

**RevoDx Direct Набір для
виявлення РНК
коронавірусу SARS-CoV-2
методом ПЛР, в
планшетах на 96/384 лунки
(без екстракції)**

**RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit on
96/384-well plate (Extraction-free)**

Інструкція з використання

**Якісне виявлення РНК SARS-CoV-2
Для використання у діагностиці *in vitro*
Тільки для професійного використання**



**Каталожні номери:
IP202221-96 – 96 тестів
IP202221-480 – 480 тестів
IP202221-384 – 384 тестів**

Склад набору

	Компонент	96 тестів	480 тестів	384 тестів
1	COVID-19 plate	96-лунковий планшет	5 x 96-лунковий планшет	384-лунковий планшет
2	Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	200 мкл	200 мкл
3	Негативний контрольний зразок (Negative Control)	100 мкл	200 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна трRevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільні до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту.

Передбачене використання

RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу зі зворотною транскрипцією, призначений для якісного виявлення та диференціації нуклеїнових кислот від SARS-CoV-2 у респіраторних зразках (мазки з ротоглотки, мазки з носоглотки або комбіновані) людей з ознаками та симптомами інфекції, які нагадують COVID-19. Тестування має проводитись лише у лабораторіях, сертифікованих щодо "Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA), 42 U.S.C. §263a" для проведення аналізів високої складності.

Результати аналізу використовуються для ідентифікації РНК SARS-CoV-2, яка зазвичай виявляється в зразках дихальних шляхів під час гострої фази інфекції. Позитивні результати вказують на наявність РНК SARS-CoV-2; для визначення інфекційного статусу пацієнта необхідна клінічна кореляція з історією хвороби та іншою діагностичною інформацією. Позитивні результати не виключають бактеріальної інфекції або коінфекції з іншими вірусами. Виявлений збудник може не бути провідною причиною захворювання. Лабораторії в США зобов'язані повідомляти про всі результати тестування відповідним органам охорони здоров'я.

Негативні результати не виключають інфікування SARS-CoV-2 і не повинні використовуватися як єдина основа для прийняття рішень про лікування пацієнта. Негативні результати необхідно поєднувати з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та процедурам діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному SARS-CoV-2, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано до використання зі зразками із ротоглотки, носоглотки або комбінованих. Використання інших типів зразків може призвести до невалідних результатів.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних результатів тесту.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів відбору, 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 Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit - це набір для ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією, що дозволяє якісну детекцію РНК генів *orf1ab* та *N* від SARS-CoV-2, при цьому виявлення РНК здійснюється в одній пробірці, в якій одночасно виявляється РНКазо Р людини.

RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit - це набір для одностадійної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією. При цьому спочатку на матриці РНК здійснюється зворотна транскрипція з утворенням комплементарних ланцюгів ДНК (кДНК), а потім відбувається ампліфікація кДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею, а потім руйнується через 5'-3' ендонуклеазну активність ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при цьому 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. Гени *orf1ab* та *N* від SARS-CoV-2 детектується на каналі FAM, а ген РНКаз *P* людини детектується на каналі HEX.

Набір RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR поставляється у вигляді готового до використання 96-лункового планшета. Всі реагенти включені у відповідні лунки планшета для успішного проведення ПЛР в режимі реального часу. Кожна лунка також включає реагенти, які дозволяють екстрагувати РНК/ДНК із зразків мазків з носоглотки/ротоглотки, зібраних у вірусних транспортних середовищах (UTM/VTM) або модифікованих рідких середовищах Еміса, або інших середовищах, які дозволяють екстрагувати та зберігати нуклеїнові кислоти. Таким чином, немає необхідності додатково виділяти та очищати РНК/ДНК зі зразків.

Загальний опис

Коронавіруси - це велика родина РНК вірусів, до якої належать HCoV-229E, OC43, NL63 та HKU1, які зазвичай викликають легкі респіраторні захворювання (1), за винятком смертельно небезпечного коронавірусу важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV) (2) і коронавірусу близькосхідного респіраторного синдрому (MERS) (3) останніх двох десятиліть. Нещодавній спалах пневмонії в Ухані, Китай, оголошений 12 грудня 2019 року, призвів до виділення та ідентифікації нового людського коронавірусу 2019-nCoV (SARS-CoV-2) як збудника нового гострого респіраторного синдрому (4). Цей вірус може викликати захворювання, яке отримало назву «коронавірусна хвороба 2019» (COVID-19). У своїй поточній документації ВООЗ називає цей вірус вірусом COVID-19.

Використані джерела:

1. Zeng ZQ, Chen DH, Tan WP, Qiu SY, Xu D, Liang HX, et al. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses oc43, 229e, nl63, and hku1: A study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in guangzhou, china. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018;37:363-9.
2. Smith RD. Responding to global infectious disease outbreaks: Lessons from sars on the role of risk perception, communication and management. Soc Sci Med 2006;63:3113-23.
3. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle east respiratory syndrome. Lancet 2015;386:995-1007.
4. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270-273 (2020).

Інформація щодо безпеки

- Зверніть увагу на Тимчасовий гайд щодо збору, обробки та тестування клінічних зразків від досліджуваних пацієнтів на новий коронавірус 2019 року (Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV))
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specime>
- 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.
- Ніколи не піпетуйте розчини за допомогою рота.
- В лабораторній зоні не можна вживати їжу, напої та палити.
- Необхідно мити руки після контакту зі зрізками та реагентами.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі у лабораторії необхідно користуватись засобами індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними 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 калібровані дозатори та завжди змінюйте наконечники під час роботи з різними рідинами (бажано використовувати наконечники з аерозольним фільтром).
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктів ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація) для уникнення контамінації.
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитись в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатись 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 ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія розведень з використанням верифікаційної панелі AccuPlex™ SARS-CoV-2 (Seracare Кат#: 0505-0129) для отримання кінцевих концентрацій 1620, 540, 180, 60 та 20 копій/мл шляхом додавання розчинника, що складається зі зразків мазків з носоглотки, зібраних у негативних до SARS-CoV-2 осіб, для імітації клінічних зразків. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Ліміт детекції був розрахований за допомогою пробіт-аналізу і складав 58 копій/мл. Цей LoD був додатково перевірений тестуванням 20 зразків, що були позитивні на SARS-CoV-2, при цьому LoD складав 62 копії/мл.

Точність

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 зразків концентрації 105 копій/мл від верифікаційної панелі AccuPlex™ SARS-CoV-2. Статистична обробка здійснювалась за допомогою програмного забезпечення PASW Statistics. Загальна точність, що пов'язана зі значеннями Ct (**відтворюваність**), була підсумована в Таблиці 1.

Таблиця 1: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних SARS-CoV-2

Статистичний опис					
	N	Значення	Стандартне відхилення	Відхилення	Коефіцієнт відхилення (%)
Intra assay	24	27,80	,21	,045	0,76
Inter assay	24	27,72	,12	,016	0,46
Inter batch	24	27,37	,08	,007	0,32
ЗАГАЛЬНЕ	72	27,63	,23	,058	0,87

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit було проведено для послідовностей SARS-CoV-2, доступних у базах даних NCBI та GISAID. Аналіз здійснювали щодо специфічних ділянок гена нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 та гена відкритої рамки зчитування (orf1ab). Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з всіма доступними послідовностями SARS-CoV2 з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) та Глобальної ініціативи з обміну даними про пташиний грип (GISAID).

Аналіз інклюзивності *in silico*

База даних	Цільовий ген orf1ab			Цільовий ген N		
	Прямий праймер	Зразок	Зворотний праймер	Прямий праймер	Зразок	Зворотний праймер
GISAID	63/63 (100%)	63/63 (100%)	63/63 (100%)	63/63 (100%)	63/63 (100%)	63/63 (100%)
NCBI	179/179 (100%)	179/179 (100%)	179/179 (100%)	179/179 (100%)	179/179 (100%)	179/179 (100%)

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx SARS-CoV-2 qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів SARS-CoV-2 і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 13 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx SARS-CoV-2 qPCR. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	ген orf1ab	ген N
Коронавірус людини 229E	Немає гомології	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології	Немає гомології
SARS-коронавірус	Немає гомології	Немає гомології

Організм	ген orf1ab	ген N
Коронавірус людини 229E	Немає гомології	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типу	Немає гомології	Немає гомології
Вірус грипу A/B	Немає гомології	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не заявлено	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не заявлено	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (Cat. No: 16/324)	2.0×10 ⁸ копій/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10 ⁵ копій/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ копій/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не заявлено	Не виявлено

Примітка: назви подані згідно каталогу виробника

Клінічні випробування

Ефективність набору RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit оцінювали за допомогою використання архівних клінічних зразків мазків з носогорла та ротогорла у транспортному середовищі для вірусів. Загалом у рандомізованому сліпому дослідженні було використано 40 зразків позитивних на SARS-CoV-2 та 40 негативних. Всі зразки були заздалегідь протестовані за допомогою FDA валідованих ампліфікаторів у державній лікарні. Зразки були протестовані в п'яти різних експериментах. Зразки виділяли за допомогою набору для очищення вірусної РНК RevoDx відповідно до інструкції, а потім проводили ПЛР-реакцію за допомогою набору RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit відповідно до інструкції. Для ампліфікації, детектування та аналізу використовували ПЛР-систему BIO-RAD CFX96 в режимі реального часу.

Результати досліджень наведені нижче. Було отримано 100% збіг з очікуваними результатами.

		Порівняльний тест		
		SARS-CoV-2 позитивні	SARS-CoV-2 негативні	Загалом
RevoDx SARS-CoV-2 qPCR Kit	SARS-CoV-2 позитивні	40	0	40
	SARS-CoV-2 негативні	0	40	40
	загалом	40	40	80
Відсоток позитивного співпадіння (positive percent agreement, PPA) = 40/40 = 100% (95% CI: 89.1% - 100%)				
Відсоток негативного співпадіння (negative percent agreement, NPA) = 40/40 = 100% (95% CI: 89.1% - 100%)				

Додаткові матеріали та обладнання

- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри і тп)
- Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок
- Бокс біологічного захисту

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання з респіраторними зразками мазків з ротогортла, мазків з носогортла або комбінованих. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; і дотримуватись запобіжних заходів під час забору зразків і обробки.

Клініцисти (включаючи фельдшерів, медсестер, лікарів та спеціалістів, пов'язаних із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час забору 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.

Дотримуйтеся інструкцій виробника пристрою для забору зразків та належних методів забору. Зразки мазків слід збирати лише за допомогою тампонів із синтетичним наконечником, таким як нейлон або Dacron®, і алюмінієвим або пластиковим стрижнем. Тампони з альгілату кальцію неприйнятні, а ватні тампони з дерев'яними стрижнями не рекомендуються. Після забору тампони слід негайно помістити в стерильні пробірки.

Зразки мають бути упаковані, відправлені та транспортовані відповідно до чинного видання Правил перевезення небезпечних вантажів Міжнародної асоціації повітряного транспорту (IATA) чи місцевого законодавства. Дотримуйтеся правил транспортування для біологічних речовин UN 3373, категорія B, надсилаючи зразки, потенційно позитивні на COVID-19. Зберігайте зразки при 2-8°C і відправляйте до лабораторії з холодоелементами. Якщо зразок заморожено при температурі -70 °C або нижче, його слід транспортувати на сухому льоду.

Зразки можна зберігати при 2-8°C протягом 72 годин після забору. Якщо очікується затримка екстракції, зберігайте зразки при -70°C або нижче. Екстраговані нуклеїнові кислоти мають зберігатись за температури -70°C або нижче.

Протокол

Внутрішній контроль Внутрішній контроль (Hs_RPP30), мішенню якого є РНКаз Р людини, має бути у кожному досліджувальному зразку для підтвердження потрапляння виділеної НК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції нуклеїнових кислот.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 30 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім обсадить краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок. Планшет з реагентами необхідно перемішати і обсадить краплі короткочасним центрифугуванням, перш ніж відкривати кришку/ковпачок.

2. Лунковий планшет готовий до використання. Внесіть

по 5 мкл респіраторних зразків, позитивного контрольного зразка та негативного контрольного зразка у відповідні лунки. Закрийте планшет та обсадить краплі короткочасним центрифугуванням.

3. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно з протоколом: 50°C 15 хв; 95°C 1 хв, 1 цикл; 95°C 2 сек, 60°C 15 сек, 40 циклів. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 1: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Синтез кДНК	1	50°C, 15 хв
Активация полімерази ("гарячий" старт)	1	95°C, 1 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 2 сек
		60°C, 15 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX

4. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX

5. Запустити програму.

6. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналах FAM та HEX має дорівнювати 30±4, а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати слід інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (гени <i>orf1ab</i> та <i>N</i> від SARS-CoV-2)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль - ген РНКазы Р)	Інтерпретація
+	+/-	РНК SARS-CoV-2 виявлена
-	+	РНК SARS-CoV-2 не виявлена
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit on 96/384-well plate (Extraction-free)	96 тестів	IP202221-96
RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit on 96/384-well plate (Extraction-free)	480 тестів	IP202221-480
RevoDx Direct SARS-CoV-2 qPCR Kit on 96/384-well plate (Extraction-free)	384 тестів	IP202221-384