



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для кількісного визначення ДНК вірусу ВК методом ПЛР

RevoDx ВК Virus Quantitative qPCR Kit

Інструкція з використання

Кількісне визначення ДНК вірусу ВК

Для використання у діагностиці *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202517-25 – 25 тестів

IP202517-100 – 100 тестів

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш BKV RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш BKV RM-2	25 мкл	100 мкл
3	BKV Внутрішній контрольний зразок	75 мкл	300 мкл
4	Кількісний стандартний зразок 1 (BKV Quantification Standart 1 (10 ⁷ МО/мл))	100 мкл	100 мкл
5	Кількісний стандартний зразок 2 (BKV Quantification Standart 2 (10 ⁷ МО/мл))	100 мкл	100 мкл
6	Кількісний стандартний зразок 3 (BKV Quantification Standart 3 (10 ⁷ МО/мл))	100 мкл	100 мкл
7	Кількісний стандартний зразок 4 (BKV Quantification Standart 4 (10 ⁷ МО/мл))	100 мкл	100 мкл
8	Негативний контрольний зразок BKV (BKV 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 Virus Quantitative 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 BKV 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 аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx BK Virus Quantitative qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для кількісного визначення ДНК вірусу BK у зразках сироватки чи плазми (ЕДТА).

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 Virus Quantitative 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 Virus Quantitative qPCR Kit призначений лише для діагностики *in vitro*.

- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, 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 Virus Quantitative 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

Поліомавірус BK (BKV) - це вірус, який інфікує 90% популяції. Первинне інфікування зазвичай відбувається в ранньому дитинстві, після чого вірус залишається в організмі у латентному стані у шляхах нирок та сечової системи. У людей зі здоровою імунною системою вірус не викликає жодних проблем, проте у пацієнтів з ослабленою імунною системою, наприклад, у людей після трансплантації, можливий розвиток асимптоматичної віремії та/або вірурії. Слід зазначити, що джерелом інфекції також можуть бути ниркові трансплантати, оскільки вірус має значну спорідненість до цих органів.

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 ВК/ЖС 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 повторах. Значення межі виявлення (LoD) становило 73 копій/мл.

Лінійний діапазон Серію розведень зразків віруса ВК приготували за допомогою стандарту -- відкаліброваної плазмідної ДНК, що містить фрагмент генома патогена. Ця стандартна плазміда була відкалібрована за стандартами ВООЗ. У клінічні зразки, негативні щодо наявності ДНК віруса ВК, додавали цей стандарт, щоб отримати кінцеві концентрації в діапазоні від 1×10^3 МО/мл до 1×10^9 МО/мл. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. У цьому діапазоні залежність між логарифмом цільової ДНК і значеннями Ct є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення Ct залежно від логарифму концентрації цільової ДНК, наведено нижче:

Значення $Ct = -3,298$ (логарифм цільової ДНК) + 44,25; з коефіцієнтом кореляції (R2) 1, Верхня межа становить принаймні 1×10^9 МО/мл.

Нижня межа була розрахована за допомогою пробіт-аналізу, виконаного програмою PASW Statistics 18 відповідно до результатів дослідження аналітичної чутливості набору. 95 % нижня довірна межа становить 79 МО/мл. Відповідно до результатів RevoDx BK Virus Quantitative qPCR Kit має лінійний діапазон від 64 МО/мл до 1×10^9 МО/мл.

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

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

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
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
Метаневмовірус 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 epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

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

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР з одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки на ВК вірус і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Збій тест-системи (Whole System Failure) Можливість збою роботи тест-системи аналізували за допомогою стандарту ВООЗ у концентрації, що втричі перевищує 95% позитивне порогове значення, яке було визначено при дослідженні аналітичної чутливості**. До негативних зразків плазми (ЕДТА) та сироватки крові додали комерційний стандартний зразок вірусу ВК від ВООЗ у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 237 МО/мл. Усі 120 зразків із додаванням HBV вірусу ВК дали позитивний результат тесту на ДНК вірусу ВК. Загальна частота збоїв RevoDx BK Virus Quantitative qPCR Kit становить $\leq 1\%$

****Це концентрація аналіту, при якій 95 % тестів дають позитивні результати після серійних розведень міжнародного еталонного матеріалу, наприклад, стандарту ВООЗ або каліброваних еталонних матеріалів.**

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

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції ДНК RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. No: IP201906; 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 Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь 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 (ВК) використовується для перевірки ефективності екстракції ДНК та ампліфікації. При цьому такий контроль передбачає ампліфікацію частини гена РНКаз Р людини, як відноситься до конститутивних генів. Внутрішній контроль може бути ендогенний або екзогенний.

Екзогенний внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставку. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx Purification Kit. **Не додавайте ВК**

безпосередньо у зразок. Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК/1 мкл буфера для елюції). Слабкий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на патоген, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК збудника під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції ДНК/РНК.

Стандартні зразки для кількісного визначення Для створення стандартної кривої для отримання точних даних для кількісного визначення методом ПЛР у реальному часі слід використовувати чотири стандартні зразки (СЗ). Для кожного стандартного зразка відповідну концентрацію слід правильно вказати при програмуванні ампліфікатора для ПЛР у реальному часі перед кожною постановкою, і в кінці реакції стандартна крива буде створена відповідно цих даних. Роботу з кількісними стандартними зразками вірусу ВК слід проводити після підготовки клінічних зразків і негативного контролю в окремій зоні. Кришки пробірок або капілярів клінічних зразків ПОВИННІ бути закриті в цій зоні.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім ВКВ RM 2. Покладіть ВКВ 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 ВКВ RM 1 та 1 мкл ВКВ 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
Активізація полімерази ("гарячий" 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

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

Аналіз даних

Для отримання достовірних результатів, ефективність ПЛР стандартної кривої має бути 90%-110%, а значення R² має бути більше 0,98. В іншому випадку експеримент слід повторити. Концентрація кожного позитивного зразка буде розрахована програмним забезпеченням (ПЗ) відповідно до стандартної кривої в міжнародних одиницях на мілілітр (МО/мл). Через різні початковий об'єм зразка та об'єм елюції під час виділення вірусної ДНК **ПОТРІБНО** використовувати наступну формулу для розрахунку концентрації вихідного клінічного зразка:

Концентрація
вихідного
зразка,
МО/мл

=

Концентрація обчислена ПЗ
(МО/мл) x Об'єм елюції (мкл)

Об'єм зразка, внесений для
виділення (мкл)

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК віруса ВК)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Обчислена концентрація вихідного зразка	Висновок
+	+	<64 МО/мл	Результат валідний. ДНК віруса ВК виявлено. Кількісне визначення неможливе, оскільки кількісний результат нижче значення лінійного діапазону аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.
+	+/-	≥64 МО/мл	Результат валідний. ДНК віруса ВК виявлено в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням, оскільки кількісний результат знаходиться в межах лінійного діапазону аналізу.
+	+/-	>1 x 10 ⁹ МО/мл	Результат дійсний. ДНК віруса ВК виявлено в концентрації >1 x 10 ⁹ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує

			лінійний діапазон аналізу.
-	+	N/A	Результат валідний. Мішень (ДНК віруса ВК) не виявлена.
-	-	N/A	Результат невалідний. Діагностична інтерпретація неможлива.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx BK Virus Quantitative qPCR Kit	25 тестів	IP202517-25
RevoDx BK Virus Quantitative qPCR Kit	100 тестів	IP202517-100