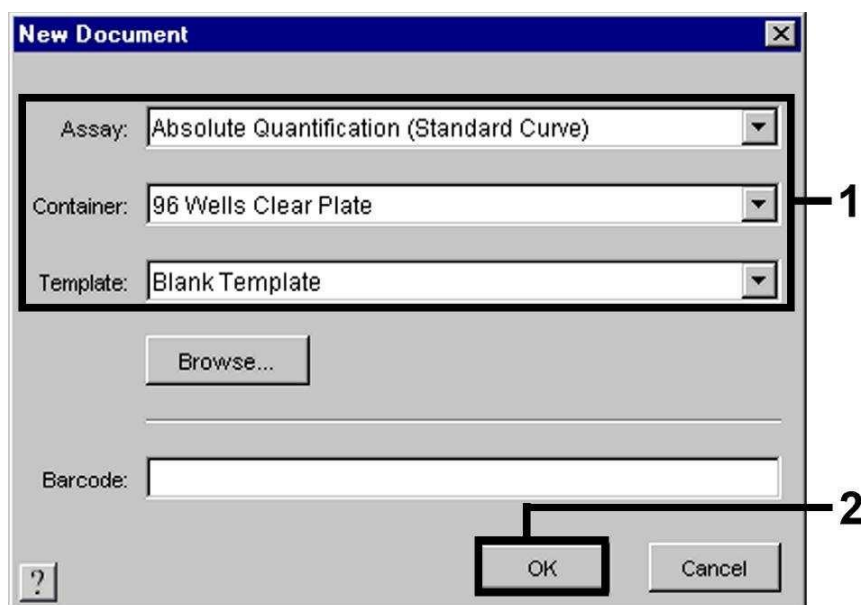


Fig. 11: Forindstillinger ved oprettelsen af et nyt dokument (New Document).

8.5.2.2 Oprettelse/valg af detektorer

Ved hjælp af den separate menu *Detector Manager*, som befinder sig under *Tools* (alternativt: Vælg *Setup-planen/Add Detector*-funktion), tildeles dokumentet de tilsvarende detektorfarvestoffer. Til detektion af HSV-DNA såvel som den *Interne Kontrol* ved hjælp af *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* skal reporterne/quencherne, der er angivet i den følgende tabel, defineres:

Detektion	Reporter	Quencher
HSV1-DNA	FAM	Non Fluorescent
HSV2-DNA	NED	Non Fluorescent
<i>Intern Kontrol (HSV TMIC)</i>	VIC	Non Fluorescent

Vælg til udarbejdelsen af disse detektorer i *Detector Manager* den forneden til venstre lokaliserede option *New*.

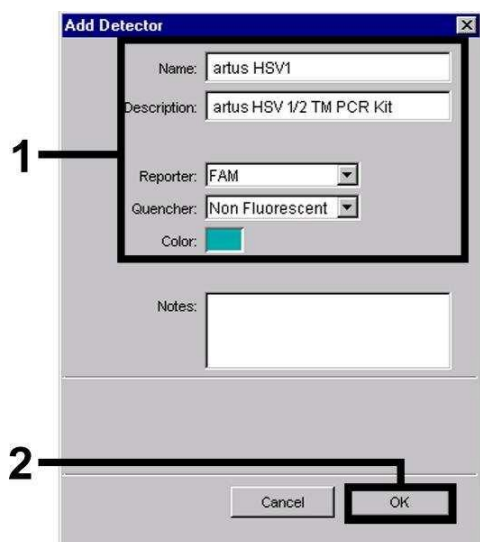


Fig. 12: Udarbejdelse af den HSV1-specifikke detektor (*Detector Manager*).

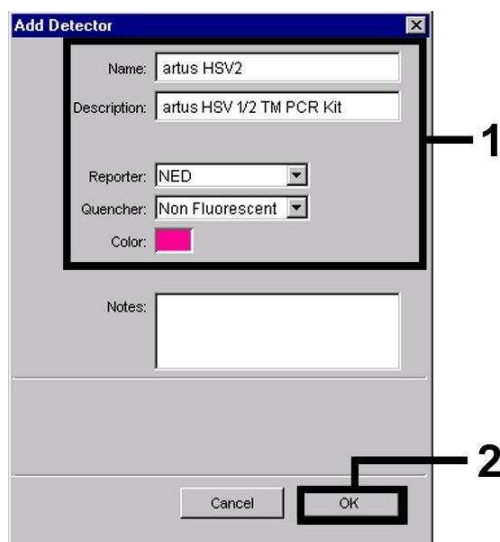


Fig. 13: Udarbejdelse af den HSV2-specifikke detektor (*Detector Manager*).

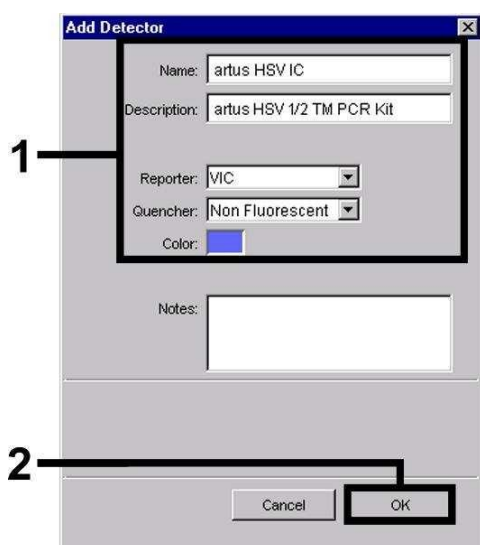


Fig. 14: Udarbejdelse af den *Interne Kontrol*-specifikke detektor (*Detector Manager*).

Definér i vinduet som nu kommer frem reporter/quencher-kombinationen **FAM/Non Fluorescent** hhv. **NED/Non Fluorescent** (tilsvarende Fig. 12 - Fig. 14) til detektion af HSV1-DNA hhv. HSV2-DNA. Vælg til detektion af den *Interne Kontrol* kombinationen **VIC/Non Fluorescent**. Ved bekræftelse af indtastningerne (OK) vender De tilbage til *Detector Manager*. Markér de lige oprettede detektorer, og transferer hvert udvalg, ved at klikke på optionen *Copy to Plate Document*, til *Setup*-planen (se Fig. 15). Luk vinduet (*Done*).



Fig. 15: Valg af detektorer (*Detector Manager*).

8.5.2.3 Tildeling af de nødvendige informationer til pladepositionerne

Efter De har lukket *Detector Manager (Done)* findes detektorerne De selv har udvalgt under 8.5.2.2 tabellarisk opstillet (se Fig. 16) på *Setup-planen (Well Inspector)*.

Setup | Instrument

Well(s): B3-B7, C3-C7, D3-D7, E3-E7

Sample Name: QS1 HSV1

Use	Detector	Reporter	Task	Quantity	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV IC	VIC	Unknown	0	Blue
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV1	FAM	Standard	1E4	Green
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV2	NED	Unknown	0	Magenta

Buttons: Add Detector..., Clear, Copy to Manager

Passive Reference: ROX

☐ Omit Well(s)

Fig. 16: Tildeling af de nødvendige informationer (HSV1) til pladepositionerne.

Setup | Instrument

Well(s): B3-B7, C3-C7, D3-D7, E3-E7

Sample Name: QS1 HSV2

Use	Detector	Reporter	Task	Quantity	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV IC	VIC	Unknown	0	Blue
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV1	FAM	Unknown	0	Green
<input checked="" type="checkbox"/>	artus HSV2	NED	Standard	1E4	Magenta

Buttons: Add Detector..., Clear, Copy to Manager

Passive Reference: ROX

☐ Omit Well(s)

Fig. 17: Tildeling af de nødvendige informationer (HSV2) til pladepositionerne.

Markér de til detektion af HSV-DNA belagte pladepositioner. Tildel de udvalgte detektorer til positionerne, idet De aktiverer *Use*-optionen for begge

detektorer ved at klikke på dem. Der dukker et kryds op. For at navngive de enkelte reaktionsopsætninger, vælger De den tilhørende position på pladen og indtaster navnet under *Sample Name*. Bemærk, at opsætninger med identisk *Sample Name* og identisk detektortilvisning identificeres af softwaren som replikat, og at der vedrørende deres kvantificerede smitstofbelastning beregnes en gennemsnitsværdi. Dernæst vælger De den tilsvarende funktion (*Task*) for hver prøvetype ifølge den nedenstående tabel:

Prøvetype	Funktion (<i>Task</i>)	Koncentration (<i>Quantity</i>)	Reporter HSV1	Reporter HSV2	Quencher
Prøve	Unknown	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Negativ kontrol	NTC	-	FAM	NED	Non Fluorescent
Standard	Standard	se 1. Indhold	FAM	NED	Non Fluorescent

Til udarbejdelsen af en standardkurve anvendes alle vedlagte *Kvantificeringsstandarder (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4)* pr. PCR-kørsel. Indtast de tilhørende koncentrationer (se 1. Indhold) for hver enkel standard (*Quantity*). Bemærk, at **ROX** for PCR- kørsler med *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* skal indstilles som passiv reference (*Passive Reference*). En jævn fordeling af ROX-farvestoffet på alle PCR- opsætninger af et lot, ved hjælp af en gennemblanding af *HSV TM Master*, sikrer genkendelsen og beregningen af *tube-to-tube* variationer (fluorescensforskelle mellem forskellige PCR-opsætninger) via *Sequence Detection Software* (normalisering).

8.5.2.4 Oprettelse af en temperaturprofil

Skift, for at indtaste temperaturprofilen fra *Setup*-planen til *Instrument*-planen. Indtast nu, tilsvarende Fig. 18, den til detektion af HSV-DNA gyldige temperaturprofil. Kontrollér, at reaktionsvolumenet er indstillet til 50 µl. Optionen *9600 Emulation* skal aktiveres. Forindstillingerne for *Ramp*-tiden og *Auto Increment* bliver uforandret (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0Seconds).

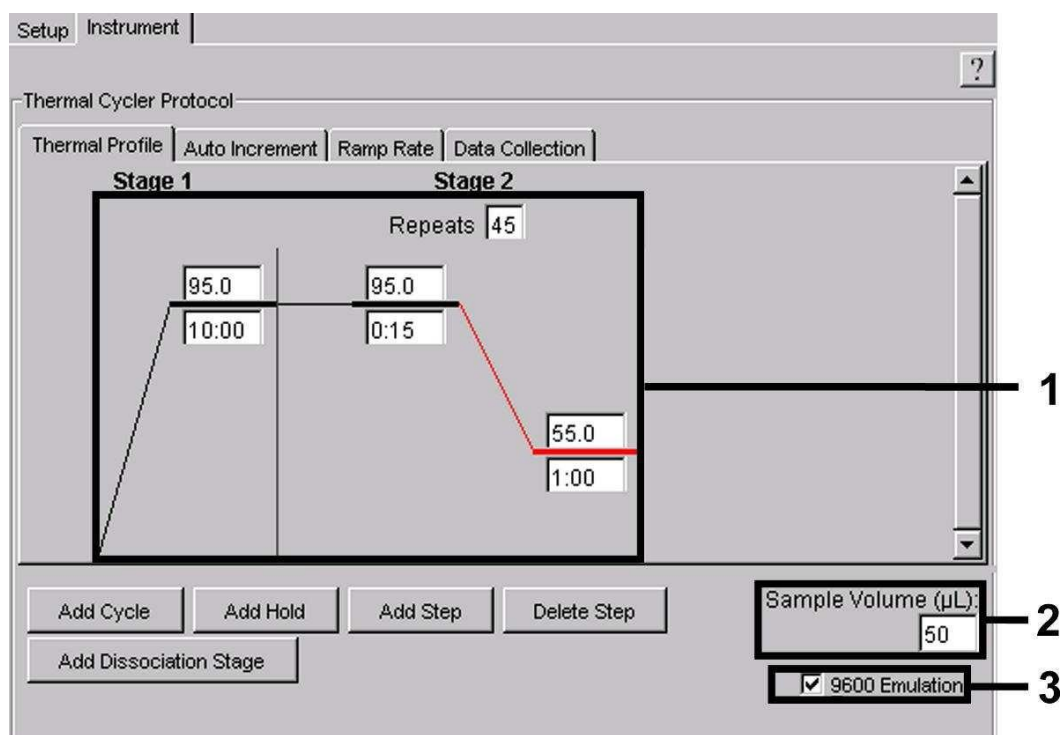


Fig. 18: Oprettelse af en temperaturprofil.

Endvidere befinder sig på *Instrument*-planen optionen *Data Collection*. Ved valg af denne option kommer De til det i Fig. 19 viste vindue. Hver *Ramp*- og hver *Plateau*-temperatur er forsynet med et symbol for datasamling (*Data Collection Icon*), dette anskueliggør samlingen af data på det nuværende tidspunkt i kørslen. Fjern alle symboler ved at klikke på dem, undtagen det til tidspunktet for *Annealing-Extension*-trinnet (*Stage2/Step2*) for at undgå unødvendige fluorescensmålinger. På denne måde holdes den samlede datamængde så lav som mulig.

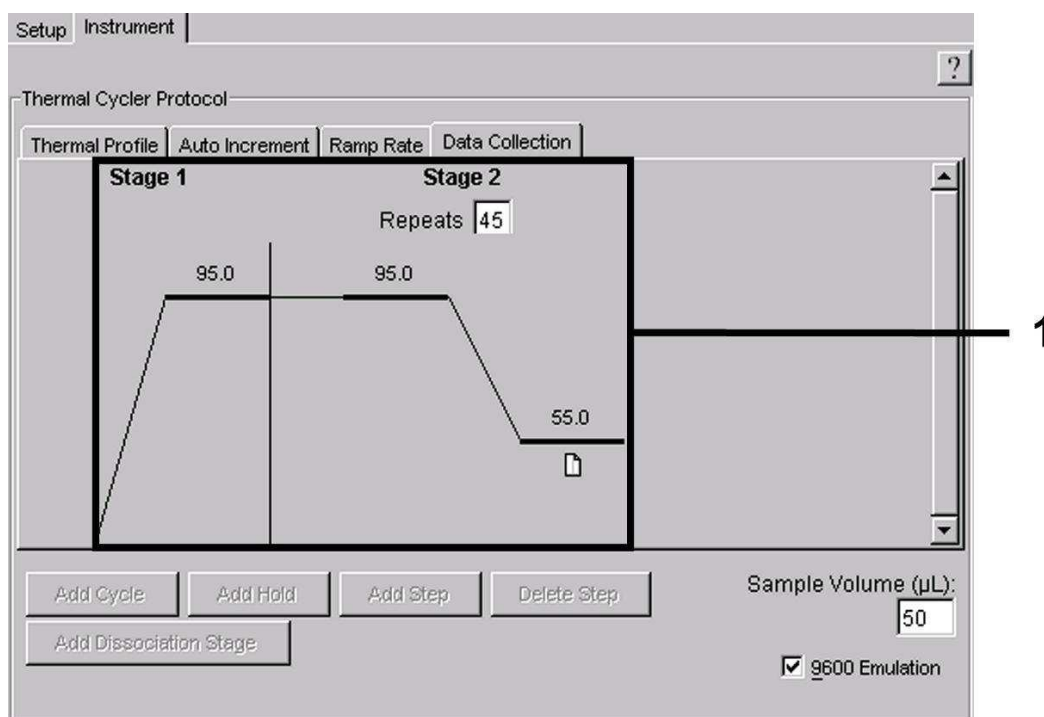


Fig. 19: Datasamling (*Data Collection*).

8.5.2.5 Arkivering af PCR-kørslen

Her kan De gemme de indtastede indstillinger (*Setup*) som maske, så de kan benyttes til senere anvendelser i ændret eller uændret form. Ved at arkivere indstillingerne som *ABI PRISM SDS Template Document (*.sdt)* i det af Applied Biosystems oprettede *Template Directory* ([D:]/Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates), kan dette dokument vælges direkte ud fra *Template*-listen i *New Document*-vinduet. Forlæg, som er gemt i andre mapper, skal åbnes via *Browse*. Inden de starter den aktuelt programmerede PCR-kørsel, er det nødvendigt at gemme den en gang til som *ABI PRISM SDS Document (*.sds)*. Dermed sikres arkiveringen af de data, der har samlet sig under PCR-kørslen.

8.5.2.6 Start af PCR-kørslen

Start PCR-kørslen ved valg af optionen *Start* under menupunktet *Instrument*.

9. Analyse

Inden instrumentet sættes igang, kræves en korrekt kalibrering af farvestofferne (*Pure Spectra Component File*) og baggrunden (*Background Component File*). Disse kalibrerings-filer er nødvendige for den præcise beregning af resultaterne på følgende måde:

Støj signaler der stammer fra instrumentet og påvirker målingen, elimineres af *Sequence Detection Software* fra *ABI PRISM Sequence Detection Systems* ved hjælp af *Background Component File*.

Desuden optræder der ved multifarve-analyser interferenser mellem emissionsspektrerne for de enkelte fluorescensfarvestoffer. Softwaren til *ABI PRISM SDS* kompenserer for disse interferenser idet den beregner spektraldataene for de enkelte farvestoffer, der er gemt i *Pure Spectra Component File*. Tildelingen af fluorescensdataene til de programmerbare detektorer, der i løbet af PCR'en har samlet sig over hele det målbare spektrum, sker ligeledes af softwaren ved hjælp af *Pure Spectra Components*. Derefter bliver de beregnede fluorescensdata for de enkelte farvestoffer til udregning af *tube-to-tube* variationer (fluorescensforskelle mellem forskellige PCR-opsætninger) delt via et signal af den passive reference (ROX). Når signalerne er blevet normaliseret på denne måde, kan de analyseres ved hjælp af *Amplification Plots*.

Kalibreringsfilerne som blev brugt ved analysen af PCR-kørslen, gemmes automatisk ved arkiveringen. Hvis der ikke er installeret nogle **kalibreringsfiler**, så bedes De følge anvisningerne i *ABI PRISM SDS User Guide/Manual* vedrørende oprettelsen af sådanne filer.

Hvis De har integreret mere end et *artus*™ PCR-system i Deres PCR-kørsel (**bemærk temperaturprofilen**), så skal disse testsystemer analyseres separate. Prøver med identisk betegnelse (*Sample Name*) og detektortilvisning identificeres af *ABI PRISM 7000* og *7900HT SDS Software* automatisk som replikat, og vedrørende deres kvantificerede smitstofbelastning beregnes en gennemsnitsværdi.

Følgende resultater er mulige:

1. Et FAM-fluorescenssignal for HSV1 hhv. et NED-fluorescenssignal for HSV2 detekteres.

Analysens resultat er positivt: Prøven indeholder HSV-DNA.

I dette tilfælde er detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*Intern Kontrol*) uvæsentlig, da høje udgangskoncentrationer af HSV-DNA (positivt FAM-fluorescenssignal for HSV1 hhv. positivt NED-fluorescenssignal for HSV2) kan føre til et reduceret og tilmed helt udeblivende fluorescens-signal af den *Interne Kontrol* (konkurrence).

2. Der detekteres hverken et FAM-fluorescenssignal for HSV1 eller et NED-fluorescenssignal for HSV2, men kun et VIC-fluorescenssignal (signal fra den *Interne Kontrol*).

I prøven kan der ikke påvises HSV-DNA. Den kan således betragtes som negativ.

Ved negativ HSV-PCR udelukker det detekterede *Intern Kontrol*-signal muligheden for en PCR-inhibition.

3. Hverken et FAM-fluorescenssignal for HSV1 eller et NED-fluorescenssignal for HSV2 eller et VIC-fluorescenssignal detekteres.

Et diagnostisk udsagn er ikke muligt.

Information om fejlkilder og afhjælpning er angivet under **10. Fejlkilder**.

Eksempler på positive og negative PCR-reaktioner er angivet i figurerne Fig. 20-Fig. 23 (**ABI PRISM 7000 SDS**) og Fig. 24-27 (**ABI PRISM 7900HT SDS**).

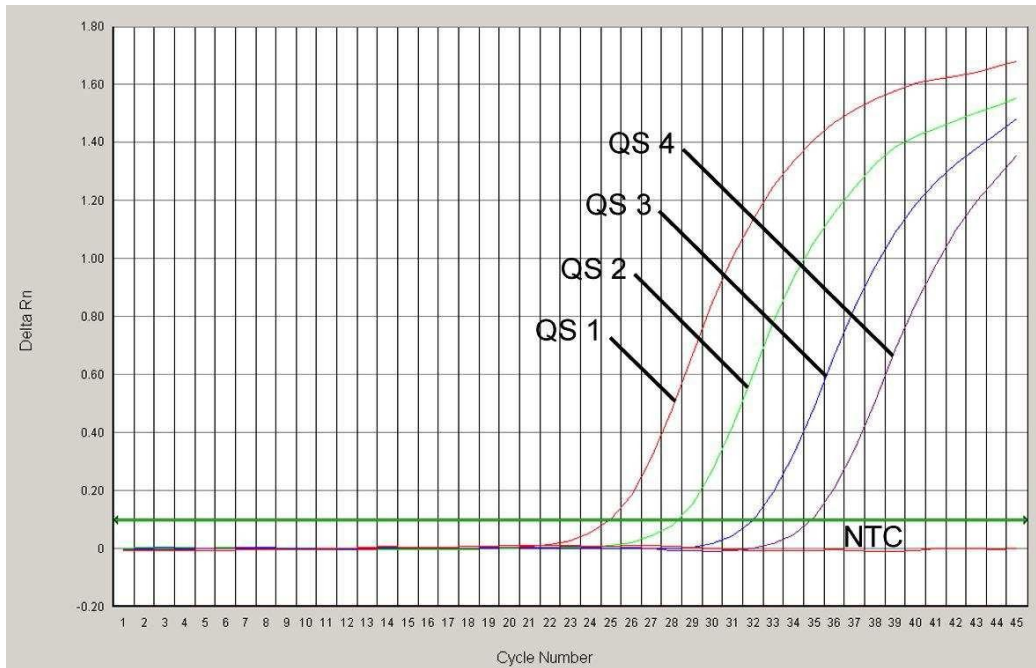


Fig. 20: Påvisning af Kvantificeringsstandarder (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4) gennem detektionen af et FAM-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (negativkontrol).

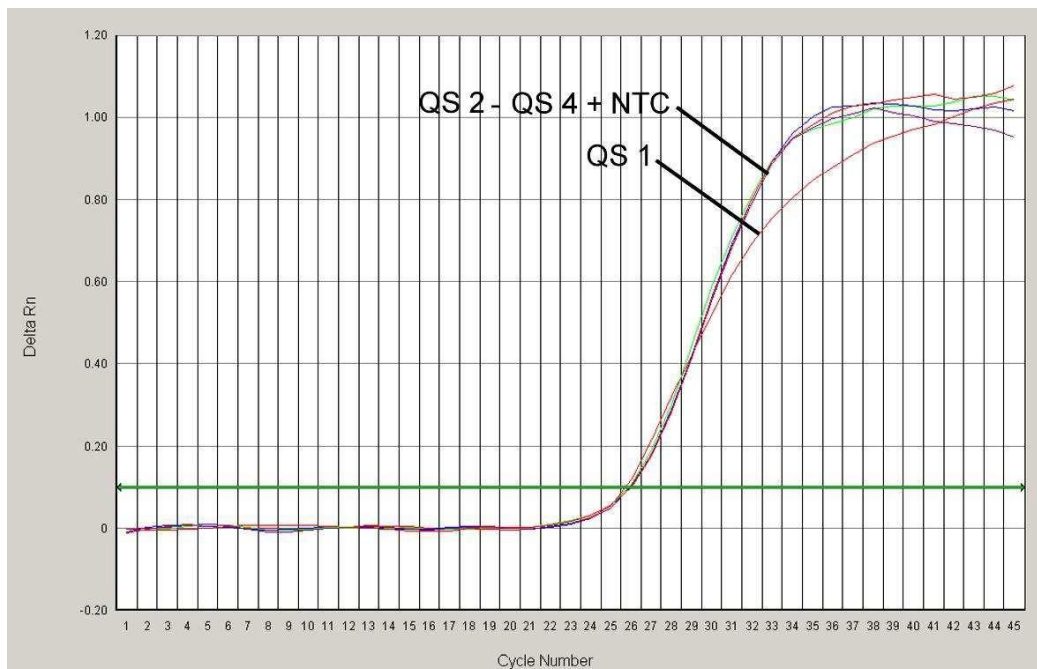


Fig. 21: Påvisning af den Interne Kontrol (IC) gennem detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7000 SDS*) ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativkontrol).

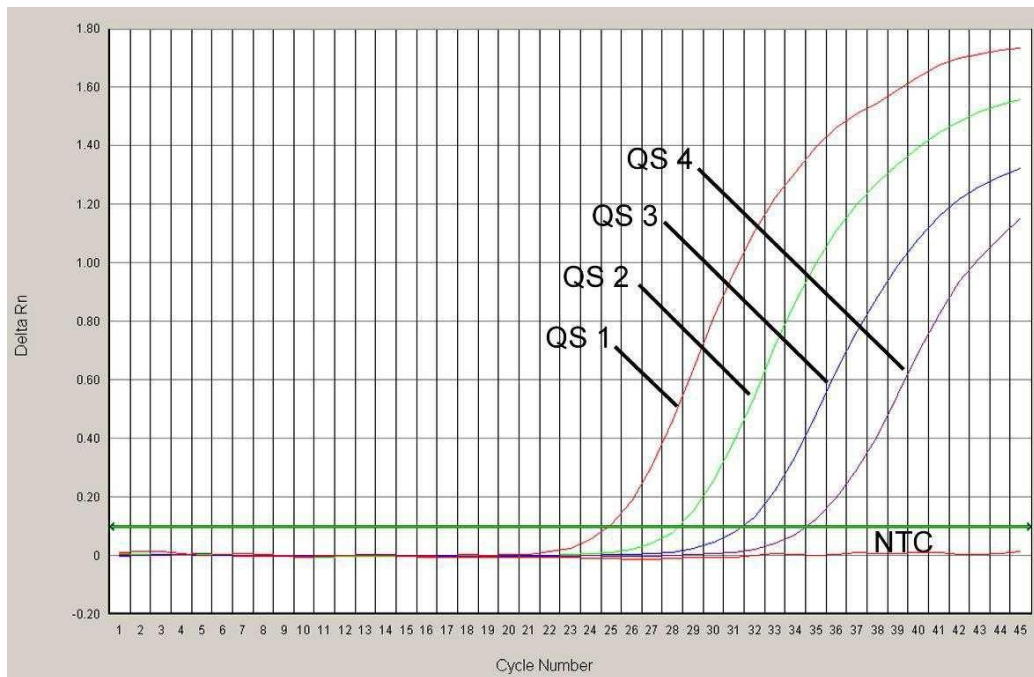


Fig. 22: Påvisning af Kvantificeringsstandarder (*HSV2 TM QS 1 - 4*) gennem detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7000 SDS*). NTC: non-template control (negativkontrol).

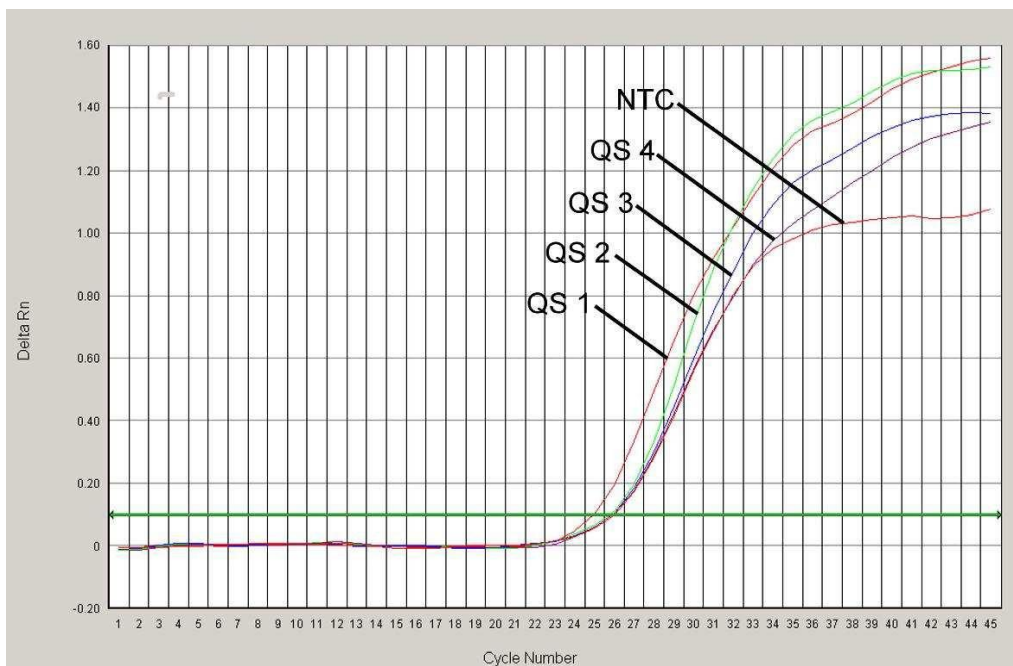


Fig. 23: Påvisning af den Interne Kontrol (IC) gennem detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7000 SDS*) ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (*HSV2 TM QS 1 - 4*). NTC: non-template control (negativkontrol).

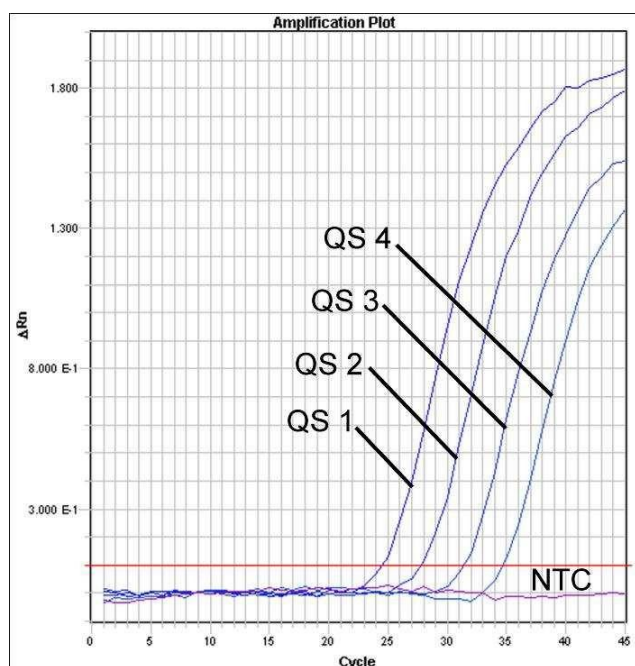


Fig. 24: Påvisning af Kvantificeringsstandarder (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4) gennem detektionen af et FAM-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (negativkontrol).

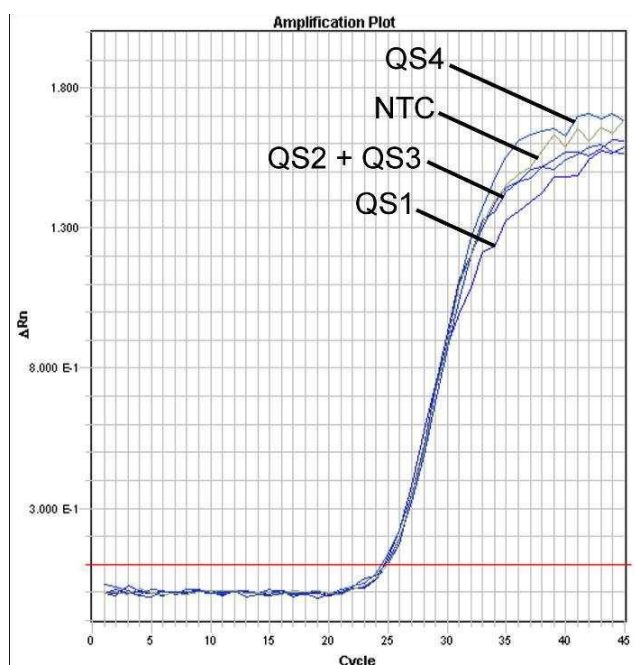


Fig. 25: Påvisning af den Interne Kontrol (IC) gennem detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7900HT SDS*) ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (*HSV1* LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativkontrol).

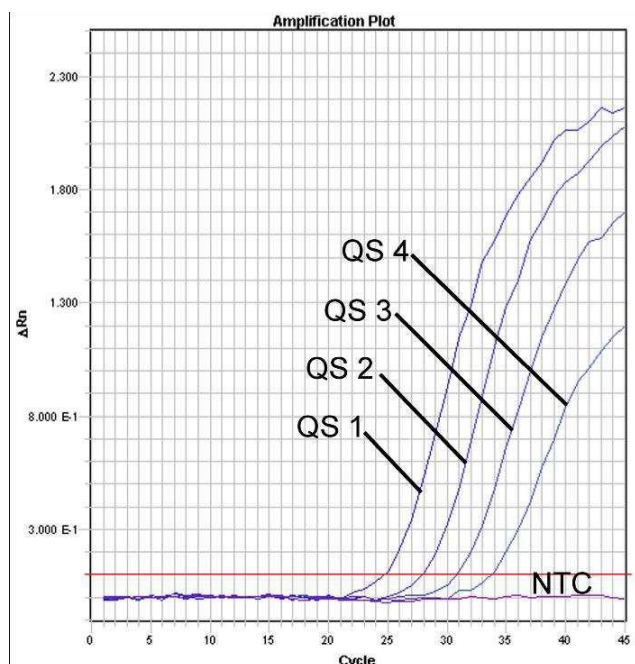


Fig. 26: Påvisning af Kvantificeringsstandarder (*HSV2 LC/RG/TM* QS 1 - 4) gennem detektionen af et NED-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7900HT SDS*). NTC: non-template control (negativkontrol).

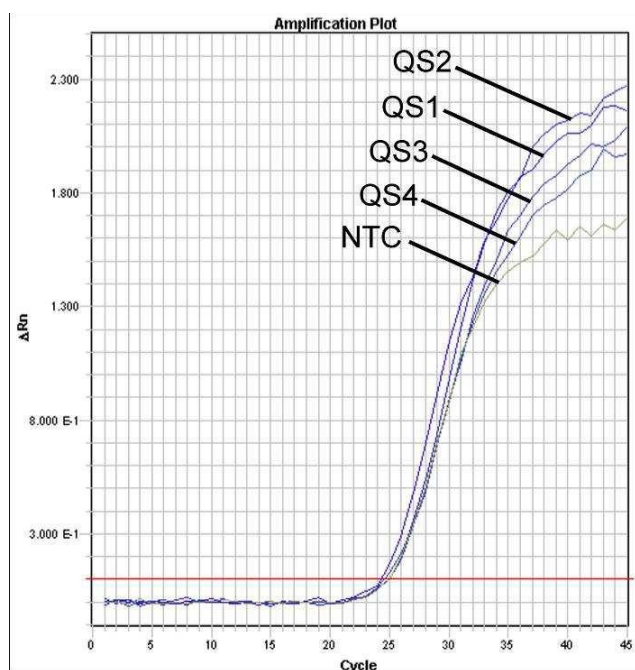


Fig. 27: Påvisning af den Interne Kontrol (IC) gennem detektionen af et VIC-fluorescenssignal (*ABI PRISM 7900HT SDS*) ved samtidig amplifikation af Kvantificeringsstandarder (*HSV2 LC/RG/TM* QS 1 - 4). NTC: non-template control (negativkontrol).

10. Fejlkilder

Hverken FAM-fluorescenssignal for HSV1 eller NED-fluorescenssignal for HSV2 ved positivkontrollerne (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4*):

- Valget af detektorfarvestofferne ved PCR-data-analysen svarer ikke til angivelserne i protokollen.
 - ❖ Vælg for data-analysen detektorfarvestoffet FAM for HSV1 hhv. NED for HSV2 for den analytiske HSV-PCR og detektorfarvestoffet VIC for PCR'en af den *Interne Kontrol*.
- Under *Options* findes indstillingen af dataene (*Extension Phase Data Extraction*), der bruges for analysen. Denne indstilling stemmer ikke overens med indstillingerne i Data Collection (for *ABI PRISM 7900HT SDS* se **8.5.2.4 Oprettelse af en temperaturprofil**).
 - ❖ Analysér PCR-kørslen med korrigerede indstillinger og gentag analysen (*Analysis*).
- Fejl i programmeringen af temperaturprofilen af *ABI PRISM Sequence Detection Systems*.
 - ❖ Sammenlign temperaturprofilen med angivelserne i protokollen (se **8.5 Programmering af ABI PRISM SDS**).
- Fejl i sammensætningen af PCR-reaktionen.
 - ❖ Kontrollér Deres arbejdsrin ved hjælp af pipetteringsskemaet (se **8.4 Forberedelse af PCR**) og gentag i givent tilfælde PCR'en.
- Betingelserne for opbevaring af en eller flere af kittets komponenter svarede ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* blev overtrådt.
 - ❖ Kontrollér venligst både betingelserne for opbevaring og holdbarhedsdatoen (se på kit-etiketten) af reagenserne og anvend i givent tilfælde et nyt kit.

Svagt eller fraværende signal fra den *Interne Kontrol* (VIC-fluorescenssignal) og samtidig fravær af et FAM-fluorescenssignal for HSV1 og NED-fluorescenssignal for HSV2 af den specifikke HSV-PCR:

- PCR-betingelserne svarer ikke til protokollen.
 - ❖ Kontrollér betingelserne (se foroven) og gentag i givent tilfælde PCR'en med korrigerede indstillinger.
- PCR'en er blevet inhiberet.
 - ❖ Sørg for, at De anvender en af os anbefalet oprensningsmetode (se **8.1 DNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.
 - ❖ Kontrollér, at der ved DNA-oprensningen, før gennemførelsen af elueringen, blev gennemført det anbefalede centrifugeringstrin til den fuldstændige fjernelse af ethanol-rester (se **8.1 DNA-isolering**).
- Der foreligger tab af DNA forårsaget af oprensningen.
 - ❖ Hvis den *Interne Kontrol* blev tilsat oprensningen, kan fravær af signalet fra den *Interne Kontrol* betyde, at der foreligger tab af DNA forårsaget af oprensningen. Sørg for, at De anvender en af os anbefalet oprensningsmetode (se **8.1 DNA-isolering**) og hold Dem nøje til producentens anvisninger.
- Betingelserne for opbevaring af en eller flere af kittets komponenter svarer ikke til de i **2. Opbevaring** angivne forskrifter eller holdbarhedsdatoen for *artus HSV-1/2 TM PCR Kit* blev overtrådt.
 - ❖ Kontrollér venligst både betingelserne for opbevaring og holdbarhedsdatoen (se på kit-etiketten) af reagenserne og anvend i givent tilfælde et nyt kit.

Et FAM-fluorescenssignal for HSV1 og et NED-fluorescenssignal for HSV2 af den analytiske PCR ved negativkontrollerne:

- Der foreligger en kontamination ved forberedelserne af PCR'en.
 - ❖ Gentag PCR'en med ubrugte reagenser i replikater.
 - ❖ Luk, hvis muligt, hvert af de enkelte PCR-beholdere direkte efter tilsætningen af den prøve, der skal undersøges.
 - ❖ Pipettér principielt positiv-kontrollerne sidst.
 - ❖ Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
- Der foreligger en kontamination forårsaget af oprensningen.
 - ❖ Gentag oprensningen og PCR'en for de prøver der skal undersøges under anvendelse af ubrugte reagenser.

- ❖ Sørg for at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.

Hvis der skulle opstå yderligere spørgsmål eller problemer, kontakt venligst vores tekniske service.

11. Specifikationer

11.1 Analytisk sensitivitet

Til bestemmelsen af den analytiske sensitivitet for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit blev der udarbejdet en standard-fortyndingsrække for HSV1 af 25,7 til nominelt 0,008 HSV-kopiækvivalenter^{*}/μl og for HSV2 af 35,31 til nominelt 0,012 HSV-kopiækvivalenter^{*}/μl. Disse blev derefter analyseret med *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit med *ABI PRISM 7000* og *7900HT Sequence Detection Systems*. Undersøgelserne for hvert apparat blev gennemført på tre forskellige dage med otte replikater. Resultaterne blev udarbejdet ved hjælp af en probit-analyse. Dens grafiske analyse (*ABI PRISM 7900HT SDS*) er vist i Fig. 28-Fig. 29.

detektionsgrænse (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,9 kopier/μl
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,5 kopier/μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	1,8 kopier/μl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	2,0 kopier/μl

Det betyder, at 0,9 kopier/μl (HSV1) hhv. 0,5 kopier/μl (HSV2, *ABI PRISM 7000 SDS*) og 1,8 kopier/μl (HSV1) hhv. 2,0 kopier/μl (HSV2, *ABI PRISM 7900HT SDS*) kan detekteres med 95 % sandsynlighed.

^{*} Standarden som anvendes her, er et klonet PCR-produkt. Dens koncentration blev bestemt spektral- og fluorescensfotometrisk.

Probit-analyse: HSV1 (ABI PRISM 7900HT SDS)

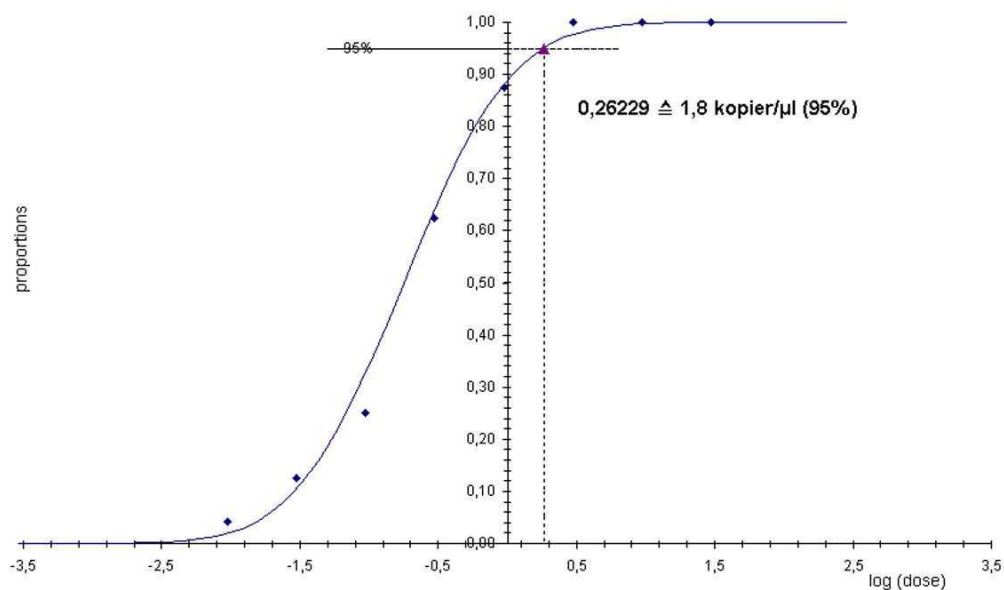


Fig. 28: Analytisk sensitivitet for HSV1 af *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

Probit-analyse: HSV2 (ABI PRISM 7900HT SDS)

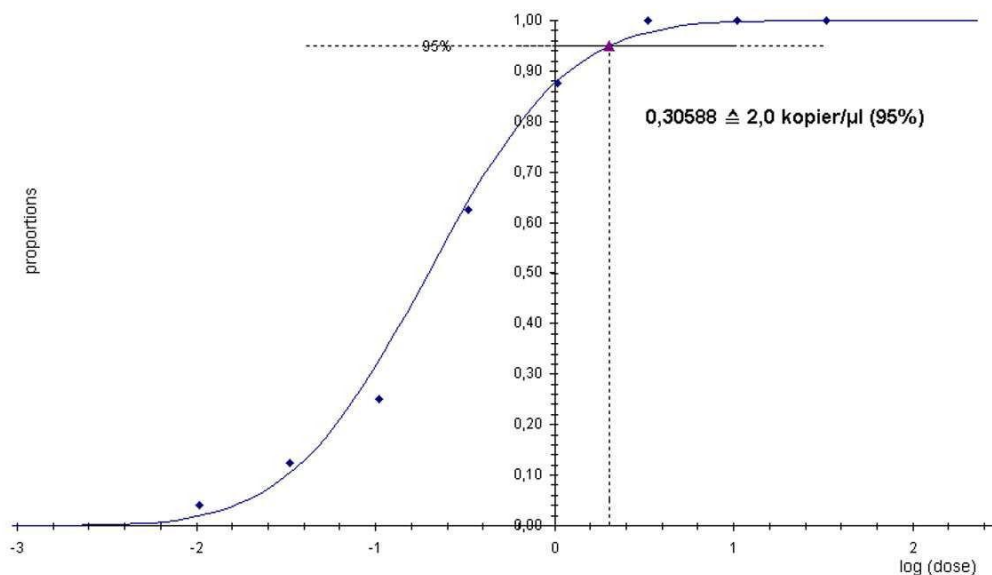


Fig. 29: Analytisk sensitivitet for HSV2 af *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit (ABI PRISM 7900HT SDS).

11.2 Specificitet

Specificiteten for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit sikres først og fremmest igennem udvalget af primere og prober samt ved valget af stringente reaktionsbetingelser. Primerne og proberne blev kontrolleret for eventuelle homologier til alle i genbanker publicerede sekvenser ved hjælp af en sekvenssammenlignings-analyse. Detekterbarheden for alle relevante stammer kontrolleres herved.

Til bestemmelsen af specificiteten for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit blev den i Tabel 1 angivne kontrolgruppe undersøgt for krydsreaktivitet. Ingen af de testede smitstoffer var reaktive.

Tabel 1 : Specificitetstest af kittet med potentielle krydsreaktive smitstoffer.

Kontrolgruppe	HSV-1/2 (FAM/NED)	Intern Kontrol (VIC)
Human herpesvirus 3 (Varizella-zoster-virus)	-	+
Human herpesvirus 4 (Epstein-barr-virus)	-	+
Human herpesvirus 5 (Cytomegalovirus)	-	+
Human herpesvirus 6 A	-	+
Human herpesvirus 6 B	-	+
Human herpesvirus 7	-	+
Human herpesvirus 8	-	+
Hepatitis A-virus	-	+
Hepatitis B-virus	-	+
Hepatitis C-virus	-	+
Human immundefekt virus	-	+
Human t-celle leukæmi virus type 1 og 2	-	+
Vest Nil virus	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

11.3 Præcision

Præcisionsdata for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit tillader en bestemmelse af totalvariansen (samlet spredning) af testsystemet. Denne totalvarians består af **Intra-assay variationen** (spredning af prøver med samme koncentration inden for en forsøgsopsætning), af **Inter-assay variationen** (spredning der forekommer pga. forskellige personer inden for et laboratorium, der udfører analysen på forskellige apparater af samme type) og af **Inter-lot variationen** (spredning ved benyttelse af forskellige lots). Via dette bliver såvel standardafvigelsen, variansen og variationskoefficienten for både den smitstof-specifikke og den *Interne Kontrol*-PCR'en beregnet.

Disse præcisionsdata blev bestemt for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit på baggrund af *Kvantificeringsstandard* med den laveste koncentration (QS 4; 10 kopier/ μ l). Undersøgelserne blev udført med otte replikater. Resultaterne af præcisionsdataene blev beregnet på baggrund af amplifikationskurvens Ct-værdier (Ct: *threshold cycle*, se Tabel 2/Tabel 4) og de derud beregnede kvantitative værdier i kopier/ μ l (se Tabel 3/Tabel 5). Således omfatter den samlede variation af en prøve med den oplyste koncentration 2,62 % (Ct, HSV1) og 2,07 % (Ct, HSV2) hhv. 14,02 % (konc., HSV1) og 14,82 % (konc., HSV2), og til detektion af den *Interne Kontrol* 1,84 % (Ct, HSV1) og 1,92 % (Ct, HSV2). Disse værdier baserer på helheden af alle enkeltværdiernes konstaterede variationer.

Tabel 2: Præcisionsdata for HSV1 på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varsians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,18	0,03	0,51
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,24	0,06	0,87
Inter-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,25	0,06	0,70
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,37	0,14	1,36
Inter-lot variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,67
Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,17	0,03	0,65
Totalvarsians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,92	0,84	2,62
Totalvarsians: <i>Intern Kontrol</i>	0,49	0,24	1,84

Tabel 3: Præcisionsdata for HSV1 på grundlag af de kvantitative værdier (i kopier/ μ l).

	Standard- afvigelse	Varsians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,32	1,75	13,12
Inter-assay variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,81
Inter-lot variation: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,22	1,50	12,14
Totalvarsians: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,42	2,00	14,02

Tabel 4: Præcisionsdata for HSV2 på grundlag af Ct-værdierne.

	Standard- afvigelse	Varsians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,17	0,03	0,49
Intra-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,10	0,01	0,37
Inter-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,23	0,05	0,68
Inter-assay variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,30	0,09	1,10
Inter-lot variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,24	0,06	0,74
Inter-lot variation: <i>Intern Kontrol</i>	0,25	0,06	0,93
Totalvarsians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,70	0,49	2,07
Totalvarsians: <i>Intern Kontrol</i>	0,52	0,27	1,92

Tabel 5: Præcisionsdata for HSV2 på grundlag af de kvantitative værdier (i kopier/ μ l).

	Standard- afvigelse	Varsians	Variations- koefficient [%]
Intra-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,44	2,06	14,25
Inter-assay variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,60	2,56	15,80
Inter-lot variation: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,48	2,18	14,62
Totalvarsians: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,50	2,25	14,82

11.4 Robusthed

Kontrol af robustheden bruges til bestemmelsen af den samlede udskillelsesrate for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit. Hertil blev benyttet 30 HSV negative CSF-prøver blandet med hver 5,4 kopier/ μ l elueringsvolumen HSV1-kontrol-DNA (tredobbelt koncentration af den analytiske sensitivitetsgrænse). Efter oprensningen med QIAamp DNA Mini Kit (se **8.1 DNA-isolering**) blev disse prøver analyseret med *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit. Undersøgelsen for HSV2 blev gennemført med den samme fremgangsmåde (30 CSF-prøver, 6 kopier/ μ l HSV2-kontrol-DNA). Fejlraten for både HSV1 og HSV2 udgjorde for alle prøver 0 %. Robustheden af den *Interne Kontrol* blev yderligere kontrolleret igennem oprensningen og analysen af 30 HSV negative CSF-prøver. Den samlede udskillelsesrate udgjorde 0 %. Inhibitioner blev ikke observeret. Dermed er robustheden for *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit ≥ 99 %.

11.5 Reproducerbarhed

Dataene for reproducerbarheden registreres, for at kunne foretage en regelmæssig vurdering af effekten af *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit samt for en sammenligning med effekten af andre produkter. Disse bliver bekræftet ved deltagelse i ringforsøg.

11.6 Diagnostisk evaluering

artus HSV-1/2 TM PCR Kit evalueres for tiden i flere studier.

12. Særlige anvisninger til brug af produktet

- Alle reagenser må udelukkende anvendes til in vitro-diagnostik.
- Kun personale, der er specielt undervist og uddannet i in vitro-diagnostika-proceduren (EN375), bør anvende dette udstyr.
- Det er absolut nødvendigt at protokollen overholdes nøje, for at opnå optimale PCR-resultater.

- Forfaldsdatoerne for de enkelte komponenter, der er angivet på emballagen og etiketterne, skal overholdes. Udløbne reagenser må ikke benyttes.

13. Advarsler og forholdsregler

Sikkerhedsinformationer vedrørende *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit findes i de tilsvarende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS). Disse findes som kompakt og brugervenlig PDF-fil under www.qiagen.com/safety.











14. Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med det ISO 9001 og ISO 13485-certificerede kvalitetsmanagement-system fra QIAGEN blev ethvert lot af *artus* HSV-1/2 TM PCR Kit testet imod givne specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

15. Litteratur

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Symbolforklaring

	Holdbar til
	Lotnummer
	Producent
	Katalognummer
	Materialenummer
	Håndbog
	In vitro diagnostik medicinsk produkt
	Globalt varenummer
	Indholdet er tilstrækkeligt for <N> tests
	Temperaturbegrænsning
QS	<i>Kvantificeringsstandard</i>
IC	<i>Intern Control</i>
Mg-Sol	<i>Magnesium-løsning</i>

artus HSV-1/2 TM PCR Kit

Mærker og ansvarsfraskrivelse

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

Registrerede navn, varemærker, osv. i dette dokument kan ikke betragtes som juridisk ubeskyttede, selvom de mangler en tilsvarende kendetegnelse.

artus HSV-1/2 TM PCR Kit, BioRobot EZ1 DSP Workstation og EZ1 DSP Virus Kit og Card er CE-mærkede diagnostiske produkter i overensstemmelse med den europæiske retningslinje 98/79/EG om in vitro-diagnostik. Kan ikke fas i alle lande.

QIAamp Kits er til almindelig laboratoriebrug. Produktangivelserne eller fremstillingerne er ikke bestemt til at levere information om diagnose, prævention eller behandling af en sygdom.

Købet af artus PCR Kits indeholder en begrænset licens for deres anvendelse til gennemførelsen af polymerase-kædereaktion-proceduren (PCR) i den humane og veterinære in vitro-diagnostik i forbindelse med en thermocycler, hvis anvendelse i en automatisk gennemført PCR er dækket ved en forudbetalt licensgebyr, som enten betales til Applied Biosystems eller betales ved køb af en autoriseret thermocycler. PCR-proceduren er beskyttet gennem tilsvarende nationale beskyttelsesrettigheder af U.S.-patenterne med numrene 5,219,727 og 5,322,770 og 5,210,015 og 5,176,995 og 6,040,166 og 6,197,563 og 5,994,056 og 6,171,785 og 5,487,972 und 5,804,375 og 5,407,800 og 5,310,652 og 5,994,056 egendom af F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2015 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdt

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

