

RevoDx Набір для кількісного визначення ДНК вірусу Варіцелла Зостер (VZV)

RevoDx VZV qPCR Kit

Інструкція з використання

Кількісне визначення ДНК вірусу Варіцелла Зостер (VZV)
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання



Каталожні номери:
IP202240-25 – 25 тестів
IP202240-100 – 100 тестів

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	VZV RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	VZV RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок VZV (Internal Control)	75 мкл	300 мкл
4	Стандартний зразок VZV 1, (Quantification Standart 1) (10^7 МО/мл)	100 мкл	100 мкл
5	Стандартний зразок VZV 2, (Quantification Standart 2) (10^6 МО/мл)	100 мкл	100 мкл
6	Стандартний зразок VZV 3, (Quantification Standart 3) (10^5 МО/мл)	100 мкл	100 мкл
7	Стандартний зразок VZV 4, (Quantification Standart 4) (10^4 МО/мл)	100 мкл	100 мкл
8	Негативний контрольний зразок VZV (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx VZV 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 VZV 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 VZV qPCR Kit — це набір для ПЛР у реальному часі, призначений для кількісного визначення ДНК вірусу Варіцелла Зостер (VZV) у зразках сироватки або плазми людини (EDTA) або спинномозкової (цереброспинальної) рідини (CSF).

Негативні результати не виключають зараження вірусом Варіцелла-Зостер і не повинні використовуватися 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 VZV 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

- RevoDx VZV qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових областях геному VZV, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з сироваткою або плазмою людини, зібраною в антикоагулянті EDTA або зразках спинномозкової рідини. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних або недійсних 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 VZV qPCR Kit – це 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. Графік (стандартна крива), що відображає залежність порогового циклу Ct (по осі Y) від логарифму кількості копій НК Стандартних зразків 1-4 (по осі X), є прямою лінією. Кількісне визначення мішені в досліджуваних зразках здійснюється шляхом вимірювання Ct і використання стандартної кривої для визначення вихідної кількості копій. ПЛР-тест на VZV у реальному часі використовує зовнішні стандартні зразки для обчислення кількісних результатів. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний

зразок. Концентрація ДНК VZV зазначається в міжнародних одиницях/мл (МО/мл).

Загальний опис

Вірус Varicella-Zoster (VZV) — це ДНК-вірус, який належить до групи герпесвірусів і викликає вітряну віспу. Патоген характеризується високим ступенем зараженості, при цьому поширюється через респіраторні виділення або прямий контакт із рідиною з висипу інфікованої людини (1). Після первинної інфекції вірус залишається в організмі в латентному стані та може реактивізуватися пізніше в житті і викликати оперізувальний герпес, широко відомий як оперізувальний лишай. Відомо, що VZV залишається в організмі в латентній формі в сенсорних нервових гангліях (1).

Симптоми вітряної віспи включають сверблячий висип, який починається на грудях, спині та обличчі та поширюється на решту тіла, лихоманку, головний біль і втому (2). Висип виглядає як маленькі, наповнені рідиною пухирі, які згодом покриваються струпами та загоюються протягом двох-чотирьох тижнів (3). Більшість людей одужують без ускладнень, але важкі випадки можуть призвести до пневмонії, енцефаліту та навіть смерті (2).

Список використаних джерел

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Varicella (Chickenpox). Посилання <https://www.cdc.gov/chickenpox/index.html>
2. Mayo Clinic. (2021). Chickenpox. Посилання <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chickenpox/symptoms-causes/syc-20351282>
3. National Health Service. (2019). Chickenpox. Посилання <https://www.nhs.uk/conditions/chickenpox/>

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 кожену 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 VZV від BOO3 для отримання кінцевих концентрацій 160, 80, 40, 20, 10 і 5 МО/мл. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) були розраховані методом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило **92 МО/мл**.

Лінійний діапазон Для визначення верхньої межі виявлення було підготовлено серію розведень еталонного матеріалу VZV у діапазоні від 1×10^3 МО/мл до 1×10^6 МО/мл. Зразки з високою концентрацією (1×10^7 , 1×10^8 і 1×10^9 МО/мл) готували за допомогою відкаліброваної плазмідної ДНК, що містить вставку – фрагмент геному VZV. У цьому діапазоні залежність між логарифмом концентрації цільової ДНК і значеннями Ct є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення Ct залежно від логарифму концентрації цільової ДНК, наведено нижче:

$Ct \text{ значення} = - 3,372 (\text{логарифм цільової ДНК}) + 44,86$; з коефіцієнтом кореляції (R^2) 0,999.
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 досліджень чутливості набору.
Визначений динамічний діапазон для RevoDx VZV qPCR Kit: **99 - 1×10^9 МО/мл***.

Прецизійність Була оцінена точність (прецизійність) результатів набору щодо внутрішньоаналітичної варіації або повторюваності (intra-assay), міжаналітичної варіації (inter-assay) та міжпартійної варіації (inter-batch). Для кожного аналізу було використано 24 повтори з використанням міжнародних стандартів VZV від BOO3 з концентрацією 10^4 МО/мл. Статистичний аналіз виконували за допомогою програми PASW Statistics. Статистичний аналіз виконували за допомогою програми PASW Statistics. Загальна точність, що пов'язана зі значеннями Ct (**відтворюваність**), була підсумована в наступних таблицях.

Таблиця 2: Описова статистика для даних щодо точності роботи набору

Описова статистика					
	Кількість, N	Середнє значення, Mean	Стандартне відхилення, Std.Deviation	Дисперсія, Variance	Коефіцієнт варіації, Coefficient of variation (%)
Intra-assay	24	30.48	0.39	0.194	1.28
Inter-assay	24	30.77	0.31	0.112	1.01
Inter-batch	24	30.56	0.44	0.178	1.44

PAZO M	72	30.61	0.51	0.298	1.67
-----------	----	-------	------	-------	------

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx VZV qPCR Kit було протестовано 121 клінічний зразок ДНК VZV від окремих донорів, що дали негативний результат. Було використано 62 клінічних зразки сироватки та 59 клінічних зразків плазми EDTA, негативних на наявність ДНК вірусу VZV. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту на ціль. Діагностична специфіка RevoDx VZV qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

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 VZV і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 132 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, зібрані RevoDx VZV qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE. Логарифмічні концентрації всіх клінічних зразків знаходяться в межах ± 1 логарифмічних концентрацій результату порівняльного набору.

Перехресна реактивність Щоб перевірити специфічність аналізу, слід провести дослідження перехресної реактивності для потенційних маркерів перехресної реакції. У цьому дослідженні специфічність аналізу оцінювалася шляхом тестування 11 еталонних організмів.

RevoDx VZV qPCR Kit не дає перехресної реакції з наступними потенційними патогенами щодо перехресної реакції:

Організм	Джерело	Результат
Human Cytomegalovirus (HCMV)	NIBSC (Кат . №: 09/162)	Не виявлено
Human Adenovirus DNA	NIBSC (Cat. No: 16/324)	Не виявлено
Hepatitis C virus	NIBSC (Cat. №: 06/102)	Не виявлено
HHV-6 Virus 1st WHO International Standard	NIBSC (Cat. No: 15/266)	Не виявлено
BK Virus (BKV) (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 14/212)	Не виявлено
JC Virus (JCV) DNA (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 14/114)	Не виявлено
Parvovirus B19	NIBSC (Cat. No: 99/686)	Не виявлено
Human Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1)	NIBSC (Cat. No: 08/224)	Не виявлено
Human Herpes Simplex virus type 2 (HSV-2)	NIBSC (Cat. No: 08/226)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. №: 16/194)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. №: 16/296)	Не виявлено

*використані комерційні стандартні зразки, назви наведено згідно каталогу виробника

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 50 негативних зразків плазми (EDTA) та 50 зразків сироватки крові додали комерційний стандартний зразок VZV від ВООЗ у кількості, необхідній для отримання фінальної концентрації 276 МО/мл. Усі 100 зразків із додаванням VZV дали позитивний результат тесту на ДНК VZV. Загальна частота відмов набору RevoDx VZV 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.**

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: 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.

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі свіжою або замороженою сироваткою або плазмою людини, зібраною в антикоагулянті EDTA, або зразках спинномозкової рідини (CSF). 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 з 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 збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в криовіальну пробірку 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

довести 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 та плазми людини, зібраної в антикоагулянті EDTA, або цереброспінальної рідини, 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 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 VZV, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК VZV під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 33 ± 4, інші значення вказують на проблему під час екстракції ДНК.

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 VZV 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 VZV RM-2. Компонент VZV RM 2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним 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 VZV RM-1 і 1 мкл VZV RM-2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків,

стандартів 1-4 та негативного контролю 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, для стандартної кривої ефективність ПЛР 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 (VZV)	Сигнал по каналу HEX (ВК)	Обчислення на концентрація вихідного клінічного зразка	Висновок
+	+	<99 МО/мл	Результат валідний. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат є нижчим за значення аналітичної чутливості набору. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.
+	+/-	≥99 МО/мл	Результат валідний. ДНК VZV виявлена в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням

+	+/-	$>1 \times 10^9$ МО/мл	Результат валідний. ДНК VZV виявлена в концентрації $>1 \times 10^9$ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон набору.
-	+	N/A	Результат валідний. Мішень (ДНК VZV) не виявлено.
-	-	N/A	Результат невалідний. Діагностична інтерпретація неможлива.