

Novembre 2019

Manuale dell'artus[®] HHV-6 RG PCR Kit



Versione 1
Per l'uso con strumenti Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF



R5 MAT

4521265

altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Amburgo, GERMANIA

1117341-IT

Distribuito da QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

Sample to Insight



Sommario

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni.....	4
Informazioni sull'agente patogeno.....	4
Principio della procedura	5
Contenuto del kit	6
Materiali necessari ma non in dotazione	7
Avvertenze e precauzioni	8
Avvertenze	8
Precauzioni	8
Conservazione e manipolazione dei reagenti	9
Componenti del kit	9
Esecuzione	11
Estrazione del DNA.....	11
Protocollo: Rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B.....	13
Interpretazione dei risultati.....	24
Validità del processo	24
Analisi qualitativa.....	25
Analisi quantitativa.....	27
Limitazioni	29
Controllo qualità.....	30
Caratteristiche delle prestazioni.....	30

Sensibilità analitica	30
Specificità analitica	31
Range lineare	32
Precisione	33
Valutazione diagnostica	35
Ripetibilità	36
Simboli	37
Guida alla risoluzione dei problemi	39
Bibliografia	39
Informazioni per gli ordini	40

Uso previsto

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit (96) è un test diagnostico *in vitro* basato sulla tecnologia della Real-time PCR per la rilevazione, la differenziazione e la quantificazione del DNA specifico del virus dell'herpes umano 6A (HHV-6A) e del virus dell'herpes umano 6B (HHV-6B).

Sommario e spiegazioni

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B tramite la Real-time PCR su strumenti Rotor-Gene Q. Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per verificare una possibile inibizione della PCR e confermare l'integrità dei reagenti del kit.

Informazioni sull'agente patogeno

HHV-6 è un nome collettivo utilizzato per identificare due virus strettamente correlati, l'HHV-6A e l'HHV-6B. Si tratta di due dei nove herpesvirus che sono risaputi infettare l'uomo. Appartengono al genere *Roseolovirus* all'interno della sottofamiglia *Betaherpesvirinae*. L'infezione primaria da HHV-6 si verifica normalmente durante l'infanzia entro i 2 anni d'età. I sintomi includono febbre, diarrea e exanthema subitum, una forma di eruzione cutanea più comunemente nota come sesta malattia. In alcuni casi, l'infezione iniziale può causare anche convulsioni febbrili, encefalite o convulsioni intrattabili. Dopo l'infezione primaria, il virus rimane latente nell'organismo.

L'HHV-6 latente può essere riattivato in età adulta. Le manifestazioni cliniche correlate alla riattivazione del virus possono interessare numerose regioni nell'organismo, quali il cervello, i polmoni, il cuore, i reni e l'apparato gastrointestinale. La riattivazione dell'HHV-6 nel tessuto cerebrale è associata a disturbi neurologici e, in alcuni casi, può causare compromissione a livello cognitivo, disabilità permanente e morte.

Mentre l'HHV-6B provoca manifestazioni cliniche nei pazienti immunodepressi e nei bambini negli Stati Uniti, in Giappone e in Europa, l'HHV-6A è prevalente nei bambini in Africa. L'HHV-6A viene riscontrato frequentemente in pazienti affetti da malattie neurologiche croniche, soprattutto malattie neuroinfiammatorie, quali sclerosi multipla (SM) e rombo-encefalite.

Principio della procedura

L'HHV-6 RG Master A e l'HHV-6 RG Master B contengono reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di regioni bersaglio nel genoma dell'HHV-6A e dell'HHV-6B e per la rilevazione diretta dell'amplicone specifico nei canali di fluorescenza Cycling Green e Cycling Red degli strumenti Rotor-Gene Q.

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit contiene inoltre un sistema di amplificazione eterologa per identificare potenziali errori durante l'analisi. Tale inibizione viene rilevata come controllo interno (Internal Control, IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow degli strumenti Rotor-Gene Q.

Le sonde specifiche per il DNA dell'HHV-6A sono legate al fluorocromo FAM™, mentre le sonde specifiche per il DNA dell'HHV-6B sono legate ad un fluorocromo che presenta le stesse caratteristiche di Cy®5. La sonda specifica per il controllo interno è legata al fluorocromo JOE™. L'impiego di sonde legate a fluorocromi spettralmente distinguibili consente la rilevazione e la quantificazione simultanea del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B, nonché la rilevazione del controllo interno nei rispettivi canali dello strumento Rotor-Gene Q.

Contenuto del kit

artus HHV-6 RG PCR Kit		(96)
Numero di catalogo		4521265
Numero di reazioni		96
Blu	HHV-6 RG Master A	8 x 60 µl
Viola	HHV-6 RG Master B	8 x 180 µl
Verde	HHV-6 RG IC	1 x 1000 µl
Rosso	HHV-6 RG QS*	4 x 250 µl
Bianco	H ₂ O	1 x 500 µl
	Manuale	1

*L'artus HHV-6 RG PCR Kit contiene 4 standard di quantificazione (Quantification Standards, QS1–QS4).

Materiali necessari ma non in dotazione

Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Reagenti

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN n. cat. 51304 o 51306; vedere "Estrazione del DNA", pag. 11)

Materiali di consumo

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, da usare con rotore a 72 pozzetti (QIAGEN, n. cat. 981103 o 981106)
- Provette per microcentrifuga a basso legame di DNA e prive di nucleasi per preparare miscele master
- Puntali per pipette privi di nucleasi con filtro

Strumentazione

- Strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex o Rotor-Gene Q 6plex
- Software Rotor-Gene Q versione 2.3.1 o superiore
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, blocco in alluminio per l'allestimento manuale delle reazioni (QIAGEN, n. cat. 9018901)
- Pipette regolabili dedicate per la preparazione dei campioni
- Pipette regolabili dedicate per la preparazione della miscela master per PCR
- Pipette regolabili dedicate per l'erogazione del DNA stampo
- Miscelatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il test.

Avvertenze

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

Precauzioni

- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche della Real-time PCR e alle procedure della diagnostica in vitro.
- I campioni devono sempre essere trattati come se fossero infettivi e/o biologicamente pericolosi in accordo con procedure di laboratorio sicure.
- Mentre si maneggiano i campioni, indossare guanti di protezione monouso non talcati, camice da laboratorio e una protezione per gli occhi.
- Evitare qualsiasi contaminazione da microbi e nucleasi (DNasi/RNasi) del campione e dei componenti del kit.
- Usare sempre puntali per pipette monouso non contaminati da DNasi/RNasi con filtro per aerosol.
- Mentre si maneggiamo i componenti del kit, indossare sempre guanti di protezione monouso non talcati.
- Usare aree di lavoro separate e isolate per la preparazione dei campioni, l'allestimento delle reazioni e le operazioni di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio deve sempre procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e sostituirli prima di entrare in un'area diversa.
- Destinare forniture e apparecchiature ad aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.

- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.
- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione per evitare la contaminazione con ampliconi.
- È possibile utilizzare ulteriori controlli in base alle linee guida o ai requisiti normativi locali, statali e/o federali o di enti di certificazione.
- Non utilizzare componenti del kit la cui data di scadenza sia stata superata.
- Smaltire i campioni e i materiali di scarto secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Componenti del kit

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento del ricevimento o se le provette sono state compromesse durante la spedizione, contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN. Al ricevimento, conservare tutti i componenti del kit a una temperatura compresa fra -30 °C e -15 °C .

Evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti dei reagenti master (più di due volte), perché ciò potrebbe ridurre le prestazioni del test. Congelare i reagenti in aliquote, se si prevede un uso intermittente. Non conservare i reagenti a 4 °C per più di 2 ore. Tenere l'HHV-6 RG Master A e l'HHV-6 RG Master B al riparo dalla luce.

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit include:

- Due reagenti master (HHV-6 RG Master A e HHV-6 RG Master B)
- Stampo del controllo interno (HHV-6 RG IC)
- Quattro standard di quantificazione (HHV-6 RG QS1–QS4)
- Acqua grado PCR (H_2O)

Gli standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA specifico dell'HHV-6. Questi standard di quantificazione sono stati calibrati rispetto al 1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus dell'herpes umano 6B (HHV-6B) (codice NIBSC: 15/266) per test basati sulla tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (nucleic acid amplification technique, NAT) (1).

Per calibrare il materiale specifico positivo HHV-6A dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit (96), è stato utilizzato un test di rilevamento degli acidi nucleici senza fare distinzioni fra HHV-6A e HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). La calibrazione è stata eseguita tramite test in linea parallela con il materiale specifico positivo HHV-6A e il 1° Standard Internazionale dell'OMS per il DNA del virus dell'herpes umano 6B (HHV-6B). La calibrazione è stata confermata tramite l'*artus* HHV-6 RG PCR Kit (96).

Questi standard di quantificazione possono essere utilizzati singolarmente come controlli positivi oppure insieme per generare una **curva standard**, che può essere utilizzata per stabilire la concentrazione nel campione di DNA specifico dell'HHV-6A e/o di DNA specifico dell'HHV-6B. Le concentrazioni degli standard di quantificazione sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Concentrazione degli standard di quantificazione

Standard di quantificazione	Concentrazione (UI/µl)	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	10.000	10.000
QS2	1000	1000
QS3	100	100
QS4	10	10

Esecuzione

Estrazione del DNA

Le sequenze bersaglio specifiche dell'HHV-6A e dell'HHV-6B vengono amplificate dal DNA. Le prestazioni del test dipendono dalla qualità del DNA stampo, pertanto si raccomanda di utilizzare un kit per la preparazione dei campioni che consenta di ottenere DNA idoneo per la PCR a valle.

Il QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, n. cat. 51304 o 51306) è raccomandato per l'estrazione del DNA da usare con l'*artus* HHV-6 RG PCR Kit. Effettuare l'estrazione del DNA seguendo le istruzioni contenute nel *manuale del QIAamp DNA Mini*.

Poiché i tamponi di lavaggio del QIAamp DNA Mini Kit contengono etanolo, eseguire un'ulteriore fase di centrifugazione prima dell'eluizione. Posizionare la colonna QIAamp Mini in una provetta per prelievo da 2 ml nuova ed eliminare la vecchia provetta contenente il filtrato. Centrifugare per 10 minuti a $17.000 \times g$ (~13.000 giri/min) in una centrifuga da banco.

Importante: L'utilizzo di carrier RNA è determinante per l'efficienza dell'estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

Importante: L'etanolo è un forte inibitore della Real-time PCR. Se il kit per la preparazione dei campioni fa uso di tamponi di lavaggio contenenti etanolo, occorre accertarsi di eliminare ogni traccia di etanolo prima di procedere all'eluizione dell'acido nucleico.

Controllo interno

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit contiene un controllo interno eterologo, che può essere usato o come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione dei campioni (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo dell'inibizione della PCR (fase 2a, pag. 13).

Se il controllo interno è utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione dei campioni, aggiungere il controllo interno direttamente alla miscela di HHV-6 RG Master A e HHV-6 RG Master B, come descritto nella fase 2b del protocollo (pag. 14).

Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, il controllo interno non deve essere aggiunto direttamente al campione. Il controllo interno deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume di controllo interno da aggiungere alla miscela campione/tampone di lisi dipende esclusivamente dal volume di eluizione ed è pari precisamente al 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il QIAamp DNA Mini Kit, il DNA viene eluito in 60 µl di Buffer AE. Aggiungere quindi 6 µl di controllo interno alla miscela campione/tampone di lisi di ogni campione.

Importante: non aggiungere il controllo interno e il carrier RNA direttamente al campione.

Protocollo: Rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di iniziare la procedura, leggere "Precauzioni" a pagina 8.
- Dedicare il tempo necessario ad acquisire familiarità con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo (acqua grado PCR).

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Accertarsi che il blocco di raffreddamento (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia stato preraffreddato a 2–8 °C.
- Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o agitandoli rapidamente su vortex) e centrifugati brevemente.

Esecuzione

1. Inserire il numero desiderato di provette per PCR negli adattatori del blocco di raffreddamento.
2. Se si usa il controllo interno per controllare la procedura di estrazione del DNA e per verificare la possibile inibizione della PCR, seguire la fase 2a. Se si usa il controllo interno esclusivamente per controllare l'inibizione della PCR, seguire la fase 2b.

Importante: se il controllo interno era stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, allora il controllo negativo (che non è un campione negativo) deve includere almeno il controllo interno.

- 2a. Il controllo interno è già stato aggiunto all'estrazione (vedere "Controllo interno", pag. 12). In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 2. La miscela di reazione contiene tipicamente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Tabella 2. Preparazione della miscela master (controllo interno usato per controllare l'estrazione del DNA e verificare l'inibizione della PCR)

Componente	1 reazione	12 reazioni
HHV-6 RG Master A	5 µl	60 µl
HHV-6 RG Master B	15 µl	180 µl
Volume totale	20 µl	240 µl

- 2b. Il controllo interno deve essere aggiunto direttamente alla miscela di HHV-6 RG Master A e HHV-6 Master B. In questo caso preparare una miscela master secondo la Tabella 3. La miscela di reazione contiene tipicamente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Tabella 3. Preparazione della miscela master (controllo interno usato esclusivamente per verificare l'inibizione della PCR)

Componente	1 reazione	12 reazioni
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
Volume totale	21 µl	252 µl

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del controllo interno durante la preparazione della PCR è irrilevante. Non viene compromessa la sensibilità del sistema di rilevazione.

3. Pipettare 20 µl della miscela master in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 10 µl del campione eluito di DNA e miscelare bene pipettando ripetutamente su e giù. Analogamente, aggiungere 10 µl di un controllo positivo o dello standard di quantificazione oppure 10 µl di acqua (acqua grado PCR) come controllo negativo. Accertarsi che in ogni processo siano inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per la quantificazione utilizzare tutti i 4 standard di quantificazione (QS1–QS4).
4. Chiudere le provette per PCR. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia applicato sopra il rotore.

5. Per l'individuazione del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B, creare un profilo termico con le seguenti operazioni.

Impostazione dei parametri generali del test	Figure 1, 2, 3, 4
Attivazione iniziale dell'enzima hot-start	Figura 5
Amplificazione del DNA	Figura 6
Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza	Figura 7
Avvio del processo	Figura 8

Tutte le specifiche sono relative al software del Rotor-Gene Q versione 2.3.1 e superiore. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene consultare il relativo manuale utente. Nelle figure queste impostazioni sono evidenziate da un riquadro nero in grassetto.

6. In primo luogo, aprire la finestra di dialogo **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo processo) con la versione **Advanced** (Avanzata) e selezionare **Two Step** (Due fasi) (Figura 1). Cliccare su **New** (Nuovo) per continuare.

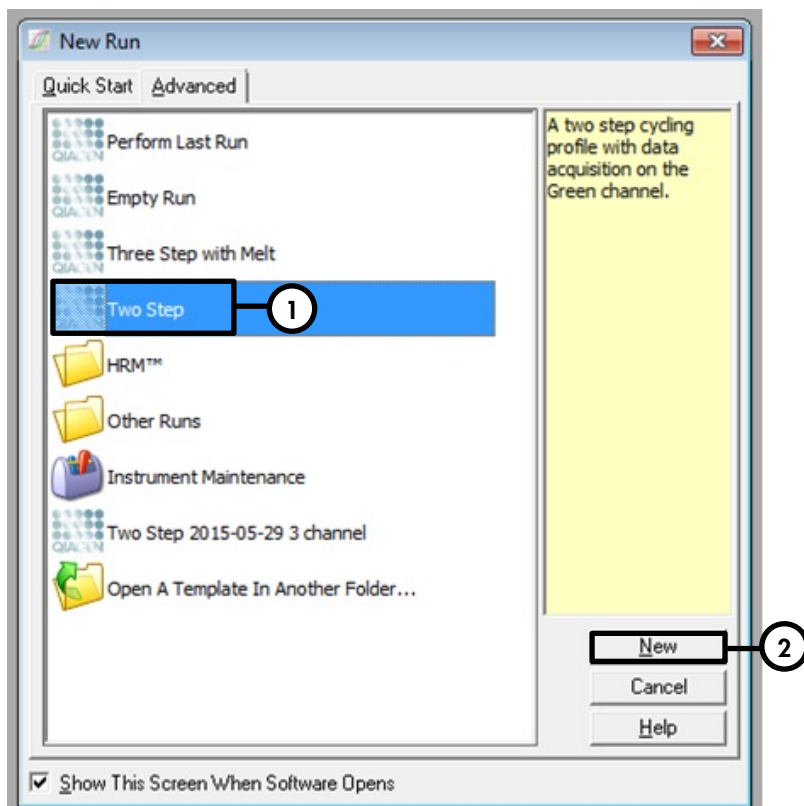


Figura 1. Finestra di dialogo New Run (Nuovo processo).

7. Nella successiva finestra di dialogo **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo processo) (Figura 2) selezionare la casella **Locking Ring Attached** (Anello di bloccaggio applicato) e cliccare su **Next** (Avanti).

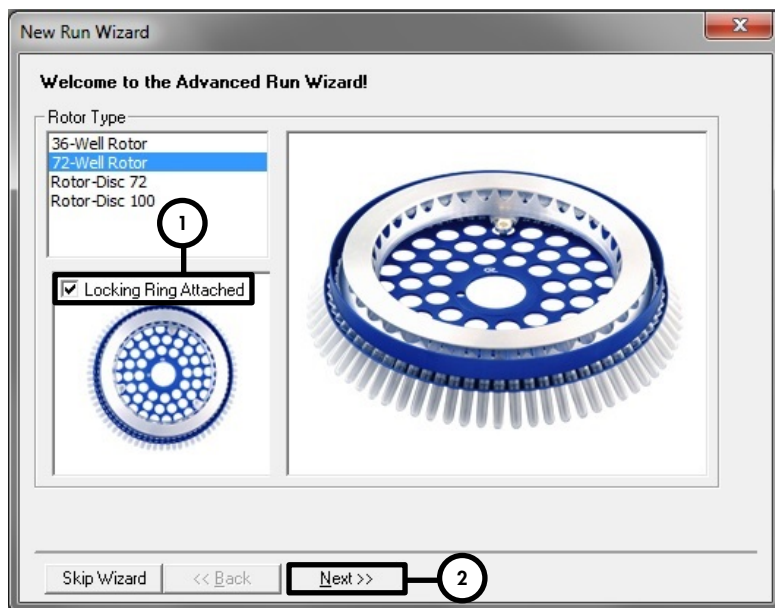


Figura 2. Finestra di dialogo New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo).

8. Selezionare **30** per il volume della reazione PCR e fare clic su **Next** (Avanti) (Figura 3).

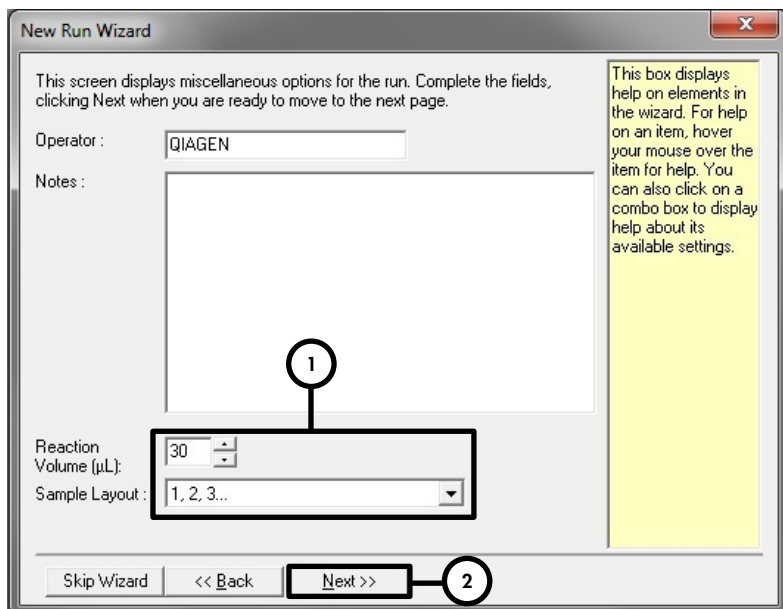


Figura 3. Impostazione dei parametri generali del test.

9. Fare clic su **Edit Profile** (Modifica profilo) nella finestra di dialogo successiva **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo processo) (Figura 4) e programmare il profilo termico, come illustrato nelle Figure 5–6.

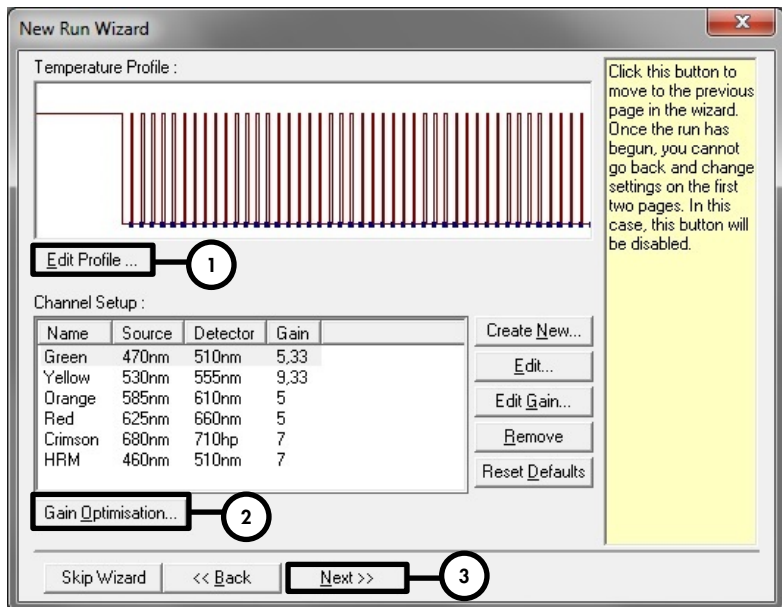


Figura 4. Modifica del profilo.

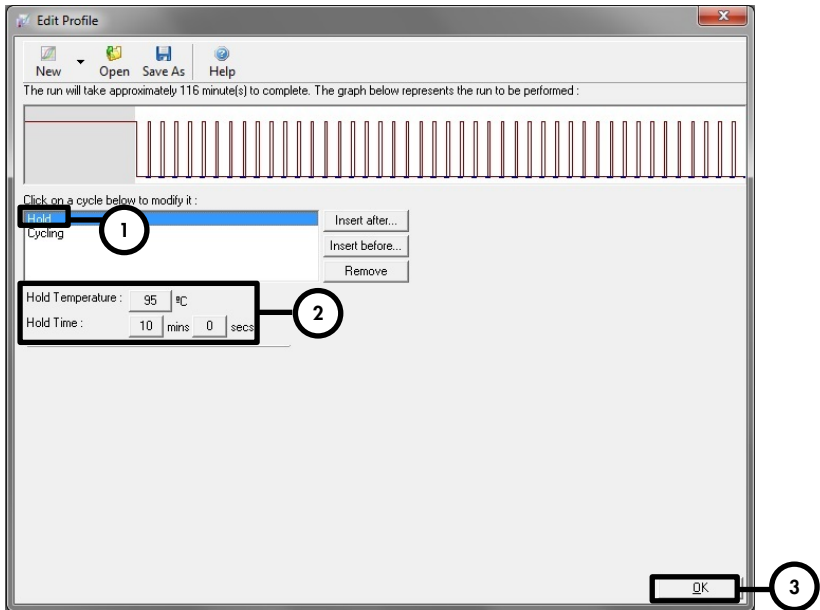


Figura 5. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

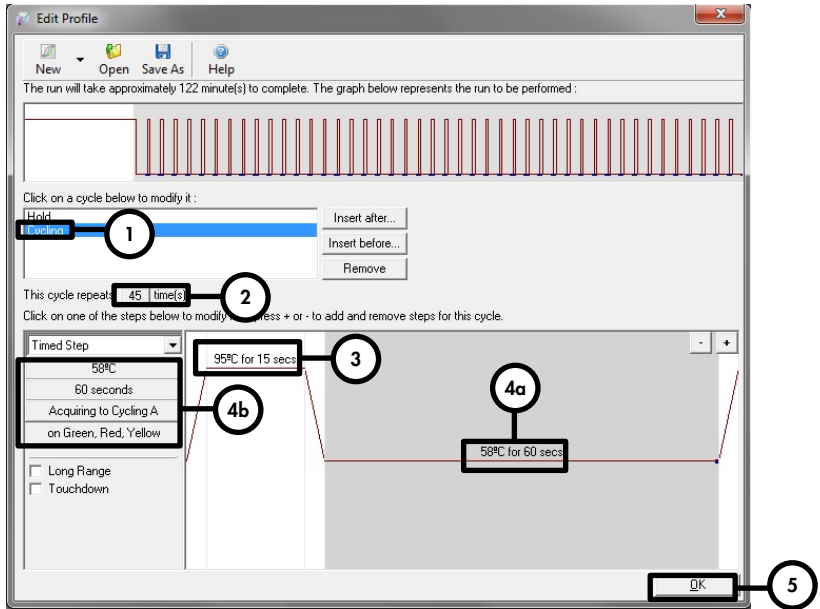


Figura 6. Amplificazione del DNA.

10. Il range di rilevazione dei canali di fluorescenza deve essere determinato in base all'intensità della fluorescenza nelle provette per PCR. Fare clic su **Gain Optimisation** (Ottimizzazione guadagno) nella finestra di dialogo **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo processo) (Figura 4, fase 2) per aprire la finestra di dialogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Impostazione automatica ottimizzazione guadagno) (Figura 7). Selezionare la casella **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Esegui ottimizzazione prima della 1^a acquisizione) (Figura 7). Accertarsi che siano stati selezionati tutti e tre i canali (Green, Red e Yellow) per l'operazione **Auto-Gain Optimisation** (Ottimizzazione guadagno automatico) (Figura 7). (Trovare i canali nel menu a tendina sotto **Channel Settings** (Impostazioni canali) e fare clic su **Add** (Aggiungi).) Fare clic su **Close** (Chiudi) nella finestra di dialogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Impostazione automatica ottimizzazione guadagno) una volta completata la calibrazione del guadagno.

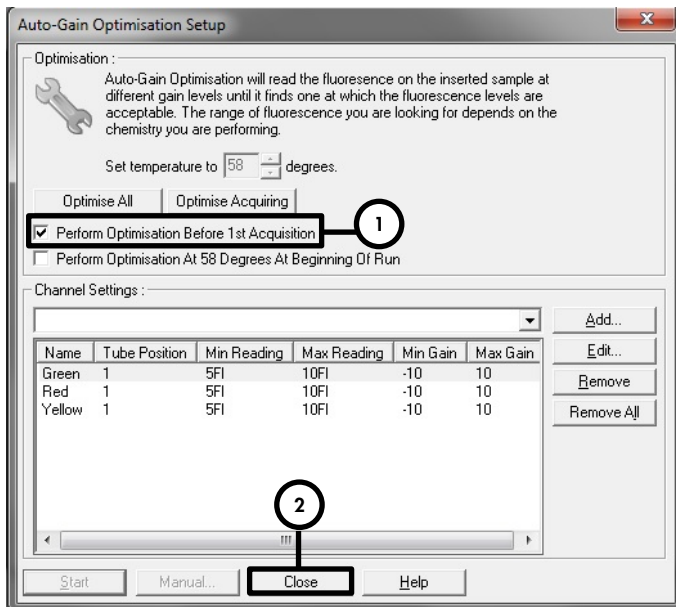


Figura 7. Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza.

11. I valori del guadagno determinati con la calibrazione dei canali vengono salvati automaticamente e sono elencati nell'ultima finestra del menu della procedura di programmazione (Figura 8). Fare clic su **Start Run** (Avvia processo).

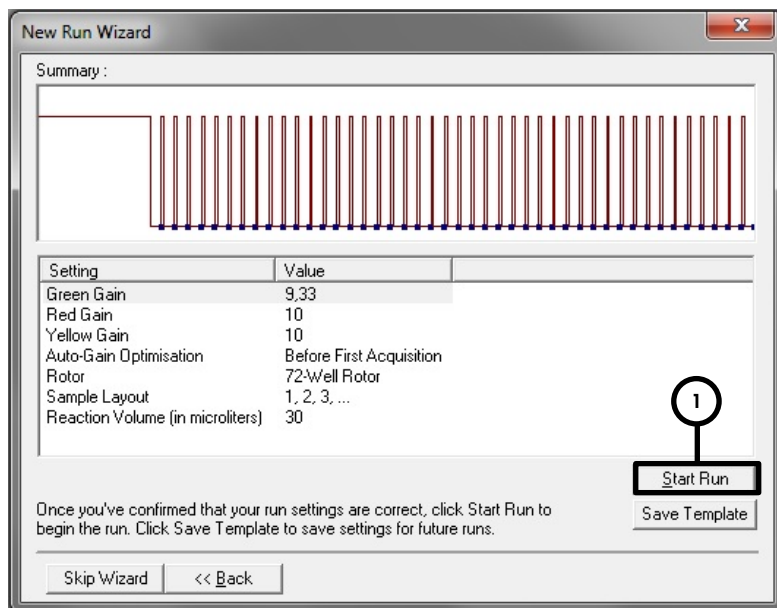


Figura 8. Avvio del processo.

12. Terminato il processo, analizzare i dati (vedere "Interpretazione dei risultati", pag. 24).

Interpretazione dei risultati

Validità del processo

Processo qualitativo valido

Devono essere soddisfatte le seguenti condizioni di controllo affinché un processo qualitativo sia valido (Tabella 4).

Tabella 4. Condizioni di controllo per un processo qualitativo valido

ID controllo	Canale di rilevazione		
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow
Controllo positivo (QS)	POSITIVE (POSITIVO)	POSITIVE (POSITIVO)	POSITIVE (POSITIVO)
Controllo negativo	NEGATIVE (NEGATIVO)	NEGATIVE (NEGATIVO)	POSITIVE (POSITIVO)

Processo qualitativo non valido

Un processo qualitativo non è valido se il processo non è stato completato oppure se le condizioni di controllo per un processo qualitativo valido non sono state soddisfatte.

In caso di processo qualitativo non valido, ripetere la PCR o estrarre di nuovo il DNA dai campioni originali se non è rimasto DNA.

Processo quantitativo valido

Un processo quantitativo è valido se tutte le condizioni di controllo per un processo qualitativo valido sono state soddisfatte (vedere la Tabella 4 sopra riportata). Inoltre, per risultati di quantificazione precisi deve essere generata una curva standard valida. Affinché il processo quantitativo sia valido, la curva standard deve avere i seguenti valori dei parametri di controllo (Tabella 5).

Tabella 5. Parametri di controllo per una curva standard valida

Parametro di controllo	Valore valido
Pendenza	-3,743/-2,765
Efficienza della PCR	85%/130%
R al quadrato (R^2)	>0,98

Processo quantitativo non valido

Un processo quantitativo non è valido se il processo non è stato completato oppure se le condizioni di controllo per un processo quantitativo valido non sono state soddisfatte.

In caso di processo quantitativo non valido, ripetere la PCR o estrarre di nuovo il DNA dai campioni originali se non è rimasto DNA.

Analisi qualitativa

Un riepilogo dell'interpretazione dei risultati è riportato nella Tabella 6.

Tabella 6. Riepilogo dell'interpretazione dei risultati

ID campione	Canale di rilevazione			Interpretazione dei risultati
	Cycling Green	Cycling Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVE (POSITIVO)	POSITIVE (POSITIVO)*	POSITIVE (POSITIVO)†	Rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B.
B	POSITIVE (POSITIVO)	NEGATIVE (NEGATIVO)*	POSITIVE (POSITIVO)†	Rilevato DNA specifico dell'HHV-6A.
C	NEGATIVE (NEGATIVO)	POSITIVE (POSITIVO)	POSITIVE (POSITIVO)†	Rilevato DNA specifico dell'HHV-6B.
D	NEGATIVE (NEGATIVO)	NEGATIVE (NEGATIVO)	POSITIVE (POSITIVO)	Non rilevato né DNA specifico dell'HHV-6A né DNA specifico dell'HHV-6B. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico dell'HHV-6A o di DNA specifico dell'HHV-6B.
E	NEGATIVE (NEGATIVO)	NEGATIVE (NEGATIVO)	NEGATIVE (NEGATIVO)	Inibizione PCR o errore del reagente. Ripetere la procedura utilizzando il campione originale o raccogliere e analizzare un nuovo campione.

*A causa dei nuovi dati di sequenziamento, non può essere esclusa la reattività crociata del sistema di rilevazione specifico dell'HHV-6B con alcuni ceppi di HHV-6A. Questi ceppi porteranno a un segnale debole nel canale di rilevazione dell'HHV-6B (Cycling Red), oltre al segnale nel canale di rilevazione dell'HHV-6A (Cycling Green).

† La rilevazione del controllo interno nel canale Cycling Yellow non è richiesta per risultati positivi né nel canale di rilevazione Cycling Green né nel canale di rilevazione Cycling Red. Alte cariche di HHV-6A o HHV-6B nel campione possono portare a una riduzione o assenza dei segnali del controllo interno.

Analisi quantitativa

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit contiene 4 standard di quantificazione (Quantification Standard ,QS). Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa dei dati occorre definire gli standard di quantificazione con le corrispondenti concentrazioni (Tabella 1, pag. 10). Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa occorre utilizzare standard con concentrazioni note.

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

- C_T = ciclo soglia
- m = pendenza
- N_0 = concentrazione iniziale
- b = intercetta

Le concentrazioni di campioni positivi di concentrazione sconosciuta possono essere desunte dalla curva standard (Figura 9).

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

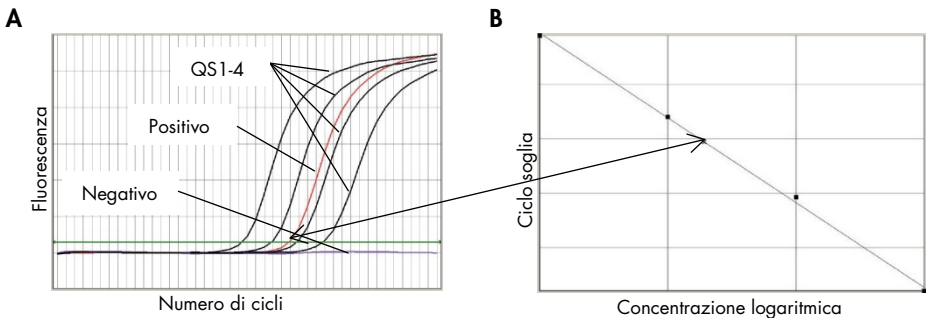


Figura 9. Standard di quantificazione, un campione positivo e un campione negativo visualizzati (A) in un grafico di amplificazione e (B) in un'analisi con curva standard.

Nota: la concentrazione del campione è visualizzata in UI/ μ l e corrisponde alla concentrazione del DNA virale nell'eluito.

Utilizzare la seguente formula per calcolare la carica virale del campione originale:

$$\text{Carica virale (campione) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (eluito) [\mu l]} \times \text{carica virale (eluito) [UI/\mu l]}}{\text{Materiale campione immesso [ml]}}$$

Limitazioni

- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche della Real-time PCR e alle procedure della diagnostica in vitro.
- Le buone pratiche di laboratorio sono essenziali affinché le prestazioni di questo test siano corrette.
- Prestare la massima cura per conservare la purezza dei componenti del kit e della preparazione delle reazioni. Controllare accuratamente tutti i reagenti per verificare la presenza di eventuali impurità e contaminazione. Smaltire i reagenti se si sospetta che siano contaminati.
- Affinché le prestazioni di questo test siano ottimali sono necessarie adeguate procedure di prelievo, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni.
- Non utilizzare questo test direttamente sui campioni. Prima di utilizzare il test eseguire l'opportuna procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR può causare risultati falsi negativi o risultati non validi.
- Mutazioni potenziali nell'ambito delle regioni bersaglio del genoma dell'HHV-6A e/o HHV-6B coperte da primer e/o sonde utilizzati nel test possono impedire la rilevazione della presenza del patogeno.
- Analogamente a ogni test diagnostico, i risultati ottenuti con l'*artus* HHV-6 RG PCR Kit devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio.
- A causa dei nuovi dati di sequenziamento, non può essere esclusa la reattività crociata del sistema di rilevazione specifico dell'HHV-6B con alcuni ceppi di HHV-6A. Questi ceppi porteranno a un segnale debole nel canale di rilevazione dell'HHV-6B (Cycling Red), oltre al segnale nel canale di rilevazione dell'HHV-6A (Cycling Green).

Controllo qualità

Ogni lotto dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni specifiche dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit sono state stabilite utilizzando DNA specifico dell'HHV-6A (ceppo GS) e DNA specifico dell'HHV-6B (ceppo Z-29) con concentrazione nota.

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è definita come la concentrazione (copie per μ l di eluito) di DNA specifico dell'HHV-6A o DNA specifico dell'HHV-6B che può essere rilevata con una probabilità di $\geq 95\%$. La sensibilità analitica è stata determinata analizzando una serie di diluizioni di DNA dell'HHV-6A e di DNA dell'HHV-6B con concentrazione nota (Tabelle 7 e 8).

Tabella 7. Risultati della PCR utilizzati per calcolare la sensibilità analitica dell'amplificazione specifica dell'HHV-6A

Concentrazione in ingresso (copie/ μ l)	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)
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

Tabella 8. Risultati della PCR utilizzati per calcolare la sensibilità analitica dell'amplificazione specifica dell'HHV-6B

Concentrazione in ingresso (copie/ μ l)	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)
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

La sensibilità analitica dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit determinata mediante analisi probit per la rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6A è pari a 1,46 copie/ μ l di eluito [intervallo di confidenza (Confidence Interval, CI) al 95%: 0,72-4,57 copie/ μ l], mentre la sensibilità analitica per la rilevazione del DNA specifico dell'HHV-6B è pari a 2,58 copie/ μ l di eluito (CI al 95%: 1,44-6,30 copie/ μ l).

Specificità analitica

La specificità analitica dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è garantita dalla scelta accurata degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili allo scopo di garantire che tutti i genotipi rilevanti di HHV-6 siano rilevati. Inoltre, la specificità dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è stata valutata testando un pannello di DNA/RNA genomico estratto da altri herpesvirus o altri patogeni di rilevanza per pazienti immunodepressi (Tabella 9).

Tabella 9. Organismi testati per valutare la reattività crociata

Organismo	Canale di rilevazione		
	Cycling Green (HHV-6A)	Cycling Red (HHV-6B)	Cycling Yellow (IC)
Virus dell'Herpes simplex tipo 1	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'Herpes simplex tipo 2	Negativo	Negativo	Valido
Virus della varicella-zoster	Negativo	Negativo	Valido
Virus di Epstein-Barr	Negativo	Negativo	Valido
Citomegalovirus	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano tipo 7	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano tipo 8	Negativo	Negativo	Valido
Virus BK	Negativo	Negativo	Valido
Virus JC	Negativo	Negativo	Valido
Parvovirus B19	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite A	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite B	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite C	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'immunodeficienza umana tipo 1	Negativo	Negativo	Valido

L'*artus* HHV-6 RG PCR Kit non ha presentato reattività crociata con nessuno degli organismi indicati.

Range lineare

Il range lineare dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è stato valutato analizzando una serie di diluizioni su base logaritmica del DNA specifico dell'HHV-6A e del DNA specifico dell'HHV-6B utilizzando concentrazioni che andavano da 1×10^8 a 10^0 copie/ μ l (Figura 10). Sono stati analizzati almeno 6 replicati per ogni diluizione.

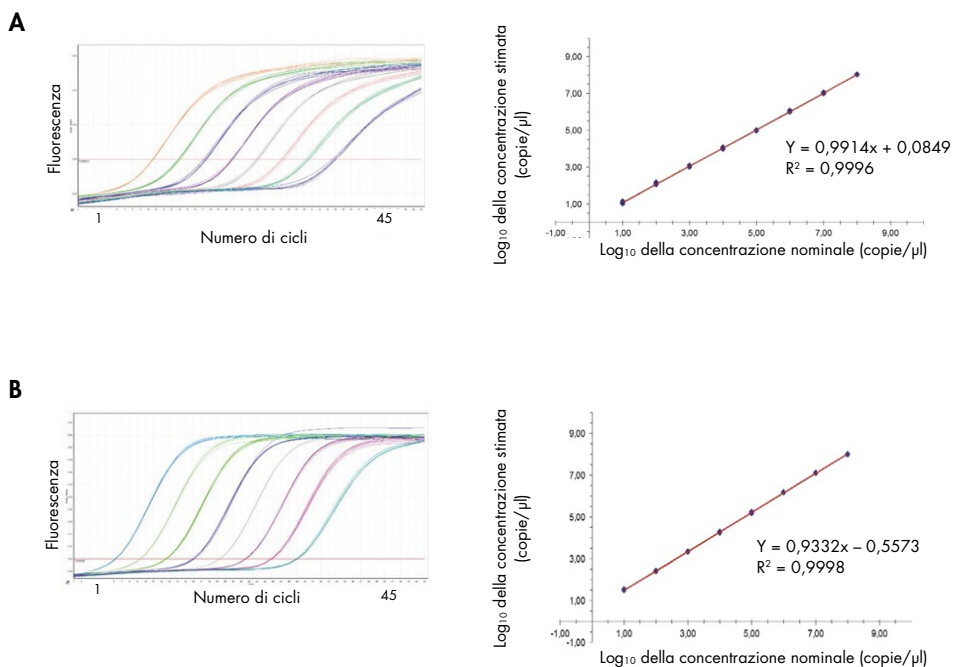


Figura 10. Curve di amplificazione e analisi di regressione lineare di una serie di diluizioni di DNA specifico dell'HHV-6A (A) e DNA specifico dell'HHV-6B (B).

Il range lineare dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit copre un intervallo di almeno 7 ordini di grandezza per il DNA specifico dell'HHV-6A e il DNA specifico dell'HHV-6B.

Precisione

La precisione dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit è stata determinata come variabilità intra-test (variabilità nell'ambito di un solo esperimento), variabilità inter-test (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra diversi lotti di produzione).

I dati relativi alla variabilità sono espressi in termini di deviazione standard, varianza e coefficiente di variazione. I dati si basano sull'analisi di quantificazione delle concentrazioni predefinite di DNA genomico dell'HHV-6 e sui valori del ciclo soglia (C_T) per il controllo interno (Tabelle 10-12). Sono stati analizzati almeno 6 replicati per campione per la variabilità intra-test, inter-test e inter-lotto. La varianza totale è stata calcolata combinando le 3 analisi.

Tabella 10. Precisione dell'amplificazione del dell'HHV-6A

Sistema specifico dell'HHV-6A	Conc. media (copie/μl)	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-test	22,07	2,75	7,56	12,50
Variabilità inter-test	23,32	2,88	8,28	12,34
Variabilità inter-lotto	23,63	3,02	9,10	12,76
Varianza totale	23,94	2,85	8,12	11,90

Tabella 11. Precisione dell'amplificazione dell'HHV-6B

Sistema specifico dell'HHV-6B	Conc. media (copie/μl)	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-test	21,58	4,83	23,32	22,37
Variabilità inter-test	25,55	3,62	13,10	14,17
Variabilità inter-lotto	24,54	4,63	21,44	18,87
Varianza totale	24,23	4,36	19,04	18,01

Tabella 12. Precisione dell'amplificazione del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C _T)	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-test	21,97	0,11	0,01	0,51
Variabilità inter-test	21,98	0,09	0,01	0,40
Variabilità inter-lotto	21,97	0,10	0,01	0,44
Varianza totale	21,97	0,09	0,01	0,39

Valutazione diagnostica

La sensibilità e specificità diagnostica dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit vengono regolarmente valutate analizzando campioni di riferimento e campioni diagnostici precedentemente analizzati con metodi di riferimento (Tabella 13).

Tabella 13. Valutazione diagnostica dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit

		<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
		HHV-6A	HHV-6B	NEGATIVO
Metodo di riferimento	HHV-6A	8	0	0
	HHV-6B	0	19	0
	NEGATIVO	0	0	3

Ripetibilità







La specificità, sensibilità e precisione di quantificazione dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit sono state valutate analizzando pannelli standardizzati per l'HHV-6. Per garantire la ripetibilità dell'*artus* HHV-6 RG PCR Kit, la specificità e la sensibilità sono state valutate analizzando pannelli standardizzati per l'HHV-6, nonché campioni diagnostici caratterizzati a scadenze regolari (Tabella 14).

Tabella 14. Risultati dell'analisi di un pannello standardizzato per l'HHV-6 (QCMD)

Pannello standardizzato			<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit		
ID campione	Contenuto del campione	Conc. attesa (copie/ml)	Conc. rilevata di HHV-6A (copie/ml)	Conc. rilevata di HHV-6B (copie/ml)	Controllo interno
HHV6DNA14-01	HHV-6B	1002	–	474	Valido
HHV6DNA14-02	HHV-6A	596	94	–	Valido
HHV6DNA14-03	HHV-6A	3020	522	–	Valido
HHV6DNA14-04	HHV-6A	171	66	–	Valido
HHV6DNA14-05	HHV-6B	10.000	–	6330	Valido
HHV6DNA14-06	HHV-6B	294	–	93	Valido
HHV6DNA14-07	HCMV	–	–	–	Valido
HHV6DNA14-08	HHV-6 negativo	–	–	–	Valido
HHV6DNA14-09	HHV-6B	843	–	894	Valido
HHV6DNA14-10	HHV-6B	8954	–	9300	Valido

Simboli

Nelle presenti istruzioni per l'uso sono utilizzati i simboli riportati nella tabella seguente.

Simbolo	Definizione del simbolo
 96	Contenuto sufficiente per 96 test
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Limite di temperatura
	Produttore

Simbolo**Definizione del simbolo**



Data di scadenza



Numero di materiale



Codice GTIN



Consultare le istruzioni per l'uso

Guida alla risoluzione dei problemi

Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per i dati di contatto visitare il sito www.qiagen.com).

Bibliografia

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>.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>artus</i> HHV-6 RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master A, Master B, 4 standard di quantificazione, controllo interno, H ₂ O (acqua grado PCR)	4521265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 QIAamp Mini Spin Columns, proteinasi K, reagenti, tamponi, provette per prelievo (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Per 250 preparazioni di DNA: 250 QIAamp Mini Spin Columns, proteinasi K, reagenti, tamponi, provette per prelievo (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera, installazione e training	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera; installazione e training non inclusi	9002022

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include Priority Package con software, installazione, training, 3 anni di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera e 3 interventi di manutenzione preventiva	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include Priority Package con software, installazione, training, 2 anni di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera e 2 interventi di manutenzione preventiva	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera, installazione e training	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termociclatore per Real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera; installazione e training non inclusi	9001570

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Strumento per Real-time PCR con 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include Priority Package con software, installazione, training, 3 anni di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera e 3 interventi di manutenzione preventiva	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Strumento per Real-time PCR con 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include Priority Package con software, installazione, training, 2 anni di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera e 2 interventi di manutenzione preventiva	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Strumento per Real-time PCR con 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera, installazione e training	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Strumento per Real-time PCR con 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori: include 1 anno di garanzia su pezzi di ricambio e manodopera; installazione e training non inclusi	9001590

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per l'allestimento manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo in provette da 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni da 10–50 µl	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni da 10–50 µl	981106

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R4, settembre 2018	Modificate le unità di refertazione del dosaggio da copie a Unità Internazionali (UI).
R5, novembre 2019	Rimossa nota sul fattore di conversione per gli Standard di quantificazione dell'artus HHV-6 RG PCR Kit (96) dalla cronologia delle revisioni del manuale. Revisionata la sezione Informazioni sull'agente patogeno per includere informazioni su HHV-6A e HHV-6B.

Contratto di licenza limitata per l'artus HHV-6 RG PCR Kit

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità con i protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene®, Sample to Insight® (Gruppo QIAGEN); FAM™, JOE™ (Thermo Fisher Scientific o sue affiliate); Cy® (GE Healthcare). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

1117341 11-19 HB-1996-005 © 2019 altona Diagnostics GmbH, tutti i diritti riservati.

