

# Vitassay qPCR

## Human Herpes Virus

PCR en tiempo real para la identificación y diferenciación específica de Herpesvirus humano 6, 7 y/o 8 en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the specific identification and differentiation of Human Herpesvirus 6, 7 and/or 8 in clinical samples.





## Uso previsto

Vitassay qPCR Human Herpes Virus permite la identificación y diferenciación específica del Herpesvirus humano 6, Herpesvirus humano 7 y/o Herpesvirus humano 8 en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por Herpesvirus humano 6, Herpesvirus humano 7 y/o Herpesvirus humano 8, junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

## Referencias

Vitassay qPCR Human Herpes Virus 4x8-well strip, low profile	7041067
Vitassay qPCR Human Herpes Virus 4x8-well strip, high profile	7042067

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S067/ 7042S067	HHV 6+7+8 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C067	HHV 6+7+8 Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Los herpesvirus son virus de ADN de doble cadena, cuyos principales huéspedes son los seres humanos. Hasta la fecha se han descubierto ocho herpesvirus humanos: El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1; herpesvirus humano 1), el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2; herpesvirus humano 2), el virus de la varicela-zóster (VZV; herpesvirus humano 3), el virus de Epstein-Barr (EBV; herpesvirus humano 4), citomegalovirus humano (HCMV; herpesvirus humano 5), herpesvirus humano 6 (HHV-6), herpesvirus humano 7 (HHV-7) y herpesvirus humano 8 (HHV-8). Los herpesvirus inducen una infección latente de por vida en el ser humano que origina posteriores reactivaciones y reinfecciones.

El herpesvirus humano 6 (HHV-6) consta de dos virus estrechamente relacionados pero distintos, designados herpesvirus humano 6 variante A (HHV-6A) y herpesvirus humano 6 variante B (HHV-6B). Son miembros de la subfamilia *Betaherpesviridae*, del género *Roseolovirus* junto con el HHV-7. Más del 95% de las personas mayores de 2 años son seropositivas para uno o ambos virus. Los síntomas son enfermedad febril y *exantema subitum* (ES), también conocido como *roseola infantum* o sexta enfermedad), menos comunes son las convulsiones, la erupción cutánea y los síntomas gastrointestinales y del tracto respiratorio.

El herpesvirus humano 7 (HHV-7) es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae*, y género *Roseolovirus*, como el HHV-6. Se supone que la transmisión del HHV-7 y del HHV-6 es por la saliva, ya que los virus se detectan con frecuencia en la saliva y en las glándulas salivales. En la infección primaria por HHV-7, los síntomas son como los de la infección por HHV-6, pero con menor frecuencia.

El herpesvirus humano 8 (HHV-8) también se conoce como herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) y pertenece a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*. Durante la infancia, el KSHV parece transmitirse con la saliva, pero también puede transmitirse dentro de las familias, de madre a hijo y entre hermanos. También puede transmitirse por contacto sexual, además hay indicios que indican que son transmisibles por transfusión de sangre y uso de drogas inyectables. El HHV-8 puede causar una infección primaria, cuyos síntomas clínicos van desde una leve linfadenopatía y diarrea hasta fatiga y erupción cutánea localizada, de todos modos, en individuos sanos, la infección se presenta con síntomas similares a los de la gripe. El sarcoma de Kaposi (KS) es un tumor agresivo, cuyas lesiones tienden a encontrarse en las extremidades inferiores, no siendo una enfermedad letal.

Para el diagnóstico, la técnica más destacada es la cuantificación del ADN viral en sangre, otros fluidos corporales y órganos, mediante la PCR en tiempo real.

## Principio del test

Vitassay qPCR Human Herpes Virus se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *U65-U66* para Herpesvirus humano 6, *U57* para Herpesvirus humano 7 y *ORF73* para Herpesvirus humano 8. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Human Herpes Virus, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Tras la reacción de amplificación, Herpesvirus humano 6 se detecta en el canal FAM, el Herpesvirus humano 7 se detecta en Cy5, el Herpesvirus humano 8 se detecta en el canal ROX, y el Control Interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos

ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.

- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## **Procedimiento**

### **Toma de muestra, preparación y extracción de DNA**

Realizar el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek Molecular).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

### **Preparación del control positivo**

Reconstituir el contenido liofilizado del HHV 6+7+8 Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

### **Preparación de la reacción**

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.

- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

## Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (Herpesvirus humano 6), Cy5 (Herpesvirus humano 7), ROX (Herpesvirus humano 8), y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada (ver Adjunto II).

## Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

### Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM, ROX, y Cy5.

### Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >40 o no señal) de FAM, ROX, y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

Human Herpes Virus				Interpretación
Herpesvirus humano 6 (FAM)	Herpesvirus humano 8 (ROX)	Herpesvirus humano 7 (Cy5)	Control Interno (HEX)	
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 6, Herpesvirus humano 8 y Herpesvirus humano 7 Positivos
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 6 Positivo, Herpesvirus humano 8 y Herpesvirus humano 7 Negativos
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 6 y Herpesvirus humano 8 Positivos, y Herpesvirus humano 7 Negativo
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 6 y Herpesvirus humano 7 Positivos, y Herpesvirus humano 8 Negativo
-	+	-	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 8 Positivo, Herpesvirus humano 6 y Herpesvirus humano 7 Negativos
-	+	+	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 8 y Herpesvirus humano 7 Positivos, Herpesvirus humano 6 Negativo
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	Herpesvirus humano 7 Positivo, Herpesvirus humano 6 y Herpesvirus humano 8 Negativos
-	-	-	+ <sup>2</sup>	DNA molde diana no Detectado <sup>2</sup>
-	-	-	- <sup>2</sup>	Test fallido <sup>2</sup>

**Positivo (+):** Señal de amplificación (Ct ≤40)

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

<sup>1</sup> En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

<sup>2</sup> En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se



recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

### **Control de Calidad**

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

### **Características técnicas**

#### **Sensibilidad y especificidad clínica**

Vitassay qPCR Human Herpes Virus se evaluó con material de referencia de 5 programas EQA (QCMD). Estos paneles constan en total de 50 muestras de plasma congelado o medio de transporte. Los resultados obtenidos utilizando Vitassay qPCR Human Herpes Virus fueron comparados con los informes finales de los programas EQAs y se muestran a continuación:

En total, el kit Vitassay reportó 34 verdaderos positivos y 15 verdaderos negativos. Solo se obtuvo una incongruencia (falso negativo). Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos de este estudio para HPV-6 fueron 0.97 (0.85-0.99) y 1 (0-78-0.99).

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar HHV-6 utilizando Vitassay qPCR Human Herpes Virus.

#### **Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción para Herpesvirus humano 6, Herpesvirus humano 7 y Herpesvirus humano 8.

## Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los Herpesvirus humanos 6, 7 y 8 fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	Virus St Louis Encephalitis cepa 17D	-
<i>Listeria innocua</i> Serotipo 6a/cepa CCUG 15531	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Virus Tick-Borne encephalitis cepa Neudorfl	-
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/cepa CCUG 15528	-	<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	-	Virus Chikungunya (S27 Petersfield)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotipo 1/2b	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Dengue 1 (cepa Hawaii A)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/cepa CIP 59.53	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-	Dengue 2 (cepa New Guinea C)	-
<i>Treponema pallidum</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Dengue 3 (H87)	-
<i>Toxoplasma gondii</i> Tipo II	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue 4 (H241)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Enterovirus tipo 68	-	Virus West Nile (Heja)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Enterovirus tipo 71	-	Virus West Nile (NY99)	-
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotipo Cloaca A	-	Virus Epstein-Barr	-	Virus West Nile (Ug37)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotipo Cloaca B	-	Virus BK Tipo Ib2	-	Virus fiebre amarilla (cepa 17D)	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	Virus BK Tipo IV	-	Echovirus Tipo 30	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Virus JC Tipo 2B	-	Echovirus Tipo 11	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	Virus JC Tipo 1A	-	HSV-1 cepa MacIntyre	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Citomegalovirus cepa AD-169	-	HSV-2 MS	-
<i>Candida albicans</i>	-	Coxsackievirus tipo A24	-	HHV6 cepa Z29	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Coxsackievirus tipo A9	-	HHV6 Tipo A	-/+
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1	-	Coxsackievirus tipo B3	-	HHV6 Tipo B	-/+
<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-	Parechovirus Tipo 3	-	Virus Varicella-Zoster Ellen	-
<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i>	-	Parvovirus B19	-	Virus Varicella Zoster OKA	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	-				

## **Reactividad analítica**

La reactividad de Vitassay qPCR Human Herpes Virus para Herpesvirus humano 6 se evaluó frente a HHV-6 cepa Z29, HHV-6 Tipo A y HHV-6 Tipo B, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Human Herpes Virus para Herpesvirus humano 7 se evaluó frente a una secuencia sintética de Herpesvirus humano 7, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Human Herpes Virus para Herpesvirus humano 8 se evaluó frente a una secuencia sintética de Herpesvirus humano 8, mostrando resultados positivos.

## **Termocicladores compatibles**

Vitassay qPCR Human Herpes Virus ha sido validado en los siguientes equipos:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

## **Limitaciones**

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con muestras en medio de transporte, plasma y LCR. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el HHV 6+7+8 positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>
7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>Azure Biosystems</b>
Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>
Azure Cielo 6
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>Roche</b>
LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>
LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>

Formatos especiales <sup>(7)</sup>
<b>Bio Molecular Systems</b>
Mic Real Time PCR Cycler
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Precision System Science Co., Ltd.</b>
geneLEAD VIII System
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 <sup>(1)</sup>
<b>Applied Biosystems</b>
7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>
7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>
ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
<b>Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Analytik Jena</b>
qTOWER
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>BIOER</b>
QuantGene 9600
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(8)</sup>
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

## Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Applied Biosystems ABI 7500</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®4 80II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Roche Cobas z 480</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
<b>Cepheid Smartcycler®</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler</b>	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Agilent Technologies AriaMx</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene® Q</b>	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

<b>BIONEER Exicycler™ 96</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

\* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.





## Intended use

Vitassay qPCR Human Herpes Virus allows the specific identification and differentiation of Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7, and/or Human Herpesvirus 8 in clinical samples. This product is intended to aid in the diagnosis of Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7 and/or Human Herpesvirus 8 infections, alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Human Herpes Virus 4x8-well strip, low profile	7041067
Vitassay qPCR Human Herpes Virus 4x8-well strip, high profile	7042067

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S067/ 7042S067	HHV 6+7+8 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C067	HHV 6+7+8 Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips

- Powder-free disposal gloves

## Summary

Herpesviruses are double-stranded DNA viruses, and its primary hosts are humans. Eight human herpesviruses have been discovered to date: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1; human herpesvirus 1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2; human herpesvirus 2), varicella-zoster virus (VZV; human herpesvirus 3), Epstein-Barr virus (EBV; human herpesvirus 4), human cytomegalovirus (HCMV; human herpesvirus 5), human herpesvirus 6 (HHV-6), human herpesvirus 7 (HHV-7) and human herpesvirus 8 (HHV-8). The herpesviruses induce a lifelong latent infection in humans which originates further reactivations and reinfections.

The human herpesvirus 6 (HHV-6) consists of two closely related yet distinct viruses, designated human herpesvirus 6 variant A (HHV-6A) and human herpesvirus 6 variant B (HHV-6B). They are members of the *Betaherpesviridae* subfamily, in the *Roseolovirus* genus along with HHV-7. Over 95% of people older than 2 years of age are seropositive for either or both viruses. The symptoms are febrile illness and exanthema subitum (ES), also known as *roseola infantum* or sixth disease), less common are seizures, skin rash, and gastrointestinal and respiratory tract symptoms.

The human herpesvirus 7 (HHV-7) is member of the family *Herpesviridae*, subfamily *Betaherpesvirinae*, and genus *Roseolovirus*, as HHV-6. HHV-7, and HHV-6 transmission is assumed to be by saliva because the viruses are frequently detected in saliva and salivary glands. In primary infection with HHV-7, the symptoms are like those of HHV-6 infection, but lower frequency.

The human herpesvirus 8 (HHV-8) is also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and it belongs to *Gammaherpesvirinae* subfamily. During childhood, KSHV appears to be transmitted with saliva, but also can be transmitted within families, from mother to child as well as among siblings. It can also be transmitted by sexual contact, and there is some evidence for transmission via blood transfusion and injecting drug use. HHV-8 can cause primary infection, which clinical symptoms ranged from mild lymphadenopathy and diarrhea to fatigue and localized rash, anyway in healthy individuals, the infection presents with flu-like symptoms. Kaposi's sarcoma (KS) is an aggressive tumor, which lesions tend to be found in the lower extremities, not being a fatal disease.

For diagnosis, the most prominent technique is the quantification of viral DNA in blood, other body fluids, and organs by means of real-time PCR.

## Principle of the test

Vitassay qPCR Human Herpes Virus is based on the real-time amplification of a conserved region of *U65-U66* genes (Human Herpesvirus 6), *U57* gene (Human Herpesvirus 7) and *ORF73* gene (Human Herpesvirus 8). After DNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Human Herpes Virus is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. After the amplification reaction, Human Herpesvirus 6 is detected in FAM channel, Human Herpesvirus 7 is detected in Cy5 channel, Human Herpesvirus 8 is detected in ROX channel, and the Internal Control (IC) is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

## Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.

- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing, and DNA extraction**

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex Molecular)

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized HHV 6+7+8 Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

### **Reaction setup**

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).

- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

## Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (Human Herpesvirus 6), Cy5 (Human Herpesvirus 7), ROX (Human Herpesvirus 8), and HEX, JOE, or VIC (Internal Control). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none (See Attached II).

## Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

### Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ( $Ct \leq 40$ ) in FAM, ROX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

### Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ( $Ct > 40$  or no signal) in FAM, ROX, and Cy5, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ( $Ct \leq 40$ ) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

Human Herpes Virus				Interpretation
Human Herpesvirus 6 (FAM)	Human Herpesvirus 8 (ROX)	Human Herpesvirus 7 (Cy5)	Internal Control (HEX)	
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 8 and Human Herpesvirus 7 Positives
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 6 Positive, Human Herpesvirus 8 and Human Herpesvirus 7 Negatives
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 8 Positives, and Human Herpesvirus 7 Negative
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7 Positives, and Human Herpesvirus 8 Negative
-	+	-	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 8 Positive, Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7 Negatives
-	+	+	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 8 and Human Herpesvirus 7 Positives, Human Herpesvirus 6 Negative
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	Human Herpesvirus 7 Positive, Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 8 Negatives
-	-	-	+ <sup>2</sup>	Targets not detected <sup>2</sup>
-	-	-	-. <sup>2</sup>	Test failure <sup>2</sup>

**(+) Positive:** Amplification signal (Ct ≤40)

**(-) Negative:** No amplification signal (Ct >40 or no signal)

<sup>1</sup> Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

<sup>2</sup> In the case of negative pathogens target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is a signal' absence or Ct value >35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

### **Quality Control**

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

### **Performance evaluation**

#### **Clinical sensitivity and specificity**

Vitassay qPCR Human Herpes Virus was evaluated with reference material from 5 EQA programs (QCMD). These panels consisted of a total of 50 samples of frozen plasma or transport medium. The results obtained using Vitassay qPCR Human Herpes Virus were compared with the final reports from the EQA programs and are shown below:

In total, the Vitassay kit reported 34 true positives and 15 true negatives. Only one incongruence (false negative) was obtained. The sensitivity and specificity values obtained from this study for HPV-6 were 0.97 (0.85-0.99) and 1 (0.78-0.99).

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity for detecting HHV-6 using Vitassay qPCR Human Herpes Virus.

#### **Analytical sensitivity**

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/reaction. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7, and Human Herpesvirus 8.

#### **Analytical specificity**

The analytical specificity for the Human Herpesvirus 6, 7 and 8 detections, was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species, except for the targeted pathogens of each assay:

**Cross-reactivity testing**

<i>E. coli</i> O.1285;O18:H7:K1	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-	St Louis Encephalitis Virus strain 17D	-
<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/strain CCUG 15531	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Tick-Borne encephalitis Virus strain Neudorfl	-
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	-	<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	-	Chikungunya Virus (S27 Petersfield)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Dengue 1 (strain Hawaii A)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/strain CIP 59.53	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	-	Dengue 2 (strain New Guinea C)	-
<i>Treponema pallidum</i>	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Dengue 3 (H87)	-
<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Dengue 4 (H241)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-	Enterovirus type 68	-	West Nile Virus (Heja)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	Enterovirus type 71	-	West Nile Virus (NY99)	-
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	-	Epstein-Barr Virus	-	West Nile Virus (Ug37)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	BK Virus Type 1b2	-	Yellow fever Virus (strain 17D)	-
<i>Enterococcus durans</i>	-	BK Virus Type IV	-	Echovirus Type 30	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	JC Virus Type 2B	-	Echovirus Type 11	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	-	JC Virus Type 1A	-	HSV-1 strain MacIntyre	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Cytomegalovirus strain AD-169	-	HSV-2 MS	-
<i>Candida albicans</i>	-	Coxsackievirus type A24	-	HHV6 strain Z29	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Coxsackievirus type A9	-	HHV6 Type A	-/+
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	-	Coxsackievirus type B3	-	HHV6 Type B	-/+
<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	-	Parechovirus Type 3	-	Varicella-Zoster Virus Ellen	-
<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i>	-	Parvovirus B19	-	Varicella Zoster Virus OKA	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	-				



## **Analytical reactivity**

The Vitassay qPCR Human Herpes Virus kit's reactivity for Human Herpesvirus 6 was evaluated against HHV-6 strain Z29, HHV-6 Type A and HHV-6 Type B, showing positive results.

The Vitassay qPCR Human Herpes Virus kit's reactivity for Human Herpesvirus 7 was evaluated against a Human Herpesvirus 7 synthetic sequence, showing positive results.

The Vitassay qPCR Human Herpes Virus kit's reactivity for Human Herpesvirus 8 was evaluated against a Human Herpesvirus 8 synthetic sequence, showing positive results.

## **Compatibles real-time PCR equipment**

Vitassay qPCR Human Herpes Virus has been validated on the following equipment:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

## **Limitations**

- All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay has been validated with transport medium, plasma and CSF samples. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by HHV 6+7+8 Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 <sup>(1)</sup>
AriaDx Real-Time PCR System	<b>Applied Biosystems</b>
<b>Applied Biosystems</b>	7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>
7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>	7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>	7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
<b>Azure Biosystems</b>	<b>Agilent Technologies</b>
Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>BIONEER</b>	<b>Analytik Jena</b>
Exicycler™ 96	qTOWER
<b>Bio-Rad</b>	<b>BIONEER</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>	<b>BIOER</b>
<b>Roche</b>	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>	<b>Bio-Rad</b>
LightCycler @96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>Special Formats <sup>(7)</sup></b>	<b>DNA-Technology</b>
<b>Bio Molecular Systems</b>	DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers <sup>(8)</sup>
<b>Cepheid</b>	<b>Eppendorf</b>
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Precision System Science Co., Ltd.</b>	<b>Qiagen</b>
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
<b>Qiagen</b>	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Applied Biosystems ABI 7500</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®48 0II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Roche Cobas z 480</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
<b>Cepheid Smartcycler®</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler</b>	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Agilent Technologies AriaMx</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene® Q</b>	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

<b>BIONEER Exicycler™ 96</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

\*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.










## **Bibliography/Bibliografía**

- Agut H, Bonnafous, P and Gautheret-Dejean A. (2015). Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clinical microbiology reviews*. 28(2):313-335.
- Agus H, Bonnafous P and Gautheret-Dejean A. (2016). Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Microbiology spectrum*. 4(3):10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015.
- Braun DK, Dominguez G and Pellet PE. (1997) Human herpesvirus 6. *Clinical microbiology reviews*. 10(3):521-567.
- Edelman DC. (2005). Human herpesvirus 8 – a novel human pathogen. *Virology journal*. 2:78.
- Lebbé C and Francès C. (2009). Human herpesvirus 8. *Cancer treatment and research*. 146:169-188.
- Mariggio G, Koch S and Schulz TF. (2017). Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 372(1732):20160275.

## Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



**VA** Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)