

RevoDx Набір для виявлення ДНК вірусу віспи мавп

RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit

Інструкція з використання
Якісне виявлення ДНК вірусу віспи мавп
Для діагностики in vitro
Для професійного використання

Каталожні номери:
IP202224-100 – 100 тестів
IP202224-500 – 500 тестів



Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	Буферний розчин MPXV RM 1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	Ферментна суміш MPXV RM 2	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контрольний зразок MPXV Positive control	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контрольний зразок MPXV Negative control	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx Monkeypox Virus 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. Реагент MPXV RM1 не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК вірусу віспи мавп. Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути остаточною причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявності інфекції і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією. Набір RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним

персоналом, що пройшов навчання методом ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики in vitro.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx Monkeypox Virus 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

RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit — це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, яка передбачає використання спеціального зонду з флуоресцентною міткою на 5'-кінці і молекулою гасника на 3'-кінці. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею і руйнується 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, 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.

Для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Прилади

Набір RevoDx Monkeypox 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 DT (DT-prime, DT-lite). Але RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit також може використовуватись з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX.

Загальний опис

У кількох регіонах світу наразі спостерігається спалах мавпячої віспи, повний масштаб і наслідки якого залишаються не до кінця з'ясованими. Хвороба зазвичай починається з лихоманки, до якої приєднуються загальна слабкість, біль у м'язах та нездужання — ці симптоми нагадують грипоподібний стан. Зазвичай вони передують появі висипу. Висип починається як макули — плоскі плями на шкірі, потім з'являються тверді вузлики (нодули), далі утворюються пухирці (везикули), які згодом перетворюються на пустули з гнійним вмістом, а після цього покриваються струпами. Вірус передається від людини до людини через тісний контакт з ушкодженнями шкіри,

біологічними рідинами, дихальними краплями, а також через заражені матеріали або предмети.

Збудником є вірус мавпячої віспи — дволанцюговий ДНК-вірус з оболонкою, що належить до роду *Orthopoxvirus* родини *Poxviridae*. Геном вірусу лінійний, розміром приблизно 197 тисяч пар основ, і містить близько 190 відкритих рамок зчитування (ORF) довжиною понад 180 нуклеотидів, що не перекриваються. Як і в інших ортопоксвірусів, центральна кодуєча область (CRS) у межах нуклеотидних позицій приблизно 56000–120000 є висококонсервативною, тоді як кінцеві ділянки геному варіабельні й містять інвертовані кінцеві повтори (ITR).

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 3ІЗ.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними 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 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

Межа виявлення (LoD) - Аналітичне дослідження чутливості:

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень штучно синтезованого фрагмента гену вірусу віспи мавп, щоб отримати кінцеві концентрації 1620, 540, 180, 60 та 20 копій/мл шляхом розведення зразками мазків із поверхні ураження та/або ексудату, зібраними у негативних осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогена очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 86 копій/мл. Це значення LoD було

підтверджено тестуванням додаткових 20 реплікатів із концентрацією 86 копій/мл. Усі 20 реплікатів дали позитивні результати для мішені, таким було підтверджено, що LoD становить 86 копій/мл.

Інклюзивність:

Для послідовностей кожного генотипу, доступних у базах даних NCBI, було проведено інклюзивний аналіз in silico праймерів і зондів RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit. Результати показали, що ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями генотипів з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність:

Перехресна реактивність набору RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу in silico, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз in silico праймерів і зондів RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір є специфічним до своєї мішені і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 25 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не виявлено.

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

Аналіз перехресної реактивності in silico

Організм	Результат
<i>Bacillus subtilis</i>	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 salivarius</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii (PJP)</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</i>	Немає гомології
<i>Listeria monocytogenes</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</i>	Немає гомології
<i>Proteus spp.</i>	Немає гомології
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Немає гомології
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Немає гомології
<i>Aspergillus niger</i>	Немає гомології
<i>Salmonella spp.</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метаневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Legionella pneumophila</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Bordetella pertussis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus dispar</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Listeria monocytogenes</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Кат.№: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Кат.№: 08/324)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус	NIBSC (Кат.№: 16/324)	2.0×10 ⁸ МО/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch /1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат.№: 07/296)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат.№: 07/298)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат.№: 07/300)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Кат.№: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Кат.№: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	NIBSC (Кат.№: 08/120)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 1 типу	NIBSC (Кат.№: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 2 типу	NIBSC (Кат.№: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 3 типу	NIBSC (Кат.№: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 4 типу	NIBSC (Кат.№: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: IP201906; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: IP201920; IdilBiotech, Туреччина) або реагент для виділення DirEXT Nucleic Acid Extraction Reagent (Кат.№: IP202004; IdilBiotech, Туреччина).
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (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.

Підготовка зразків

В якості клінічного матеріалу рекомендується використовувати матеріал з уражених ділянок шкіри, в тому числі мазки з поверхні ураження та/або екссудату, або кірки уражень (при зборі потрібно використовувати кілька уражень). Можна використовувати як сухі тампони (сваби), так і тампони, поміщені у середовище для транспортування вірусів (VTM).

Зразки слід зберігати в холодильнику або заморозити протягом години після збору та транспортувати до лабораторії якомога швидше після збору. Правильна обробка та зберігання зразків під час транспортування є критичною для отримання вірних результатів тестування. Транспортування зразків має відповідати національним та/або міжнародним нормам. Для міжнародного транспортування зразки з підозрюваних ймовірних або підтверджених випадків МРХВ, включаючи клінічні зразки, вірусні ізоляти та культури, слід транспортувати як категорію А, UN2814 «інфекційна речовина, що вражає людей». Усі зразки, що транспортуються, повинні мати відповідну потрібну упаковку, маркування та документацію. Для доставки потрібен сертифікований вантажовідправник небезпечних вантажів. Щоб отримати інформацію про вимоги до транспортування інфекційних речовин, перегляньте Посібник ВООЗ щодо правил транспортування інфекційних речовин.

Зразки, зібрані для дослідження МРХВ, слід зберігати в холодильнику (від 2 до 8 °C) або заморозувати (-20 °C або нижче) протягом однієї години після збору. Якщо транспортування зразка для тестування перевищує 7 днів, зразки слід зберігати при -20°C або нижче. Для більш тривалого зберігання (>60 днів після взяття) рекомендується заморозити зразки при -70°C. Вірусна ДНК, присутня в матеріалі пошкоджень шкіри, є відносно стабільною, якщо зберігати її в темному прохолодному середовищі, що можна враховувати, коли холодний ланцюг недоступний, але транспортування при кімнатній температурі не рекомендується. Слід уникати повторних циклів заморожування-відтавання, оскільки вони можуть погіршити якість зразків.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати набір 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), 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 Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 28 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім МРХВ RM 2. Покладіть компонент МРХВ RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.

- Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів MPXV RM 1 та MPXV 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.
- Для приготування майстер-суміші додайте 14 мкл MPXV RM 1 та 1 мкл MPXV RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку. Внести по 5 мкл позитивного контролю та негативного контролю у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
- Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit	100 тестів	IP202224-100
RevoDx Monkeypox Virus qPCR Kit	500 тестів	IP202224-500

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 та HEX

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

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 28 ± 4 , а негативний контроль у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (вірус Monkeypox)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК вірусу віспи мавп виявлено
-	+	Результат валідний. ДНК збудника не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати