

Oktober 2015

Håndbog til *artus*[®] HSV-1/2 Quant RG PCR Kit



Version 1
Til brug sammen med Rotor-Gene[®]

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, TYSKLAND

1096239-DA

Forhandles af QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

Qinstrumenter

Sample to Insight



Indhold

Tilsigtet anvendelse.....	4
Oversigt og forklaring	4
Patogeninformation.....	4
Funktionsprincip	5
Leverede materialer.....	6
Kittets indhold	6
Påkrævede materialer, der ikke medfølger.....	6
Advarsler og forholdsregler.....	7
Advarsler	7
Forholdsregler.....	7
Opbevaring og håndtering af reagenser	8
Kitkomponenter	8
Procedure	10
DNA-ekstraktion	10
Protokol: Detektion af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA	12
Fortolkning af resultater	23
Kørlens gyldighed	23
Kvalitativ analyse	24
Kvantitativ analyse.....	25
Begrænsninger	26
Kvalitetskontrol	27
Ydelseskarakteristik.....	27

Analysesensitivitet.....	28
Analysespecificitet.....	29
Lineært område.....	30
Præcision	31
Gentagelighed.....	33
Symboler	35
Fejlsøgning	36
Bestillingsinformation.....	37

Tilsigtet anvendelse

artus® HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96) er en *in vitro*-diagnostisk test, som er baseret på real-time PCR teknologi, til samtidig detektion og kvantificering af herpes simplex-virus 1 (HSV-1)- og herpes simplex-virus 2 (HSV-2)-specifikt DNA.

Oversigt og forklaring

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet udgør et brugsklart system til detektion af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA ved hjælp af real-time PCR på Rotor-Gene Q-instrumenter. Analysen omfatter et heterologt amplifikationssystem (intern kontrol) til at identificere mulig PCR-inhibition og bekræfte kitreagensernes integritet.

Patogeninformation

Herpes simplex-virus 1 (HSV-1) og herpes simplex-virus 2 (HSV-2) er medlemmer af familien *Herpesviridae* og klassificeres sammen med VZV som *Alphaherpesvirinae*. HSV-1 og HSV-2 har et lineært dobbeltstrengt DNA-genom på ca. 150 kbp. HSV-1 og HSV-2 har mere end 80 % fælles nukleotididentitet i deres proteinkodende region.

Herpes simplex-virusinfektioner forekommer over hele verden uden nogen sæsonmæssig afhængighed. Virus spredes ved direkte kontakt med virus i sekreter. Prævalensen af HSV-1-infektion stiger gradvist fra barndommen og når 80 % og mere i en senere alder, mens seroprævalensen for HSV-2 forbliver lav indtil ungdommen. De fleste primære HSV-1-infektion erhverves som subkliniske eller uigenkendte infektioner. Primære infektioner med HSV-2 præsenterer sig klassisk som herpes genitalis. Primær infektion med HSV-1 eller HSV-2 følges af etablering af latens i spinalganglierne. Virus reaktiveres periodisk og bevæger sig via nerveaksonet til orale eller genitale placeringer, hvilket resulterer i frigivelse af infektiøst virus og i nogle tilfælde af dannelse af læsioner. HSV-infektioner er sædvanligvis

asymptomatiske, men kan forårsage et bredt spektrum af kliniske manifestationer, inklusive oral herpes, genital herpes, neonatal herpes, encefalitis og okulær herpes.

Funktionsprincip

HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B indeholder reagenser og enzymer til specifik amplifikation af målregioner i HSV-1- og HSV-2-genomer og til direkte detektion af det specifikke amplikon i fluorescenskanalerne Cycling Green og Cycling Red på Rotor-Gene Q-instrumenter.

Derudover indeholder *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet et heterologt amplifikationssystem til at identificere potentielle svigt under analyseprocessen. Denne detekteres som en intern kontrol (IC) i fluorescenskanalen Cycling Yellow på Rotor-Gene Q-instrumenter.

Prober, som er specifikke for HSV-1-DNA, er mærket med fluoroforen FAMTM, mens prober, der er specifikke for HSV-2-DNA, er mærket med en fluorofor med de samme egenskaber som Cy[®]5. Den probe, som er specifik for den interne kontrol (IC), er mærket med fluofoeren JOETM. Anvendelse af prober, som er mærket med fluoroforer, der kan skelnes spektralt, gør det muligt på samme tid at detektere og kvantificere HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA samt detektere den interne kontrol i de tilsvarende kanaler på Rotor-Gene Q-instrumentet.

Leverede materialer

Kittets indhold

artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		(96)
Katalognummer		4515265
Antal reaktioner		96
Blåt	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Lilla	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Grønt	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Rødt	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Orange	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Hvidt	H ₂ O	1 x 500 µl
	Håndbog	1

* artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet indeholder 4 HSV-1-quantificeringsstandarder (QS1–QS4) og 4 HSV-2-quantificeringsstandarder (QS1–QS4).

Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Sørg for, at instrumenterne før anvendelse regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

Reagenser

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN kat.nr. 51304 eller 51306, se "DNA-ekstraktion" på side 10)

Forbrugsartikler

- 0,1 ml stripør og hætter til brug med 72-brøndsrotor (QIAGEN katalognr. 981103 eller 981106)
- Nukleasefri, mikrocentrifugerør med lav DNA-binding til klargøring af masterblandinger

- Nukleasefri pipettespidser med aerosolbarrierer

Udstyr

- Rotor-Gene Q MDx 5plex-, Rotor-Gene Q 5plex- eller Rotor-Gene Q 6plex-instrument
- Rotor-Gene Q-software version 2.3.1 eller nyere
- Loading Block 72 x 0,1 ml rør, aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion (QIAGEN, kat.nr. 9018901)
- Dedikerede justerbare pipetter til prøveklargøring
- Dedikerede justerbare pipetter til klargøring af PCR-masterblanding
- Dedikerede justerbare pipetter til dosering af skabelon-DNA
- Vortex-mixer
- Bordcentrifuge med rotor til 2 ml reagensglas

Advarsler og forholdsregler

Til *in vitro*-diagnostisk anvendelse.

Læs alle anvisninger omhyggeligt før anvendelse af denne test.

Advarsler

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier.

Forholdsregler

- Dette produkt må kun anvendes af personale, som er særligt uddannet i teknikkerne til real-time PCR- og *in vitro*-diagnostiske procedurer.

- Prøver skal altid behandles som smittefarlige og/eller biologisk skadelige i overensstemmelse med sikre laboratorieprocedurer.
- Brug beskyttende puddefri engangshandsker og øjenværn ved håndtering af prøver.
- Undgå kontaminering af prøven og komponenterne i kittet med mikrober og nuklease (DNase/RNase).
- Benyt altid DNase/RNase-fri engangspipettespidser med aerosolbarrierer.
- Benyt altid beskyttende puddefri engangshandsker ved håndtering af kitkomponenter.
- Benyt separate og adskilte arbejdsområder til klargøring af prøver, opsætning af reaktioner og amplifikations-/detektionsaktiviteter. Arbejdsgangen i laboratoriet skal foregå i én retning. Benyt altid engangshandsker i hvert område, og skift handsker, før du går ind i andre områder.
- Dediker materialer og udstyr til de adskilte arbejdsområder, og flyt dem ikke fra et område til et andet.
- Opbevar positivt og/eller potentielt positivt materiale adskilt fra alle andre komponenter i kittet.
- Reagensglas/-plader må ikke åbnes efter amplifikation for at undgå kontaminering med amplikoner.
- Yderligere kontroller kan testes i henhold til retningslinjer eller krav fra lokale, statslige og/eller føderale regler eller akkrediteringsorganisationer.
- Du må ikke anvende komponenter i kittet, som er udløbet.
- Kassér prøve- og analyseaffald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Kitkomponenter

artus HSV-1/2 RG PCR-kittet forsendes på tør is. Kitkomponenterne skal være frosne ved ankomsten. Hvis en eller flere komponenter ikke er frosne ved modtagelsen, eller hvis rørene er blevet kompromitteret under forsendelsen, kontaktes QIAGENs tekniske service for assistance. Efter modtagelsen opbevares alle kitkomponenter ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Undgå gentagen optøning og nedfrysning af masterreagenser (mere end to gange), da det kan reducere analysens ydeevne. Nedfrys reagenserne i aliquoter, hvis de skal anvendes ind imellem. Reagenserne må opbevares ved 4 °C i højst 2 timer. Beskyt HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B mod lys.

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet indeholder:

- To masterreagenser (HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B)
- Skabelon for intern kontrol (HSV-1/2 RG IC)
- Fire HSV-1-quantificeringsstandarder (HSV-1 QS1–QS4)
- Fire HSV-2-quantificeringsstandarder (HSV-2 QS1–QS4)
- Vand i PCR-kvalitet (H₂O)

HSV-1/2 RG Master A- og HSV-1/2 RG Master B-reagenser indeholder alle komponenter (buffer, enzymer, primere og prober) til amplifikation, detektion og differentiering af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA og den interne kontrol i en enkelt reaktion.

Kvantificeringsstandarderne indeholder standardiserede koncentrationer af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA. De kan anvendes hver for sig som positive kontroller eller sammen til at generere en standardkurve, som kan anvendes til at bestemme koncentrationen af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA i prøven. Koncentrationerne af kvantificeringsstandarderne er vist i tabel 1.

Tabel 1. Koncentration af kvantificeringsstandarder

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

Procedure

DNA-ekstraktion

HSV-1- og HSV-2-specifikke målsekvenser forstærkes fra DNA. Da analysens ydelse er afhængig af skabelon-DNA's kvalitet, skal du sørge for at anvende et prøveklargøringskit, der giver DNA, som er egnet til brug i efterfølgende PCR.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, kat.nr. 51304 eller 51306) anbefales til DNA-oprensning til brug med *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet. Udfør DNA-oprensning i henhold til anvisningerne i *QIAamp DNA Mini-håndbogen*.

Da vaskebufferne i QIAamp DNA Mini-kittet indeholder ethanol, skal der udføres et ekstra centrifugeringstrin før eluering. Anbring QIAamp Mini-spinkolonnen i et nyt 2 ml opsamlingsrør, og kassér det gamle opsamlingsrør sammen med filtratet. Centrifuger i 10 minutter ved ca. 17.000 x g (~13.000 rpm) i en bordcentrifuge.

Vigtigt: Anvendelse af carrier-RNA er af afgørende betydning for ekstraktionens effektivitet og den ekstraherede nukleinsyres stabilitet.

Vigtigt: Ethanol er en stærk inhibitor i real-time PCR. Hvis prøveklargøringskittet anvender vaskebuffer med ethanol, skal du sørge for at fjerne alle spor af ethanol før eluering af nukleinsyren.

Intern kontrol

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet indeholder en heterolog intern kontrol, der enten kan anvendes som PCR-inhibitionskontrol eller som kontrol af prøveklargøringsproceduren (nukleinsyreekstraktion) og som PCR-inhibitionskontrol.

Hvis den interne kontrol anvendes som PCR-inhibitionskontrol, men ikke som kontrol for prøveklargøringsproceduren, tilføjes den interne kontrol direkte til blandingen af HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B som beskrevet i trin 2b af protokollen (side 13).

Uanset hvilken metode/hvilket system der anvendes til nukleinsyreekstraktion, må den interne kontrol ikke tilsættes direkte til prøven. Den interne kontrol skal altid tilsættes til prøve-/lysisbufferblandingen. Den mængde intern kontrol, der skal tilsættes til prøve-/lysisbufferblandingen, afhænger kun af elueringsmængden og udgør 10 % af elueringsmængden. Når f.eks. QIAamp DNA Mini-kittet anvendes, elueres DNA'et i 60 µl AE-buffer. Derfor tilsættes 6 µl intern kontrol til prøve-/lysisblandingen af hver prøve.

Vigtigt: Tilsæt ikke den interne kontrol og/eller carrier-RNA direkte til prøven.

Protokol: Detektion af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA

Vigtige anvisninger før start

- Før proceduren påbegyndes, bør "Forholdsregler" på side 7 gennemlæses.
- Brug tid på at blive fortrolig med Rotor-Gene Q-instrumentet, før protokollen startes. Se instrumentets brugervejledning.
- Sørg for, at der inkluderes mindst en positiv og en negativ kontrol (vand i PCR-kvalitet) pr. PCR-kørsel.

Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at køleblokken (tilhører til Rotor-Gene Q-instrumentet) er forkølet til 2–8 °C.
- Før hver brug skal alle reagenser tøs helt op, blandes (ved gentagen op- og nedpipettering eller hurtig vortex-blanding) og centrifugeres kortvarigt.

Procedure

1. Anbring det ønskede antal PCR-rør i køleblokkens adaptere.
2. Hvis du anvender den interne kontrol til at monitorere oprensningen af DNA og til at kontrollere en eventuel inhibition af PCR, følges trin 2a. Hvis du kun anvender den interne kontrol til at kontrollere en inhibition af PCR, følges trin 2b.

Brug den interne kontrol ifølge trin 2b til alle prøver, kontroller og kvantificeringsstandarder, der skal analyseres.

- 2a. Den interne kontrol er allerede tilsat isolationen (se "Intern kontrol" på side 11). I dette tilfælde klargøres en masterblanding ifølge tabel 2.

Reaktionsblandingen indeholder alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 2. Klargøring af masterblanding (intern kontrol anvendes til at monitorere DNA-isolering og kontrollere for hæmning af PCR)

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

2b. Den interne kontrol skal tilsættes direkte til blandingen af HSV-1/2 RG Master A og HSV-1/2 RG Master B. I dette tilfælde klargøres en masterblanding ifølge tabel 3.

Reaktionsblanding indeholder alle de komponenter, der skal anvendes til PCR, undtagen prøven.

Tabel 3. Klargøring af masterblanding (intern kontrol anvendes kun til at kontrollere for hæmning af PCR)

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

* Volumenforøgelsen, som opstår på grund af den interne kontrol, er irrelevant. Detektionssystemets sensitivitet påvirkes ikke.

3. Pipetter 20 µl af masterblanding i hvert PCR-rør. Tilsæt derefter 10 µl af det eluerede prøve-DNA, og bland godt ved at pipettere op og ned flere gange. Tilsvarende tilsættes 10 µl af en positiv kontrol eller kvantificeringsstandard eller 10 µl H₂O (af PCR-kvalitet) som negativ kontrol.

Sørg for at have mindst en positiv og en negativ kontrol pr. kørsel. Til kvantificering anvendes alle 8 kvantificeringsstandarder (HSV1 QS1–QS4 & HSV2 QS1–QS4).

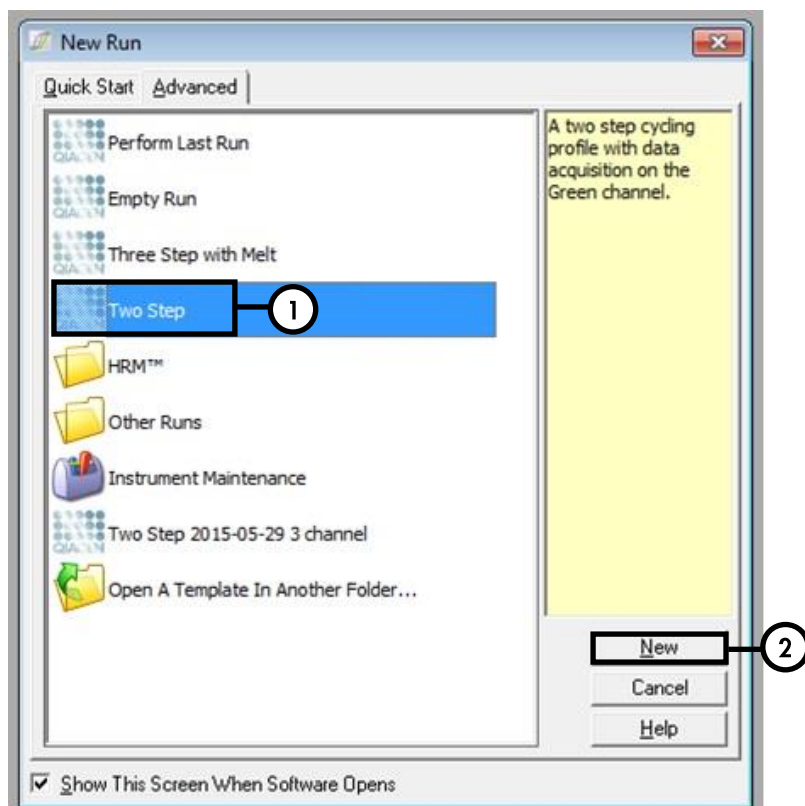
4. Luk PCR-rørene. Sørg for, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene-instrumentet) er placeret oven på rotoren.

5. Til detektion af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA oprettes en temperaturprofil i henhold til de følgende trin.

Indstilling af generelle analyseparametre	Figur 1, 2, 3, 4
Indledende aktivering af hot-start-enzymet	Figur 5
Amplifikation af DNA'et	Figur 6
Justering af fluorescenskanalens sensitivitet	Figur 7
Start af kørsel	Figur 8

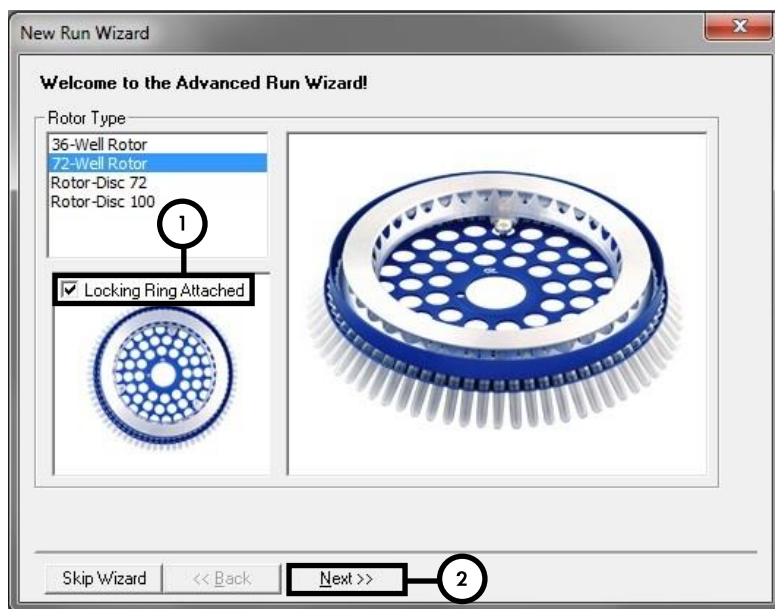
Alle specifikationer henviser til Rotor-Gene Q-software version 2.3.1 og nyere. Yderligere oplysninger om programmering af Rotor-Gene-instrumenter kan ses i instrumentets brugervejledning. I illustrationerne er disse illustrationer indrammet med en fed, sort streg.

6. Først åbnes dialogboksen **New Run Wizard** (Hjælp til ny kørsel) med versionen **Advanced** (Avanceret), og derefter vælges **Two Step** (To trin) (figur 1). Klik på **Next** (Næste) for at fortsætte.



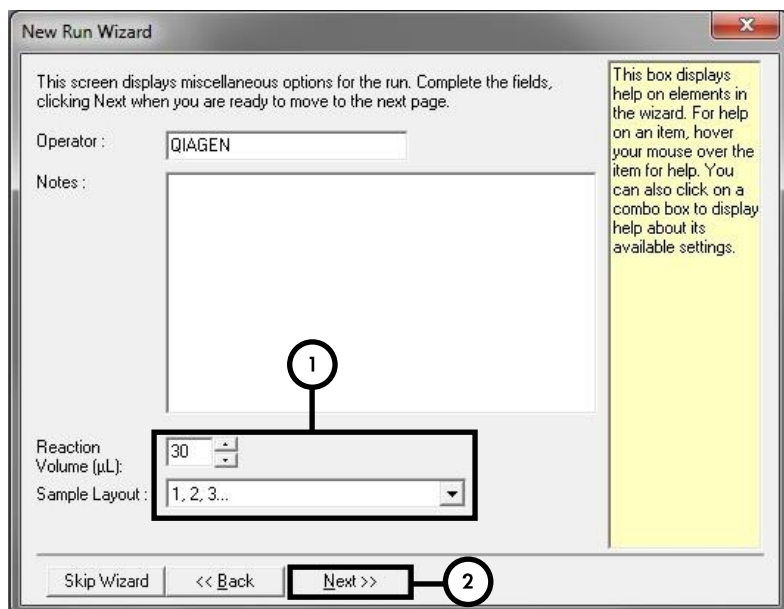
Figur 1. Dialogboksen New Run (Ny kørsel).

7. I den næste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 2) markeres **Locking Ring Attached** (Låsering monteret), og der klikkes på **Next**.



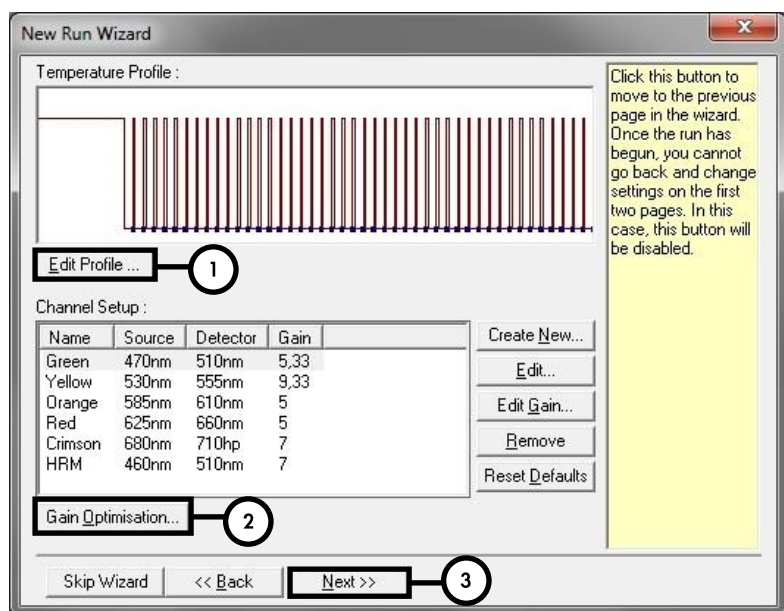
Figur 2. Dialogboksen New Run Wizard.

8. Vælg **30** for PCR-reaktionsvolumen, og klik på **Next** (figur 3).

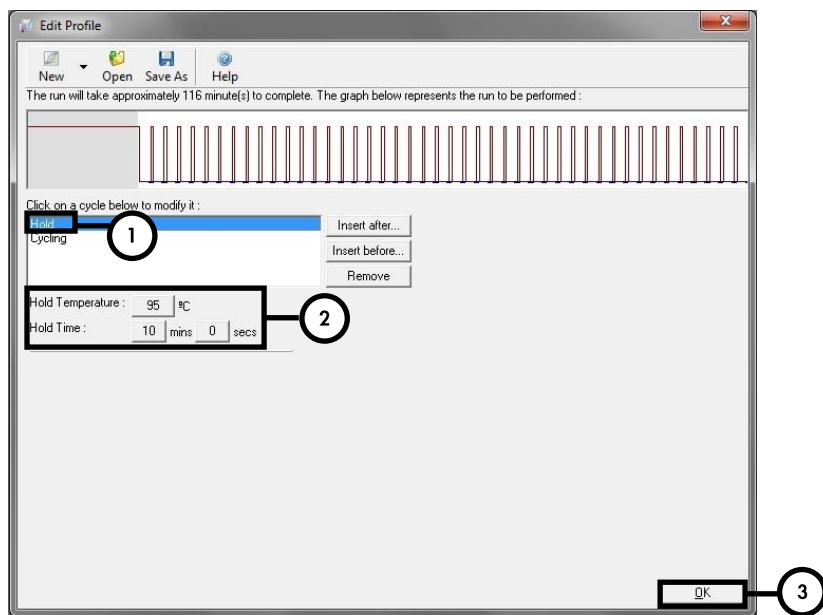


Figur 3. Indstilling af generelle analyseparametre.

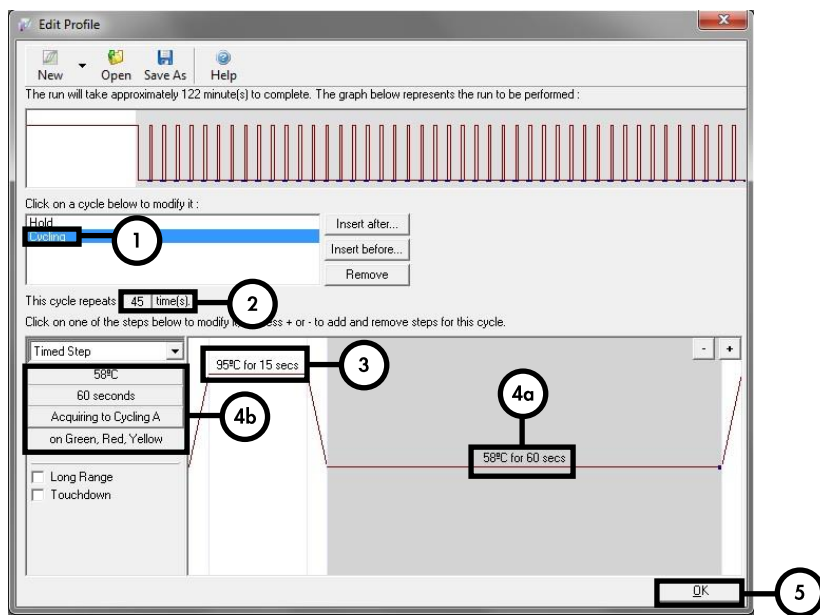
9. Klik på knappen **Edit Profile** (Rediger profil) i den næste **New Run Wizard**-dialogboks (figur 4), og programmer temperaturprofilen som vist i figur 5–6.



Figur 4. Redigering af profilen.

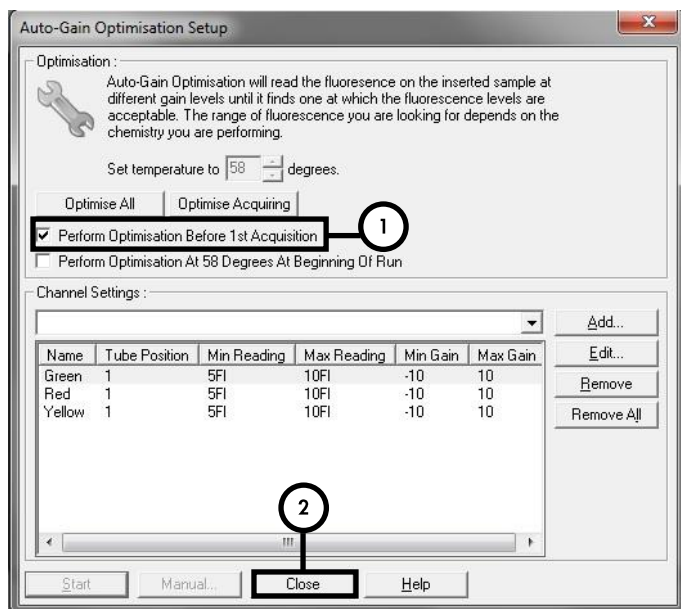


Figur 5. Indledende aktivering af hot-start-enzymet.



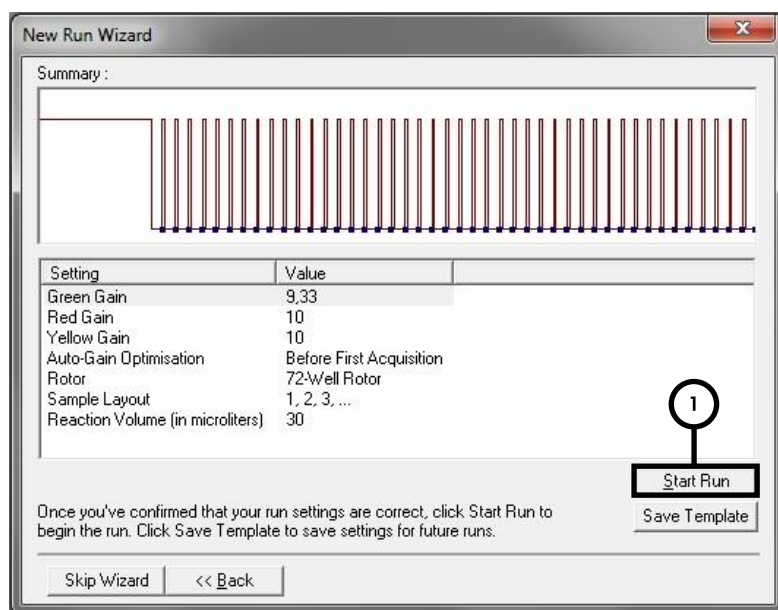
Figur 6. Amplifikation af DNA'et.

10. Detektionsområdet for fluorescenskanalerne skal bestemmes i henhold til fluorescensintensiteterne i PCR-rørene. Klik på **Gain-Optimisation** (Gain-optimering) i dialogboksen **New Run Wizard** (se figur 4, trin 2) for at åbne dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup** (Opsætning af automatisk gain-optimering) (figur 7). Markér **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Udfør optimering før første opsamling) (figur 7). Sørg for, at alle tre kanaler (Green, Red og Yellow) er valgt for **Auto-Gain Optimisation** (Automatisk gain-optimering) (figur 7). (Find kanaler i rullemenuen under **Channel Settings** (Kanalindstillinger), og klik på **Add** (Tilføj)). Klik på **Close** (Luk) i dialogboksen **Auto-Gain Optimisation Setup**, når gain-kalibreringen er udført.



Figur 7. Justering af fluorescenskanalens sensitivitet.

11. Gain-værdierne, der bestemmes af kanalkalibreringen, gemmes automatisk og angives i det sidste menuvindue i programmeringsproceduren (figur 8). Klik på **Start Run** (Start kørsel).



Figur 8. Start kørslen.

12. Når kørslen er færdig, analyseres dataene (se "Fortolkning af resultater" på side 23).

Fortolkning af resultater

Kørslens gyldighed

Gyldig kvalitativ kørsel

Følgende kontrolbetingelser skal være opfyldt, for at en kvalitativ kørsel er gyldig (tabel 4).

Tabel 4. Kontrolbetingelser for en gyldig kvalitativ kørsel

Kontrol-id	Detektionskanal		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
HSV-1-positiv kontrol (QS)	POSITIV	NEGATIV	POSITIV
HSV-2-positiv kontrol (QS)	NEGATIV	POSITIV	POSITIV
Negativ kontrol	NEGATIV	NEGATIV	POSITIV

Ugyldig kvalitativ kørsel

En kvalitativ kørsel er ugyldig, hvis kørslen ikke er gennemført, eller hvis en eller flere af kontrolbetingelserne for en gyldig kvalitativ kørsel ikke er opfyldt.

I tilfælde af en ugyldig kvalitativ kørsel gentages PCR'en, eller der ekstraheres DNA fra de oprindelige prøver igen, hvis der ikke er noget DNA tilbage.

Gyldig kvantitativ kørsel

En kvantitativ kørsel er gyldig, hvis alle kontrolbetingelser for en gyldig kvalitativ kørsel er opfyldt (se tabel 4 ovenfor). Desuden skal der genereres en gyldig standardkurve for nøjagtige kvantificeringsresultater. En kvantitativ kørsel er gyldig, hvis standardkurven har følgende kontrolparameterverdier (tabel 5).

Tabel 5. Kontrolparametre for en gyldig standardkurve

Kontrolparameter	Gyldig værdi
Hældning	-3,743/-2,765
PCR-effektivitet	85 %/130 %
R i anden (R^2)	>0,98

Ugyldig kvantitativ kørsel

En kvantitativ kørsel er ugyldig, hvis kørslen ikke er gennemført, eller hvis en eller flere af kontrolbetingelserne for en gyldig kvantitativ kørsel ikke er opfyldt.

I tilfælde af en ugyldig kvantitativ kørsel gentages PCR'en, eller der ekstraheres DNA fra de oprindelige prøver igen, hvis der ikke er noget DNA tilbage.

Kvalitativ analyse

Der vises en oversigt over tolkningen af resultater i tabel 6.

Tabel 6. Resume af resultattolkning

Prøve-id	Detektionskanal			Tolkning af resultater
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIV	NEGATIV	POSITIV*	HSV-1-specifikt DNA detekteret.
B	NEGATIV	POSITIV	POSITIV*	HSV-2-specifikt DNA detekteret.
C	NEGATIV	NEGATIV	POSITIV	Hverken HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA detekteret. Prøve indeholder ikke detekterbare mængder af HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA.
D	NEGATIV	NEGATIV	NEGATIV	PCR-inhibition eller reagenssvigt. Gentag procedure med oprindelig prøve, eller indhent og test en ny prøve.

* Detektion af den interne kontrol i Cycling Yellow-kanalen er ikke nødvendig for positive resultater i Cycling Green- eller Cycling Red-detektionskanalen. Høj HSV-1- eller HSV-2-belastning i prøven kan føre til reducerede eller fraværende intern kontrol-signaler.

Kvantitativ analyse

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet indeholder 4 kvantificeringsstandarder (QS) til HSV-1 og 4 kvantificeringsstandarder (QS) til HSV-2. For at kunne generere en standardkurve til kvantitativ analyse skal disse være defineret som standarder med passende koncentrationer (se tabel 1 på side 10). Der kan genereres en standardkurve til kvantitativ analyse ved hjælp af standarder for kendte koncentrationer.

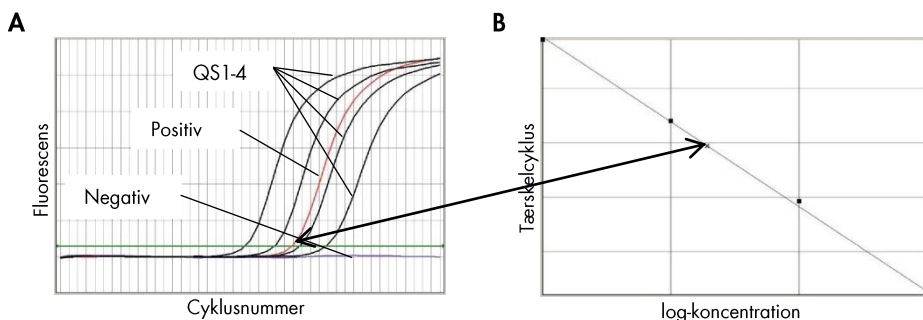
$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = Tærskelcyklus
- m = Hældning
- N_0 = Initial koncentration

- b = Intercept

Koncentrationerne af positive prøver med ukendt koncentration kan udledes af standardkurven (figur 9).

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



Figur 9. Kvantificeringsstandarder, en positiv og en negativ prøve vist i (A) et amplifikationsplot og (B) en standardkurveanalyse.

Bemærk: Koncentrationen af prøven er vist i kopier/ μ l og henviser til koncentrationen af viralt DNA i eluatet.

Brug følgende formel til at bestemme virusbelastningen i den oprindelige prøve.

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

Begrænsninger

- Dette produkt må kun anvendes af personale, som er særligt uddannet i teknikkerne til real-time PCR- og *in vitro*-diagnostiske procedurer.

- God laboratoriepraksis er af afgørende betydning for korrekt ydeevne for denne analyse.
- Vær ekstremt omhyggelig med at opretholde renheden af komponenterne i kittet og reaktionsopsætningerne. Monitorer nøje alle reagenser for urenheder og kontaminering. Kassér reagenser, der er under mistanke for kontaminering.
- Korrekt prøveindsamling, -transport, -opbevaring og -behandling er nødvendige for optimal ydelse af denne analyse.
- Brug ikke denne analyse direkte på prøven. Udfør de relevante nukleinsyreekstraktionsprocedurer før denne analyse.
- Tilstedeværelse af PCR-inhibitorer kan fremkalde falsk negative eller ugyldige resultater.
- Potentielle mutationer i målregionerne i det HSV1- og/eller HSV-2-genom, der er dækket af de primære og/eller prober, der anvendes i kittet, kan resultere i, at tilstedeværelse af patogener ikke detekteres.
- Som ved andre diagnostiske test tolkes resultaterne ved hjælp af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet med hensyn til alle kliniske og laboratoriemæssige fund.

Kvalitetskontrol

Hvert batch af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet testes efter fastlagte specifikationer for at sikre ensartet produktkvalitet.

Ydelseskarakteristik

De specifikke ydelseskarakteristika for *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet blev fastlagt ved hjælp af HSV-1-specifikt DNA (ATCC® nummer: VR-1493) og HSV-2-specifikt DNA (ATCC-nummer: VR-540) i kendte koncentrationer.

Analysesensitivitet

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittets sensitivitet defineres som koncentrationen (kopier pr. μ l eluat) af HSV-1- eller HSV-2-specifikt DNA, der kan detekteres med en positivitetsrate på ≥ 95 %. Analysesensitiviteten blev bestemt ved analyse af en fortyndingsrække af HSV-1-DNA og HSV-2-DNA med kendt koncentration (tabel 7 og 8).

Tabel 7. De PCR-resultater, der blev brugt til at beregne analysesensitiviteten af HSV-1-specifik amplifikation

Inputkoncentration (kopier/ μ l)	Antal replika	Antal positive	Genfindelsesforhold (%)
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

Tabel 8. De PCR-resultater, der blev brugt til at beregne analysesensitiviteten af HSV-2-specifik amplifikation

Inputkoncentration (kopier/ μ l)	Antal replika	Antal positive	Genfindelsesforhold (%)
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

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittets analysesensitivitet, der er bestemt ved probitanalyse, til detektion af HSV-1-specifikt DNA er 0,33 kopier/ μ l eluat [95 % konfidensinterval (CI): 0,16–1,3 kopier/ μ l] og analysesensitiviteten for detektion af HSV-2-specifikt DNA er 1,2 kopier/ μ l eluat (95 % CI: 0,7–3,5 kopier/ μ l).

Analysespecificitet

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittets analysespecificitet sikres ved omhyggelig udvælgelse af oligonukleotiderne (primere og prober). Oligonukleotiderne kontrolleres ved sekvenssammenligningsanalyse i forhold til offentligt tilgængelige sekvenser for at sikre, at alle relevante HSV-genotyper detekteres. Derudover blev *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittets specificitet evalueret ved at teste et panel af genom-DNA/-RNA ekstraheret fra andre herpesvirus eller andre patogener, som er relevante for immunkompromitterede patienter (tabel 9).

Tabel 9. Organismer analyseret for krydsreaktivitet

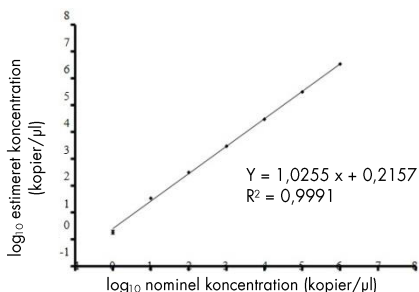
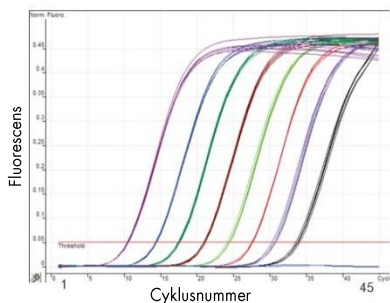
Organisme	Detektionskanal		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Varicella-Zoster-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Epstein-Barr-virus	Negativ	Negativ	Gyldig
Cytomegalovirus	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 6 (A, B)	Negativ	Negativ	Gyldig
Humant herpesvirus 7	Negativ	Negativ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

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet krydsreagerede ikke med nogen af de specificerede organismer.

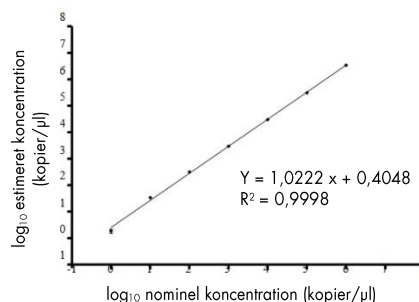
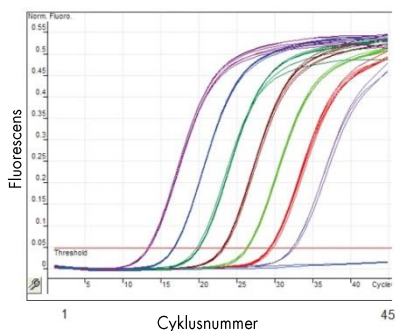
Lineært område

Det lineære område af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet blev evalueret ved at analysere en logaritmisk fortyndingsserie af HSV-1- og HSV-2-specifikt DNA med koncentrationer 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). Mindst 6 replika pr. fortynding blev analyseret.

A



B



Figur 10. Amplifikationskurver og lineær regressionsanalyse af en fortyndingsserie af (A) HSV-1- og (B) HSV-2-specifikt DNA.

Det lineære område af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR Kit strækker sig over et interval på mindst 7 størrelsesordener for HSV-1- og et interval på mindst 6 størrelsesordener for HSV-2-specifikt DNA.

Præcision

artus HSV-1/2 Quant RG PCR-kittets præcision blev bestemt ved variabiliteten inden for analysen (variabiliteten inden for et eksperiment), variabiliteten mellem analyserne (variabiliteten mellem flere eksperimenter) og variabiliteten mellem batches (variabiliteten mellem forskellige produktionsbatches).

Variabilitetsdata udtrykkes med standardafvigelse, varians og variationskoefficient. Dataene er baseret på kvantificeringsanalyse af definerede koncentrationer af genomisk HSV-1 og HSV-2-specifikt DNA og på tærskelcyklusværdier (C_t) med hensyn til den interne kontrol (tabel 10–13). Der blev analyseret mindst 6 replika pr. prøve for variabiliteten inden for analysen, mellem analyser og mellem batches. Den totale varians blev beregnet ved at kombinere de 3 analyser.

Tabel 10. Præcision af amplifikation af HSV-1-specifikt DNA

HSV-1-specifikt system	Gensn. konc. (kopier/μl)	Standardafvigelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Variabilitet inden for analyse	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Variabilitet mellem analyser	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Variabilitet mellem batches	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

Tabel 11. Præcision af amplifikation af intern kontrol for HSV-1

Intern kontrol	Gennemsnitlig tærskelcyklus (C _t)	Standardafvigelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Variabilitet inden for analyse	23,0	0,05	0,003	0,23
Variabilitet mellem analyser	22,9	0,12	0,01	0,51
Variabilitet mellem batches	23,5	0,61	0,37	2,6
Total varians	23,3	0,61	0,37	2,6

Tabel 12. Præcision af amplifikation af HSV-2-specifikt DNA

HSV-2-specifikt system	Gensn. konc. (kopier/µl)	Standardafvigelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Variabilitet inden for analyse	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Variabilitet mellem analyser	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Variabilitet mellem batches	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

Tabel 13. Præcision af amplifikation af intern kontrol for HSV-2

Intern kontrol	Gennemsnitlig tærskelcyklus (C _t)	Standardafvigelse	Varians	Variationskoefficient (%)
Variabilitet inden for analyse	24,0	0,1	0,004	0,43
Variabilitet mellem analyser	23,8	0,3	0,13	1,27
Variabilitet mellem batches	24,0	0,14	0,02	0,59
Total varians	23,9	0,25	0,06	1,03

Gentagelighed

Specificitet, sensitivitet og nøjagtighed af kvantificering af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet blev vurderet ved at analysere etablerede præstationspaneler for HSV. For at sikre gentagelighed af *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet vurderes specificitet og sensitivitet ved at analysere etablerede præstationspaneler for HSV-1 og HSV-2 samt karakteriserede diagnostiske prøver jævnligt (et eksempel er vist i tabel 15).

Tabel 15. Resultater af analysen af et præstationspanel for HSV (QCMD)

Præstationspanel			artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit		
Prøve-id	Prøveindhold	Forventet konc. (kopier/ml)	Detekteret konc. af HSV-1 (kopier/ml)	Detekteret konc. af HSV-2 (kopier/ml)	Intern kontrol
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
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

Symbolerne i nedenstående tabel anvendes i denne brugsanvisning.

Symbol	Symboldefinition
 96	Indholdet er tilstrækkeligt til 96 tests
	Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnosticering
	Katalognummer
	Batchnummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent

Symbol	Symboldefinition
	Anvendes inden
	Materialenummer
	Globalt handelsvarenummer
	Læs brugsanvisningen

Fejlsøgning

Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og/eller protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: Besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat. nr.
<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	Til 96 reaktioner: Master A, Master B, 4 kvantificeringsstandarder HSV-1, 4 kvantificeringsstandarder HSV-2, intern kontrol, H ₂ O (vand i PCR-kvalitet)	4515265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Til 50 DNA-fremstillinger: 50 QIAamp Mini-spinkolonner, Proteinase K, reagenser, buffere, indsamlingsrør (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Til 250 DNA-fremstillinger: 250 QIAamp Mini-spinkolonner, Proteinase K, reagenser, buffere, indsamlingsrør (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9002022

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: inklusive Priority Package med software, installation, uddannelse, 3 års garanti på reservedele og arbejdsløn og 3 forebyggende vedligeholdelsesbesøg	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: inklusive Priority Package med software, installation, uddannelse, 2 års garanti på reservedele og arbejdsløn og 2 forebyggende vedligeholdelsesbesøg	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejdsløn, installation og uddannelse	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Realtime PCR-cycler med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet), bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejdsløn. Installation og uddannelse ikke inkluderet	9001570

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inklusive bærbar computer, software, tilbehør: inklusive Priority Package med software, installation, uddannelse, 3 års garanti på reservedele og arbejds løn og 3 forebyggende vedligeholdelsesbesøg	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inklusive bærbar computer, software, tilbehør: inklusive Priority Package med software, installation, uddannelse, 2 års garanti på reservedele og arbejds løn og 2 forebyggende vedligeholdelsesbesøg	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: Inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Realtime PCR-instrument med 6 kanaler (blå, grøn, gul, orange, rød, violet), inkl. bærbar computer, software, tilbehør: inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn. Installation og uddannelse er ikke inkluderet	9001590

Produkt	Indhold	Kat. nr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Aftale om begrænset licens for *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR-kittet

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i henhold til de protokoller, der blev leveret sammen med produktet og denne håndbog, og kun sammen med komponenterne i dette kit. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkorporere de leverede komponenter i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der leveres med produktet, denne håndbog og yderligere protokoller, der kan ses på www.qiagen.com. Nogle af disse ekstra protokoller er leveret af QIAGEN-brugere til QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke blevet testet eller optimeret grundigt af QIAGEN. QIAGEN giver hverken garanti for dem eller garanterer, at de ikke overtræder tredjeparters rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparters rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale i enhver ret og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med produktet og/eller komponenterne deraf.

For opdaterede licensbetingelser henvises der til www.qiagen.com.

Ved køb af dette produkt må køber anvende det til at udføre diagnostiske tjenester til human *in vitro*-diagnostik. Derved gives intet generelt patent eller nogen anden tilladelse af nogen art ud over denne specifikke brugsret.

Varemærker: 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. Alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com