



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення вірусу Лан'я методом ПЛР **RevoDx** Langya Virus qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення РНК вірусу Лан'я

Для використання у діагностиці *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202340-25 – 25 тестів

IP202340-100 – 100 тестів



Компоненти набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферний розчин Lngy RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш Lngy RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль Lngy Lngy Internal Control	75 мкл	150 мкл
4	Позитивний контрольний зразок Lngy Lngy Positive Control	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контрольний зразок Lngy Lngy Negatif Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx Langya virus 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. Реагент Lngy RM 1 не можна заморожувати-розморожувати понад 3 разів, це може призвести до зниження чутливості. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть реагенти на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Langy - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення РНК вірусу Лан'я у зразках мазків з носагорла або ротогорла, спинномозковій рідині. Негативні результати не виключають інфікування вірусом Лан'я і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.

RevoDx Langya Virus qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx Langya Virus qPCR Kit призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному вірусу Лан'я, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- 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 Langya Virus 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.

Для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Загальний опис

Вірус Лан'я (Langya virus), який належить до роду *Henipavirus*, вперше був ідентифікований на сході Китаю у 2018 році і привернув увагу через зоонозний потенціал. До *Henipavirus* також належать відомі патогени — вірус Хендра та Ніпах. Вірус Лан'я передається від тварин до людини, при цьому інфікування людини супроводжується грипоподібними симптомами, а саме лихоманкою, втомою та кашлем.

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.
- 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 знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі 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 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 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 ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту вірусу Лан'я для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 та 1.6 копій/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Значення LoD становило 96 копій/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Langya Virus qPCR Kit було протестовано 109 клінічних зразків від окремих донорів, що мали негативний результат при тестуванні на наявність РНК вірусу Лан'я. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx Langya Virus qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Langya Virus qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів вірусу Лан'я і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 15 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Langya Virus qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С (Hepatitis C virus)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (Human Cytomegalovirus, HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (Hepatitis B virus)	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 (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології
Вірус паратифу 1-4 типу	Немає гомології
Вірус грипу A/B	Немає гомології
Ентеровірус (напр. 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>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
Human Adenovirus	NIBSC (Cat. No: 16/324)	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

Примітка: назви подані згідно каталогу виробника

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР з одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки вірусу Лан'я та 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (халат, рукавички, окуляри)
- Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
- Мікропробірки 1,5 мл з маркуванням DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок

- Бокс біологічного захисту
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі зразками мазків з ротогорла та носогорла людини, а також спинномозковою рідиною. 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.

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, при транспортуванні.

Протокол

Виділення вірусної РНК Для екстракції РНК вірусу бажано використовувати набір RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтеся 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 патоген, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК патогена 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.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок містить плазмиду зі вставкою. Позитивний контроль має ампліфікуватись в окремій реакційній пробірці. Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Lngu RM 2. Покладіть Lngu RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадить краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix)

отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів RM-1 and RM-2 на загальну кількість зразків. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.

3. Для приготування майстер-суміші додайте 14 мкл Lngu RM 1 та 1 мкл Lngu RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої РНК, позитивного контрольного зразку та негативного контрольного зразку у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу: 50°C 15 хв; 95°C 2 хв, 1 цикл; 95°C 10 сек, 60°C 20 сек, 40 циклів (Таблиця 1). Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 1: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Синтез кДНК	1	50°C, 15 хв
Активція полімерази ("гарячий" старт)	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

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

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

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу FAM має дорівнювати 26 ± 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 (РНК вірусу Лан'я)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	РНК вірусу Лан'я виявлена
-	+	РНК вірусу Лан'я НЕ виявлена
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Langya virus qPCR Kit	25 тестів	IP202340-25
RevoDx Langya virus qPCR Kit	100 тестів	IP202340-100