

RevoDx Набір для виявлення ДНК цитомегаловірусу (CMV)

RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення ДНК цитомегаловірусу людини
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP201925-25 – 25 тестів
IP201925-50 – 50 тестів
IP201925-100 – 100 тестів
IP201925-250 – 250 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів в	50 тестів в	100 тестів	250 тестів
1	CMV RM -1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	CMV RM -2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	Внутрішній контроль (Internal control CMV)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	Позитивний контрольний зразок (Positive control CMV)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контрольний зразок (Negative control CMV)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набір можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагенти CMV RM 1 і RM 2 не слід заморожувати-розморожувати більше 3 разів; оскільки це може призвести до зниження чутливості набору. За необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК цитомегаловірусу людини (CMV) у сироватці або плазмі людини (EDTA).

Негативні результати не виключають інфекції, а тому не повинні використовуватись як єдине підґрунтя для прийняття рішення про подальші діагностику та лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням.
- Тільки для діагностики *in vitro*.

- Потенційні мутації в цільових областях геному ЦМВ, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Набір валідовано для використання з сироваткою або плазмою крові людини, зібраною в антикоагулянті EDTA. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання.
- Набір валідовано для використання з набором RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших наборів для екстракції може негативно вплинути на робочі характеристики набору.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних 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.
- RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів з хронічною CMV-інфекцією та для формування стратегії протівірусної терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами.
- 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

RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення гена ДНК-полімерази ДНК ЦМВ з одночасним виявленням внутрішнього контролю.

RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit — це одноетапний ПЛР-аналіз у реальному часі, у якому мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з матрицею та розщеплюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) у міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація кДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) — це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній із зразків пацієнта. Виявлення ДНК ЦМВ проводиться в одній пробірці, в якій одночасно виявляється внутрішній контроль. У наборі використовується внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені. Праймери та зонди для виявлення ЦМВ підібрані щодо консервативних ділянок геному вірусу. Набір призначений для специфічного виявлення ЦМВ.

Прилади

Набір RevoDx Qualitative CMV 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 RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX.

Загальний опис

Цитомегаловіруси (ЦМВ) належать до підродини бетагерпесвірусів і є широко розповсюдженими, але дуже видоспецифічними вірусами, які інфікують багатьох тварин, в тому числі людей. Інфекція ЦМВ поширена в усіх популяціях і рідко пов'язана з симптоматичною інфекцією у здорових організмах. У пацієнтів з ослабленим імунітетом ця інфекція здатна викликати мультиорганні ураження. ЦМВ також здатні викликати вроджені інфекції, захворювання головного мозку та втрату слуху у дітей у Сполучених Штатах та Західній Європі. Як і у випадку з іншими вірусами герпесу, первинне інфікування ЦМВ викликає персистентні інфекції (1).

ЦМВ морфологічно подібний до інших герпесвірусів і є найбільшим представником родини. Вірус складається з ядра розміром 64 нм, оточеного ікосаедричним капсидом розміром 110 нм. Капсид оточений слабо вираженим аморфним тегументом, який сам оточений нещільно приєднаною оболонкою, що містить ліпіди (2). Геном ЦМВ складається з лінійної дволанцюгової молекули ДНК розміром приблизно 240 кб. Геном ЦМВ схожий на геном вірусу простого герпесу тим, що він має довгі та короткі унікальні сегменти, обидва з яких обмежені гомологічними повторюваними послідовностями. Геном ЦМВ приблизно на 50% більший, ніж геном вірусу простого герпесу, і кодує принаймні 35 структурних білків і невизначену кількість неструктурних білків (3). Хоча реплікація ЦМВ дуже подібна до описаної для вірусу простого герпесу, реплікативний цикл набагато повільніший, ніж для простого герпесу (4).

Використані джерела

1. Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. N Engl J Med 1971;285:203-214.
2. Smith J, DeHaven E. Herpes simplex and human cytomegalovirus replication in WI 38 cells. I. Sequence of viral replication. J Virol 1978;12:919-930.
3. Sarov I, Abady I. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirus and dense bodies. Virology 1975;66:464-473.
4. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. J Virol 1974;14:8-19.

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.
- 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 засоби індивідуального захисту.
- На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтеся 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/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- 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 межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту ВООЗ для ЦМВ, щоб отримати кінцеві концентрації 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 44 МО/мл.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit було протестовано 107 клінічних зразків від окремих донорів, негативних щодо наявності ДНК ЦМВ. Було використано 51 клінічний зразок **сироватки** та 56 клінічних зразків **плазми EDTA**. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту на ціль. Діагностична специфіка RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність

Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів CMV і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перелічені нижче 16 збудників були протестовані на перехресну

реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту В	Немає гомології
Вірус гепатиту С	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 (наприклад, C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4	Немає гомології
Вірус грипу А і В	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, EV68)	Немає гомології
Респіраторно-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>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>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Кат . №: 10/266)	Не виявлено
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Кат . №: 18/184)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Кат . №: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Кат . №: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Кат . №: 08/324)	Не виявлено
Human Adenovirus	NIBSC (Кат . №: 16/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат . №: 07/296)	Не виявлено

Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат . №: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат . №: 07/300)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	NIBSC (Кат . №: 16/194)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	NIBSC (Кат . №: 16/296)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Кат . №: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Кат . №: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Кат . №: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Кат . №: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Кат . №: 08/180)	Не виявлено

*використані комерційні стандартні зразки, назви наведено згідно каталогу виробника

Перехресна контамінація

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

Інтенсивність відмов системи (Whole System Failure)

Інтенсивність відмов системи аналізували за допомогою стандарту ВООЗ у концентрації, що втричі перевищує 95% позитивне порогове значення**, яке було визначено аналітичним дослідженням чутливості. До негативних зразків плазми (ЕДТА) та сироватки крові додали комерційний стандартний зразок ЦМВ від ВООЗ у кількості, необхідній для отримання фінальної концентрації 132 МО/мл. Усі 120 зразків із додаванням ЦМВ дали позитивний результат тесту на ДНК ЦМВ. Загальна частота відмов системи RevoDx CMV Qualitative 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 104 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx CMV Qualitative qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Cat №: IP201906 ; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (халат, рукавички, окуляри)

- 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/стрип-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі
- Бокс біологічного захисту

Підготовка зразків

Набір валідовано для використання зі свіжою або замороженою сироваткою чи плазмою людини, зібраною в антикоагулянті EDTA. Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров. Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.

Після відбору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріопробірку з гвинтовою кришкою. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам. Зразки сироватки або плазми можна зберігати при 2-8°C протягом 24 годин або заморозити при -70°C або нижче для тривалого зберігання. Необхідно уникати повторних циклів заморожування/розморожування, оскільки це призведе до зниження титру вірусу.

Зразки необхідно перемішати, перевертаючи пробірки або піпетуючи кілька разів, перед перенесенням у пробірку для зразків. При використанні заморожених зразків, потрібно прогріти їх до кімнатної температури перед початком процедури. При наявності осаду, видалити його центрифугуванням протягом 3 хв при 5000 x g.

Протокол

Очищення ДНК вірусу Для екстракції ДНК вірусу із сироватки або плазми людини, зібраної в антикоагулянті EDTA, бажано використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid 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 Наявність внутрішнього контролю (ВК) під час процедури очищення є необхідною.

Внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* ДНК, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. **Не додавайте ВК безпосередньо у зразок сироватки/плазми.** 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 ЦМВ оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК ЦМВ під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 30 ± 4, інші значення вказують на проблему під час екстракції НК.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю повинні дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім CMV RM-2. Компонент CMV RM-2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть 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 та 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. В окрему пробірку внести реагенти із розрахунку 14 мкл CMV RM-1 і 1 мкл CMV RM-2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки для ПЛР або капіляри для кожного зразка. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, позитивного та негативного контролів у відповідні пробірки. Осадити краплі центрифугуванням.

4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C***	20 сек

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

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM і HEX.

6. Запустити програму.

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

Аналіз даних

Для отримання достовірних результатів значення C_t позитивного контролю по каналу FAM має дорівнювати 26 ± 4 , а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК ЦМВ)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК ЦМВ виявлена
-	+	Результат валідний. ДНК ЦМВ не виявлено
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно