

راهنمای کیت HHV6 RQ

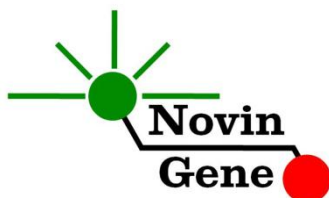
جهت تشخیص و کمیت سنجی HHV-6A و HHV-6B به روش
Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-38-100

ویرایش ۱/۰

تابستان ۱۳۹۹



فهرست مندرجات:

۱.مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۳
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۴
۵. نکات قابل توجه.....	۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۵
۷. عوامل مزاحم.....	۵
۸. کنترل داخلی.....	۶
۹. استخراج DNA.....	۶
۱۰. دستور کار PCR.....	۷
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۷
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne.....	۸
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۸
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۹
۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۲
۱۶. محاسبه تیترو ویروس.....	۱۵
۱۷. محدوده خطی.....	۱۵
۱۸. میزان حساسیت.....	۱۵

کیت **HHV6 RQ** جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne و به منظور تشخیص و کمیت سنجی HHV-6A DNA و HHV-6B DNA می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس هرپس انسانی ۶ (human herpesvirus 6, HHV-6) از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) است و ژنوم آن از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس شامل دو گونه HHV-6A و HHV-6B می باشد که از نظر بیماریزایی با یکدیگر متفاوت می باشند. عفونت اولیه در سنین پایین و معمولاً قبل از دوسالگی اتفاق می افتد و اغلب با تب و بثورات جلدی (roseola infantum) همراه است. در پی عفونت اولیه ویروس به صورت نهفته (latent) تا پایان عمر در بدن فرد باقی می ماند. در صورت بروز ضعف سیستم ایمنی امکان فعال شدن هر دو نوع ویروس وجود دارد گرچه احتمال بروز HHV-6B پس از پیوند مغز استخوان یا پیوند عضو بیشتر است. همچنین هر دو ویروس با مشکلات سیستم عصبی از جمله مننژیت و آنسفالیت نیز مرتبط شده اند.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تفکیک ویروس های HHV-6A و HHV-6B و همچنین تعیین تیتراژ آنها را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این روش در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با

دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOn طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HHV6 Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
HHV6 S1	استاندارد ۱: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S2	استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S3	استاندارد ۳: یک صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S4	استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 IC	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- ورتکس (Vortex Mixer)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و لوازم و تجهیزات لازم برای استخراج
- میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله ها) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله ها) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.

- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) یا پلاسمای حاصل از آن می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. پس از دریافت، نمونه را بایستی به حجم های کوچکتر تقسیم کرده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه خون یا پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو ویروس در آن ثابت می ماند. حداقل نمونه لازم برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر می باشد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر

۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. در صورتی که کنترل داخلی را به HHV6 Mix اضافه می‌نمایید، به ازای هر واکنش، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به HHV6 Mix اضافه نمایید.

در صورت موفق بودن PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه Rotor-Gene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می‌شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن PCR را نشان می‌دهد.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از **HHV6 Mix** اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از **DNA استخراج شده و یا استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود. در لوح فشرده همراه کیت روی فایل HHV6 0.2 یا HHV6 strip (با توجه به لوله های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود. در منوی بالای صفحه روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و سپس فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. به خاطر داشته باشید که میکس فاقد Rox به عنوان رنگ مرجع می باشد و این گزینه غیرفعال شده است. در پایان تنظیمات، دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاهها

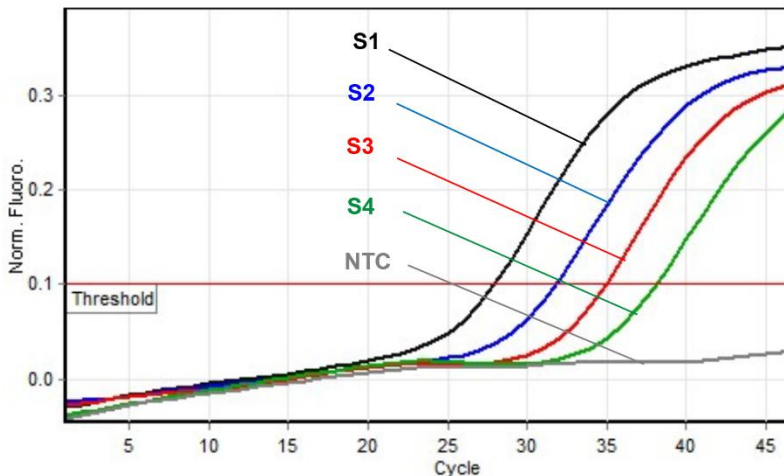
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

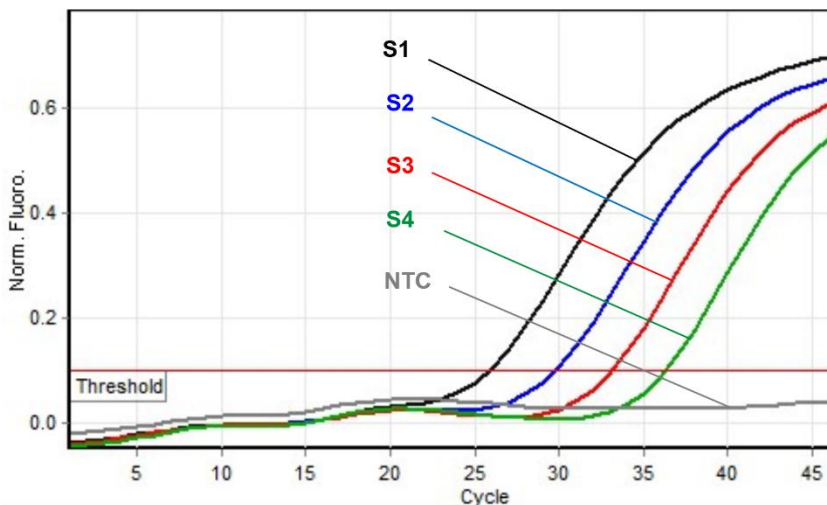
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگهای FAM و VIC و ROX تنظیم شود.

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

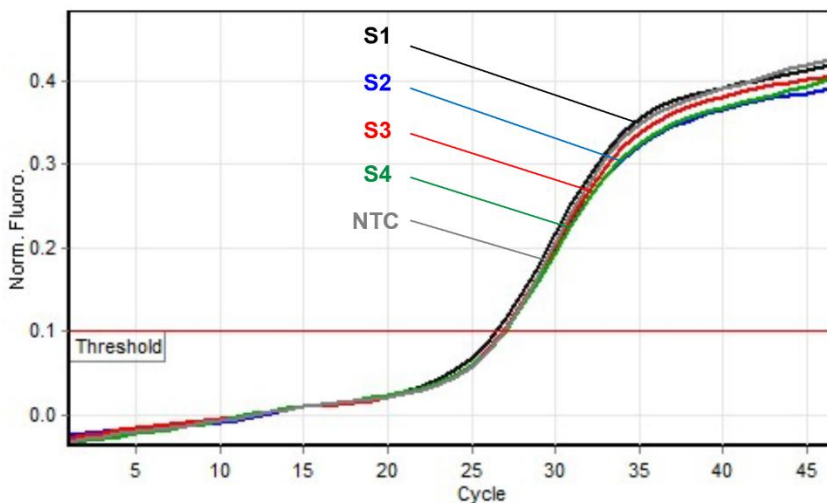
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation Analysis را انتخاب کرده و روی Green کلیک کنید. و آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. این مراحل را برای کانالهای Orange و Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو و سه را ملاحظه فرمایید.



شکل ۱. منحنی استانداردهای HHV-6A در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی استانداردهای HHV-6B در کانال نارنجی دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

افزایش تابش سبز (Green) مربوط به HHV-6A، تابش نارنجی (Orange) مربوط به HHV-6B و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را برای HHV-6A مثبت تلقی نمود و تیتراژ محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که نمونه در کانال نارنجی مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را برای HHV-6B مثبت تلقی نمود و تیتراژ محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های سبز و نارنجی منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد و در کانال زرد دارای CT بیشتر از ۳۵ باشد، نتیجه نامعتبر بوده و استخراج باید تکرار شود.

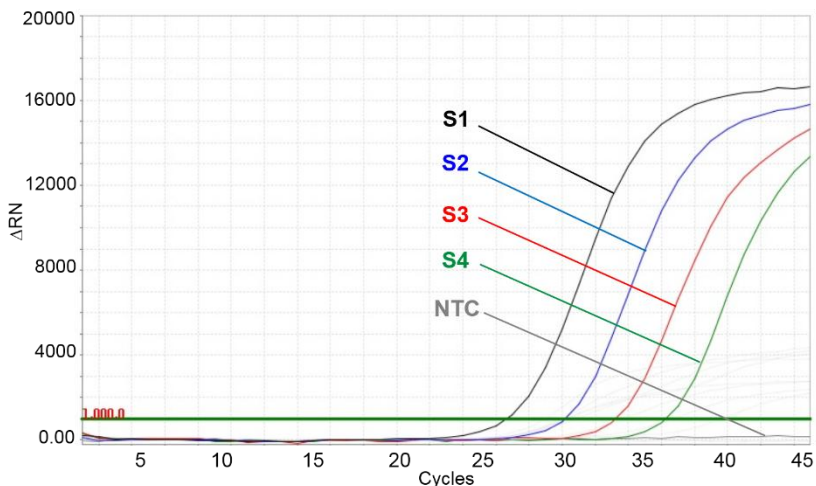
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال سبز ، نارنجی و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

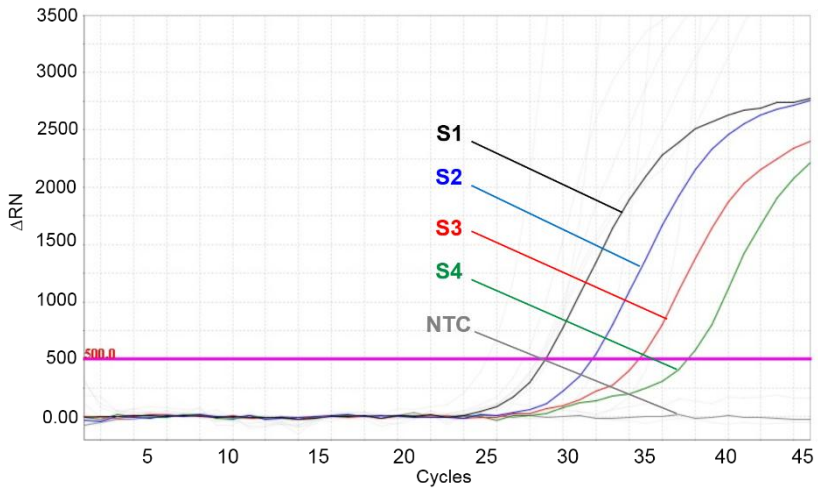
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۱۰۰۰ و برای ROX و VIC آستانه را روی ۵۰۰ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر چهار، پنج و شش را ملاحظه فرمایید.

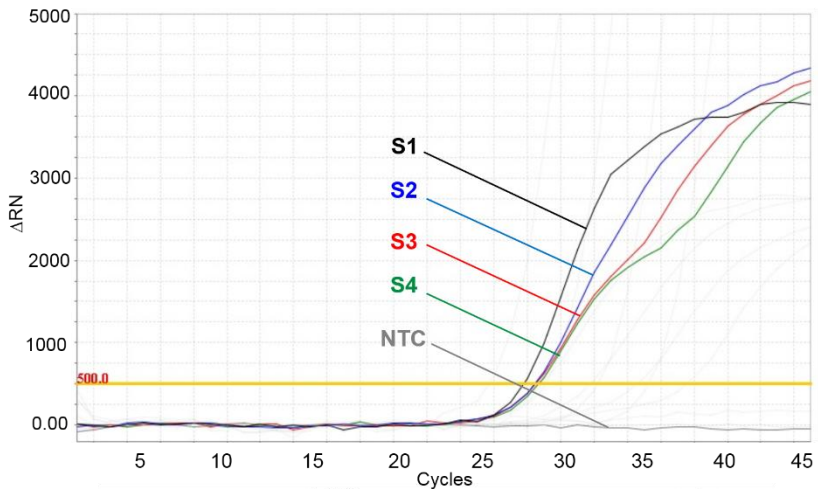
افزایش **تابش FAM** مربوط به **HHV-6A** ، **تابش ROX** مربوط به **HHV-6B** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.



شکل ۴. منحنی استانداردهای HHV-6A در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۵. منحنی استاندارد های HHV-6B در کانال Rox دستگاه استپ وان



شکل ۶. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود، فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال VIC می توان آن را برای HHV-6A **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که نمونه در کانال ROX مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال VIC می توان آن را برای HHV-6B **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد ولی در کانال VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد و در کانال زرد دارای CT بیشتر از ۳۵ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و استخراج باید **تکرار** شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال FAM، ROX و VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیترو ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر (copy/μl) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و شامل بازه یکصد میلیون کپی در میکرولیتر تا ده کپی در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل ده کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

HHV6 RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection and
Quantitation of
HHV-6A and HHV-6B
DNA**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-38-100
Version 1.0
Summer 2020

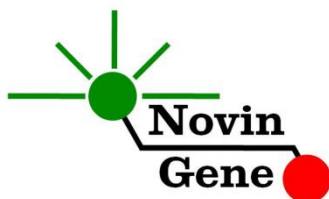


Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. General Precautions.....	3
5. Additionally Required Materials	4
6. Specimen, storage and transport.....	4
7. Interfering substances	5
8. Internal control (IC).....	5
9. DNA isolation.....	6
10. PCR Protocol.....	6
11. Programming of the Rotor-Gene	7
12. Programming of StepOne.....	7
13. Programming other machines	7
14. Data Analysis: Rotor-Gene.....	8
15. Data Analysis: StepOne	11
16. Quantitation.....	13
17. Linear Range.....	14
18. Sensitivity.....	14

HHV6 RQ kit is intended for use with Rotor-Gene or StepOne machines and for the quantitative detection of HHV-6A and HHV-6B DNA. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human Herpesvirus 6 (HHV-6) is a double-stranded DNA virus and a member of Herpesviridae family. It comprises two distinct herpesvirus species of HHV-6A and HHV-6B. Primary infection occurs mostly in early childhood followed by a life-long latent infection. While both viruses may get re-activated later on, HHV-6B is more prone to it especially in post-transplant patients. Both viruses have also been related to nervous system complications including meningitis and encephalitis.

HHV6 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection, differentiation and quantitation of HHV-6A and HHV-6B viruses with Rotor-Gene or StepOne machines. This method provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other available methods. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product.

Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
HHV6 Mix	PCR Master mix*	360 µl
HHV6 S1	Standard 1: 10,000 copy/µl	150 µl
HHV6 S2	Standard 2: 1,000 copy/µl	150 µl
HHV6 S3	Standard 3: 100 copy/µl	150 µl
HHV6 S4	Standard 4: 10 copy/µl	150 µl
HHV6 IC	Internal Control	250ul
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes

and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components **on ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice** after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required items/equipments
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend whole blood or EDTA or citrate plasma for HHV-6 detection. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Sample can be stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well. Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

In order to evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, HHV6 RQ kit contains internal control (IC). IC can be used during extraction process or simply added to HHV6 Mix.

To monitor both DNA extraction and PCR reaction, internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Required volume of internal control is 10% of elution buffer. For instance if extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. **Please note that internal control should not be added directly to the patient sample (i.e. before addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.**

If IC is added to HHV6 Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of internal control should be added to 150ul of HHV6 Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, Internal control should generate a CT of 28-32 in Yellow Channel on Rotor-Gene and a CT of 28-34 in VIC channel on StepOne.

9. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

Pipette 15ul of [HHV6 Mix](#) directly to each tube followed by adding 10ul of [standard](#) or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on Template file, HHV6 strip or HHV6 0.2 according to the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on "Define Targets and Samples" menu. When finished, click on "Start Run" and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly. Please note that HHV6 mix does not contain Rox as passive dye and for reference dye "none" is selected.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC and ROX dyes.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as "standard" and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **HHV-6A (Green channel)**, **HHV-6B (Orange channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green and set the threshold on 0.1. Repeat above for Orange and Yellow channels. Figures 1,2 and 3 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

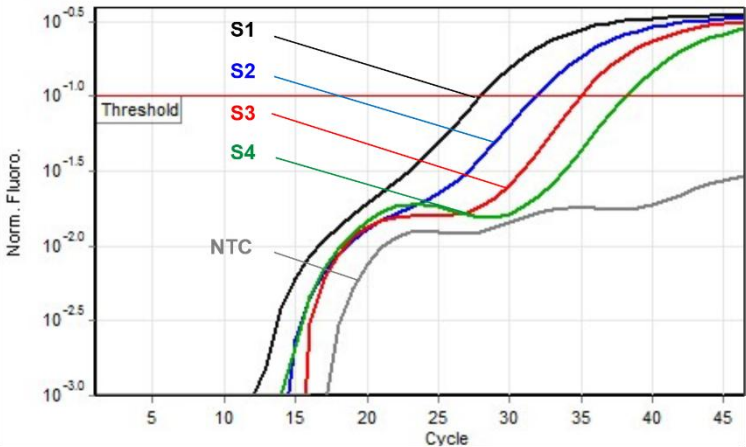


Fig 1. Typical HHV-6A graph in Green channel for Rotor-Gene

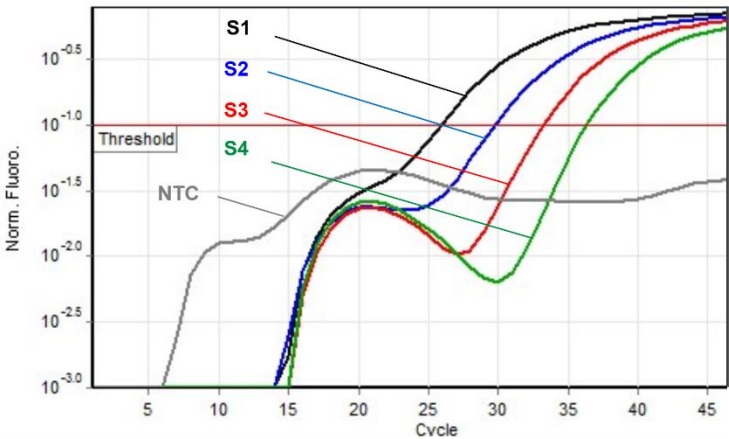


Fig 2. Typical HHV-6B graph in Orange channel for Rotor-Gene

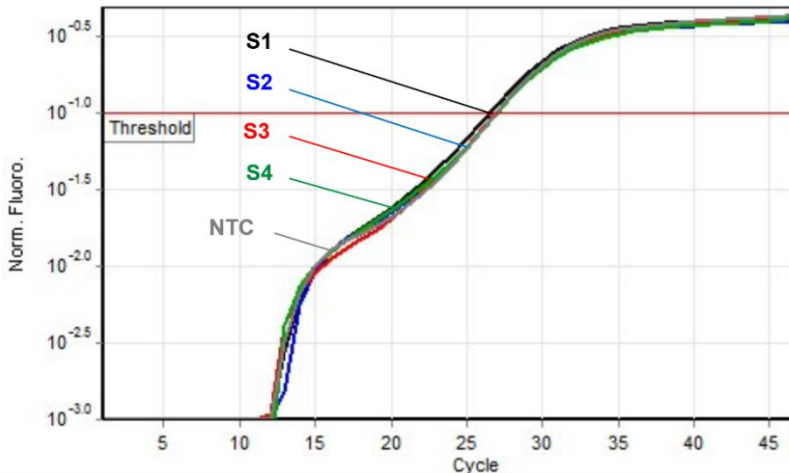


Fig 3. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for HHV-6A if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Positive** for HHV-6B if it is positive in Orange channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Organe are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green and Orgne channels while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.

- Results are **Invalid** and DNA isolation should be repeated if a sample is negative in FAM and ROX with CT of higher than 35 in VIC channels.
- Results are **Invalid** and the test should be repeated if a sample is negative in all of Green, Orange and Yellow channels.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for FAM at 1000 and at 500 for ROX and VIC. Figures 4, 5 and 6 represent typical graphs for StepOne machine.

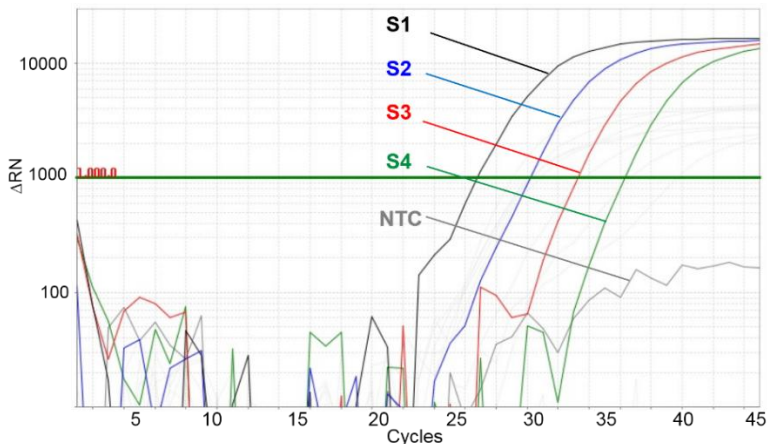


Fig 4. Typical HHV-6A graph in FAM channel for StepOne

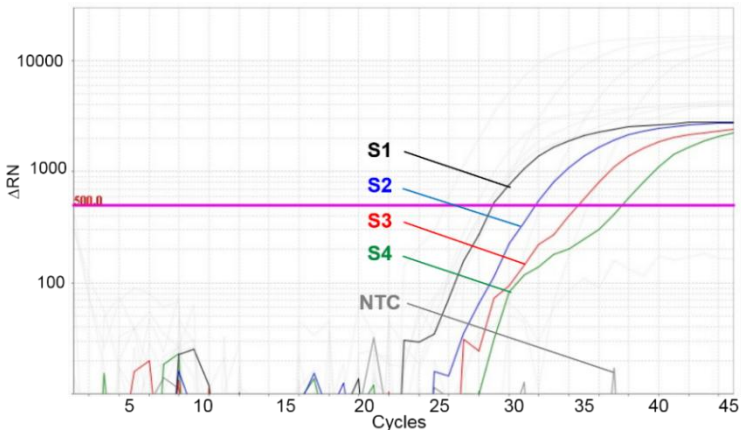


Fig 5. Typical HHV-6B graph in ROX Channel for StepOne

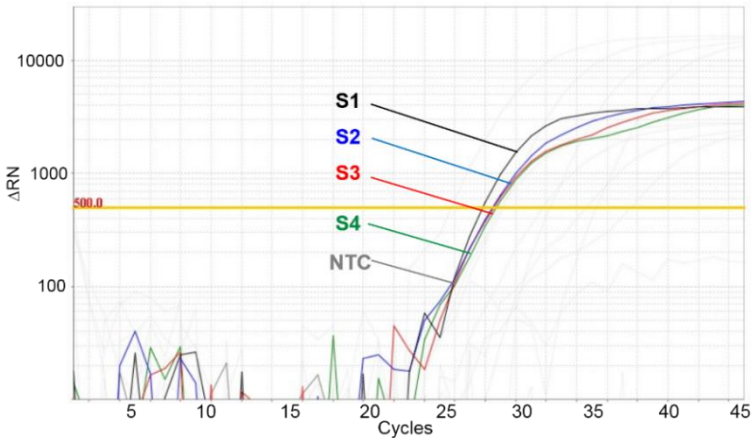


Fig 6. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for HHV-6A if it is positive in FAM channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Positive** for HHV-6B if it is positive in ROX channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM and ROX channels while it is positive in VIC channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Invalid** and DNA isolation should be repeated if a sample is negative in FAM and ROX with CT of higher than 35 in VIC channels.
- Results are **Invalid** and the test should be repeated if a sample is negative in all of FAM, ROX and VIC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the

current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ μ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 100,000,000 copies/ μ l to 10 copy/ μ l.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 10 copy/ μ l.

