



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення РНК вірусу кору ПЛР

RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення РНК вірусу кору
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202429-25 – 25 тестів
IP202429-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Назва компонента	25 тестів	100 тестів
1	Morbillivirus RM -1	350 мкл	1400 мкл
2	Morbillivirus RM -2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок Morbillivirus Positive control	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок Morbillivirus Negative control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти RevoDx Measles morbillivirus 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 Morbillivirus RM 1 не слід заморожувати-розморожувати більше 3 разів; оскільки це може призвести до зниження чутливості набору. За 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 Measles morbillivirus qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення РНК вірусу кору. Негативні результати не виключають інфекції, а тому не повинні використовуватись як єдине підґрунтя для прийняття рішення про подальші діагностику та лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією. RevoDx Measles morbillivirus 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 продукту

- Використовувати лише за призначенням.
- Тільки для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання використання з назофарингеальними і орофарингеальними мазками, аспіратами з носа чи змивами з горла і зразками сечі.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних 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

RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit — це набір для аналізу методом одностадійної РЧ-ПЛР (або 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 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділений із зразків пацієнта. Виявлення ДНК збудника проводиться в одній пробірці, в якій одночасно виявляється внутрішній контроль. У наборі використовується внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

Прилади

Набір RevoDx Measles morbillivirus 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 Measles morbillivirus qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX.

Загальний опис

Морбілівірус кору належить до родини *Paramyxoviridae*, роду *Morbillivirus*. Це високо контагіозний вірус, який викликає кір – захворювання, що характеризується лихоманкою, кашлем, кон'юнктивітом і характерним висипом. Вірус кору є одноланцюговим вірусом із негативним РНК геномом. Вірус передається повітряно-крапельним шляхом під час кашлю та чхання інфікованих людей. Після проникнення в організм хазяїна вірус вражає епітеліальні клітини в дихальних шляхах, потім поширюється в лімфатичну систему і далі поширюється по всьому тілу. Характерний висип є результатом імунної відповіді на інфіковані ендотеліальні клітини в капілярах. Кір залишається серйозною проблемою для сфери охорони здоров'я, особливо в регіонах з низьким рівнем вакцинації населення. Висока контагіозність вірусу робить ранню діагностику та ізоляційні заходи критичними під час спалахів.

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 ЗІЗ.
- На початку та вкінці 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 вторинного стандарту вірусу кору, щоб отримати кінцеві концентрації 1000, 200, 40, 8 і 1,6 копій/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 77 копій/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit було протестовано 115 клінічних зразків від окремих донорів, негативних щодо наявності РНК вірусу кору. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту на ціль. Діагностична специфіка RevoDx Morbillivirus Virus qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів вірусу кору і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перелічені нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту В	Немає гомології
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Цитомегаловірус	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 паратрипу 1-4	Немає гомології
Вірус грипу А і В	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Chlamydia pneumoniae	Немає гомології
Haemophilus influenzae	Немає гомології
Legionella pneumophila	Немає гомології
Mycobacterium tuberculosis	Немає гомології
Streptococcus pneumoniae	Немає гомології
Streptococcus pyogenes	Немає гомології
Bordetella pertussis	Немає гомології
Mycoplasma pneumoniae	Немає гомології

Pneumocystis jirovecii (PJP)	Немає гомології
Candida albicans	Немає гомології
Staphylococcus epidermis	Немає гомології
Streptococcus salivarius	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 (HMorbillivirus) 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/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

*використані комерційні стандартні зразки, назви наведено згідно каталогу виробника

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 вірусу кору і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 102 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202302; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202303; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (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
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

Підготовка зразка

Цей набір валідовано для використання назофарингеальними і орофарингеальними мазками, аспіратами з носа чи змивами з горла і зразками сечі. Для аналізу бажано використовувати зразки з носа або ротоглотки, ніж сечі. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне тестування.

Клінічні зразки слід зберігати та транспортувати відповідно до локального законодавства.

Обробка та транспортування зразків із носоглотки:

- **Зберігання та транспортування:** Зразки з носоглотки слід зберігати і транспортувати охолодженими до температури 4-8°C разом з холодоелементами протягом 48 годин.

- **Затримка доставки:** Якщо негайна відправка неможлива, струсіть зонди (сваби, тампони) для забору біоматеріалу в транспортному середовищі щоб елюювати клітини, а потім видалить зонди. Центрифугуйте середовище або назальний аспірат при 500 × g (приблизно 1500 об/хв) протягом 5 хвилин, бажано при 4°C. Ресуспендуйте отриманий осад у культуральному середовищі для клітин. Зберігайте суспендований осад і супернатант окремо при -70°C. Відправте зразки до лабораторії в охолодженому стані (4-8°C) за умов доставки протягом 48 годин або, бажано, на сухому льоду в добре закупорених флаконах з гвинтовими кришками.

- **Малооб'ємні зразки:** для змивів з носоглотки чи ротоглотки або свабів з об'ємом 1-4 мл рідини, заморозьте весь зразок при -70°C. Якщо низькотемпературні морозильні камери недоступні, зберігайте зразок при 4°C до відправлення. Уникайте циклів заморожування-розморожування або заморожування при -20°C, оскільки кристалики льоду можуть знищити вірус. Якщо зберігання при -40°C або -70°C неможливе, охолодіть зразок при 4°C.

- **Поводження зі зразком в лабораторії:** після прибуття в лабораторію, якщо зразок заморожений у 2-3 мл клітинного середовища або PBS, він може залишатися замороженим. Якщо отримано оригінальну пробірku із зондом (тампоном, свабом) додайте 2 мл DMEM, перемішайте за допомогою вихрового змішувача (вортекса) та дайте пробірці постояти протягом години для елюції вірусу. Видалить якомога більше рідини з тампона, притиснувши його до краю пробірки. Якщо є значні залишки, центрифугуйте пробірku, щоб видалити їх. Зберігайте рідкий зразок при -70°C.

Обробка та транспортування зразків сечі:

Для найбільш ефективного виділення вірусу кору зразки слід зібрати якнайшвидше після появи висипу, в ідеалі протягом 5 днів. Бажано використовувати першу порцію ранкової сечі, зібравши 10-50 мл сечі в стерильний контейнер і зберігаючи при 4-8°C перед центрифугуванням.

Вірус кору присутній у клітинах сечовивідних шляхів під час гострих випадків. Вірус концентрують центрифугуванням сечі та ресуспендуванням клітинного осаду у відповідному середовищі для транспортування вірусів. *Примітка. Не заморожуйте сечу перед центрифугуванням.* Зразки сечі можна транспортувати при 4°C у добре закритих контейнерах, але бажано центрифугувати їх протягом 24 годин. Центрифугуйте при 500хg (приблизно 1500 об./хв.) протягом 5-10 хвилин при 4°C, видалить супернатант і ресуспендуйте осад у 2-3 мл стерильного транспортного середовища, культурального середовища для тканин або фосфатно-сольового буферу.

Ресуспендований осад можна зберігати при 4°C і протягом 48 годин і відправити до референс-лабораторії. Крім того, його можна заморозити при -70°C у транспортному середовищі для

вірусів і відправити на сухому льоду в добре закупореному флаконі з гвинтовою кришкою.

Протокол

Очищення ДНК вірусу Для екстракції РНК вірусу зі зразків 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 (ВК), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потрапляння виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю повинні дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Morbillivirus RM-2. Компонент Morbillivirus RM-2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним 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 та 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. В окрему пробірku внести реагенти із розрахунку 14 мкл Morbillivirus RM-1 і 1 мкл Morbillivirus RM-2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки для ПЛР для кожного зразка. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, позитивного контролю та негативного контролю у відповідні пробірки. 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

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

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM і HEX.

6. Запустити програму.

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

Аналіз даних

Щоб отримати достовірні результати, 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 інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (РНК вірусу кору)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	РНК вірусу кору виявлена
-	+	Результат валідний. РНК вірусу не виявлено
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit	25 тестів	IP202429-25
RevoDx Measles morbillivirus qPCR Kit	100 тестів	IP202429-100

