



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК вірусів ВК/JS методом ПЛР

RevoDx ВКJS qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК вірусів ВК/JS

Для використання у діагностиці *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202334-25 – 25 тестів

IP202334-100 – 100 тестів

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	BKV/JCV RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	BKV/JCV RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок BKV/JCV (BKV/JCV Positive Control)	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок BKV/JCV (BKV/JCV Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільні до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагент BK/JC Virus RM 1 не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть реагенти на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК вірусів BK/JC. Негативні результати не виключають інфікування і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією. Набір RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Набір RevoDx BK/JC Virus qPCR не призначений для дослідження крові на наявність ДНК вірусу BK/JC або для підтвердження діагнозу інфікування вірусом BK/JC
- Потенційні мутації в цільових областях геному вірусів BK/JC, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних результатів тесту.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів відбору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
- Дотримуйтеся інструкцій з використання до наборів для отримання оптимальних результатів ПЛР.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Прилади

Набір RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96, Tianlong Gentier 96, Applied Biosystems QuantStudio5, а також приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite). Але набір також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами HEX та FAM.

Загальний опис

Поліомавіруси - це родина широко розповсюджених і видоспецифічних вірусів, що належать до родини *Papovaviridae*. Два найбільш поширеніших поліомавірусів серед людей - це вірус ВК та вірус JC, які були вперше ідентифіковані в 1970-х роках. Багато людей інфікуються цими вірусами в дитинстві, при цьому хвороба має легкий перебіг. Проте у людей з ослабленим імунітетом може відбуватись реактивація або вторинне інфікування, що може призводити до клінічних станів. Вірус ВК зазвичай пов'язаний з нирковими захворюваннями, наприклад, стеноз сечоводу, геморагічний цистит і нефропатія. Іноді може викликати такі захворювання, як пневмоніт, ретиніт, захворювання печінки та менінгоенцефаліт. Вірус JC найчастіше пов'язаний з прогресуючою мультифокальною лейкоенцефалопатією, а також, можливо, бере участь у розвитку різних пухлин людини.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
- Ніколи не піпетуйте розчини за допомогою рота.
- В лабораторній зоні не можна вживати їжу, напої та палити.
- Необхідно мити руки після контакту зі зрізками та реагентами.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі у лабораторії необхідно користуватись засобами індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки калібровані дозатори та завжди змінюйте наконечники під час роботи з різними рідинами (бажано використовувати наконечники з аерозольним фільтром).
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктів ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація) для уникнення контамінації.
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожну зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.

- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Характеристики набору

Аналітична чутливість Для визначення ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія вірусів BK/JC для отримання кінцевих концентрацій 1000, 250, 45, 10 та 1.6 копій/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 25 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 73 копій/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК BK/JC. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx RSV qPCR Kit становить $\geq 99\%$

Пережресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів вірусів BK/JC і не буде пережресно реагувати з цими патогенами. 15 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на пережресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

Нижче наведені результати пережресної реактивності, як в *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз пережресної реактивності *in silico*

Організм	Цільові олігонуклеотиди
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	Немає гомології
Коронавірус SARS-CoV-2	Немає гомології
Коронавірус людини 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології
SARS-коронавірус	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А і В	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, EV68)	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз пережресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено

WHO International Standard)		
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Примітка: назви подані згідно каталогу виробника

Пережресна контамінація Було оцінено потенційну пережресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР з одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки BK/JC вірусів і 4 негативні зразки. Пережресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 101 клінічний зразок. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit, зіставляються з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (халат, рукавички, окуляри і тп)
- Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
- Мікропробірки 1,5 мл з маркуванням DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стріп-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл
- Бокс біологічного захисту

Протокол

Екстракція вірусної РНК Для екстракції РНК вірусу з клінічних зразків бажано використовувати RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтеся інструкцій виробника обраного набору для виділення ДНК/РНК. В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (для

виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

Внутрішній контроль Внутрішній контроль (Hs_RPP30), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потрапляння виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок містить плазмиду зі вставкою. Позитивний контроль має ампліфікуватись в окремій реакційній пробірці. Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім BK/JC Virus RM 2. Покладіть BK/JC Virus RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадить краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів RM-1 and RM-2 на загальну кількість зразків. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
3. Для приготування майстер-суміші додайте 14 мкл BK/JC Virus RM 1 та 1 мкл BK/JC Virus RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої РНК, позитивного контрольного зразку та негативного контрольного зразку у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу: 95°C, 2 хв, 1 цикл; 95°C 10 сек, 60°C 20 сек, 40 циклів (таблиця 3). Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 1: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Активация полімерази ("горячий" старт)	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами HEX та FAM

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами HEX та FAM.
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу ROX має дорівнювати 26±4, а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати слід інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК вірусів BK/JC)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК вірусів BK/JC виявлена
-	+	ДНК вірусів BK/JC не виявлена
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit	25 тестів	IP202334-25
RevoDx BK/JC Virus qPCR Kit	100 тестів	IP202334-100