

Mplex Monkeypox, Orthopox

ПЛР в реальному часі

RUO

ТІЛЬКИ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ДОСЛІДЖЕННЯХ
Не для використання в діагностичних процедурах

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

REF

PPOX6201

(1 x 96 визначень)

1. ВСТУП

Вірус мавпячої віспи викликає значне занепокоєння в зв'язку з його недавнім поширенням світом та зростанням підтверджених випадків. З огляду на поточну невизначеність щодо клінічних наслідків дії вірусу віспи мавп, надзвичайно важливо ретельно стежити за динамікою поширення і надавати надійні рішення для ідентифікації вірусу.

Цей вірус належить до роду Orthoroxvirus, який охоплює такі патогенні віруси, як віспа (вірус Variola; ліквідований), коров'яча віспа або віспа буйволів.

Інфекцію або наявність збудника можна визначити за

- Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (NAT): наприклад, ПЛР у реальному часі
- Серологія: виявлення антитіл за допомогою, наприклад, ІФА
- мікроскопія

2. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ (ЛИШЕ ДЛЯ ДОСЛІДНИЦЬКИХ ЦІЛЕЙ!)

Mplex Monkeypox, Orthopox — це ПЛР-аналіз у режимі реального часу, маркований лише для дослідницького використання (RUO), призначений для одночасного якісного виявлення вірусу мавпячої віспи та його диференціації від інших ортопокс вірусів. Матеріалом зразка має бути ДНК, виділена із зразків верхніх дихальних шляхів людини, цільної крові, сироватки або пусти. Mplex Monkeypox, Orthopox не призначений для діагностики віспи мавп або інфекцій ортопоксу та не для використання в діагностичних процедурах. Він призначений лише для допомоги у розслідуванні поширеності та частоти цього вірусу.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Якісне визначення специфічної ДНК базується на технології полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Набір містить специфічні праймери та зонди, мічені флуоресцентними молекулами-репортерами та гасителями для ампліфікації та одночасного виявлення послідовностей ДНК, які є загальною мішенню для ортопокс-вірусів, а також специфічною мішенню для вірусів віспи мавп.

Зонд для виявлення ортопокс-мішені мічений флуорофором HEXTM, зонд для виявлення віспи мавп мічений флуорофором FAMTM.

Внутрішній контроль процесу забезпечує ген людської рибонуклеази Р (RNase P) який виявляється за допомогою Cy5TM міченого зонда. Набір праймерів і зондів для гена Rnase P людини служить внутрішнім позитивним контролем для моніторингу якості зразка, екстракції ДНК і для виявлення інгібіторів реакції ПЛР.

Mplex Monkeypox, Orthopox перевірено для AriaDxTM (Agilent Technologies) - платформи ПЛР у реальному часі.

4. МАТЕРІАЛИ

4.1. Реагенти в комплекті

Колір маркування Кришки	Символ	Компонент	PPOX6201	
			Обсяг на Флакони [мкл]	Кількість Флакони
зелений	POL 2x	Полімераза (ДНК-полімераза гарячого старту, нуклеотиди, магній, енхансери та стабілізатори)	1060	1
блакитний	PP	Primer-Probe-Mix (суміш праймерів для реакції) (для виявлення мішеней ортопоксу та віспи мавп)	320	1
червоний	PC	Позитивний контроль (плазмідна ДНК, що представляє послідовності ортопоксу та віспи мавп)	150	1
прозорий	NFW	Вода без нуклеаз	500	1

4.2. Необхідні матеріали та обладнання, які не надаються

- Шафа біологічної безпеки для обробки зразків
- Контейнер для біологічно небезпечних відходів
- Обладнання та витратні матеріали для виділення ДНК вірусу
- Прилад ПЛР у режимі реального часу, оснащений відповідним набором оптичних картриджів (для вже валідованих інструментів див. п.3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ; щодо використаних барвників див п.7.2.) Також можуть підійти альтернативні інструменти ПЛР у реальному часі. Їх придатність для використання з Mplex Monkeypox, Orthopox має підтвердити користувач.
- Відповідні витратні матеріали для ПЛР у реальному часі (наприклад, одноразові пробірки, реакційні пластини, відповідні оптичні закриваючі матеріали)
- Настільна мікроцентрифуга
- Центрифуга з ротором для мікропланшетів
- Вихровий змішувач
- Автоматичні дозатори перемінного об'єму.
- Одноразові наконечники для піпеток без ДНК/Рнази з фільтрами
- Одноразові неопудрені рукавички

5. СТІЙКІСТЬ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Набір Mplex Monkeyrox, Orthorox доставляється на сухому льоду, і всі компоненти мають бути замороженими.

- Усі компоненти слід зберігати при температурі від -30 °С до -15 °С одразу після прибуття.
- Слід уникати повторних циклів заморожування та розморожування реагентів (не більше двох), оскільки це може вплинути на продуктивність набору. Реагенти слід заморожувати аліквотами, якщо вони використовуються з перервами.
- Зберігайте в незамороженому стані (наприклад, зберігання на льоду) якомога коротше.
- Захищайте **POL 2x** і **PP** від світла та зберігайте в замороженому вигляді до використання.

6. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Вихідним матеріалом для Mplex Monkeyrox, Orthorox є екстрагована ДНК або загальна нуклеїнова кислота, виділена із зразків верхніх дихальних шляхів людини, цільної крові, сироватки та пустилу.
- Якість і кількість вилученої ДНК має вирішальний вплив на роботу всієї системи ПЛР-тесту. Переконайтеся, що метод екстракції нуклеїнової кислоти сумісний із технологією ПЛР у реальному часі.
- Переконайтеся, що умови відбору (час, метод, зберігання та транспортування зразка) є відповідними, щоб уникнути негативного впливу на екстракцію та ПЛР.
- Оскільки етанол є сильним інгібітором ПЛР, його необхідно повністю видалити перед елюванням нуклеїнової кислоти під час екстракції. Якщо використовуються спінувальні колонки з промивними буферами, що містять етанол, настійно рекомендується виконати додатковий етап центрифугування тривалістю 10 хвилин при приблизно 17000 xg (~ 13000 об/хв) перед елюванням ДНК. Для цього додаткового етапу центрифугування використовуйте нову пробірку для збору.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

7.1. Налаштування реакції

- Перед проведенням аналізу уважно прочитайте інструкцію із застосування. Достовірність результатів залежить від чіткого дотримання інструкції із застосування.
- Перед використанням переконайтеся, що всі зразки та реагенти повністю розморожені, перемішані за допомогою піпетування вгору та вниз або вортексу та коротко відцентрифуговані.
- Важливо:** **POL 2x** є в'язким. Коротко покрутіть пробірку, щоб переконатися, що матеріал не застряг у кришці або збоку пробірки. Дозуйте та піпетуйте обережно, використовуючи наконечники піпеток, придатні для піпетування в'язких рідин. Тримайте постійно всі компоненти **POL 2x** і **PP** на льоду/ блоку охолодження під час налаштування ПЛР. Готуйте остаточну реакційну суміш безпосередньо перед початком ПЛР.
- Настійно рекомендується використовувати NFW, як контроль без шаблону (NTC).
- Визначте положення (лунок) для зразків і контролів (PC або NFW) на планшеті.

Налаштування реакції	
Компонент	Обсяг
POL 2x	10 мкл
PP	3 мкл
Зразок PC чи NFW	7 мкл
Загальний обсяг	20 мкл

- Закрийте оптичну реакційну пластину (*планшет*) відповідним оптичним закриваючим матеріалом (*кришкою*).
- Центрифугуйте оптичну реакційну пластину (*планшет*) (в центрифугу з ротором для мікротитраційних пластин (*мікропланшетів*) протягом 60 секунд при 4 °С при приблизно 1000 xg (~ 3000 об/хв).

7.2. Програмування приладу ПЛР у реальному часі

Щодо налаштування та програмування приладу ПЛР у реальному часі, скористайтеся інструкцією до відповідного приладу.

Щоб отримати докладні інструкції з програмування щодо використання Mplex Monkeypox, Orthopox на конкретних інструментах ПЛР у реальному часі, будь ласка, зв'яжіться з NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Налаштування запуску ПЛР у реальному часі	
Об'єм реакції	20 мкл
Пасивне посилення	Жодного

Канали виявлення

Детекція ампліфікованих вірусних фрагментів нуклеїнових кислот виконується в каналах виявлення HEX (ортопокс) за допомогою гасника MGBEQ і FAM (віспа мавп), помічених гасником BHQ1. Виявлення ампліфікованої внутрішньої контрольної РНази Р виконується в каналі виявлення Cy5 за допомогою гасника BHQ2 Quencher.

Цільова	Флуорофор (гасник)	Канал виявлення
Ортопокс	HEX TM (MGBEQ)	HEX
Мавпяча віспа	FAM TM (BHQ1)	FAM
РНаза Р	Cy5 TM (BHQ2)	Cy5

Температурний профіль і вимірювання

Кількість циклів	температура	Час (хв)	Збір даних
1	95 °C	02:00	-
40	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Вимірювання флуоресценції на кінець кожного циклу

Перед початком пробного запуску перевірте налаштування циклів, температури та часу.

8. РЕЗУЛЬТАТИ

Аналіз даних слід виконувати за допомогою програмного забезпечення використовуваного пристрою ПЛР у реальному часі відповідно до інструкцій виробника.

Параметри аналізу:

Налаштування	Рекомендація
Поріг	Введіть значення для порогу, щоб порогове значення було: <ul style="list-style-type: none">• Над фоном• Нижче плато та лінійної ділянки кривої посилення• В межах експоненціальної фази кривої посилення
Базовий рівень	Виберіть значення початкового та кінцевого циклу так, щоб не було включено можливий початковий шум сигналу, а базова лінія завершилася до виявлення значної флуоресценції.

8.1. Інтерпретація результатів

Тестовий запуск дійсний лише за умови завершення ПЛР-запуску.

Протокол тесту Mplex Monkeypox, Orthopox передбачає, що контролі повинні бути проаналізовані перед отриманням результатів зразків.

8.1.1. Контролі

Якщо контроль(і) набору не вдалися, тест недійсний і його потрібно повторити.

Дані зразків аналізуються та інтерпретуються лише після того, як усі контролю набору спрацюють:

NTC (без контролю за шаблоном): НЕ повинен мати виявлений Ct для жодної цілі. Якщо цей контроль має виявлений Ct, це вказує на забруднення циклу ПЛР. Він вважається недейсним і повинен бути повторений.

- PC : Ct ≤ 38 для всіх специфічних мішеней для ортопокси та віспи мавп
- Внутрішній контроль процесу (РНаза Р): усі зразки людини повинні демонструвати значення Cy5 Ct ≤ 38, що вказує на наявність гена РНази Р людини.

Неможливість виявлення РНази Р в будь-якому зразку може вказувати на:

- Неправильне виділення нуклеїнової кислоти з клінічних матеріалів, що призводить до втрати ДНК та/або інгібування ПЛР.
- Відсутність достатньої кількості людського клітинного матеріалу через поганий збір або втрату цілісності зразка.
- Неправильне налаштування та виконання аналізу.
- Невідповідність реагенту або несправність обладнання.

Якщо аналіз РНази Р не дає позитивного результату для зразків, інтерпретуйте наступним чином:

- Якщо принаймні ортопоксна мішень позитивна навіть за відсутності позитивного сигналу РНази Р, результат слід вважати дійсним. Цілком можливо, що деякі зразки можуть не демонструвати кривих ампліфікації РНази Р через низьку кількість копій в оригінальному зразку. Негативний сигнал РНази Р не виключає присутності ДНК ортопоксу (та віспи мавп) у зразку.
- Якщо всі мішені та РНаза Р є негативними для зразка, результат слід вважати недійсним. Якщо є залишковий зразок, повторіть процедуру екстракції та повторіть тест. Якщо після повторного тесту всі маркери залишаються негативними, повідомте результати як недійсні та, якщо це можливо, слід взяти новий зразок.

8.1.2. Зразки

Якщо тестовий запуск дійсний, інтерпретація результатів зразка така:

- Позитивний (POS): Ct ≤ 38
- Негативний (neg): не виявлено (ND) або Ct > 38

Кожна ціль, виявлена Mplex Monkeypox, Orthopox, призначається унікальному каналу виявлення (див.7.2.). Будь ласка, зверніться до наступної таблиці для тлумачення різних комбінацій сигналів.

Ціль			Інтерпретація результатів
Ортопокс (HEX)	Мавпяча віспа (FAM)	РНаза П (Cy5)	
позитивний	негативний	будь-який результат	Зразок містить ДНК ортопоксвірусу. Специфічна ДНК віспи мавп не виявлена.
позитивний	позитивний	будь-який результат	Зразок містить ДНК віспи мавп (ортопоксвірусу).
негативний	позитивний	будь-який результат	Непереконливий результат ПЛР: виявлено ДНК віспи мавп, ортопоксвірус не виявлено. Повторіть процедуру екстракції та/або повторіть тест. Якщо маркер HEX залишається негативний після повторного тесту, повідомте результати як недійсні та проаналізуйте новий зразок, якщо його можливо повторно зібрати,
негативний	негативний	позитивний	Зразок не містить виявлених ДНК ортопоксу або віспи мавп (див 9.).
негативний	негативний	негативний	Інгібування ПЛР або збір дії реагентів. ПЛР слід повторити або проаналізувати новий зразок.

9. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Дуже низькі кількості вихідного матеріалу можуть призвести до тестування Mplex Monkeypox, Orthopox із негативними сигналами. Однак такі результати не виключають наявності ДНК вірусу ортопоксу або віспи мавп. Нездатність виявити мішень вірусу віспи мавп у зразку не обов'язково гарантує відсутність інших представників роду Orthopox.

10. ТОРГОВІ МАРКИ ТА ВІДМОВА ВІД ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ

Зареєстровані назви, товарні знаки тощо, що використовуються в цьому документі, вважаються захищеними законом, навіть якщо вони спеціально не позначені як такі.

11. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- **ЛИШЕ ДЛЯ ДОСЛІДНИЦЬКОГО ВИКОРИСТАННЯ. Не для використання в діагностичних процедурах.**
- Усі людські зразки слід розглядати та обробляти як потенційно інфекційні.
- Разом з реагентами цього тест-набору не можна використовувати реагенти інших виробників.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Одягайте одноразові неопудрені рукавички, лабораторний халат і засоби захисту очей під час роботи зі зразками.
- Завжди використовуйте одноразові реакційні пробірки та наконечники піпеток, що не містять ДНКаз/Рнази, з аерозольними бар'єрами.
- Уникайте мікробного та нуклеазного (Днази/Рнази) забруднення зразка та компонентів набору.
- Щоб уникнути забруднення робочого простору нуклеїновими кислотами, реакційні пробірки/планшети не слід відкривати після ампліфікації.
- ПЛР у реальному часі дуже чутлива до забруднення нуклеїновими кислотами. Тому позитивний / потенційно позитивний матеріал необхідно зберігати окремо від усіх інших компонентів набору.
- Виділіть запаси та обладнання для окремих робочих зон і не переміщуйте їх з однієї зони в іншу.
- Цей аналіз не можна використовувати безпосередньо на зразку.
- Перед використанням цього аналізу нуклеїнову кислоту необхідно виділити відповідними методами екстракції з вихідного зразка.
- Оскільки етанол є сильним інгібітором ПЛР у реальному часі, його необхідно повністю видалити до елюції нуклеїнової кислоти під час екстракції. Якщо використовуються спінювальні колонки з промивними буферами, що містять етанол, настійно рекомендується виконати додатковий етап центрифугування тривалістю 10 хвилин при приблизно 17000 xg (~ 13000 об/хв) перед елюванням ДНК. Для цього додаткового етапу центрифугування використовуйте нову пробірку для збору.
- Високі концентрації етанолу можуть призвести до інгібування Mplex Monkeypox, Orthopox. На результат цього набору для ПЛР можуть вплинути потенційні мутації в геномі збудника, якщо вони розташовані в області зв'язування праймера/зонда. Може виникнути недооцінка та/або нездатність виявити патоген.
- Інгібітори ПЛР також можуть викликати недооцінку, хибно негативні результати або недійсні цикли. Тому використовуйте лише набори для екстракції нуклеїнових кислот, які видаляють інгібітори ПЛР і які призначені для подальших процесів ПЛР у реальному часі.
- ПЛР у реальному часі призначений лише для кваліфікованого персоналу, який знайомий із належною лабораторною практикою та навчений ПЛР у реальному часі.
- Для подальшого внутрішнього контролю якості кожна лабораторія повинна додатково використовувати відомі зразки.

11.1. Зауваження щодо утилізації

Залишки хімічних речовин і препаратів зазвичай вважаються небезпечними відходами. Утилізація такого роду відходів регулюється національними та регіональними законами та правилами. Зв'яжіться з місцевими органами влади або компаніями з утилізації відходів, які нададуть поради щодо утилізації небезпечних відходів.

12. ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ

REF	PPOX6201	Mplex Monkeypox, Orthopox	(1 x 96 визначень)
-----	----------	---------------------------	--------------------







БІБЛІОГРАФІЯ

Глобальна карта спалаху віспи мавп у 2022 році: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html>

СКОРОЧЕННЯ

Ct/Cq	Пороговий цикл (Ct) або цикл кількісного визначення (Cq) — це номер циклу, за якого крива реакції зразка перетинає порогову лінію.
NAT	Нуклеїнові кислоти для ампліфікації
NTC	Немає контролю шаблону, безшаблонний контроль

СИМВОЛИ

	Виробник
RUO	Тільки для дослідницьких цілей. Не для використання в діагностичних процедурах
LOT	Лот номер
	Дата використання (до)
	Температура зберігання
	Захистити від світла
REF	Номер продукту
	Інструкція Користувача
POL 2x	Полімераза 2x
PP	Праймер-проба-мікст
NFW	Вода вільна від нуклеаз
PC	Позитивний контроль
	Містить достатню кількість реагентів для "n" тестів

Novatec Immundiagnostica GmbH, частина Gold Standard Diagnostics Europe

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Німеччина

тел.: +49 6074 23698-0 Факс: +49 6074 23698-900

Електронна пошта:
info@goldstandarddiagnostics.eu

сайт: www.goldstandarddiagnostics.com