

НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ ГЕРПЕСУ 6 ТИПУ

HHV6 DNA Quantitation (QT)

Кат. №: **HHV6DNAQT.CE.100**
Кількість тестів: **100**

Дата випуску інструкції: **10-2019**
Версія: **5**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Кількісне визначення ДНК HHV6 (QT)

ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному А-В Герпесвірусу 6

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір для **Кількісного визначення ДНК HHV6** ПЛР у режимі реального часу з кодом **HHV6DNAQT.CE.100** призначений для кількісного виявлення ДНК Герпесвірусу 6 у плазмі/крові людини з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою **Внутрішнього контролю (IC)**.

Набір адаптований для використання на Термоциклерах для визначення в режимі реального часу ABI 7500 Sequence Detection System® (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems™), MX3000P (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene™), та CFX96 (програмне забезпечення CFX manager версії 1.7, Biorad™).

*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applied Corporation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.

**Biorad є зареєстрованою торговою маркою.

***Stratagene є зареєстрованою торговою маркою.

В. ВСТУП

Герпесвірус людини, тип 6, є бета-герпесвірусом, який може існувати в двох варіантах, А і В, і вражає майже 90% населення до дворічного віку. Крім того, є дані про інфекцію HHV6 приблизно у 10% немовлят з гарячкою віком до 90 днів. Первинні інфекції у дітей часто призводять до лихоманки з подальшим розвитком раптової екзантеми, також відомої як дитяча розеола.

Після первинного зараження латентність встановлюється в мієлоїдних попередниках і попередниках кісткового мозку і існує протягом усього життя носія. Вірус періодично реактивується з цього латентного стану, при цьому ДНК HHV6 можна виявити у здорових дорослих. Повторна активація у імунокомпетентних осіб часто протікає безсимптомно, але в клінічному стані зі зниженим імунітетом вона може призвести до серйозних ускладнень.

HHV6 реактивується у ВІЛ-серопозитивних пацієнтів, але специфічні клінічні синдроми, пов'язані з реактивацією, зустрічаються рідко. Найбільш часто описуються випадки пневмонії та енцефаліту. Є більше доказів асоціації захворювання у реципієнтів трансплантованих органів. Захворювання, пов'язані з реактивацією HHV6, варіюються від недиференційованої гарячкової хвороби до інтерстиціального пневмонії, гепатиту, енцефаліту та відторгнення трансплантованого органу.

Було продемонстровано, що молекулярний аналіз, такий як ПЛР-аналіз в реальному часі, є корисним інструментом для виявлення HHV6 через високу чутливість, специфічність, простий у використанні та швидкий метод.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір HHV6DNAQT.CE.100 заснований на аналізі в реальному часі, що використовує специфічні Праймери та Проби.

ДНК HHV6, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, ампліфікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Ампліфікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності HHV6.

Гетерологічний Внутрішній контроль (IC) служить контролем Екстракції/Ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.

Надається стандартна крива, що дозволяє визначити вірусне навантаження.

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат продукту з кодом HHV6DNAQT.CE містить реагенти для 50 тестів.

Компонент	Вміст	HHV6DNAQT.CE 50 тестів
A КОД: ALL/ММ-4 КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ	Майстер-мікс	x 1 флакон/0.825 мл (ml)
B КОД: HHV6/CB КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЖОВТИЙ	Ліофілізовані Праймери/Проби	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
C КОД: ALL/C КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	MG Вода	x 4 флакони/1.5 мл (ml)
NTC КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ	Негативний контроль	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
STD Кількісний стандарт (1.65x10 ⁵ копій/мкл (μl))	Ліофілізований Кількісний стандарт	x 6 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
IC Внутрішній контроль	Ліофілізований Внутрішній контроль	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладиш інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом Dia.Pro може надати реагенти для 25, 100, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент А	x1 флакон/0.4 мл (ml)	x2 флакони/0.825 мл (ml)	x3 флакони/0.825 мл (ml)
2. Компонент В	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
3. Компонент С	x2 флакони/1.5 мл (ml)	x4 флакони/1.5 мл (ml)	x6 флаконів/1.5 мл (ml)
4. NTC	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)
5. IC	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
6. STD	x3 флакони	x4 флакони	x6 флаконів
7. Інструкція	1	1	1
Кількість тестів	25	100	150
Код	HHV6DNAQT.CE.25	HHV6DNAQT.CE.100	HHV6DNAQT.CE.150

Е. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір HHV6DNAQT.CE.100 необхідно зберігати при +2...8 °C (°C).

Після розчинення **Компонент В** (кодування HHV6/CB) і **Компонент IC** (кодування ALL/IC) стабільні протягом 4 місяців при -20 °C (°C). Після розчинення **Компонент STD** (кодований HHV6/STD) стабільний протягом 2 тижнів при -20 °C (°C). Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

F. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
2. Набір для екстракції ДНК.
3. MG EtOH.
4. Термоблок.
5. Мікроцентрифуга.
6. Штативи для пробірок.
7. Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
8. Безнуклеазні мікропробірки.
9. 0.2 мл (ml) мікропробірки або мікропланшети для ПЛР, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без тальку.
11. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
12. Абсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(* **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі.
7. Компоненти А і В світлочутливі. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері.
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки/крові/плазми людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти з правильною кількістю (зазначеною на етикетках) Компонента С (кодування: ALL/C), що постачається в наборі.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.

19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
20. Використовуйте одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Не спостерігалось впливу внаслідок підготовки зразка з цитратом або EDTA.
Увага: Гепарин (≥ 10 МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР.
Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати зразки пацієнтів із гепарином.
3. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
4. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
5. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
6. Плазма, якщо вона не використовується негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при -20 .. -80 °C (°C). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -80 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
7. Зразки плазми для екстракції ДНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати при +2-8 °C (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
8. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 300 мкл (µl)) і зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
9. Використовуючи заморожені зразки, розморожуйте зразки безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути розпаду нуклеїнової кислоти.
10. Зразки цільної периферичної крові для екстракції ДНК повинні бути зібрані в EDTA згідно з рекомендаціями лабораторії, транспортуватися та зберігатися при +2-8 °C (°C) протягом максимум 3 днів. Не заморожуйте зразки цільної периферичної крові, щоб уникнути лізису клітин і втрати вірусного титру.

I. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-мікс:

Компонент А. Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі та коротко центрифугуйте, щоб зібрати весь об'єм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Праимери/Проби:

Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

NTC. Готовий до використання.

Стандартна крива:

STD.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований STD з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте 4 безнуклеазні флакони для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення STD 1:10 у Компоненті С (код: ALL/C), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

Підготовка Стандартної кривої		
STD	Калібратор 165000 копій/мкл (µl)	Додайте об'єм Компонента С (код: ALL/C), як написано на етикетці флакона
STD 1	16500 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 2	1650 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 1) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 3	165 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 2) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 4	16.5 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 3) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)

Внутрішній контроль:

I.C.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір HHV6DNAQT.CE.100 призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp DNA Mini з кодом: 51306 (QIAGEN), набором NucleoSpin Blood з кодом: 740951 (Macherey-Nagel), набором NA Body Fluid з кодом: D-2021 (Chemagen розповсюджується Dia.Pro). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.

3. **Термоциклери в режимі реального часу.** Набір HHV6DNAQT.CE.100 призначений для використання тільки в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI PRISM 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene) та CFX96 RTS, програмним забезпеченням CFX manager версія 1.7, Biorad). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (код: ALL/C), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтеся посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція ДНК

Крок екстракції геномної ДНК HHV6 має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Інструменти для ручної екстракції

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/Кров	NucleoSpin Blood	740951	MN™
Плазма/Кров	Набір QIAamp DNA mini®	51306	QIAGEN™

Інструмент для автоматичної екстракції в поєднанні з інструментом DIA.FASTEX

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/Кров	Набір NA Body Fluid	D-2021	Chemagen, дистрибується Dia.Pro

Виділення ДНК необхідно проводити тільки відповідно до Інструкції з експлуатації (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro).

Важлива примітка: У процедурах екстракції необхідно суворо використовувати наступні об'єми:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм елюювання мкл (µl)
NucleoSpin Blood	200	100
Набір QIAamp DNA mini®	200	100
Набір NA Body Fluid	200	100

ДНК, зібрану із зразків, не використану під час аналізу, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

Важлива примітка: IC набору HHV6DNAQT.CE.100 можна використовувати в процедурі ізоляції як контроль екстракції.

Значення Внутрішнього Контролю Ct використовується для оцінки того, чи була процедура екстракції ДНК виконана правильно (див. розділ Q).

Для цього застосування

- **Набір Nucleospin Blood та QIAamp DNA mini: Додайте 5 мкл (μl) I.C. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.**
- **Набір NA Body Fluid: Додайте 5 мкл (μl) I.C. до зразка (протокол крові) або до буфера для лізису та суміші зразків (протокол плазми) і продовжуйте, дотримуючись інструкцій, наданих виробником Набору для екстракції.**

N.2 Постановка реакції

Набір **HNH6DNAQT.CE.100** призначений для використання виключно в комбінації зі стандартом ABI 7500 (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems), Mx3000P (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene) та CFX96 (CFX manager версії 1.7, Biorad).

N.2.1 Підготовка ПЛР

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі O. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі I.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в розділі I).

Важлива примітка: Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (I.C. як Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		1	12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	150 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	24 мкл (μl)
I.C.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (μl)	6 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	180 мкл (μl)

Важлива примітка: Якщо Внутрішній контроль був доданий під час процедури виділення ДНК, приготуйте **Ампліфікаційну суміш** для **Зразків** як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (I.C. як Екстракційний/Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	150 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	24 мкл (μl)
C	Вода MG	0.5 мкл (μl)	6 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	180 мкл (μl)

N.2.2 Процедура ампліфікації

- Додайте 15 мкл (μl) Ампліфікаційної суміші в кожен реакційну пробірку або лунку мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (μl) **Зразків, NTC та стандартної кривої** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Коротко центрифугуйте реакційні пробірки при 2000 об/хв (rpm).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.

- Після операцій налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

Важлива примітка: Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті C (MG вода) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C).

Наприкінці робочого дня належним чином викиньте залишки матеріалу Точок розведення STD.

Невикористаний об'єм Компонента B, STD та I.C. можна заморозувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі E.

N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

Важлива примітка: Для Mx3000P встановіть «Налаштування підсилення фільтра»: ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (див. Інструкцію з експлуатації програмного забезпечення MxPro™ QPCR, стор.41).

N.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
2	1	95 °C (°C)	10 хвилин
3	50	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

N.3.2 Вибір Детекторів

Дотримуючись інструкцій з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (ABI 7500, Mx3000P Stratagene та CFX96), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення	Репортер	Гасник
HNH8	FAM	Нефлуоресцентний
Внутрішній Контроль (I.C.)	JOE/VIC	Нефлуоресцентний
Пасивний Стандарт	ROX	Не присутній

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

O. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

Мікропланшет або пробірки

	1	2	3
A	STD 1 14000 копій/мкл (μl)	Зразок 4	
B	STD 2 1400 копій/мкл (μl)	Зразок 5	
C	STD 3 140 копій/мкл (μl)	Зразок 6	
D	STD 4 14 копій/мкл (μl)	Зразок 7	
E	NTC	Зразок 8	
F	Зразок 1	Зразок 9	
G	Зразок 2	Зразок 10	
H	Зразок 3	Зразок 11	

Легенда: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК HNH6, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що оцінюються.

Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати інтерпретацію даних:

- Встановіть «**Baseline/Початкові умови**» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
STRATAGENE™ Mx3000P®	Адаптивні початкові умови Не використовуйте алгоритм Mx4000 v1.00 - v3.00
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови/базова лінія

- Встановіть вручну «Threshold/Поріг» флуоресценції FAM/JOE/VIC.

FAM «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ Mx3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	300

JOE/VIC «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.10
STRATAGENE™ Mx3000P®	0.03
BIORAD™ CFX96®	200

Р.2 Аналіз даних

Перевірка на калібраторах STD проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення Ct очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

Перевірка FAM	Вимоги
STD 1	20.5 < Ct (Пороговий цикл) < 23

Крім того, значення Нахилу і R² перевіряються, щоб перевірити якість виконання. Повинні бути виконані наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил FAM	-3.1 < Нахил < -3.9

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R ² > 0.98

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE/VIC підтверджують виявлення ННВ6, як описано в таблиці нижче:

ННВ6 FAM	Внутрішній Контроль JOE/VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	24 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	ВІРНО*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	24 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

*Концентрація ДНК ННВ6 вище 100 000 копій/мкл (μl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕННЯ або ВІДСУТНОСТІ флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.

**Проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів або початковий зразок, що містить недостатню кількість клітин), що призводить до неправильного результату. Процедуру тестування необхідно повторити, починаючи з етапу Екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, код ННВ6DNAQT.CE.100, можна застосувати правильне кількісне визначення вірусного навантаження в межах від 1.65E+08 копій/мкл (μl) до 5E-01 копій/мкл (μl), тому вірусне навантаження ННВ6 має бути виражене, як зазначено в таблиці нижче:

Кількість зразка ННВ6 копії/мкл (μl)	Вірусне навантаження ННВ6 копії/мкл (μl)
Кількість > 1.65E+08	Вірусне навантаження ННВ6 > 1.65E+08
5E-01 ≤ Кількість ≤ 1.65E+08	КІЛЬКІСНА ОЦІНКА
Кількість < 5E-01	Вірусне навантаження ННВ6 < 5E-01

Важлива примітка: Для кількісного визначення зразків див. розділ R.

Результати, отримані з набором, код ННВ6DNAQT.CE.100, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта.

Можливі наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE/VIC	Результат	Перевірити
ЗРАЗОК невідомий	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	ВАЖЛИВО: Концентрація ДНК ННВ6 вище 100000 копій/мкл (μl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕННЯ або ВІДСУТНОСТІ флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилка в процедурі або неправильне функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення ННВ6 і JOE/VIC для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	ВАЖЛИВО: 1. Концентрація ДНК ННВ6 вище 100000 копій/мкл (μl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕННЯ або ВІДСУТНОСТІ флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів. 2. Негативний сигнал JOE/VIC правильний, лише якщо І.С. використовувався як контроль екстракції.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення ННВ6 і JOE/VIC для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
STD	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення ННВ6 і JOE/VIC для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався.
NTC	-	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC правильний, лише якщо І.С. використовувався як контроль екстракції.
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
2. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути помилкової передачі даних.

Якщо результати тесту співпадають з **КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ АНАЛІЗУ**, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD обробляються як очищені зразки і використовують той самий об'єм, 10 мкл (μl).

Концентрація калібраторів STD виражається в копіях/мкл (μl).

Концентрація вірусного геному на мл (ml) для кожного зразка пацієнта розраховується за такою формулою:

$$\text{Результати (копії/мл (ml))} = \frac{\text{копії/мкл (μl) (дані прогону)} \times \text{Об'єм елюйованого зразка (мкл (μl))}}{\text{Об'єм екстрагованого зразка (мл (ml))}}$$

Приклад:

Результати (копії/мл (ml)) = 1500 x 100/0.2

Результати (копії/мл (ml)) = 7.5 E+05

S. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ITS.

Оцінку ефективності проводили в лабораторіях на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

S.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа виявлення** та як **Межа кількісного визначення**.

Межа виявлення (LOD): Це найменша кількість цільового значення, яку може виявити система із заданою ймовірністю.

Для тестів NAT це виражається як найменша концентрація **аналіту**, яка за багаторазової перевірки дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) визначається шляхом тестування серійних розведень зразка, що містять відомі концентрації аналіту.

LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, у ≥ 95% зразків у звичайних лабораторних умовах).

Для набору HHV6DNAQT.CE.100 **LOD** було визначено шляхом тестування 24 повторів, 8 повторів у трьох різних запусках, найнижчої концентрації аналіту, яку можна виявити в 100% з них.

Результати аналізу є наступними:

Межа виявлення	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.5 копії/мкл (μl)
STRATAGENE™ MX3000P®	0.5 копії/мкл (μl)
BIORAD™ CFX96®	0.5 копії/мкл (μl)

Це означає, що існує 100% ймовірність того, що 0.5 копій/мкл (μl) буде виявлено на ABI™PRISM® 7500 SDS, STRATAGENE™ MX3000P® та на приладі BIORAD™ CFX96® RTS.

S.1.1 Межа кількісного визначення

Межа кількісного визначення була визначена шляхом вимірювання лінійності, динамічного діапазону та відтворюваності.

Лінійність - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

Динамічний діапазон - це діапазон концентрацій аналіту, для якого кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації аналіту з прийнятною правдивістю та точністю.

Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).

Для набору HHV6DNAQT.CE.100 було підготовлено граничну криву розведення з визначеними копіями/мкл (μl) плазмиди, що несе

специфічну цільову вірусну послідовність. Точки розведення перевіряли в аналітичній системі та визначали їх Ct (пороговий цикл).

Верхня **межа кількісного визначення** становить 8.21 log₁₀ (1.65E+08 копій/мкл (μl)), а **нижня межа кількісного визначення** становить -0.3 log₁₀ (5E-01 копій/мкл (μl)).

S.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти та кількісно визначати тільки цільовий маркер.

Аналітичну специфічність аналізу ДНК HHV6 вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (LionSoft v.1.0 від Biotools і Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з HHV6, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів HHV6.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Зразки, отримані від пацієнтів, які страждають від інфекцій, викликаних потенційно інтерферуючими мікроорганізмами, були отримані з Референсного клінічного центру та протестовані.

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Результат
CMV	негативний
VZV	негативний
EBV	негативний
HHV8	негативний
HSV1	негативний
HSV2	негативний

S.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

S.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.

Цей параметр досліджували шляхом дослідження 7 негативних ДНК HHV6 зразків плазми і 3 негативних ДНК HHV6 зразків цільної крові:

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	10
ХИБНО ПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	40
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Специфічність системи становить 100%.

S.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що прилад дає негативний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.

Для набору з кодом HHV6DNAQT.CE.100 цей параметр досліджували шляхом дослідження панелей QCMD 2009 і QCMD 2012 зразків вірусу герпесу людини 6 у двох примірниках під час одного і того ж запуску. Потім розраховували відсоток (%) позитивних зразків.

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	15
ХИБНО НЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	15
ЧУТЛИВІСТЬ %	100

Крім того, були протестовані Панель вірусу Епштейна-Барр QCMD 2005 і QCMD 2010. Панель QCMD 2005 містить 7 позитивних зразків плазми та 1 негативний зразок плазми, панель QCMD 2010 містить 9 позитивних зразків плазми та 1 негативний зразок плазми.

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Чутливість системи становить 100%.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	100%

5.4 ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу. У наборі HHV6DNAQT.CE.100 **точність** виражалася як варіабельність в межах аналізу та мінливість між аналізами. 4 точки розведення у 8 повторях були перевірені в одному запуску (внутрішній аналіз) і в трьох різних запусках (між аналізами).

За відсутності встановлених міжнародних параметрів в Європейській IVD Директиві CTS ми визначили наступне значення прийнятності для HHV6 ДНК:

Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%) ≤ 10%.

Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) ≤ 10%.

Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу. Зокрема, точне піпетування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення та кількісного визначення ДНК HHV6.


Визначення ДНК HHV6 у зразку пацієнта має великі медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

U. ЛІТЕРАТУРА

- Human Herpesvirus 6. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):521-67.
- Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. Dockrell DHJ Med Microbiol. 2003 Jan;52(Pt 1):5-18. Review.
- Human herpesvirus 6. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Clin Infect Dis. 2001 Sep 15;33(6):829-33. Epub 2001 Aug 10. Review.
- Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 6 DNA in serum. Flamand L, Gravel A, Boutolleau D, Alvarez-Lafuente R, Jacobson S, Malnati MS, Kohn D, Tang YW, Yoshikawa T, Ablashi DJ. Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2700-6Feb;47(2):519.
- Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. J Virol. 1999 Oct;73(10):8040-52.

5. СИМВОЛИ

ЛЕГЕНДА			
	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики in vitro		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
	Знак відповідності CE		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

