

НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ JC

JCV DNA Quantitation (QT)

Кат. №: **JCVDNAQT.CE.150**
Кількість тестів: **150**

Дата випуску інструкції: **10-2019**
Версія: **6**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Кількісне визначення ДНК вірусу JC (QT)
ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному Вірусу JC

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір для **Кількісного визначення ДНК вірусу JC методом ПЛР** у режимі реального часу, кат. № **JCVDNAQT.CE.150**, призначений для кількісного визначення ДНК Вірусу JC у плазмі, сечі та спинномозковій рідині (СМР) людини з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою **Внутрішнього контролю (IC)**.
Набір адаптований для використання на Термоциклерах для визначення в режимі реального часу та Системі визначення послідовності ABI 7500® (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems™), MX3000P (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene™) та CFX96 (програмне забезпечення CFX manager версії 1.7, Biorad™).

*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applied Corproation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.

**Biorad є зареєстрованою торговою маркою.

***Stratagene є зареєстрованою торговою маркою.

В. ВСТУП

Вірус JC поліоми людини (*Polyomavirus hominis 2*) належить до роду *Polyomaviridae*, які є ДНК-вірусами без оболонки, що містять коло дволанцюгової ДНК розміром близько 5 КБ (КВ). Вперше виявлено в 1965 році за допомогою електронної мікроскопії у випадках прогресуючої мультифокальної лейкоенцефалопатії (PML) і вперше виділено в культурі в 1971 році.

До 90% дорослих є серопозитивними. Основний шлях передачі точно не визначений, але повідомлялося про зв'язок первинної поліомавірусної інфекції з легкими захворюваннями дихальних шляхів та циститом. Наявність вірусу JC у зразках калу дітей свідчить про те, що фекально-оральний шлях передачі може відігравати певну роль у поширенні вірусу. Після проникнення в носія вірус JC часто встановлює латентні та/або стійкі інфекції з постійною присутністю в різних органах, включаючи нирки. Вірус залишається в стані спокою, якщо не введено природний або ятрогенний стан імуносупресії.

Вірус JC є збудником прогресуючої мультифокальної лейкоенцефалопатії (PML) - захворювання центральної нервової системи, що характеризується множинними вогнищами демієлінізації, спричиненими літичною інфекцією вірусу JC олігодендроцитів. Повідомлялося про PML серед реципієнтів серця, нирок і печінки. Вірус JC також асоціюється з нефропатією, пов'язаною з поліомавірусом (PVAN), і показаний як коагент з вірусом BK у деяких випадках PVAN у пацієнтів із трансплантованою ниркою.

Діагностика інфекції вірусу JC зазвичай вимагає біопсії ураженого органу та демонстрації наявності поліомавірусу в тканині за допомогою електронної мікроскопії, імуногістохімії. За останні кілька років молекулярний аналіз, такий як ПЛР-аналіз в реальному часі, був продемонстрований як корисний інструмент для виявлення/кількісної оцінки вірусу JC завдяки високій чутливості, специфічності та простоті використання і швидкості виконання методу.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір, кат. № JCVDNAQT.CE.150, заснований на аналізі в реальному часі, що використовує специфічні Праймери та Проби.

ДНК вірусу JC, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, ампліфікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Ампліфікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності вірусу JC.

Внутрішній контроль (IC) служить контролем екстракції/ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.

Надається стандартна крива, що дозволяє визначити вірусне навантаження.

D. КОМПОНЕНТИ

Набір, кат. № JCVDNAQT.CE.150, містить реагенти для 150 тестів.

Компонент	Вміст	JCVDNAQT.CE.150 150 тестів
A КОД: ALL/ММ-4 КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ	Майстер-мікс	х 3 флакони/0.825 мл (мл)
B КОД: JCV/СВ КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЖОВТИЙ	Ліофілізовані Праймери/Проби	х 6 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
C КОД: ALL/С КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	МГ Вода	х 6 флаконів/1.5 мл (мл)
NTC КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ	Негативний контроль	х 1 флакон/1.5 мл (мл)
STD Кількісний стандарт (1.6x10 ⁵ копій/мкл (μl))	Ліофілізований Кількісний стандарт	х 6 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
IC Внутрішній контроль	Ліофілізований Внутрішній контроль	х 6 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
КОД: ALL/IC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЗЕЛЕНИЙ		
Вкладка інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом Dia.Pro може надати реагенти для 25, 50, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент А	x1 флакон/0.4 мл (мл)	X1 флакони/0.825 мл (мл)	X2 флакони/0.825 мл (мл)
2. Компонент В	x1 флакон	X2 флакони	X4 флакони
3. Компонент С	x2 флакони/1.5 мл (мл)	x4 флакони/1.5 мл (мл)	X4 флакони/1.5 мл (мл)
4. NTC	x1 флакон/1.5 мл (мл)	x1 флакон/1.5 мл (мл)	x1 флакон/1.5 мл (мл)
5. IC	x1 флакон	x2 флакони	x4 флакони
6. STD	x3 флакони	x6 флаконів	x4 флакони
7. Інструкція	1	1	1
Кількість тестів	25	50	100
Код	JCVDNAQT.CE.25	JCVDNAQT.CE.50	JCVDNAQT.CE.100

Е. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір JCVDNAQT.CE.150 необхідно зберігати при +2...8 °C (°C).

Після розчинення **Компонент В** (кодування JCV/CB) і **Компонент IC** (кодування ALL/IC) стабільні протягом 4 місяців при -20 °C (°C). Після

розчинення **Компонент STD** (кодований JCV/STD) стабільний протягом 2 тижнів при -20 °C (°C). Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

F. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Відкалібровані мікродозатори (0,5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
2. Набір для екстракції ДНК.
3. MG EtOH.
4. Термоблок.
5. Мікроцентрифуга.
6. Штативи для пробірок.
7. Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
8. Безнуклеазні мікропробірки.
9. 0,2 мл (ml) мікропробірки, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без тальку.
11. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
12. Абсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(*) **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом завідувача лабораторією.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечно та ефективно.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі.
7. Компоненти А і В є світлочутливими. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації стола, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не замінювалися.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або агрегатів. Якщо ні, порекомендуйте завідувачу лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішній етикетці контейнера.
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки/крові/плазми людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів і використовуйте окреме приміщення для обробки.

17. Розчиніть ліофілізовані реагенти коректною кількістю, зазначеною на етикетках, води молекулярного класу (Компонент С, код: ALL/C), що входить до набору.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.
19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
20. Використання одноразового пластикового посуду рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Збір спинномозкової рідини (СМР) проводиться асептично шляхом люмбальної пункції.
3. Жодного впливу не спостерігалось при приготуванні зразка з цитратом чи ЕДТА.
Увага: Гепарин (≥ 10 МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР. Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати гепаринізовані зразки пацієнтів.
4. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків плазми, сечі та СМР.
5. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
6. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
7. Плазму, сечу та СМР, якщо вони не використовуються негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при -20 °C .. -80 °C (°C). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -80 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
8. Зразки плазми для екстракції ДНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати їх при +2/+8 °C (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
9. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 300 мкл (µl)) і зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
10. Використовуючи заморожені зразки, розморожуйте зразки безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути можливих випадків деградації нуклеїнової кислоти.

I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Майстер-мікс:

Компонент А. Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі та центрифугуйте протягом короткого проміжку часу, щоб зібрати весь об'єм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Праймери/Проби:

Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчиненим на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

N.T.C. Готовий до використання.

Стандартна крива:

STD.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований STD з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчиненим на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте 4 безнуклеазні пробірки для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення STD 1:10 у Компоненті С (код: ALL/C), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

Підготовка Стандартної кривої		
STD	Калібратор 160000 копій/мкл (µl)	Додайте об'єм Компонента С (код: ALL/C), як написано на етикетці флакона
STD 1	16000 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 2	1600 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 1) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 3	160 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 2) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 4	16 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 3) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)

Внутрішній контроль:

I.C.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчиненим на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікродозатори** повинні бути відкалібровані для дозування правильного об'єму, необхідного для аналізу, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та істинність +/- 5%.
2. **Набір для екстракції:** Набір JCVDNAQT.CE.150 призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp DNA Mini з кодом: 51306 (QIAGEN), набором NucleoSpin Blood з кодом: 740951 (Macherey-Nagel), набором NA Body Fluid з кодом: D-2021

(Chemagen розповсюджується Dia.Pro). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.

3. **Термоциклери в режимі реального часу програмне забезпечення інструментів.** Набір JCVDNAQT.CE.150 призначений для використання тільки в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene) та CFX96 RTS, програмним забезпеченням CFX manager версія 1.7, Biorad).

Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. ПЕРЕВІРКА ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки набору. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або агрегатами, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (Код: ALL/C), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтеся посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікродозатори на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція ДНК

Крок екстракції геномної ДНК вірусу JC має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Набори для ручної екстракції

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/сеча/CMP	Nucleospin Blood	740951	MN™
Плазма/сеча/CMP	Набір QIAamp DNA mini®	51306	Qiagen™

Набір для автоматичної екстракції в поєднанні з інструментом DIA.FASTEX

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/сеча/CMP	Набір NA Body Fluid	D-2021	Chemagen, дистрибується Dia.Pro

Виділення ДНК необхідно проводити тільки відповідно до Інструкції з експлуатації (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro).

Важлива примітка: У процедурах екстракції необхідно суворо використовувати наступні об'єми:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм елюювання мкл (µl)
Nucleospin Blood	200	100
Набір QIAamp DNA mini®	200	100
Набір NA Body Fluid	200	100

Екстраговану із зразків ДНК, не використану під час аналізу, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

Важлива примітка: ІС набору JCVDNAQT.CE.150 можна використовувати в процедурі ізоляції як контроль екстракції. Значення Ст Внутрішнього Контролю використовується для оцінки того, чи була процедура екстракції ДНК виконана коректно (див. розділ Q).

Для цього застосування

ЗРАЗКИ ПЛАЗМИ/СМР

- **Набір Nucleospin Blood та набір QIAamp DNA mini: Додайте 5 мкл (µl) І.С. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.**
- **Набір NA Vody Fluid: Додайте 5 мкл (µl) І.С. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкцій, наданих виробником Набору для екстракції.**

ЗРАЗКИ СЕЧІ

- **Набір Nucleospin Blood та набір QIAamp DNA mini: Додайте 10 мкл (µl) І.С. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.**
- **Набір NA Vody Fluid: Додайте 10 мкл (µl) І.С. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкцій, наданих виробником Набору для екстракції.**

Н.2 Постановка реакції

Набір **JCVDNAQT.CE.150** призначений для використання виключно в комбінації зі стандартом ABI 7500 (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems), МХ3000Р (програмне забезпечення МхPro версії 4.01, Stratagene) та CFX96 (CFX manager версії 1.7, Biorad).

Н.2.1 Підготовка ПЛР

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі О. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі І.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в розділі І).

Важлива примітка: Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в дубляж.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (І.С. як Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (µl)	150 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (µl)	24 мкл (µl)
І.С.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (µl)	6 мкл (µl)
Загальний об'єм		15 мкл (µl)	180 мкл (µl)

Важлива примітка: Якщо Внутрішній контроль був доданий під час процедури виділення ДНК, приготуйте **Ампліфікаційну суміш** для **Зразків** як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (І.С. як Екстракційний/Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (µl)	150 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (µl)	24 мкл (µl)
C	Вода MG	0.5 мкл (µl)	6 мкл (µl)
Загальний об'єм		15 мкл (µl)	180 мкл (µl)

Н.2.2 Процедура ампліфікації

- Дозуйте 15 мкл (µl) Ампліфікаційної суміші в кожну реакційну пробірку або лунку мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (µl) **Зразків, NTC та стандартної кривої** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Центрифугуйте реакційні пробірки протягом короткого проміжку часу при 2000 об/хв (rpm).

- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операції налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

Важлива примітка: Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті С (вода MG) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C).

Наприкінці робочого дня належним чином утилізуйте залишки матеріалу Точок розведення STD.

Невикористаний об'єм Компонента В, STD та І.С. можна заморозувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі Е.

Н.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

Важлива примітка: Для Мх3000Р встановіть «Налаштування підсилення фільтра»: ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (див. Інструкцію з експлуатації програмного забезпечення МхPro™ QPCR, стор.41).

Н.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
2	1	95 °C (°C)	10 хвилин
3	50	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

Н.3.2 Вибір Детекторів

Дотримуючись інструкції з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (ABI 7500, МХ3000Р Stratagene та BioRad CFX96), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення	Репортер	Гасник
Вірус JC	FAM	Нефлуоресцентний
Внутрішній Контроль (І.С.)	JOE/VIC	Нефлуоресцентний
Пасивний Стандарт	ROX	Не присутній

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

Мікропланшет або пробірки

	1	2	3
A	STD 1 16000 копій/мкл (µl)	Зразок 4	
B	STD 2 1600 копій/мкл (µl)	Зразок 5	
C	STD 3 160 копій/мкл (µl)	Зразок 6	
D	STD 4 16 копій/мкл (µl)	Зразок 7	
E	NTC	Зразок 8	
F	Зразок 1	Зразок 9	
G	Зразок 2	Зразок 10	
H	Зразок 3	Зразок 11	

Позначення: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК вірусу JC, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що аналізуються.

Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати аналіз:

- Встановіть «Baseline/Початкові умови» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
STRATAGENE™ MX3000P®	Адаптивні початкові умови (Не використовуйте алгоритм Mx4000 v1.00 - v3.00)
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови

– Встановіть вручну «Threshold/Поріг» флуоресценції FAM/JOE/VIC.

FAM «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	400

JOE/VIC «Threshold/Поріг» флуоресценції	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	350

Р.2 Аналіз даних

Перевірка на калібраторах STD проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення Ct очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

ABI™ PRISM® 7500 SDS/STRATAGENE™ MX3000P®	
Перевірка FAM	Вимоги
STD 1	21.5 < Ct (Пороговий цикл) < 24

BIORAD™ CFX96®	
Перевірка	Вимоги
STD 1	22 < Ct (Пороговий цикл) < 24.5

Крім того, значення Нахилу і R² перевіряються, щоб перевірити якість виконання. Повинні бути виконані наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил	-3.1 < Нахил < -3.9

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R ² > 0.98

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція JOE/VIC Внутрішнього Контролю підтверджують виявлення вірусу JC, як описано в таблиці нижче:

Можливими є наступні результати:

Вірус JC FAM	Внутрішній Контроль JOE/VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	ВІРНО*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	20 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

*Концентрація ДНК вірусу JC вища за 10000 копій/мкл (µl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. через конкуренцію реагентів.

**У цьому випадку проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів або початковий зразок, що містить недостатню кількість клітин), що може призвести до некоректного результату чи до хибнонегативних. Процедуру тестування необхідно повторити, починаючи з етапу Екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, кат. № JCVDNAQT.CE.150, можна застосувати коректне кількісне визначення вірусного навантаження в межах від 1.6E+08 до 1.6E+00 копій/мкл (µl). Вірусне навантаження вірусу JC має бути виражено, як зазначено в таблиці нижче:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - BIORAD™ CFX96® - STRATAGENE™ MX3000P®	
Дані запуску зразка вірусу JC (копій/мкл (µl))	Вірусне навантаження вірусу JC (копій/мкл (µl))
Кількість > 1.6E+08	Вірусне навантаження вірусу JC > 1.6E+08
1.6E+00 ≤ Кількість ≤ 1.6E+08	КІЛЬКІСНА ОЦІНКА
Кількість < 1.6E+00	Вірусне навантаження вірусу JC < 1.6E+00

Важлива примітка: Для кількісного визначення зразків див. Розділ R.

Результати, отримані з набором, кат. № JCVDNAQT.CE.150, повинні бути інтерпретовані відповідально особою лабораторії з урахуванням клінічних симптомів пацієнтів та інших лабораторних маркерів інфекції.

Можливими є наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE/VIC	Результат	ПЕРЕВІРИТИ
ЗРАЗОК невідомий	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	ВАЖЛИВО: Концентрація ДНК вірусу JC вища за 10000 копій/мкл (µl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. через конкуренцію реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі або неправильного функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення JCV і JOE/VIC для виявлення І.С.; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	ВАЖЛИВО: 1. Концентрація ДНК вірусу JC вища за 10000 копій/мкл (µl) (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗМЕНШЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. через конкуренцію реагентів. 2. Негативний сигнал JOE/VIC є коректним, лише якщо ІС використовувався як контроль екстракції.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в дозуванні або в процедурі	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення JCV і JOE/VIC для виявлення І.С.; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
STD	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в дозуванні або в процедурі	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення JCV і JOE/VIC для виявлення І.С.; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався.
NTC	-	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC є коректним, лише якщо І.С. використовувався як контроль екстракції.
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки;

				3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. щоб набір зберігався належним чином.
--	--	--	--	--

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідальної особи лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
2. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути передачі помилкових даних.

Якщо результати тесту співпадають з КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ АНАЛІЗУ, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD обробляються як зразки пацієнтів, і під час етапу ампліфікації використовується той самий об'єм, 10 мкл (µl). Концентрація калібраторів STD виражається в копіях/мкл (µl).

Концентрація вірусного геному на мл (ml) для кожного зразка пацієнта розраховується за такою формулою:

$$\text{Результати (копій/мл (ml))} = \frac{\text{копій/мкл (µl) (дані запуску) x Об'єм елюйованого зразка (мкл (µl))}{\text{Об'єм екстрагованого зразка (мл (ml))}}$$

Приклад:

Результати (копій/мл (ml)) = 1500 x 100/0.2

Результати (копій/мл (ml)) = 7.5 E+05

S. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ВТС.

Оцінку ефективності проводили в лабораторіях DiaPro на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

S.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа виявлення** та як **Межа кількісного визначення**.

Межа виявлення (LOD): Це найменша кількість цільового значення, яку може виявити система із заданою ймовірністю.

Для тестів АНК це виражається як найменша концентрація **аналіту**, яка за багаторазової перевірки дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) визначається шляхом тестування серійних розведень зразка, що містять відомі концентрації аналіту.

LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, у ≥ 95% зразків у звичайних лабораторних умовах).

Для набору, кат. № JCVDNAQT.CE.150, **LOD** було визначено шляхом тестування 24 повторів (8 повторів у трьох різних запусках) найменшого розведення аналіту, яке можна виявити в 100% випадків.

Результати аналізу є наступними:

Межа виявлення	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	1.6 копій/мкл (µl)
STRATAGENE™ MX3000P®	1.6 копій/мкл (µl)
BIORAD™ CFX96®	1.6 копій/мкл (µl)

Це означає, що існує 100% ймовірність того, що 1.6 копій/мкл (µl) буде виявлено на ABI PRISM 7500 SDS, STRATAGENE MX3000P, BIORAD CFX96.

S.1.1 Межа кількісного визначення

Межа кількісного визначення була визначена шляхом вимірювання лінійності, динамічного діапазону та відтворюваності.

Лінійність - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

Динамічний діапазон - це діапазон концентрацій аналіту, для якого кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації аналіту з прийнятною правдивістю та точністю.

Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).

У наборі, кат. № JCVDNAQT.CE.150, було підготовлено граничну криву розведення з визначеними копіями/мкл (µl) плазміді, що несе специфічну цільову вірусну послідовність. Точки розведення перевіряли в аналітичній системі та визначали їх Ct (пороговий цикл).

Верхня **межа кількісного визначення** становить 1.6E+08 копій/мкл (µl), а **нижня межа кількісного визначення** становить 1.6E+00 копій/мкл (µl).

S.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти та кількісно визначати тільки цільовий маркер.

Аналітичну специфічність аналізу ДНК вірусу JC вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (LionSoft v.1.0 від Biotools і Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з вірусом JC, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів вірусу JC.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Зразки, отримані від пацієнтів, які страждають від інфекцій, викликаних потенційно інтерферуючими мікроорганізмами, були отримані з Референсного клінічного центру та протестовані.

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Результат
Вірус ВК	негативний
ЦМВ	негативний
ВЕБ	негативний
ВВВ	негативний
Вірус герпесу 8 типу	негативний
Вірус герпесу 6 типу	негативний
ВПГ1	негативний
ВПГ2	негативний

S.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

S.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що з набором отримується негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований з набором.

Цей параметр вивчали шляхом дослідження 20 екстрактів негативних зразків ДНК вірусу JC:

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	20
ХИБНОПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	20
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована **Діагностична Специфічність системи становить 100%**.

S.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що з набором отримується позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований з набором.

У наборі, кат. № JCVDNAQT.CE.150, цей параметр досліджували шляхом аналізу 10 ДНК-позитивних на вірус JC зразків у дублях у тому самому запуску. Також було протестовано панелі QCMD 2010 і QCMD 2011 зразків Вірусу JC і Вірусу ВК. Потім було розраховано відсоток (%) позитивних зразків.

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	10
ХИБНОНЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	10
ЧУТЛИВІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Чутливість системи становить 100%.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	100%

5.4 ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу. У наборі, кат. № JCVDNAQT.CE.150, **точність** виражалася як варіабельність в аналізі та між аналізами. 4 точки розведення у 8 повторях були перевірені в одному запуску (внутрішній аналіз) і в трьох різних запусках (між аналізами). Потім розраховували варіабельність в межах і між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів ми визначили наступне значення прийнятності для ДНК вірусу JC:

Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%) ≤ 10%.

Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) ≤ 10%.

Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу. Зокрема, точне дозування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення та кількісного визначення ДНК вірусу JC.

Визначення ДНК вірусу JC у зразку пацієнта має значні медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

U. ЛІТЕРАТУРА

1. Polyomavirus nephropathy: a current perspective and clinical considerations. Wiseman AC. Am J Kidney Dis. 2009 Jul;54(1):131-42.
2. Virological, epidemiological and pathogenic aspects of human polyomaviruses. Hurault de Ligny B, Godin M, Lobbedez T, El Haggan W, Pujo M, Etienne I, Ryckelynck JP. Presse Med. 2003 Apr 12;32(14):656-8.
3. Molecular and clinical perspectives of polyomaviruses: emerging evidence of importance in non-kidney transplant populations. Vilchez RA, Kusne S. Liver Transpl. 2006 Oct;12(10):1457-63.
4. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Clin Microbiol Rev. 1992 Jan;5(1):49-73.
5. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. Elfaitouri A, Hammarin AL, Blomberg J. J Virol Methods. 2006 Aug;135(2):207-13.

5. СИМВОЛИ

ПОЯСНЕННЯ УМОВНИХ ЗНАКІВ			
	Каталоговий номер		Температура зберігання
	Виріб медичного призначення		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
	Знак відповідності CE		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci, 27
20099 Sesto San Giovanni
(MI) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан - Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

