

RevoDx Набір для виявлення РНК пареховірусу методом ПЛР

Набір реагентів пареховірус людини (Human parechovirus) для
якісного виявлення РНК методом ПЛР у реальному часі

Інструкція з використання

Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202254-25 – 25 тестів
IP202254-100 – 100 тестів

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферний розчин Parechovirus RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш Parechovirus RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок Parechovirus Positive Control	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок Parechovirus Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Human Parechovirus 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 Parechovirus 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 Human Parechovirus qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення РНК пареховірусу людини у таких зразках: спинномозкова рідина, мазки носоглотки та ротоглотки, назофарингеальний аспірат/лаваж, бронхоальвеолярний лаваж, бронхіальний аспірат, мокротиння.

Негативні результати не виключають інфікування пареховірусом 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 Human Parechovirus 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 вірусу, 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 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 Human Parechovirus 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 кДНК, 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.

У наборі RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації

Прилади

Набір RevoDx Human Parechovirus 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 Human Parechovirus qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, ROX та Cy5.

Загальний опис

Пареховіруси людини (HPEV) спричиняють інфекції шлунково-кишкового тракту та дихальної системи. Нещодавно було встановлено, що вони можуть викликати широкий спектр симптомів — від легкої діареї до важких станів, таких як сепсис і менінгіт, особливо у немовлят. HPEV належать до великої родини *Picornaviridae* — безоболонкових вірусів з одноланцюговою позитивною РНК, до якої входить 12 родів. У рідкісних випадках пареховіруси можуть спричиняти сепсис, важке зараження крові, або ураження центральної нервової системи — менінгіт чи енцефаліт. Найчастіше інфекції, викликані HPEV, виявляються у дітей віком до 3 місяців. Основні симптоми, на які слід звернути увагу у немовлят і маленьких дітей — це лихоманка, дратівливість, а також інші неспецифічні ознаки інфекції.

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 3І3.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі 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 вторинного стандарту Parechovirus для отримання кінцевих концентрацій 1200, 700, 55, 30 та 1.8 МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 16 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 76 МО/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit було протестовано 118 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність РНК пареховірусу. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів Parechovirus і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 15 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Цільові олігонуклеотиди
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (CMV)	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 (наприклад, C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	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 (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 із одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки пареховірусу 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 105 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx Human Parechovirus 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 Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: IP201920; IdilBiotech, Туреччина).
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (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.

Протокол

Виділення ДНК вірусу Для екстракції РНК вірусу бажано використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid 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 РНКаза Р людини, потрібен для підтвердження потраплення виділеної ДНК/РНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок включає плазмиду, що містить вставку. Позитивний контроль ампліфікується 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 Parechovirus RM-2. Покладіть Parechovirus 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 Parechovirus RM-1 та 1 мкл Parechovirus 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 ДНК, 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

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

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, ROX 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 ROX 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	Сигнал по каналу ROX	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	+/-	РНК Parechovirus виявлена
-	+	+/-	РНК Parechovirus виявлена
-	-	+	Цільова РНК не виявлена, результат валідний.
-	-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit	25 тестів	IP202254-25
RevoDx Human Parechovirus qPCR Kit	100 тестів	IP202254-100