



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК CMV/EBV/HHV-6

RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК вірусів CMV/EBV/HHV-6
Лише для наукових досліджень
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202529-25 – 50 tests
IP202529-100 – 100 tests



Компоненти

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	CMV/EBV/HHV-6 RM-1	700 мкл	1400 мкл
2	CMV/EBV/HHV-6 RM-2	50 мкл	100 мкл
3	CMV/EBV/HHV-6 Внутрішній контрольний зразок (Internal Control)	150 мкл	250 мкл
4	CMV/EBV/HHV-6 Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
5	CMV/EBV/HHV-6 Негативний контрольний зразок (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можуть транспортуватися при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Зберігання при вищих температурах необхідно уникати. Якщо дотримано умов зберігання, усі компоненти набору залишаються стабільними до дати придатності, зазначеної на етикетці продукту.

Флакон CMV/EBV/HHV-6 RM 1 не слід піддавати циклам заморожування–розморожування більше трьох разів, оскільки це може знизити чутливість. У разі необхідності рекомендується розподілити вміст на зручні за об'ємом аликвоти та зберігати при температурі від -25°C до -15°C.

Призначення

Набір RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit призначений для якісного виявлення ДНК вірусу сказу методом ПЛР у реальному часі в зразках сироватки крові, спинномозкової рідини, біоптаті шкіри потиличної ділянки та слини від осіб, які мають ознаки та/або симптоми інфекції, спричиненої вірусом сказу. Негативний результат не виключає наявності інфекції вірусом сказу та не може бути єдиною підставою для прийняття клінічних рішень щодо ведення пацієнта. Отримані негативні результати необхідно оцінювати у поєднанні з клінічними спостереженнями, анамнезом пацієнта та епідеміологічними даними. Набір RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і навченим персоналом клінічних лабораторій, який має відповідну підготовку з методів ПЛР у реальному часі та процедур *in vitro* діагностики.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit призначений 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 збору, 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.

Опис продукту

Набір RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit призначений для якісного виявлення ДНК гена ДНК-полімерази вірусів CMV, EBV та HHV-6 методом ПЛР у реальному часі в одній реакційній пробірці, у якій одночасно детектується внутрішній контроль. Це однокроковий ПЛР-аналіз у реальному часі, у якому внутрішній олігонуклеотидний зонд гібридується з матрицею та розщеплюється 5' - 3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) під час подовження праймера. Розщеплення зонда відбувається лише у випадку справжньої реплікації ДНК, унаслідок чого флуоресцентна мітка відділяється від гасника, що призводить до появи вимірюваного сигналу. Продукти ампліфікації детектуються протягом кількох хвилин завдяки моніторингу зростання інтенсивності флуоресценції, яка експоненційно збільшується з кожним циклом ПЛР. Параметр Ct визначається як номер циклу, на якому інтенсивність флуоресценції перевищує встановлений поріг. Метод проводиться безпосередньо на ДНК, виділеній із клінічних зразків пацієнта. Виявлення ДНК CMV, EBV та HHV-6 відбувається в одній пробірці, у якій одночасно детектується внутрішній контроль.

Для контролю ампліфікації в системі використовується плазмід із вбудованим фрагментом ДНК. Олігонуклеотидні праймери та зонди для детекції CMV, EBV і HHV-6 були підібрані з консервативних ділянок вірусного геному, що забезпечує високу специфічність системи. Набір призначений для специфічного виявлення вірусів CMV, EBV та HHV-6.

Загальний опис

Цитомегаловірус (CMV) належить до підродини бета-герпесвірусів (*Betaherpesvirinae*) родини *Herpesviridae*. Це поширений і видоспецифічний вірус, який може інфікувати багатьох ссавців, включаючи людину. Інфікування CMV є звичним у всіх популяціях і рідко спричиняє симптоми в осіб із нормальною імунною системою. Натомість у імунокомпрометованих пацієнтів він є основною причиною поліорганичних уражень. CMV також є ведучою причиною вроджених інфекцій і одним із головних інфекційних чинників уражень головного мозку та втрати слуху у дітей у США та Західній Європі. Подібно до інших герпесвірусів, після первинного інфікування CMV зберігається в організмі у латентній формі (1). Вірус Епштейна–Барр (EBV) належить до гамма-герпесвірусів (*Gammapherpesvirinae*) і є поширеним збудником інфекцій, який вражає до 95% населення світу (1). EBV — це ДНК-вірус із тороїдальним білковим ядром, оточеним ДНК, нуклеокапсидом із 162 капсомерами, білковим тегументом між нуклеокапсидом і оболонкою та зовнішньою мембраною з глікопротеїновими шипами, закодованими вірусом.

Вірус герпесу людини 6-го типу (HHV-6) був уперше виявлений у лімфоцитах крові дорослих із лімфопроліферативними захворюваннями або СНІДом і спочатку отримав назву В-лімфотропного вірусу людини. Подальші дослідження підтвердили його присутність у CD4⁺-лімфоцитах, що дозволило віднести його до родини *Herpesviridae*. Як шостий ідентифікований представник цієї групи вірусів, він отримав сучасну назву вірусу герпесу людини типу 6 (HHV-6). Подібно до інших герпесвірусів, HHV-6 здатний спричиняти гострі, персистентні та довгочасні інфекції.

Список літератури

- Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* 1971;285:203-214.
- Smith J, DeHavern E. Herpes simplex and human cytomegalovirus replication in WI 38 cells. I. Sequence of viral replication. *J Virol* 1978;12:919-930.

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 поводитися 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.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії використовувати ЗІЗ.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі розідріні 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 повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/ПНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).

Аналітична чутливість: Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту BOO3 для CMV/EBV/HHV-6 із кінцевими концентраціями 1000, 200, 40, 8 та 1,6 МО/мл (IU/ml). Вірусну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення тестували у 24 повторностях. Отримане значення межі виявлення (LoD) становить 37 МО/мл (IU/ml).

Діагностична специфічність: Для визначення діагностичної специфічності набору RevoDx CMV/EBV/HHV-6 Qualitative qPCR Kit було протестовано 107 клінічних зразків, негативних щодо ДНК CMV/EBV/HHV-6, отриманих від індивідуальних донорів. До дослідження включено 51 зразок сироватки крові та 56 зразків плазми EDTA, негативних щодо ДНК цитомегаловірусу людини (HCMV). Жоден із протестованих зразків не дав позитивного результату для цільових патогенів. Отже, діагностична специфічність набору становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність: Під час *in silico* аналізу праймерів і проб набору RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit із послідовностями 29 різних патогенів було підтверджено, що система є високоспецифічною до цільових генів CMV, EBV та HHV-6 і не проявляє перехресної реактивності з іншими збудниками. Додатково було проведено експериментальне тестування для 16 патогенів, перелік яких наведено нижче. Жодного хибнопозитивного результату не виявлено.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Вірус гепатиту В	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
Метапневмовірус людини	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4	Немає гомології
Грип А та В	Немає гомології
Ентеровірус	Немає гомології
Респіраторний синцитіальний вірус	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>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Organism	Source	Result
РНК вірусу гепатиту С (Hepatitis C virus RNA) — 6-й міжнародний стандарт ВООЗ для методів ампліфікації нуклеїнових кислот	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
4-й міжнародний стандарт ВООЗ для ДНК вірусу гепатиту В (HBV DNA) для NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
1-й міжнародний стандарт ВООЗ для РНК SARS-CoV-2	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Коронавірус людини (Human coronavirus 229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Риновірус (Rhinovirus)	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Вірус грипу А (штам A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Вірус грипу А (штам A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Вірус грипу В (штам B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини (штам A2)	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 3	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Перехресна контамінація Проведено оцінку потенційної перехресної контамінації між зразками. Для цього виконано п'ять незалежних серій тестувань, у кожній з яких чергувалися зразки з високою концентрацією CMV/EBV/HHV-6 (позитивні) та негативні зразки. У кожній серії використовували 4 позитивні та 4 негативні зразки. Жодних ознак перехресного забруднення не виявлено, а також не спостерігалося інгібування ПЛР, що підтверджується успішною ампліфікацією внутрішнього контролю у всіх зразках.

Аналіз можливості системного збою проводили з використанням стандарту ВООЗ при концентрації, що становить утричі вище 95% порогу позитивного результату, визначеного під час дослідження аналітичної чутливості.

Негативні клінічні зразки (сироватка та EDTA-плазма) були штучно збагачені стандартом ВООЗ CMV/EBV/HHV-6 до кінцевої концентрації 132 МО/мл (IU/ml). Усі 120 збагачених зразків дали позитивний результат на ДНК CMV/EBV/HHV-6.

Таким чином, частота системного збою для набору RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit становить $\leq 1\%$.

Клінічні порівняльні дослідження Було протестовано 104 клінічні зразки. Отримані результати показали, що дані, отримані за допомогою набору RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit, повністю узгоджуються з результатами, отриманими за допомогою інших приладів, сертифікованих за стандартом CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Cat. No: IP201906; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Засоби індивідуального захисту: лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо
- Мікропіпетки (діапазон об'єму від 0,5 мкл до 1000 мкл)
- Наконечники для мікропіпеток із фільтрами, DNase/RNase-free
- Мікропробірки об'ємом 1,5 мл, DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів або стрип-трубок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

Протокол

Очищення РНК патогену Для виділення вірусної ДНК необхідно використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших наборів для очищення може негативно вплинути на ефективність і точність результатів.

Слід дотримуватися інструкції виробника, наведених у посібнику до набору. Рекомендовано проводити всі етапи роботи у трьох окремих зонах — для очищення ДНК/РНК, для підготовки реакційної суміші та для ампліфікації для уникнення контамінації.

Внутрішній контроль: Наявність внутрішнього контролю під час процедури очищення є обов'язковою. Внутрішній контроль містить *in vitro* транскрибовану РНК із вставкою. Він використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції РНК та для виявлення можливих інгібіторів ПЛР. Для кожного зразка слід додати 2,5 мкл внутрішнього контролю у лізуючий розчин набору RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. **Не додавайте ІС безпосередньо у клінічний зразок.** Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК/1 мкл буфера для елюції). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на один зі збудників, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК чи РНК 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 НК.

Позитивний контроль: Позитивний контроль містить плазмід з відповідною вставкою та ампліфікується 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 CMV/EBV/HHV-6 RM-2. Компонент CMV/EBV/HHV-6 RM 2 слід тримати на льоду. Добре перемішайте кожен реагент і коротко центрифугуйте перед використанням. Після цього перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок.
2. Загальний об'єм Master Mix розраховується шляхом множення об'єму однієї реакції (RM 1 та RM 2) на загальну кількість зразків. Під час розрахунку необхідно врахувати кількість негативних і позитивних контролів, а також клінічних зразків. Щоб уникнути похибок при піпетуванні, рекомендується додати один додатковий об'єм до загальної кількості реакцій.
3. Для приготування Master Mix додайте 14 мкл CMV/EBV/HHV-6 RM 1 та 1 мкл CMV/EBV/HHV-6 RM 2 на кожен зразок у пробірку для суміші. Перемішайте пробірку на вортексі та коротко центрифугуйте у мікроцентрифугу. Додайте 15 мкл Master Mix у пробірки або капіляри для проведення реакції ПЛР у реальному часі для кожного зразка. Додайте 5 мкл ДНК із кожного зразка, а також негативного та позитивного контролю у відповідні пробірки. Коротко центрифугуйте перед початком ампліфікації.
4. Повторіть крок 3 для кожного екстрагованого зразка, негативного та позитивного контролю.
5. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу (таблиця 3). Вказати об'єм зразка 20 мкл. 95°C – 2 хв (1 цикл), 95°C – 10 сек, 56°C – 20 сек (40 циклів). Об'єм реакції: 20 мкл.

Таблиця 3. Програма ампліфікації

Назва етапу	Цикл и	Програма
Активация полімерази	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек*

* Детекція флуоресценції збираються на етапі 60°C; необхідно обрати канали FAM та HEX.

6. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy5. 6. Запустити програму.

7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Для коректної оцінки результатів необхідно, щоб значення Ct позитивного контролю у каналі FAM становило 26 ± 4 , а негативний контроль у всіх каналах не показував сигналу. Якщо ці умови не виконані, експеримент слід повторити.

Сигнал у каналі FAM (CMV)	Сигнал у каналі HEX (HHV-6)	Сигнал у каналі ROX (EBV)	Сигнал у каналі Су-5 (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	-	+/-	Виявлено ДНК CMV (позитивний результат)
-	+	-	+/-	Виявлено ДНК CMV (позитивний результат)
-	-	+	+/-	Виявлено ДНК CMV (позитивний результат)
-	-	-	+	ДНК патогену не виявлено
-	-	-	-	Недійсний результат. Зразок необхідно протестувати повторно.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit	50 tests	IP202529-50
RevoDx CMV/EBV/HHV-6 qPCR Kit	100 tests	IP202529-100