

RevoDx Набір для виявлення РНК вірусу грипу А і В

RevoDx Influenza A&B qPCR Kit Інструкція з використання

Якісне виявлення та диференціація РНК вірусу грипу А і В
Для діагностики *in vitro*.
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202220-100 – 100 тестів
IP202220-500 – 500 тестів



Склад набору

	Колір кришки	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	ЗЕЛЕНИЙ	Flu RM-1	1500 мкл	5x1500 мкл
2	БЛАКИТНИЙ	FLU RM-2	110 мкл	550 мкл
3	ЖОВТИЙ	Позитивний контрольний зразок FLU (Positive Control)	100 мкл	500 мкл
4	БІЛИЙ	Негативний контрольний зразок FLU (Negative Control)	100 мкл	500 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Після отримання, всі компоненти набору RevoDx Influenza A&B 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 FLU 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 аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Influenza A&B qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення та диференціації РНК грипу А та В у зразках мазків з ротоглотки та носоглотки людини від осіб із ознаками та симптомами інфекції, які нагадують грип. РНК вірусів грипу А та грипу В, як правило, виявляється в мазку з ротоглотки та носоглотки людини під час гострої фази інфекції. Позитивні результати свідчать про активну інфекцію. Негативні результати не виключають інфікування одним із вірусів 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&B 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.
- Потенційні мутації в цільових областях геному вірусів, що покриваються олігонуклеотидами в наборі, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з мазками із ротоглотки та носоглотки людини. Використання з іншим біоматеріалом може вплинути на робочі характеристики набору.
- 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&B 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) у 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.

Метод виконується безпосередньо на РНК, виділений із зразків пацієнта. Виявлення вірусів грипу А та грипу В здійснюється в одній пробірці, в якій одночасно виявляється РНКаз Р людини — внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені. Матричний (M1) ген РНК вірусу грипу А детектується за каналом FAM. Неструктурний ген 2 (NS2) РНК вірусу грипу В детектується за каналом HEX. А ген РНКаз Р людини детектується за каналом Cy5.

Прилади

Набір RevoDx Influenza A&B 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&B qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX та Cy5.

Загальний опис

Віруси грипу типів А і В є двома найважливішими збудниками респіраторних інфекцій людини. Сезонний грип викликає смертність і захворюваність значного рівня у всьому світі. Віруси грипу належать до сімейства вірусів *Orthomyxoviridae*. Представники мають сегментований негативно-змістовий РНК-геном у віріоні з оболонкою. Існує чотири типи вірусів грипу: А, В, С і D. Віруси людського грипу А і В викликають сезонні епідемії захворювань (відомі як сезон грипу).

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.
- Поводьтесь 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 комерційного стандартного зразка «AccuPlex™ SARS-CoV-2, Flu A/B and RSV Verification Panel (Seracare Cat#: 0505-0183)» для отримання кінцевих концентрацій 1620, 540, 180, 60 та 20 МО/мл. Для розведення використовували суспензії із клітин людини та транспортного середовища для вірусів (VTM), щоб імітувати клінічні зразки. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) були розраховані шляхом пробіт-аналізу. Для кожної цілі значення межі виявлення (LoD) наведені нижче:

Для вірусу грипу А: 59 копій/мл

Для вірусу грипу В: 74 копії/мл

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР із 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 із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Перехресна реактивність. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Influenza A&B 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 Influenza A&B 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
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
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	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

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	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
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

Порівняльні клінічні випробування. Ефективність RevoDx

Influenza A&B qPCR Kit оцінювалася за допомогою архівних клінічних зразків мазків з носоглотки (NP) і ротоглотки (OP) у транспортному середовищі для вірусів. Загалом було досліджено 69 зразків мазків у рандомізованому сліпому дослідженні. Усі зразки були зібрані в лабораторії державної лікарні та попередньо протестовані за допомогою валідованого ПЛР-набору. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx Influenza A&B qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат.№: IP201906; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Viral RNA Purification Kit (Кат.№: IP201915; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (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/стрип-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі зразками мазків з ротоглотки та носоглотки 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 точне і повне документування. Дотримуйтесь 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 РНК вірусу Для екстракції РНК вірусу бажано використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit або RevoDx Viral 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 (ВК), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потраплення виділеної ДНК/РНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК/РНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок містить транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставки фрагмента матричного (M1) гена грипу А та фрагмента неструктурного гена 2 (NS2) грипу В. Позитивний контроль ампліфікується через послідовності гена N. Позитивний контроль включає транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставки для часткового матричного (M1) гена грипу А та часткового неструктурного гена 2 (NS2) грипу В. Позитивний контроль ампліфікується через послідовності 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 FLU RM-2. Покладіть FLU RM-2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть 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 FLU RM-1 та 1 мкл FLU RM-2 для кожного зразка у підготовані 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 контролю та негативного контролю 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	Температура	Час
Синтез кДНК	1	50°C	15 хв
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C*	20 сек
		72°C	10 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy5.
6. Запустити програму.
7. 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 (грип А)	Сигнал по каналу HEX (грип В)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	+/-	РНК грипу А виявлена
-	+	+/-	РНК грипу В виявлена
-		+	Цільова РНК не виявлена, результат не валідний.
-		-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Influenza A&B qPCR Kit	100 тестів	IP202220-100
RevoDx Influenza A&B qPCR Kit	500 тестів	IP202220-500