

RevoDx Набір для виявлення вірусів грипу А та В, респіраторно-синцитіального вірусу та коронавірусу SARS-CoV-2

RevoDx Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення та диференціація грипу А, грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу, коронавірусу SARS-CoV-2

Для діагностики *in vitro*.

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202343-100 – 100 тестів

IP202343-500 – 500 тестів



Склад набору

	Назва компонента	100 тестів	500 тестів
1	Буферна суміш Multi2 RM-1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	Ферментна суміш Multi2 RM-2	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контрольний зразок Positive Control	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контрольний зразок Negative Control	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx Flu A / Flu B / RSV / 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 Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу зі зворотною транскрипцією, призначений для якісного виявлення та диференціації нуклеїнових кислот від грипу А, грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу (RSV) і коронавірусу SARS-CoV у зразках мазків з ротової порожнини та носогорла

людей з ознаками та симптомами інфекції, які нагадують на грип або COVID-19.

РНК вірусів грипу А, грипу В, RSV і SARS-CoV-2, як правило, виявляються в мазку з ротогорла та носогорла людини під час гострої фази інфекції. Позитивні результати свідчать про активну інфекцію. Лабораторії зобов'язані повідомляти про всі позитивні результати на SARS-CoV-2 відповідним органам охорони здоров'я.

Негативні результати не виключають інфікування 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 Flu A / Flu B / RSV / 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

- RevoDx Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному грипу А, грипу В, RSV і SARS-CoV-2, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання зі зразками мазків з ротогорла та носогорла людини. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних 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 Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit - це набір для ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією, який дозволяє якісну детекцію генів *orf1ab* та гену *N* у складі РНК SARS-CoV-2, гену матриксу (M1) у складі РНК грипу А, неструктурного гена 2 (NS2) у складі РНК грипу В та гену матриксу (M) у складі РНК респіраторно-синцитіального вірусу в одній пробірці разом з одночасним виявленням РНКаз Р людини.

RevoDx Flu A / Flu B / RSV / 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.

Метод виконується безпосередньо на РНК, виділений із зразків пацієнта. Виявлення РНК грипу А, грипу В, RSV і SARS-CoV-2 здійснюється в одній пробірці, в якій одночасно виявляється РНКаз Р людини як внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

Ген *orf1ab* і ген N РНК SARS-CoV-2 детектуються за каналом Cy5.5. Матричний ген (M1) РНК вірусу грипу А детектується за каналом FAM, а неструктурний ген 2 (NS2) РНК вірусу грипу В за каналом HEX. Матричний (M) ген РНК RSV детектується за каналом ROX, а ген РНКаз Р людини детектується за каналом Cy5.

Загальний опис

Коронавіруси, віруси грипу та респіраторно-синцитіальні віруси - це оболонкові, одноланцюгові РНК віруси. Однак геноми цих вірусів відрізняються за полярністю та сегментованістю. Вірус грипу містить 8 негативних фрагментів РНК, SARS-CoV-2 має несеgmentований позитивний геном РНК, RSV має несеgmentований негативний геном.

Інша відмінність між цими вірусами полягає в тому, що SARS-CoV-2 представлений 1 штамом, вірус грипу має 4 різних штами (А, В, С і D) і багато різних підтипів, а RSV має 2 різні штами (А і В) і багато різних підтипів.

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-specimens.html>
- 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 SARS-CoV-2, вірусів грипу А/В та RSV панелі верифікації AccuPlex™ (Seracare Cat#: 0505-0183) для отримання кінцевих концентрацій 1620, 540, 180, 60 та 20 копій/мл. Розведення відбувалось шляхом додавання розчинника, що складається з суспензії людських клітин і вірусного транспортного середовища (VTM), для імітації клінічних зразків. Вірусну РНК отримували за допомогою набору Viral RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Ліміт детекції був розрахований за допомогою пробіт-аналізу. Для кожної мішені було отримано такі значення:

Для SARS-CoV-2: 58 копій/мл

Для грипу А та В: 76 копій/мл

Для RSV: 95 копій/мл

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 з транскрибованою *in vitro* РНК і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що було підтверджено відповідною ампліфікацією внутрішнього контролю.

Перехресна реактивність. Перехресна реактивність набору RevoDx Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Flu A / Flu B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit проти послідовностей 27 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів вірусів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 12 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Flu A&B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Цитомегаловірус людини (Human Cytomegalovirus, HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту С (Hepatitis C virus)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (Hepatitis B virus)	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 парагрипу 1-4 типу	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Rhinovirus	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (халат, рукавички, окуляри і тп)
- 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. 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 точні та 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 В, 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. Екстраговану нуклеїнову кислоту слід зберігати при -70°C або нижче.

Протокол

Виділення вірусної РНК Для екстракції РНК вірусу бажано використовувати набір RevuDx Viral RNA Purification Kit або реагент DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent. 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 Внутрішній контроль (Hs_RPP30), мішенню якого є РНКаз Р людини, має бути у кожному досліджуваному зразку для підтвердження потрапляння виділеної ДНК/РНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції нуклеїнових кислот.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок містить транскрибовану *in vitro* РНК, що має фрагменти гена N, гена *orf1ab*, матричного гена (M1) грипу А, неструктурного гена 2 (NS2) грипу В та матричного гена (M) RSV. Позитивний

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	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
Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	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

Клінічні випробування:

Ефективність набору RevuDx Flu A&B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit оцінювали за допомогою використання архівних клінічних зразків мазків з носогорла (NP) та ротогорла (OP) у транспортному середовищі для вірусів. Загалом було досліджено 254 зразки мазків SARS-CoV-2 у рандомізованому сліпому дослідженні. Усі зразки були зібрані в лабораторії державної лікарні й попередньо протестовані за допомогою валідованого ПЛР-набору. Було отримано 100% збіг з очікуваними результатами.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevuDx Viral RNA Purification Kit (Cat. No: IP201915; idil biotech, Туреччина), DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent (Cat. No: IP202319; idil biotech, Туреччина)

контроль ампліфікується завдяки послідовностям гена N. Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 30 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

- 1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Multi2 RM 2. Покладіть Multi2 RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім обсадіть краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний 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 Multi2 RM 1 та 1 мкл Multi2 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. Внести по 5 мкл позитивного контрольного зразка та негативного контрольного зразка у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
- 4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно з протоколом: 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.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналах FAM, HEX, ROX та Cy5.5 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 (Грип А)	Сигнал по каналу HEX (Грип В)	Сигнал по каналу ROX (RSV)	Сигнал по каналу Cy5.5 (SARS-CoV-2)	Сигнал по каналу Cy5 (ген РНКаз и Р)	Інтерпретація
+	-	-	-	+/-	РНК грипу А виявлена
-	+	-	-	+/-	РНК грипу В виявлена
-	-	+	-	+/-	РНК RSV виявлена
-	-	-	+	+/-	РНК SARS-CoV-2 виявлена.
-	-	-	-	+	РНК SARS-CoV-2 або грипу А/В або RSV не виявлена.
-	-	-	-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Таблиця 1: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Синтез кДНК	1	50°C, 15 хв
Активация 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 FAM, HEX, ROX, Cy5 та Cy5.5

- 5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX, Cy5 та Cy5.5.
- 6. Запустити програму.
- 7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.