

Listopad 2019

Příručka pro soupravu *artus*[®] HHV-6 RG PCR Kit



Verze 1

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF

4521265



altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, NĚMECKO

R5 MAT

1117341-CS

Distributor: QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

Obsah

Účel použití.....	4
Shrnutí a vysvětlení.....	4
Informace o patogenech	4
Princip testu.....	5
Obsah soupravy	6
Potřebný materiál, který není součástí dodávky	7
Varování a bezpečnostní opatření.....	8
Varování.....	8
Bezpečnostní opatření	8
Skladování reagensů a manipulace s nimi	9
Součásti soupravy.....	9
Postup	11
Extrakce DNA.....	11
Protokol: Detekce DNA specifické pro virus HHV-6A a HHV-6B.....	13
Interpretace výsledků	24
Platnost cyklu	24
Kvalitativní analýza	26
Kvantitativní analýza	27
Omezení.....	29
Kontrola kvality	30
Charakteristiky účinnosti.....	30
Analytická senzitivita	30

Analytická specifická	31
Lineární oblast kvantifikace	32
Přesnost	33
Diagnostické hodnocení	35
Opakovatelnost	36
Symboly	37
Řešení problémů	39
Literatura	39
Informace pro objednání	40

Účel použití

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96) je test pro diagnostiku *in vitro* založený na technologii PCR v reálném čase pro detekci, diferenciaci a kvantifikaci specifické DNA lidského herpesviru 6A (HHV-6A) a lidského herpesviru 6B (HHV-6B).

Shrnutí a vysvětlení

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit je systém k přímému použití pro detekci specifické DNA viru HHV-6A a HHV-6B s pomocí PCR v reálném čase v přístrojích Rotor-Gene Q. Test obsahuje heterologní amplifikační systém (interní kontrolu) pro průkaz potenciální inhibice PCR a pro potvrzení neporušenosti reagensů soupravy.

Informace o patogenech

HHV-6 je společný název dvou blízce příbuzných virů HHV-6A a HHV-6B. Jsou to dva z devíti herpesvirů, o nichž je známo, že vyvolávají infekci u lidí. Patří do rodu *Roseolovirus* v podčeledi *Betaherpesvirinae*. K primární infekci virem HHV-6 nejčastěji dochází v dětském věku do dvou let. K symptomům patří horečka, průjem a exantheme subitum, což je vyrážka obecně známá jako růžovka. Počáteční infekce může v některých případech vést k febrilním křečím, encefalitidě nebo neústupným křečím. Virus po primární infekci zůstává v organismu latentní.

V průběhu života může dojít k reaktivaci latentního viru HHV-6. Klinické projevy reaktivece mohou mít vliv na řadu míst v organismu, např. na mozek, plíce, srdce, ledviny a trávicí trakt. Reaktivece viru HHV-6 v mozkové tkáni je spojena s neurologickými poruchami a ve vzácných případech může vést k poruše kognitivních funkcí, trvalé invaliditě a smrti.

Zatímco virus HHV-6B je příčinou klinických projevů u imunokompromitovaných pacientů a u dětí v USA, Japonsku a Evropě, HHV-6A převládá u dětí v Africe. HHV-6A se často objevuje u pacientů s chronickými neurologickými chorobami – zejména zánětlivými onemocněními nervového systému, jako např. roztroušenou sklerózou (RS) a rhomboencefalitidou.

Princip testu

HHV-6 RG Master A a HHV-6 RG Master B obsahují reagencie a enzymy pro specifickou amplifikaci cílových úseků v genomech HHV-6A a HHV-6B a také pro přímou detekci specifického amplikonu ve fluorescenčních kanálech Cycling Green a Cycling Red přístrojů Rotor-Gene Q.

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit dále obsahuje heterologní amplifikační systém pro zjištění potenciálních chyb v průběhu analýzy. Je detekován jako interní kontrola (Internal Control, IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Yellow přístrojů Rotor-Gene Q.

Sondy specifické pro DNA viru HHV-6A jsou označeny fluoroforem FAM™, kdežto sondy specifické pro DNA viru HHV-6B jsou označeny fluoroforem, který vykazuje stejné charakteristiky jako Cy[®]5. Sonda specifická pro interní kontrolu je označena fluoroforem JOE™. Použití sond označených spektrálně rozlišitelnými fluorofory umožňuje současnou detekci a kvantifikaci DNA specifické pro viry HHV-6A a HHV-6B a dále detekci interní kontroly v odpovídajících kanálech přístroje Rotor-Gene Q.

Obsah soupravy

artus HHV-6 RG PCR Kit		(96)
Katalogové číslo		4521265
Počet reakcí		96
Modrá	HHV-6 RG Master A	8× 60 µl
Fialová	HHV-6 RG Master B	8× 180 µl
Zelená	HHV-6 RG IC	1× 1 000 µl
Červená	HHV-6 RG QS*	4× 250 µl
Bílá	H ₂ O	1× 500 µl
	Příručka	1

*Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit obsahuje 4 kvantifikační standardy (Quantification Standards, QS1–QS4).

Potřebný materiál, který není součástí dodávky

Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.

Reagencie

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN kat. č. 51304 nebo 51306; viz „Extrakce DNA“, strana 11)

Spotřební materiál

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps pro použití s rotorem o 72 jamkách (QIAGEN, kat.č. 981103 nebo 981106)
- Beznukleázové zkumavky málo vázající DNA do mikrocentrifugy na přípravu master mixů
- Beznukleázové pipetovací špičky s aerosolovými bariérami

Vybavení

- Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex nebo Rotor-Gene Q 6plex
- Software přístroje Rotor-Gene Q, verze 2.3.1 nebo vyšší
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, hliníkový blok k ruční přípravě reakce (QIAGEN, kat. č. 9018901)
- Nastavitelné pipety vyhrazené k přípravě vzorku
- Nastavitelné pipety vyhrazené k přípravě PCR master mixu
- Nastavitelné pipety vyhrazené k dávkování templátu DNA
- Vířivý mixér (vortex)
- Stolní centrifuga s rotorem na zkumavky po 2 ml

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

Před použitím testu si pečlivě přečtěte všechny pokyny.

Varování

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle.

Bezpečnostní opatření

- Použití tohoto produktu je omezeno na pracovníky, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v technikách PCR v reálném čase a metodice diagnostiky in vitro.
- Se vzorky je nutné vždy zacházet jako s infekčním a/nebo biologicky nebezpečným materiálem podle bezpečných laboratorních postupů.
- Při manipulaci se vzorky vždy používejte jednorázové rukavice bez pudru, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- Zamezte kontaminaci vzorku a součástí soupravy mikroby a nukleázou (DNázou/RNázou).
- Vždy používejte jednorázové pipetovací špičky bez DNázy/RNázy s aerosolovými bariérami.
- Při manipulaci se součástmi soupravy vždy používejte ochranné jednorázové nepudrované rukavice.
- Pro přípravu vzorků, přípravu reakce a amplifikační/detekční činnosti používejte samostatné a oddělené pracovní prostory. Pracovní postup v laboratoři by měl postupovat jedním směrem. Pro každý prostor používejte jednorázové rukavice a před vstupem do nich je vždy vyměňte.

- Pro jednotlivé pracovní prostory používejte samostatný spotřební materiál a zařízení a nepřesouvejte je z jednoho prostoru do druhého.
- Pozitivní a/nebo potenciálně pozitivní materiál uchovávejte odděleně od všech ostatních součástí soupravy.
- Neotvírejte reakční zkumavky / destičky po amplifikaci, aby nedošlo ke kontaminaci aplikony.
- Dodatečné kontroly lze testovat podle směrnic či požadavků místních, státních a/nebo federálních předpisů nebo akreditačních organizací.
- Nepoužívejte součásti soupravy, které exspirovaly.
- Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Skladování reagensů a manipulace s nimi

Součásti soupravy

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit je dodávána na suchém ledu. Součásti soupravy musí být doručeny zmrazené. Pokud jedna nebo více součástí nebudou po doručení zmrazené, nebo pokud došlo během přepravy k poškození zkumavek, obraťte se na oddělení technických služeb QIAGEN s žádostí o pomoc. Po převzetí všechny součásti soupravy skladujte při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reagencie označené Master nerozmrazujte a nezmrázujte více než dvakrát, snižuje se tím účinnost analýzy. Jednotlivé reagencie zmrazte v alikvotních množstvích, budou-li se používat nepravidelně. Reagencie neskladujte při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ déle než 2 hodiny. Reagencie HHV-6 RG Master A a HHV-6 RG Master B chraňte před světlem.

Obsah soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit:

- dvě Master reagencie (HHV-6 RG Master A a HHV-6 RG Master B),
- interní kontrola s templátem (HHV-6 RG IC),
- čtyři kvantifikační standardy (HHV-6 RG QS1–QS4),
- voda v kvalitě vhodné pro PCR (H_2O).

Kvantifikační standardy obsahují standardizované koncentrace DNA specifické pro virus HHV-6. Tyto kvantifikační standardy byly kalibrovány vůči 1. mezinárodnímu standardu WHO pro DNA lidského herpesviru 6B (HHV-6B) (kód NIBSC: 15/266) pro analýzy založené na technice amplifikace nukleových kyselin (nucleic acid amplification testing, NAT) (1).

Pro kalibraci pozitivního materiálu specifického pro virus HHV-6A v soupravě *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96), byla použita analýza detekce nukleových kyselin nerozlišující HHV-6A a HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). Kalibrace byla provedena analýzou podle rovnoběžných přímek pomocí pozitivního materiálu specifického pro virus HHV-6A a 1. mezinárodního standardu WHO pro DNA lidského herpesviru 6B (HHV-6B). Kalibrace byla potvrzena pomocí soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit (96).

Tyto kvantifikační standardy je možné použít jednotlivě jako pozitivní kontroly, nebo společně k vytvoření **standardní křivky**, kterou lze použít ke stanovení koncentrace DNA specifické pro virus HHV-6A a/nebo HHV-6B ve vzorku. Koncentrace kvantifikačních standardů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Koncentrace kvantifikačních standardů

Kvantifikační standard	Koncentrace (IU/μl)	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	10 000	10 000
QS2	1 000	1 000
QS3	100	100
QS4	10	10

Postup

Extrakce DNA

Z DNA jsou amplifikovány specifické cílové sekvence virů HHV-6A a HHV-6B. Jelikož účinnost analýzy závisí na kvalitě templátové DNA, použijte soupravu pro přípravu vzorku, která poskytuje DNA vhodnou pro použití v navazující PCR.

Pro purifikaci DNA pro použití se soupravou *artus* HHV-6 RG PCR Kit se doporučuje souprava QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN kat. č. 51304 nebo 51306). Purifikaci DNA provádějte podle pokynů v *příručce k soupravě QIAamp DNA Mini*.

Jelikož promývací pufrы v soupravě QIAamp DNA Mini Kit obsahují ethanol, před elucí proveďte dodatečnou centrifugaci. Odstředivací kolonku QIAamp Mini dejte do čisté 2ml sběrné zkumavky a zlikvidujte starou sběrnou zkumavku s filtrátem. Centrifugujte ve stolní centrifuze 10 minut při cca 17 000 x g (~13 000 ot./min.).

Důležité: Pro účinnost extrakce a stabilitu extrahované nukleové kyseliny je zásadní použití nosiče RNA.

Důležité: Ethanol je při PCR v reálném čase silný inhibitor. Jestliže vaše souprava pro přípravu vzorku obsahuje promývací pufrы s obsahem ethanolu, před elucí nukleové kyseliny odstraňte všechny stopy ethanolu.

Interní kontrola

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit obsahuje heterologní interní kontrolu, která může být použita buďto jako kontrola inhibice PCR, nebo jako kontrola postupu přípravy vzorku (extrakce nukleové kyseliny) a jako kontrola inhibice PCR (krok 2a, strana 13).

Pokud je interní kontrola použita jako kontrola inhibice PCR a nikoli jako kontrola postupu přípravy vzorku, přidejte interní kontrolu přímo do směsi reagensů HHV-6 RG Master A a HHV-6 RG Master B, jak je popsáno v kroku 2b protokolu (strana 14).

Bez ohledu na to, kterou metodu/systém pro extrakci nukleové kyseliny použijete, se interní kontrola nesmí přidat přímo do vzorku. Interní kontrolu je nutné vždy přidávat do směsi vzorku a lyzačního pufru. Objem interní kontroly přidávané do směsi vzorku a lyzačního pufru závisí pouze na elučním objemu a představuje 10 % elučního objemu. Používáte-li například soupravu QIAamp DNA Mini Kit, DNA eluujete v 60 µl reagentie Buffer AE. Do směsi každého vzorku a lyzačního pufru proto přidejte 6 µl interní kontroly.

Důležité: Interní kontrolu a nosič RNA nepřidávejte přímo do vzorku.

Protokol: Detekce DNA specifické pro virus HHV-6A a HHV-6B

Důležité pokyny před zahájením

- Před zahájením postupu si přečtěte část „Bezpečnostní opatření“, stránka 8.
- Před zahájením procedury získajte základní informace o přístroji Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Dbejte na to, aby do každého cyklu PCR byla zahrnuta alespoň jedna pozitivní kontrola a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR).

Co je třeba udělat, než začnete

- Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) předem vychlazen na 2–8 °C.
- Všechny reagensie se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběh pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Postup

1. Umístěte požadovaný počet zkumavek PCR do adaptérů chladicího bloku.
2. Chcete-li pomocí interní kontroly sledovat jak izolaci DNA, tak možnou inhibici PCR, postupujte podle kroku 2a. Chcete-li interní kontrolu použít výhradně ke kontrole inhibice PCR, postupujte podle kroku 2b.

Důležité: Pokud byla interní kontrola přidána během přípravy vzorku, pak musí interní kontrolu obsahovat minimálně negativní kontrola (což není negativní vzorek).

- 2a. Interní kontrola již byla přidána k izolaci (viz „Interní kontrola“, strana 11). V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 2. Reakční směs obvykle obsahuje kromě vzorku všechny složky nutné k provedení PCR.

Tabulka 2. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá ke sledování izolace DNA a ke kontrole inhibice PCR)

Složka	1 reakce	12 reakcí
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
Celkový objem	20 µl	240 µl

- 2b. Interní kontrolu je nutné přidat přímo do směsi HHV-6 RG Master A a HHV-6 Master B. V tomto případě připravte směs Master Mix podle tabulky 3. Reakční směs obvykle obsahuje kromě vzorku všechny složky nutné k provedení PCR.

Tabulka 3. Příprava směsi Master Mix (interní kontrola použitá výhradně ke kontrole inhibice PCR)

Složka	1 reakce	12 reakcí
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
HHV-6 RG IC	1 µl	12 µl
Celkový objem	21 µl	252 µl

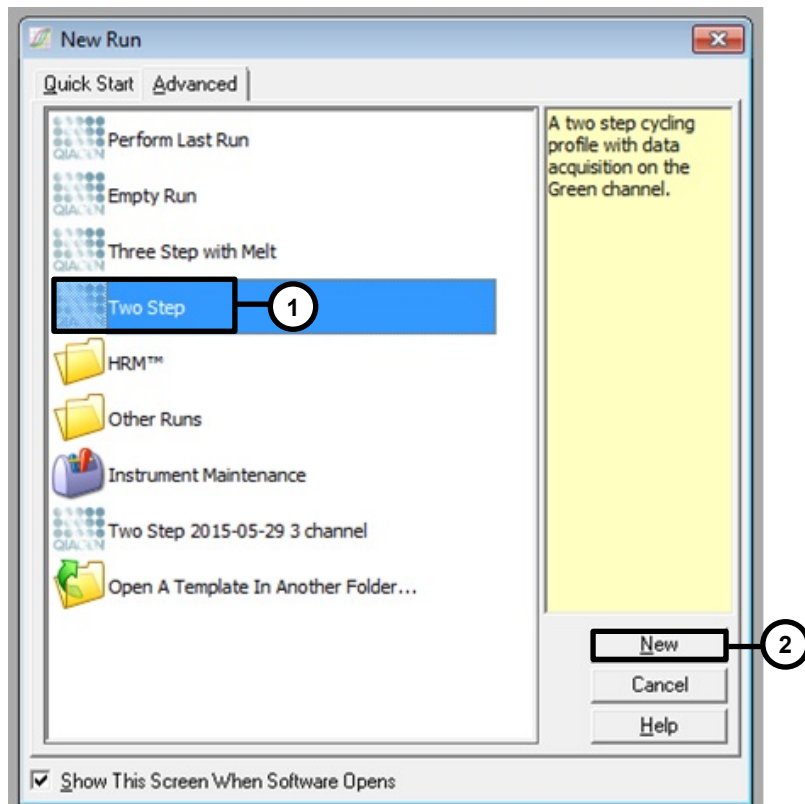
* Zvýšení objemu podmíněně přidáním interní kontroly se při přípravě reakce PCR nezohledňuje. Senzitivita detekčního systému není ovlivněna.

- Do každé zkumavky PCR odměřte pipetou 20 µl směsi Master Mix. Následně přidejte 10 µl eluátu z izolace DNA a řádně směs promíchejte opakovaným náběrem a vypuštěním pipety. Obdobně přidejte 10 µl pozitivní kontroly nebo kvantifikačního standardu nebo 10 µl vody (v kvalitě vhodné pro PCR) jakožto negativní kontroly. Ujistěte se, že je v každém cyklu alespoň jedna pozitivní kontrola a jedna negativní kontrola. Pro kvantifikaci použijte všechny 4 kvantifikační standardy (QS1–QS4).
- Uzavřete zkumavky PCR. Ujistěte se, že v horní části rotoru je umístěn pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q).
- Pro detekci DNA specifické pro virus HHV-6A a HHV-6B vytvořte teplotní profil podle následujících kroků:

Nastavení obecných parametrů analýzy	Obrázky 1, 2, 3, 4
Počáteční aktivace hot-start enzymu	Obrázek 5
Amplifikace DNA	Obrázek 6
Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů	Obrázek 7
Spuštění cyklu	Obrázek 8

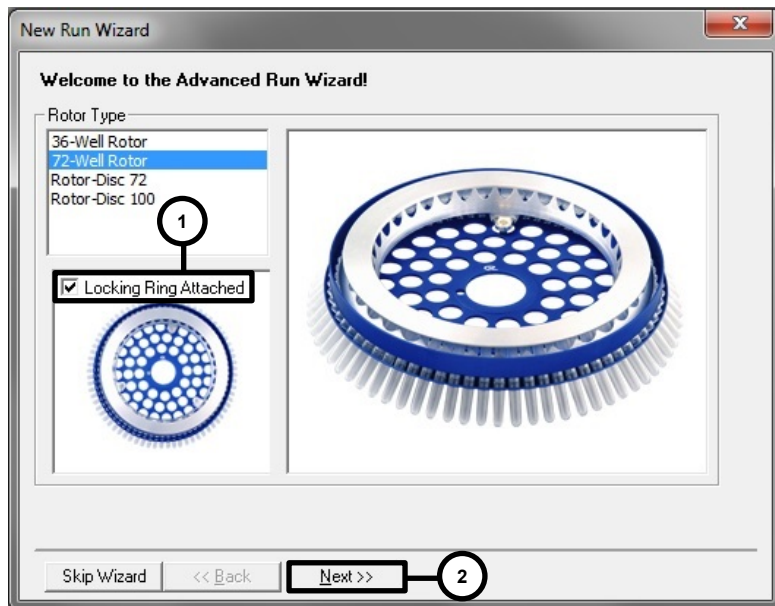
Všechny specifikace viz software přístroje Rotor-Gene Q, verze 2.3.1 a vyšší. Podrobnosti k programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce k přístroji. Na obrázku jsou tato nastavení orámována silnou černou čarou.

6. Nejdříve otevřete dialogové okno **New Run Wizard** (Průvodce novým cyklem) s verzí **Advanced** (Pokročilá) a vyberte možnost **Two Step** (Ve dvou krocích) (obrázek 1). Pokračujte kliknutím na tlačítko **New** (Nový).



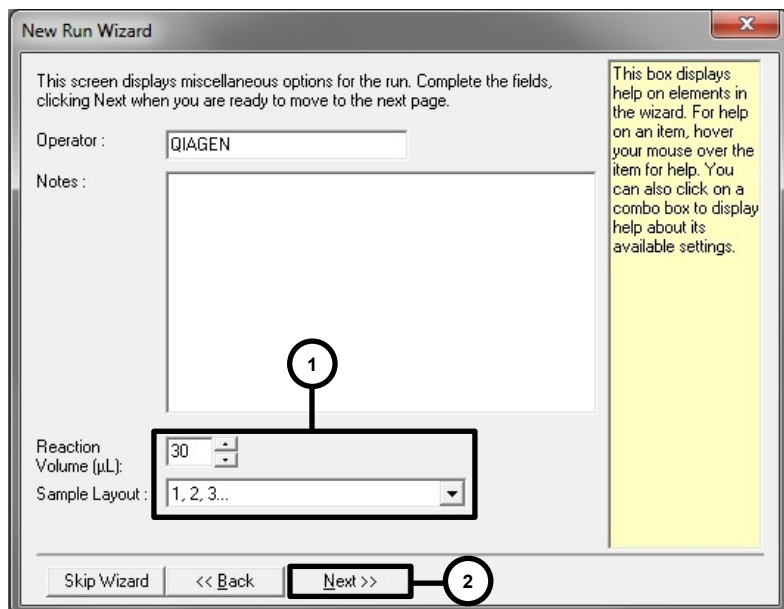
Obrázek 1. Dialogové okno New Run (Nový cyklus).

7. V dalším dialogovém okně **New Run Wizard** (Průvodce novým cyklem) (obrázek 2) zaškrtněte políčko **Locking Ring Attached** (Pojistný kroužek nasazen) a klikněte na tlačítko **Next** (Další).



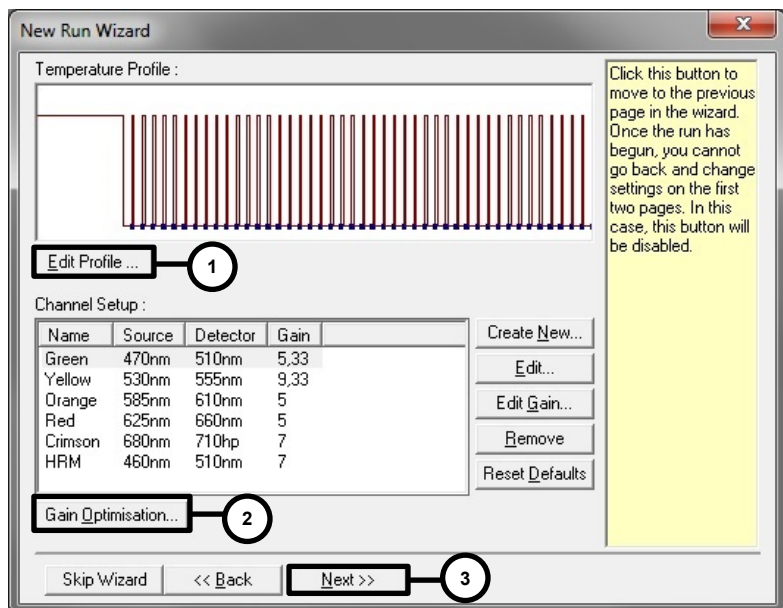
Obrázek 2. Dialogové okno New Run Wizard (Průvodce novým cyklem).

8. Zvolte **30** jako objem reakce a klikněte na tlačítko **Next** (Další) (obrázek 3).

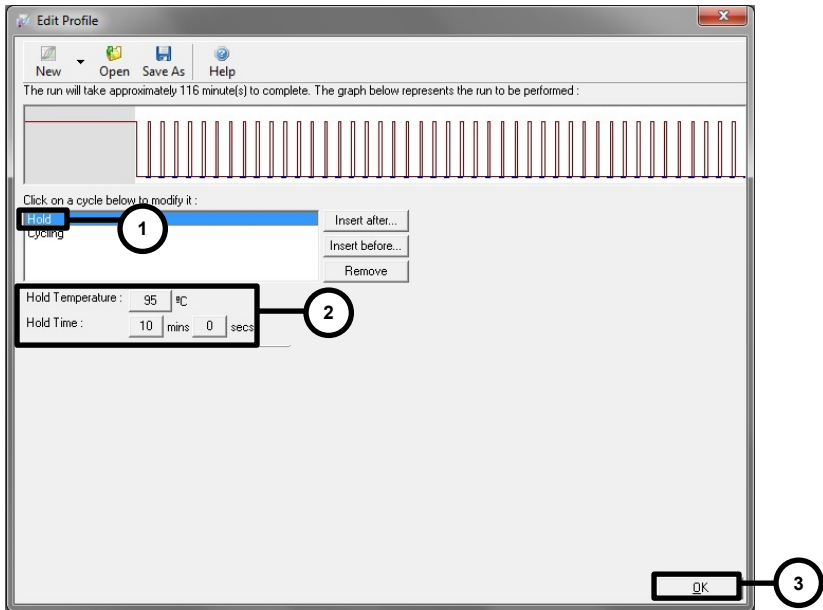


Obrázek 3. Nastavení obecných parametrů analýzy.

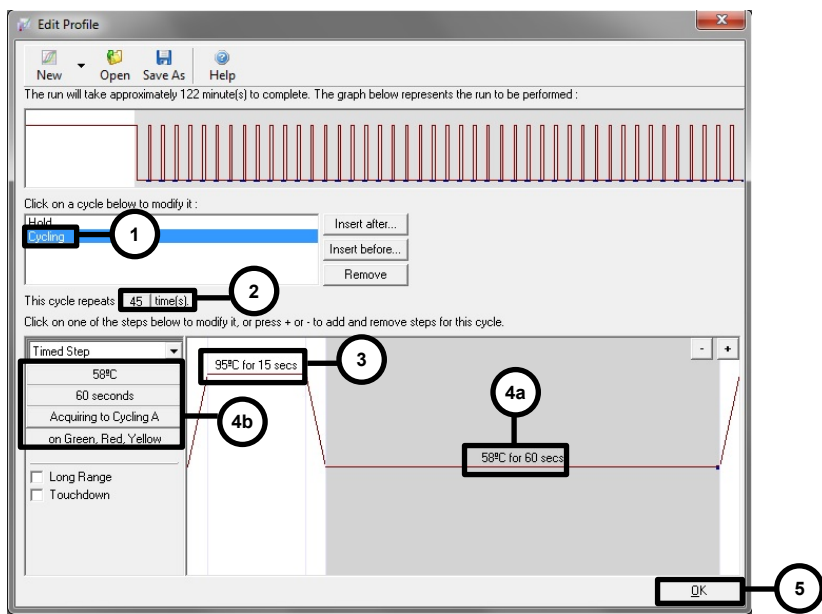
9. Klikněte na tlačítko **Edit Profile** (Upravit profil) v dalším dialogovém okně **New Run Wizard** (Průvodce novým cyklem) (obrázek 4) a naprogramujte teplotní profil podle obrázků 5–6.



Obrázek 4. Úprava profilu.

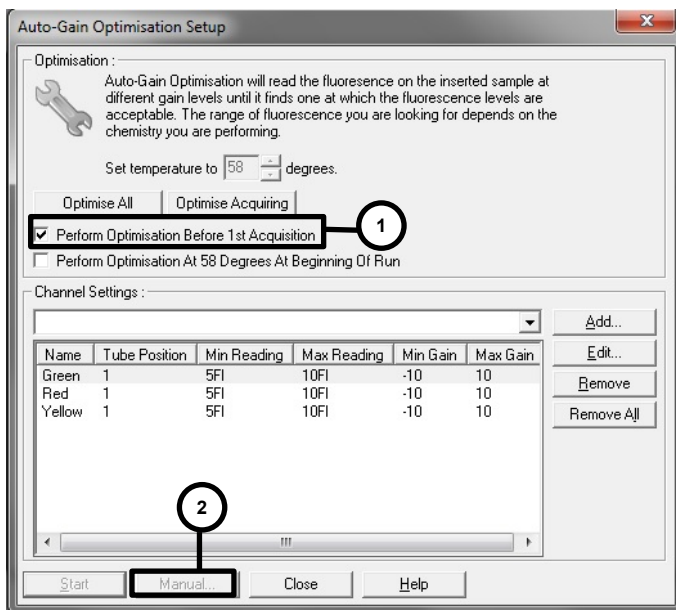


Obrázek 5. Počáteční aktivace hot-start enzymu.



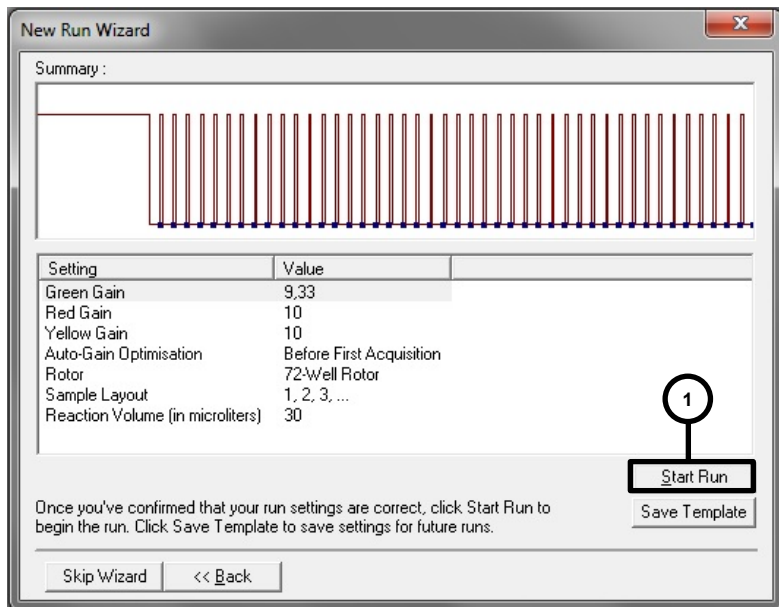
Obrázek 6. Amplifikace DNA.

10. Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity ve zkumavkách PCR. Kliknutím na **Gain Optimisation** (Optimalizace zisku) v dialogovém okně **New Run Wizard** (Průvodce novým cyklem) (obrázek 4, krok 2) otevřete dialogové okno **Auto-Gain Optimisation Setup** (Nastavení automatické optimalizace zisku) (obrázek 7). Zaškrtněte políčko **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Provést optimalizaci před 1. pořízením) (obrázek 7). Ujistěte se, že jsou pro možnost **Auto-Gain Optimisation** (Automatická optimalizace zisku) (obrázek 7) vybrány všechny tři kanály (Green (Zelený), Red (Červený) a Yellow (Žlutý)). (Kanály naleznete v rozevírací nabídce pod položkou **Channel Settings** (Nastavení kanálů) a klikněte na tlačítko **Add** (Přidat).) Po dokončení kalibrace zisku klikněte na tlačítko **Close** (Zavřít) v dialogovém okně **Auto-Gain Optimisation Setup** (Nastavení automatické optimalizace zisku).



Obrázek 7. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.

11. Hodnoty výsledků determinované kalibrací kanálů se automaticky uloží a jsou uvedené v seznamu v posledním okně programovací procedury (obrázek 8). Klikněte na tlačítko **Start Run** (Spustit cyklus).



Obrázek 8. Spuštění cyklu.

12. Po dokončení zpracování data analyzujte (viz „Interpretace výsledků“, strana 24).

Interpretace výsledků

Platnost cyklu

Platný kvalitativní cyklus

Aby byl kvalitativní cyklus platný, musí být splněny následující podmínky kontroly (tabulka 4).

Tabulka 4. Podmínky kontroly pro platnost kvalitativního cyklu

ID kontroly	Detekční kanál		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Pozitivní kontrola (QS)	POSITIVE (POZITIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)
Negativní kontrola	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)

Neplatný kvalitativní cyklus

Kvalitativní cyklus je neplatný, pokud cyklus nebyl dokončen nebo pokud nebyla splněna některá z podmínek kontroly pro platnost kvalitativního cyklu.

V případě neplatného kvalitativního cyklu zopakujte PCR nebo znovu extrahujte DNA z původních vzorků, pokud žádná DNA nezbyla.

Platný kvantitativní cyklus

Kvantitativní cyklus je platný, pokud byly splněny všechny podmínky kontroly pro platnost kvalitativního cyklu (viz tabulka 4). Pro přesné výsledky kvantifikace je dále nutné vytvořit platnou standardní křivku. Aby byl kvantitativní cyklus platný, musí mít standardní křivka následující hodnoty kontrolních parametrů (tabulka 5).

Tabulka 5. Kontrolní parametry pro platnost standardní křivky

Kontrolní parametr	Platná hodnota
Sklon	-3,743/-2,765
Účinnost PCR	85 % / 130 %
R na druhou (R^2)	> 0,98

Neplatný kvantitativní cyklus

Kvantitativní cyklus je neplatný, pokud cyklus nebyl dokončen nebo pokud nebyla splněna některá z podmínek kontroly pro platnost kvantitativního cyklu.

V případě neplatného kvantitativního cyklu zopakujte PCR nebo znovu extrahujte DNA z původních vzorků, pokud žádná DNA nezbyla.

Kvalitativní analýza

Souhrn interpretace výsledků je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6. Souhrn interpretace výsledků

ID vzorku	Detekční kanál			Interpretace výsledků
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVE (POZITIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)*	POSITIVE (POZITIVNÍ)†	Detekována DNA specifická pro HHV-6A a HHV-6B.
B	POSITIVE (POZITIVNÍ)	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)*	POSITIVE (POZITIVNÍ)†	Detekována DNA specifická pro HHV-6A.
C	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)†	Detekována DNA specifická pro HHV-6B.
D	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	POSITIVE (POZITIVNÍ)	Nebyla detekována DNA specifická pro HHV-6A ani HHV-6B. Vzorek neobsahuje detekovatelná množství DNA specifické pro HHV-6A nebo HHV-6B.
E	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	NEGATIVE (NEGATIVNÍ)	Inhibice PCR nebo selhání reagentie. Zopakujte postup s využitím původního vzorku nebo odeberte a analyzujte nový vzorek.

* Vzhledem k novým údajům o sekvenci nelze vyloučit křížovou reaktivitu systému detekce specifické pro virus HHV-6B s některými kmeny viru HHV-6A. Tyto kmeny způsobí slabý signál v detekčním kanálu pro HHV-6B (Cycling Red) vedle signálu v detekčním kanálu pro HHV-6A (Cycling Green).

† Detekce interní kontroly v kanálu Cycling Yellow není pro pozitivní výsledky v detekčním kanálu Cycling Green nebo v detekčním kanálu Cycling Red nutná. Vysoká zátěž viru HHV-6A nebo HHV-6B ve vzorku může vést ke sníženým signálům interní kontroly nebo k jejich absenci.

Kvantitativní analýza

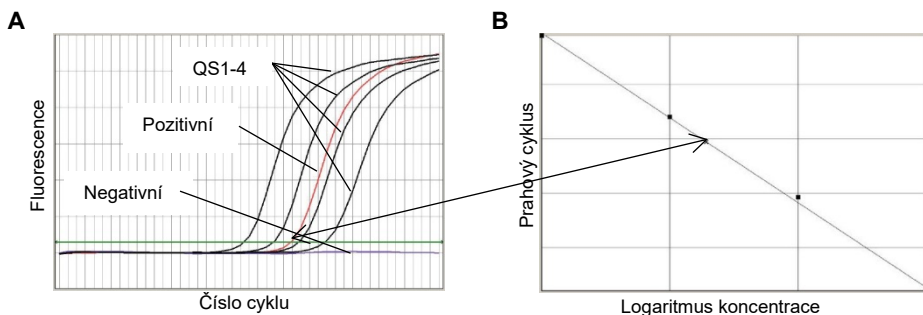
Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit obsahuje 4 kvantifikační standardy (QS). Aby bylo možné vytvořit standardní křivku pro kvantitativní analýzu, musí být definovány jako standardy s vhodnými koncentracemi (tabulka 1, strana 10). Standardní křivku pro kvantitativní analýzu lze vytvořit pomocí standardů o známých koncentracích.

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

- C_T = prahový cyklus
- m = sklon
- N_0 = počáteční koncentrace
- b = průsečík

Koncentrace pozitivních vzorků s neznámou koncentrací lze odvodit ze standardní křivky (obrázek 9).

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



Obrázek 9. Kvantifikační standardy, pozitivní a negativní vzorek zobrazené v amplifikačním grafu (A) a analýze standardní křivky (B).

Poznámka: Koncentrace vzorku je zobrazena v jednotkách IU/ μ l a udává koncentraci DNA viru v eluátu.

Ke stanovení virové zátěže v původním vzorku se používá následující vzorec.

$$\text{Virová zátěž (vzorek) [IU/ml]} = \frac{\text{Objem (eluát) } [\mu\text{l}] \times \text{virová zátěž (eluát) [IU}/\mu\text{l}]}{\text{Vstup vzorku [ml]}}$$

Omezení

- Použití tohoto produktu je omezeno na pracovníky, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v technikách PCR v reálném čase a metodice diagnostiky in vitro.
- Základem správné účinnosti této analýzy je správná laboratorní praxe.
- Věnujte mimořádnou péči zachování čistoty součástí soupravy a nastavení reakce. Pečlivě sledujte, zda reagentie neobsahují nečistoty či nejsou kontaminované. Při podezření na kontaminaci reagentie zlikvidujte.
- Pro optimální účinnost této analýzy je nutný správný odběr, přeprava, skladování a postupy zpracování vzorků.
- Tuto analýzu nepoužívejte přímo na vzorku. Před použitím této analýzy proveďte příslušné postupy extrakce nukleových kyselin.
- Přítomnost inhibitorů PCR může vést k falešně negativním či neplatným výsledkům.
- Potenciální mutace v cílových oblastech genomu viru HHV-6A a/nebo HHV-6B obsažené v primerech a/nebo sondách použitých v soupravě mohou vést k tomu, že patogeny nebudou zjištěny.
- Stejně jako u každého diagnostického testu interpretujte výsledky získané pomocí soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit s přihlédnutím ke všem klinickým a laboratorním nálezům.
- Vzhledem k novým údajům o sekvenci nelze vyloučit křížovou reaktivitu systému detekce specifické pro virus HHV-6B s některými kmeny viru HHV-6A. Tyto kmeny způsobí slabý signál v detekčním kanálu pro HHV-6B (Cycling Red) vedle signálu v detekčním kanálu pro HHV-6A (Cycling Green).

Kontrola kvality

Každá šarže soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit je testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Charakteristiky účinnosti

Specifické charakteristiky účinnosti soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit byly stanoveny pomocí DNA specifické pro virus HHV-6A (kmen GS) a DNA specifické pro virus HHV-6B (kmen Z-29) o známých koncentracích.

Analytická senzitivita

Analytická senzitivita soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit je definována jako koncentrace (počet kopií v 1 μ l eluátu) DNA specifické pro virus HHV-6A nebo HHV-6B, kterou je možné stanovit s pravděpodobností ≥ 95 %. Analytická senzitivita byla stanovena analýzou série ředění DNA viru HHV-6A a DNA viru HHV-6B o známé koncentraci (tabulky 7 a 8).

Tabulka 7. Výsledky PCR použité pro výpočet analytické senzitivity amplifikace specifické pro HHV-6A

Vstupní koncentrace (kopie/ μ l)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Úspěšnost (%)
3,33	18	18	100
1,05	18	18	100
0,33	18	11	61
0,11	18	10	56
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	1	6
0,001	18	0	0

Tabulka 8. Výsledky PCR použité pro výpočet analytické senzitivity amplifikace specifické pro HHV-6B

Vstupní koncentrace (kopie/μl)	Počet replikátů	Počet pozitivních	Úspěšnost (%)
10,50	18	18	100
3,33	36	36	100
1,05	18	16	89
0,33	18	8	44
0,11	18	1	6
0,03	18	3	17
0,01	18	1	6
0,003	18	0	0

Analytická senzitivita soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit, stanovená probitovou analýzou, je u detekce DNA specifické pro virus HHV-6A 1,46 kopií/μl eluátu [95% interval spolehlivosti (confidence interval, CI): 0,72–4,57 kopií/μl] a analytická senzitivita je u detekce DNA specifické pro virus HHV-6B 2,58 kopií/μl eluátu (95% CI: 1,44–6,30 kopií/μl).

Analytická specifická

Analytická specifická soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit je zajištěna pečlivým výběrem oligonukleotidů (primerů a sond). Oligonukleotidy jsou kontrolovány sekvenční analýzou, porovnáním s veřejně známými sekvencemi k zajištění, že jsou detekovány všechny relevantní genotypy viru HHV-6. Dále byla hodnocena specifická soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit testováním panelu genomové DNA/RNA extrahované z jiných herpesvirů nebo jiných patogenů, které jsou pro imunokompromitované pacienty relevantní (tabulka 9).

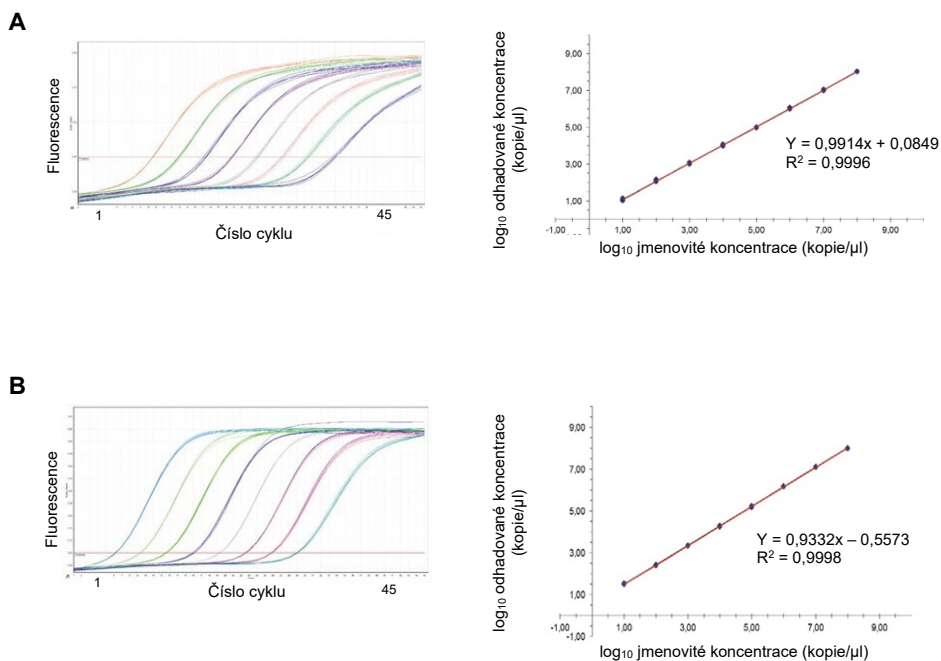
Tabulka 9. Organismy testované na zkříženou reaktivitu

Organismus	Detekční kanál		
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Red (HHV-6B)	Cycling Yellow (IC)
Herpes simplex virus 1	Negativní	Negativní	Platné
Herpes simplex virus 2	Negativní	Negativní	Platné
Virus varicella zoster	Negativní	Negativní	Platné
Virus Epstein-Barr	Negativní	Negativní	Platné
Cytomegalovirus	Negativní	Negativní	Platné
Lidský herpesvirus 7	Negativní	Negativní	Platné
Lidský herpesvirus 8	Negativní	Negativní	Platné
BK virus	Negativní	Negativní	Platné
JC virus	Negativní	Negativní	Platné
Parvovirus B19	Negativní	Negativní	Platné
Virus hepatitidy A	Negativní	Negativní	Platné
Virus hepatitidy B	Negativní	Negativní	Platné
Virus hepatitidy C	Negativní	Negativní	Platné
Virus lidské imunodeficiency 1	Negativní	Negativní	Platné

Souprava *artus* HHV-6 RG PCR Kit zkříženě nereagovala se žádným z uvedených organismů.

Lineární oblast kvantifikace

Lineární oblast kvantifikace soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit byla hodnocena analýzou série logaritmických ředění DNA specifické pro virus HHV-6A a HHV-6B pomocí koncentrací v rozsahu od 1×10^8 do 10^0 kopií/ μ l (obrázek 10). Bylo analyzováno alespoň 6 replikátů na ředění.



Obrázek 10. Amplifikační křivky a lineární regresní analýzy řady ředění DNA specifické pro virus HHV-6A (A) a pro virus HHV-6B (B).

Lineární oblast kvantifikace soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit zahrnuje interval alespoň 7 řádů velikosti DNA specifické pro virus HHV-6A a HHV-6B.

Přesnost

Přesnost soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit byla stanovena variabilitou v rámci jedné zkoušky, variabilitou mezi různými zkouškami a variabilitou mezi různými výrobními šaržemi.

Údaje o variabilitě jsou vyjádřeny pomocí směrodatné odchylky, rozptylu a variačního koeficientu. Údaje vycházejí z kvantifikační analýzy definovaných koncentrací genomové DNA viru HHV-6 DNA a z hodnot prahového cyklu (C_T) u interní kontroly (tabulky 10–12). Z hlediska variability v rámci jedné zkoušky, mezi různými zkouškami a mezi různými šaržemi bylo analyzováno alespoň 6 replikátů z jednoho vzorku. Celkový rozptyl byl vypočten spojením 3 analýz.

Tabulka 10. Přesnost amplifikace HHV-6A

Systém specifický pro HHV-6A	Průměrná konc. (kopie/μl)	Směrodatná odchylka	Rozptyl	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci jedné zkoušky	22,07	2,75	7,56	12,50
Variabilita mezi různými zkouškami	23,32	2,88	8,28	12,34
Variabilita mezi různými šaržemi	23,63	3,02	9,10	12,76
Celkový rozptyl	23,94	2,85	8,12	11,90

Tabulka 11. Přesnost amplifikace HHV-6B

Systém specifický pro HHV-6B	Průměrná konc. (kopie/μl)	Směrodatná odchylka	Rozptyl	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci jedné zkoušky	21,58	4,83	23,32	22,37
Variabilita mezi různými zkouškami	25,55	3,62	13,10	14,17
Variabilita mezi různými šaržemi	24,54	4,63	21,44	18,87
Celkový rozptyl	24,23	4,36	19,04	18,01

Tabulka 12. Přesnost amplifikace interní kontroly

Interní kontrola	Průměrný prahový cyklus (C_T)	Směrodatná odchylka	Rozptyl	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci jedné zkoušky	21,97	0,11	0,01	0,51
Variabilita mezi různými zkouškami	21,98	0,09	0,01	0,40
Variabilita mezi různými šaržemi	21,97	0,10	0,01	0,44
Celkový rozptyl	21,97	0,09	0,01	0,39

Diagnostické hodnocení

Diagnostická senzitivita a specifita soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit je pravidelně hodnocena analyzováním referenčních a diagnostických vzorků, jež byly dříve analyzovány referenčními metodami (tabulka 13).

Tabulka 13. Diagnostické hodnocení soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit

		<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
		HHV-6A	HHV-6B	NEGATIVNÍ
Referenční metoda	HHV-6A	8	0	0
	HHV-6B	0	19	0
	NEGATIVNÍ	0	0	3

Opakovatelnost







Specifita, senzitivita a přesnost kvantifikace pomocí soupravy *artus* HHV-6 PCR Kit byly hodnoceny analyzováním uznávaných panelů pro testování způsobilosti pro HHV-6. K zajištění opakovatelnosti soupravy *artus* HHV-6 RG PCR Kit je specifita a senzitivita hodnocena pravidelným analyzováním uznávaných panelů pro testování způsobilosti pro HHV-6 a též charakterizovaných diagnostických vzorků (tabulka 14).

Tabulka 14. Výsledky analýzy panelu pro testování způsobilosti pro HHV-6 (QCMD)

Panel pro testování způsobilosti			<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
ID vzorku	Obsah vzorku	Předpokládaná konc. (kopie/ml)	Zjištěná konc. HHV-6A (kopie/ml)	Zjištěná konc. HHV-6B (kopie/ml)	Interní kontrola
HHV6DNA14-01	HHV-6B	1002	–	474	Platné
HHV6DNA14-02	HHV-6A	596	94	–	Platné
HHV6DNA14-03	HHV-6A	3020	522	–	Platné
HHV6DNA14-04	HHV-6A	171	66	–	Platné
HHV6DNA14-05	HHV-6B	10 000	–	6330	Platné
HHV6DNA14-06	HHV-6B	294	–	93	Platné
HHV6DNA14-07	HCMV	–	–	–	Platné
HHV6DNA14-08	HHV-6 negativní	–	–	–	Platné
HHV6DNA14-09	HHV-6B	843	–	894	Platné
HHV6DNA14-10	HHV-6B	8954	–	9300	Platné

Symboly

V tomto návodu k použití se používají symboly uvedené v následující tabulce.

Symbol	Definice symbolu
 96	Obsahuje reagentie dostačující pro 96 testů
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Teplotní rozmezí
	Výrobce

Symbol

Definice symbolu



Použijte do



Číslo materiálu



Globální číslo obchodní položky (GTIN)



Další informace viz návod k použití

Řešení problémů

Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozborů (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte **www.qiagen.com**).

Literatura

1. Govind, S., Hockley, J., Morris, C., and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260259/WHO-BS-2017.2321-eng.pdf>.

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master A, Master B, 4 kvantifikační standardy, interní kontrola, H ₂ O (voda v kvalitě vhodné pro PCR)	4521265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pro 50 stanovení DNA: 50 centrifugačních kolonek QIAamp Mini, proteináza K, reagentie, pufrý, sběrné zkumavky (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Pro 250 stanovení DNA: 250 centrifugačních kolonek QIAamp Mini, proteináza K, reagentie, pufrý, sběrné zkumavky (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis, instalaci a školení	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na součásti a servis bez instalace a školení	9002022

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje balíček Priority Package se softwarem, instalací, školením, tříletou zárukou na součásti a servis a 3 preventivní servisní návštěvy	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje balíček Priority Package se softwarem, instalací, školením, dvouletou zárukou na součásti a servis a 2 preventivní servisní návštěvy	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční zárukou na součásti a servis, instalaci a školení	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Cyklér pro PCR v reálném čase s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový), notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční zárukou na součásti a servis bez instalace a školení	9001570

Produkt	Obsah	Kat. č.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) obsahující notebook, software, příslušenství: zahrnuje balíček Priority Package se softwarem, instalací, školením, tříletou zárukou na součásti a servis a 3 preventivní servisní návštěvy	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) obsahující notebook, software, příslušenství: zahrnuje balíček Priority Package se softwarem, instalací, školením, dvouletou zárukou na součásti a servis a 2 preventivní servisní návštěvy	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční zárukou na součásti a servis, instalaci a školení	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Přístroj pro PCR v reálném čase s 6 kanály (modrý, zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční zárukou na součásti a servis bez instalace a školení	9001590

Produkt	Obsah	Kat. č.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednokanálové pipety s využitím zkumavek 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s víčky, pro 1000 reakcí, objem 10–50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky pro 10 000 reakcí, objem 10–50 µl	981106

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Historie revizí dokumentu

Datum	Změny
R4, září 2018	Změna jednotky pro podávání zpráv z kopií na mezinárodní jednotky (International Units, IU).
R5, listopad 2019	Z historie revizí příručky byla odstraněna poznámka o konverzním faktoru pro kvantifikační standardy sady artus HHV-6 RG PCR Kit (96). Revidovaná část informace o patogenech obsahuje informace o virech HHV-6A a HHV-6B.

Omezená licenční smlouva pro soupravu *artus* HHV-6 RG PCR Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato souprava a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovně nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní diagnostiku in vitro. Tímto není udělen žádný všeobecný patent ani jiná licence jakéhokoliv druhu, s výjimkou tohoto specifického práva k použití po koupi.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene®, Sample to Insight® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific nebo její pobočky); Cy5® (GE Healthcare). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.

1117341 11-19 HB-1996-005 © 2019 altona Diagnostics GmbH, všechna práva vyhrazena.

