



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для кількісного визначення ДНК парвовірусу B19 методом ПЛР

RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit

Інструкція з використання

**Кількісне визначення ДНК парвовірусу B19
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202345-25 – 25 тестів
IP202345-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш PV-B19 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш PV-B19 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок PV-B19 Internal Control	75 мкл	300 мкл
4	Стандартний зразок PV-B19 №1 Quantification Standart 1 (10 ⁷ МО/мл)	100 мкл	100 мкл
5	Стандартний зразок PV-B19 №2 Quantification Standart 2 (10 ⁶ МО/мл)	100 мкл	100 мкл
6	Стандартний зразок PV-B19 №3 Quantification Standart 3 (10 ⁵ МО/мл)	100 мкл	100 мкл
7	Стандартний зразок PV-B19 №4 Quantification Standart 4 (10 ⁴ МО/мл)	100 мкл	100 мкл
8	Негативний контрольний зразок PV-B19 Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Parvovirus B19 Quantitative 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 PV-B19 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 Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit — це набір для ПЛР у реальному часі, призначений для кількісного визначення ДНК парвовірусу B19 (PV-B19) у зразках сироватки або плазми людини (EDTA).

Негативні результати не виключають зараження парвовірусом B19 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 Parvovirus B19 Quantitative 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 Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових областях геному PV-B19, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з сироваткою або плазмою 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.

- 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 Parvovirus B19 Quantitative 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.

Графік (стандартна крива), що відображає залежність порогового циклу Ct (по осі Y) від логарифму кількості копій ДНК 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 PV-B19 передбачає використання зовнішніх стандартних зразків для обчислення кількісних результатів. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок. Концентрація ДНК PV-B19 зазначається в міжнародних одиницях/мл (МО/мл).

Прилади

Набір RevoDx Parvovirus B19 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 FAM і HEX.

Загальний опис

Парвовірус людини B19 (B19V) — невеликий одноланцюговий ДНК-вірус, який належить до родини *Parvoviridae*. Патоген при інфікуванні викликає кілька клінічних проявів, включаючи інфекційну еритему (п'ята хвороба), артрит, водянку плода та апластичну анемію, особливо в осіб із гематологічними розладами або ослабленою імунною системою.

Аналіз методом ПЛР дозволяє виявити вірусну ДНК у клінічних зразках, таких як кров, сироватка або респіраторні виділення. ПЛР є високочутливим і специфічним методом, тому може бути особливо корисним для діагностики гострих інфекцій, особливо у випадках, коли серологічні тести можуть

дати хибнонегативні результати.

Кількісні аналізи ПЛР можуть визначити вірусне навантаження В19V у клінічних зразках, що дозволяє клініцистам контролювати прогресування захворювання та оцінювати відповідь на лікування. Цей моніторинг особливо актуальний у випадках персистуючої або хронічної інфекції В19V, коли динаміка вірусного навантаження може впливати на клінічне лікування.

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 вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі 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

Аналітична чутливість Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту PV-B19 від ВООЗ для отримання кінцевих концентрацій 1000, 250, 45, 10 та 1.6 МО/мл. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) були розраховані методом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 73 МО/мл.

Лінійний діапазон Для визначення верхньої межі виявлення було підготовлено серію розведень кількісного стандартного зразка PV-B19. Плазмідну ДНК зі вставкою гену PV-B19 калібрували відносно стандартного зразка від ВООЗ. До негативних зразків додавали відкалібрований стандарт для

досягнення концентрацій у діапазоні від 1×10^3 МО/мл до 1×10^6 МО/мл. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. У цьому діапазоні залежність між логарифмом концентрації цільової ДНК і значеннями C_t є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення C_t залежно від логарифму концентрації цільової ДНК, наведено нижче:

C_t значення = $-3,314$ (логарифм цільової ДНК) + $43,24$; з коефіцієнтом кореляції (R^2) 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 досліджень чутливості набору. 95 % нижня довірча межа становить 73 МО/мл.

Визначений динамічний діапазон для RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit: **73 - 1×10^9 МО/мл***.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків ДНК PV-B19 від окремих донорів, що дали негативний результат. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту на ціль. Діагностична специфіка RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit становить ≥ 99 %.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів PB-B19 і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перелічені нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Parvovirus B19 Quantitative 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
Цитомегаловірус (CMV)	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	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус паргрипу 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
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

*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 PV-B19 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 PV-B19 від ВООЗ у кількості, необхідній для отримання фінальної концентрації 219 МО/мл. Усі 120 зразків із додаванням PV-B19 дали позитивний результат тесту на ДНК PV-B19. Загальна частота відмов набору RevoDx Parvovirus B19 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, зібрані RevoDx Parvovirus B19 Quantitative 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 (Кат. №: IP201906; 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.

Протокол

Очищення ДНК вірусу Для екстракції ДНК вірусу із сироватки та 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, 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 PV-B19, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК PV-B19 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 PV-B19 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

- Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім PV-B19 RM-2. Компонент PV-B19 RM 2 тримати на льоду. 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 RM-1 та RM-2 на загальну кількість. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий

- зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
- В окрему пробірку внести реагенти із розрахунку 14 мкл PV-B19 RM-1 і 1 мкл PV-B19 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. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, СЗ 1-4 та негативного контролю у відповідні пробірки. Осадити краплі центрифугуванням.
 - 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

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

Аналіз даних

Щоб отримати достовірні результати, для стандартної кривої ефективність ПЛР має бути між 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 (PV-B19)	Сигнал по каналу HEX (BK)	Обчислена концентрація вихідного клінічного зразка	Висновок
+	+	<73 МО/мл	Результат валідний. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат є нижчим за значення аналітичної чутливості аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.

+	+/-	≥73 МО/мл	Результат валідний. ДНК PV-B19 виявлена в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням
+	+/-	>1 x 10 ⁹ МО/мл	Результат валідний. ДНК PV-B19 виявлена в концентрації >1 x 10 ⁹ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон аналізу.
-	+	N/A	Результат валідний. Мішень (ДНК PV-B19) не виявлено.
-	-	N/A	Результат невалідний. Діагностична інтерпретація неможлива.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit	25 тестів	IP202345-25
RevoDx Parvovirus B19 Quantitative qPCR Kit	100 тестів	IP202345-100