

# НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ ГЕРПЕСУ 6 ТИПУ

## HHV6 DNA Quantitation (QT)

Кат. №: **HHV6DNAQT.CE**  
Кількість тестів: **50**

Дата випуску інструкції: **05-2022**  
Версія: **6**



*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 Вірусу герпесу 6 типу (QT)  
ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному А-В  
Вірусу герпесу 6 типу**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір для **Кількісного визначення ДНК Вірусу герпесу 6 типу** методом ПЛР у режимі реального часу з кат. № **HHV6DNAQT.CE** призначений для кількісного визначення ДНК Вірусу герпесу людини 6 типу у плазмі/крові людини з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою **Внутрішнього Контролю (IC)**.

Аналіз HHV6DNAQT.CE був стандартизований відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для Вірусу герпесу 6 типу (код NIBSC 15/266), щоб виразити концентрацію зразків також у міжнародних одиницях (МО/мл (IU/ml)).

### 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 інфікування Вірусом герпесу 6 типу приблизно у 10% немовлят з лихоманкою віком до 90 днів від народження. Первинні інфекції у дітей часто призводять до лихоманки з подальшим розвитком раптової екзантеми, також відомої як дитяча розеола.

Після первинного інфікування латентність встановлюється в мієлоїдних та кістковомозкових прогеніторах і існує протягом усього життя носія. Вірус періодично реактивується з цього латентного стану, при цьому ДНК вірусу герпесу 6 типу можна виявити у здорових дорослих. Повторна активація у імунікомпетентних осіб часто протікає безсимптомно, але в клінічному стані зі зниженим імунітетом вона може призвести до серйозних ускладнень.

Вірус герпесу 6 типу реактивується у ВІЛ-серопозитивних пацієнтів, але специфічні клінічні синдроми, пов'язані з реактивацією, зустрічаються рідко. Найбільш часто описуються випадки пневмоніту та енцефаліту. Є більше доказів асоціації захворювання у реципієнтів трансплантованих органів. Захворювання, пов'язані з реактивацією Вірусу герпесу 6 типу, варіюються від недиференційованої гарячкової хвороби до інтерстиціального пневмоніту, гепатиту, енцефаліту та відторгнення трансплантованого органу.

Було продемонстровано, що молекулярний аналіз, такий як ПЛР-аналіз в режимі реального часу, є корисним інструментом для виявлення Вірусу герпесу 6 типу через високу чутливість, специфічність, простий у використанні та швидкий метод.

### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

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

**ДНК Вірусу герпесу 6 типу**, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, амплікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Амплікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності вірусу герпесу 6 типу.

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.

### Д. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат набору, кат. № HHV6DNAQT.CE, містить реагенти для 50 тестів.

Компонент	Вміст	HHV6DNAQT.CE 50 тестів
<b>А</b> КОД: ALL/ММ5 КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ	Майстер-мікс	x 1 флакон/0.825 мл (ml)
<b>В</b> КОД: HHV6/СВ КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЖОВТИЙ	Ліофілізовані Праймери/Проби	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
<b>С</b> КОД: ALL/С КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	МГ Вода	x 4 флакони/1.5 мл (ml)
<b>NTC</b> КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ	Негативний контроль	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
<b>STD</b> Кількісний стандарт (1.65x10 <sup>5</sup> копій/мкл (μl))  КОД: HHV6/STD КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	Ліофілізований Кількісний стандарт	x 6 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
<b>IC</b> Внутрішній контроль  КОД: ALL/IC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЗЕЛЕНИЙ	Ліофілізований Внутрішній контроль	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладка 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, кат. № HHV6DNAQT.CE, необхідно зберігати при +2...8 °C (°C). Після розчинення **Компонент В** (кодування HHV6/СВ) і **Компонент IC** (кодування ALL/IC) стабільні протягом 4 місяців при -20 °C (°C). Після розчинення **Компонент STD** (кодований HHV6/STD) стабільний протягом 15 днів при -20 °C (°C). Компонент STD, який зберігається при -20 °C (°C) протягом ≤ 15 днів, можна використовувати лише разом із компонентом В і ALL/IC, замороженими при -20 °C (°C) протягом ≤ 30 днів. Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аликвотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

### Ф. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Відкалібровані мікродозатори (0.5 мкл (μl) < об'єм < 1000 мкл (μl)).
2. Набір для екстракції ДНК.
3. МГ 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, 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.

## Г. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом завідувача лабораторією.
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 є світлочутливими. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації стола, 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. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не замінялися.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або агрегатів. Якщо ні, порекомендуйте завідувачу 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 зовнішній етикетці контейнера.
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки/крові/плазми людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів і використовуйте окреме приміщення для обробки.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти коректною кількістю (зазначеною на етикетках) Компонента С (код: ALL/C), що входить до набору.
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. Використання одноразового пластикового посуду рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворились 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.

## Н. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Жодного впливу не спостерігалось при приготуванні зразка з цитратом чи ЕДТА.  
Увага: Гепарин ( $\geq 10$  МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР. Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати гепаринізовані зразки пацієнтів.
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. Плазму, якщо вона не використовується негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при  $-20$  °C ..  $-80$  °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, розморозуйте їх безпосередньо перед екстракцією, щоб уникнути можливих випадків деградації нуклеїнової кислоти.
10. Зразки цільної периферичної крові для екстракції ДНК повинні бути зібрані в ЕДТА 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.

## І. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

### Майстер-мікс:

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

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

### Праймери/Проби:

#### Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом води (Компонент С), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчинним на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі ( $15$  °C (°C) <  $KT$  <  $25$  °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.
- Повністю розчиніть Ліофілізований STD з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчинним на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте безнуклеазні пробірки 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.
- Повністю розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчинним 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. **Мікродозатори** 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 прецизійність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Набір для екстракції:** Набір, кат. № HHV6DNAQT.CE, було валідовано для використання в поєднанні з Набором QIAamp DNA Mini, код: 51306 (QIAGEN), Набором Nucleospin Blood, код: 740951 (Macherey Nagel) і робочою станцією OMNIA LH 75 PRO (реагенти для екстракції постачаються разом з приладом). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.
3. **Термоциклери в режимі реального часу та програмне забезпечення приладів:** Набір, кат. № HHV6DNAQT.CE, було валідовано для використання в поєднанні з термоциклерами в режимі реального часу ABI7500, програмне забезпечення SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), CFX96, програмне забезпечення CFX manager версії 1.7 (Biorad), Системою ПЛР в реальному часі Gentier 96E, і похідними версіями OEM, програмне забезпечення Системи Realab (Tianlong).

Для використання набору HHV6DNAQT.CE кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися інструкцій із використання приладів, які надаються виробниками.

**Важлива примітка:** нові версії програмного забезпечення для приладів ПЛР у режимі реального часу повинні бути валідовані для можливих потреб у налаштуваннях специфічних аналізів (див. розділ P).

**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 агрегатами, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (Вода молекулярного класу), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікродозатори 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 вірусу герпесу 6 типу має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

**Набори для ручної екстракції**

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

**Набір для автоматичної екстракції**

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/Кров	Набір для екстракції, постачається разом з інструментом	Masmec	OMNIA LH 75 PRO

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

**Важлива примітка:** IC набору HHV6DNAQT.CE використовується в процедурі виділення як контроль екстракції для оцінки правильності виконання процедури екстракції ДНК (див. розділ Q).

У процедурах екстракції необхідно суворо використовувати наступні об'єми:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм IC мкл (µl)	Об'єм елюювання мкл (µl)
Nucleospin Blood	200	5	100
Набір QIAamp DNA mini®	200	5	100
OMNIA LH 75 PRO	200	5	100

Не використану під час аналізу ДНК, екстраговану зі зразків, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

**Для цього застосування**

- **Набір Nucleospin Blood та набір QIAamp DNA mini: Додайте 5 мкл (µl) I.C. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкцій з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.**

## N.2 Постановка реакції

Для налаштування ПЛР виконайте процедуру, описану в наступному параграфі.

### N.2.1 Підготовка ПЛР

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

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

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

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

#### Приготування Ампліфикаційної суміші (І.С. як Екстракційний/Ампліфикаційний контроль)

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

### N.2.2 Процедура ампліфикації

- Дозуйте 15 мкл (μl) Ампліфикаційної суміші в кожен реакційну пробірку або лунку мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (μl) **Зразків, NTC та Стандартної Кривої** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Швидко 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 операції налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

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

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

Невикористаний об'єм Компонента В, STD та І.С. можна заморозувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі Е.

### N.3 Програмування приладу

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

#### 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

Детектори слід вибирати відповідно до того, що описано в таблиці нижче, і згідно з посібниками з експлуатації використовуваних термоциклерів реального часу.

Детектори	Вірус герпесу 6 типу	Внутрішній Контроль (І.С.)	Пасивний Стандарт
Прилад	Флуорофор	Флуорофор	
<b>ABI 7500 SDS</b>	FAM - нема	JOE - нема	ROX
<b>ROX BIORAD CFX96®</b>	FAM	VIC	-
<b>TIANLONG GENTIER</b>	FAM	JOE	-

Відповідно до інструкції з експлуатації запропонованого Термоциклера реального часу (ABI 7500 Applied Biosystems, BioRad CFX96, Gentier Tianlong) виберіть тип зразка та завантажте детектори, як зазначено в таблиці нижче:

Тип зразка	STD	ЗРАЗОК (Невідомий)	NTC
	Детектори	Детектори	Детектори
<b>ВСІ ПРИЛАДИ</b>	Вірус герпесу 6 типу	Вірус герпесу 6 типу IC	Вірус герпесу 6 типу

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

### О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

#### Мікропланшет або пробірки

	1	2	3
<b>A</b>	<b>STD 1</b> 16500 копій/мкл (μl)	Зразок 4	
<b>B</b>	<b>STD 2</b> 1650 копій/мкл (μl)	Зразок 5	
<b>C</b>	<b>STD 3</b> 165 копій/мкл (μl)	Зразок 6	
<b>D</b>	<b>STD 4</b> 16.5 копій/мкл (μl)	Зразок 7	
<b>E</b>	NTC	Зразок 8	
<b>F</b>	Зразок 1	Зразок 9	
<b>G</b>	Зразок 2	Зразок 10	
<b>H</b>	Зразок 3	Зразок 11	

Позначення: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК Вірусу герпесу 6 типу, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що аналізуються.

### Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

#### Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати аналіз:

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

«Baseline/Початкові умови»	
<b>ABI™ PRISM® 7500 SDS</b>	Автоматично встановлені початкові умови
<b>BIORAD™ CFX96®</b>	Автоматично встановлені початкові умови
<b>Tialong Gentier 96E</b>	Налаштування підсилення початкових умов

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

«Threshold/Поріг» флуоресценції FAM	
<b>ABI™ PRISM® 7500 SDS</b>	<b>0.15</b>
<b>BIORAD™ CFX96®</b>	<b>300</b>
<b>Tialong Gentier 96E</b>	<b>120</b>

«Threshold/Поріг» флуоресценції JOE/VIC	
<b>ABI™ PRISM® 7500 SDS</b>	<b>0.10</b>
<b>BIORAD™ CFX96®</b>	<b>200</b>
<b>Tialong Gentier 96E</b>	<b>100</b>

## Р.2 Аналіз даних

Перевірка на калібраторах STD проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити якість циклу. Повинні виконуватися наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
STD 1	Ct (Пороговий цикл) < 24.0

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил	-3.9 < Нахил < -3.1

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R <sup>2</sup> > 0.98

## Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція JOE/VIC Внутрішнього Контролю підтверджують виявлення Вірусу герпесу 6 типу, як описано в таблиці нижче:

FAM Вірусу герпесу 6 типу	Внутрішній Контроль JOE/VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ*

**ВАЖЛИВО:** Висока початкова концентрація ДНК Вірусу герпесу 6 типу у зразку (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕНОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю I.C. через конкуренцію реагентів.

\*Під час етапу екстракції можуть виникнути проблеми (наявність інгібіторів або вихідний зразок містить недостатню кількість клітин), що призведе до неправильного результату. Процедуру тесту необхідно повторити, починаючи з етапу екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, кат. № HHV6DNAQT.CE, можна застосувати правильну кількісну оцінку вірусного навантаження, як зазначено в таблиці нижче:

Вірусне навантаження Вірусу герпесу 6 типу МО/мл (IU/ml)	Інтерпретація результатів
Кількість > 5.6E+07	Вірусне навантаження Вірусу герпесу 6 типу > ULOQ
2.5E+02 ≤ Кількість ≤ 5.0E+06	<b>КІЛЬКІСНА ОЦІНКА МО/мл (IU/ml) або копій/мл (ml)*</b>
Кількість < 2.5E+02	Вірусне навантаження Вірусу герпесу 6 типу < LLOQ

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

ULOQ = Верхня межа кількісного визначення

LLOQ = Нижня межа кількісного визначення

Результати, отримані з набором, кат. № HHV6DNAQT.CE, повинні бути інтерпретовані завідуючим лабораторією з урахуванням клінічних симптомів пацієнтів та інших лабораторних маркерів інфекції.

Можливі наступні результати:

### Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE/VIC	Результат	ПЕРЕВІРИТИ
ЗРАЗОК невідомий	+	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	<b>ВАЖЛИВО:</b> Висока початкова концентрація ДНК Вірусу герпесу 6 типу (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕНОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю I.C. через конкуренцію реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	+/-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі або неправильного функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення Вірусу герпесу 6 типу і JOE/VIC для виявлення I.C.;

				4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC є коректним, лише якщо I.C. використовувався як контроль екстракції.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в дозуванні або в процедурі	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення Вірусу герпесу 6 типу; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
NTC	-	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC є коректним, тому що I.C. використовувався як контроль екстракції.
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. щоб набір зберігався належним чином.

### Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом завідуючого лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути передачі помилкових 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:

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

### Приклад:

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

Результати (копій/мл (ml)) = 7.5 E+05

Для перетворення вірусного навантаження зразків, вираженого в копіях/мл (ml), у МО/мл (IU/ml) використовуйте відповідний коефіцієнт перетворення, як зазначено в таблиці нижче:

Методи екстракції	Коефіцієнт перетворення	Результат МО/мл (IU/ml) (*)
Ручна екстракція	0.95	копій/мл (ml) ÷ 0.95
Автоматична екстракція	1.40	копій/мл (ml) ÷ 1.40

\*відкалібровано за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ (код NIBSC 15/266)

## 5. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка робочих характеристик була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ВТС.

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

### 5.1 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 АНК 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  $\geq 95\%$  зразків у звичайних лабораторних умовах).

Для набору, кат. № HHV6DNAQT.CE, **LOD** було визначено шляхом тестування серійних розведень (8 повторів для трьох різних циклів) позитивного зразка.

Результати були проаналізовані за допомогою аналізу **Probit**, щоб визначити межу виявлення на рівні 95%.

Результати аналізу **Probit** є наступними:

Межа виявлення LOD (p=0.05)	
<b>TIANLONG GENTIER 96E</b>	<b>127 МО/мл (IU/ml)</b>
<b>ABI™ PRISM® 7500 SDS</b>	<b>154 МО/мл (IU/ml)</b>
<b>BIORAD™ CFX96®</b>	<b>153 МО/мл (IU/ml)</b>

#### 5.1.1 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, кат. № HHV6DNAQT.CE, було підготовлено криву граничного розведення 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для Вірусу герпесу 6 типу (код NIBSC 15/266) із визначеними МО/мл (IU/ml). Точки розведення перевіряли після очищення ДНК (стадія екстракції) та визначали їх Ct (порогові цикли).

Верхня **межа кількісного визначення** становить  $7.75 \log_{10}$  ( $5.6E+07$  МО/мл (IU/ml)), а нижня межа кількісного визначення становить  $2.40 \log_{10}$  ( $2.5E+02$  МО/мл (IU/ml)).

**ВАЖЛИВА ПРИМІТКА:** Для кількісного визначення зразків зверніться до розділів Q і R.

### 5.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

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

Аналітичну специфічність аналізу ДНК вірусу герпесу 6 типу вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення.
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 Вірусом герпесу 6 типу, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів Вірусу герпесу 6 типу.
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
ЦМВ	негативний
ВВВ	негативний
ВЕБ	негативний
Вірус герпесу 8 типу	негативний
ВПГ1	негативний
ВПГ2	негативний
Вірус JC	негативний
Вірус BK	негативний

### 5.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

#### 5.3.1 Діагностична специфічність

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

Цей параметр вивчали шляхом дослідження 8 негативних зразків плазми ДНК Вірусу герпесу 6 типу і 5 негативних зразків цільової крові ДНК Вірусу герпесу 6 типу:

СПРАВЖНІ НЕГАТИВНІЙ	13
ХИБНОПОЗИТИВНІЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	13
<b>СПЕЦИФІЧНІСТЬ %</b>	<b>100</b>

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

#### 5.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що з набором буде отримано позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований з набором.

Для набору, кат. № HHV6DNAQT.CE, цей параметр вивчали шляхом дослідження панелей QCMD 2019 і QCMD 2021 зразків Вірусу герпесу 6 типу. Потім розраховували відсоток (%) позитивних зразків.

СПРАВЖНІ ПОЗИТИВНІЙ	16
ХИБНОНЕГАТИВНІЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	16
<b>ЧУТЛИВІСТЬ %</b>	<b>100</b>

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, кат. № HHV6DNAQT.CE, **точність** виражалася як варіабельність в аналізі та між аналізами. Було перевірено 4 точки розведення (STD) у 3 повторях в одному циклі (внутрішній аналіз) і в трьох різних циклах (між аналізами).

На основі отриманих результатів потім розраховували варіабельність в та між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів ми визначили наступне значення прийнятності для набору, кат. № HHV6DNAQT.CE:

**Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%)  $\leq 10\%$ .**

**Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%)  $\leq 10\%$ .**

### Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворо дотримання протоколу. Зокрема, точне дозування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із

ретьним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення та кількісного визначення ДНК Вірусу герпесу 6 типу.

Визначення ДНК Вірусу герпесу 6 типу у зразку пацієнта має значні медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

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

#### U. ЛІТЕРАТУРА

1. Human Herpesvirus 6. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Clin Microbiol Rev. 1997 Jul;10(3):521-67.
2. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. Dockrell DH. J Med Microbiol. 2003 Jan;52(Pt 1):5-18. Review.
3. Human herpesvirus 6. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Clin Infect Dis. 2001 Sep 15;33(6):829-33. Epub 2001 Aug 10. Review.
4. 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):2700-6 Feb;47(2):519.
5. 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

ПОЯСНЕННЯ УМОВНИХ ЗНАКІВ			
	Каталоговий номер		Температура зберігання
	Виріб медичного призначення		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 (MI) 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  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

