



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення РНК вірусу грипу А H1N1 (pdm09)

RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення РНК вірусу грипу А H1N1 (pdm09)

Для діагностики *in vitro*.

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202512-25 – 25 тестів

IP202512-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	pdm09 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	pdm09 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок pdm09 Positive Control	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок pdm09 Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Після отримання, всі компоненти набору RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагент pdm09 RM 1 не можна заморожувати та розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення РНК грипу A H1N1 (pdm09).

Негативні результати не виключають інфікування вірусом грипу A і не повинні використовуватися як єдина основа для прийняття рішень про лікування пацієнта. Негативні результати необхідно поєднувати з клінічними спостереженнями, історією захворювання та епідеміологічною інформацією.

RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання набору

- Використовувати лише за призначенням.
- Набір RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному вірусу, що залучені 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 збору, 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

Набір RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit — це набір для аналізу методом 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 фермента ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею та розщеплюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq). 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. Аналіз виконується безпосередньо на РНК, виділений із зразків пацієнта. Набір RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit передбачає використання внутрішнього контролю, який потрібен для контролю якості екстракції та ампліфікації.

Прилади

Набір RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96, Tianlong Gentier 96, Applied Biosystems QuantStudio5, а також приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite). Але RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з відповідними каналами.

Загальний опис

Вірус грипу A H1N1 (pdm09), також відомий як пандемічний штам H1N1, з'явився у 2009 році і призвів до глобальної пандемії грипу. Це варіант вірусу є реасортантним штамом, тобто таким, що поєднує генетичний матеріал кількох вірусів грипу.

Після пандемії 2009 року, вірус грипу H1N1 (pdm09) залишився як сезонний вірус і наразі циркулює у світі разом з іншими штамми грипу A (H3N2) та грипу B.

Рання діагностика патогену має вирішальне значення для ефективного лікування, контролю спалахів та диференціації H1N1 від інших респіраторних інфекцій. Золотим стандартом діагностики є ПЛР у реальному часі, яка виявляє вірусну РНК з високою чутливістю. Набір RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR пропонує швидке, точне та специфічне виявлення, що робить його цінним інструментом для клінічного використання та впровадження в галузі охорони здоров'я.

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.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії використовувати 3ІЗ
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими 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 повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- 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 межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень стандарту вірусу грипу А H1N1 (pdm09) для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 та 1.6 копій/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Визначене значення межі виявлення (LoD) 69 копій/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit було протестовано 109 клінічних зразків від окремих донорів з негативним результатом щодо патогену. Жоден із перевірених зразків не показав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів вірусу грипу А H1N1 (pdm09) і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 14 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) 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
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	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	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	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 epidermidis</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
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 на вірус грипу А H1N1 (pdm09) 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.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 112 клінічних зразки. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; Idil Biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic

Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202303; Idil Biotech, Туреччина)

- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (халат, рукавички, окуляри, тощо)
- 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/стріп-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл
- Бокс біологічного захисту

Протокол

Екстракція вірусної РНК Для екстракції РНК вірусу бажано використовувати 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, дотримуйтесь 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, потрібен для перевірки наявності нуклеїнової кислоти у кожному зразку. Внутрішній контроль використовується для перевірки якості екстракції. в тому числі для запобігання отримання хибнонегативних результатів.

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 під час ампліфікації.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім pdm09 RM 2. Покладіть pdm09 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 RM 1 та 1 мкл 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 зразку та негативного контрольного зразку у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Синтез кДНК	1	50°C, 15 хв
Активация полімерази	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 (Вірус грипу А H1N1 (pdm09))	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	РНК вірусу грипу А H1N1 (pdm09) ВІЯВЛЕНА
-	+	РНК вірусу грипу А H1N1 (pdm09) НЕ ВІЯВЛЕНА, результат валідний
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit	25 тестів	IP202512-25
RevoDx Influenza A H1N1 (pdm09) qPCR Kit	100 тестів	IP202512-100