

НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ РНК COVID-19 Vs 2

COVID-19 RNA Vs 2

Кат. №: **COV19RNALYO.CE**

Дата випуску інструкції: **07-2021**

Версія: **3**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

**Мультиплекс Реальний час
РЧ-ПЛР для виявлення SARS-CoV-2
Ліофілізований формат**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір **Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex Real-Time RT-PCR** з кодом **COV19RNALYO.CE** призначений для специфічного якісного виявлення SARS-CoV-2 у зразках людини (див. розділ Н) шляхом одночасної ретротранскрипції та ампліфікації певної цільової області геному Sars-CoV-2 (ген RdRp та ген N). У тій же реакційній пробірці ендogenous ген людини використовується як контроль реакції екстракції/ампліфікації (внутрішній контроль).

Набір адаптований для використання на ампліфікаторах в режимі реального часу та з системою послідовного виявлення (Sequence Detection System®) ABI 7500 (програмне забезпечення SDS, версія 1.3.1, Applied Biosystems™) і системою виявлення в режимі реального часу (Real-Time System) CFX96 (програмне забезпечення CFX manager, версія 1.7, Biorad™**).

*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applied Biosystems Corporation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.

**Biorad є зареєстрованою торговою маркою.

В. ВСТУП

Коронавіруси (CoV) – це велике сімейство вірусів, які викликають різні захворювання, від звичайної застуди до більш важких захворювань.

Загальні ознаки інфекції включають респіраторні симптоми, лихоманку, кашель, задишку та утруднене дихання. У більш важких випадках інфекція може викликати пневмонію, важкий гострий респіраторний синдром, ниркову недостатність і навіть смерть.

Захворювання органів дихання, спричинене новим коронавірусом, яке вперше виявили в місті Ухань, Китай, було названо *коронавірусною хворобою 2019* (COVID-19), а вірус - SARS-CoV-2.

Вірус SARS-CoV-2 є бетакоронавірусом, таким як MERS-CoV і SARS-CoV; вони є оболонковими, позитивно-направленими, одноланцюговими РНК-вірусами зоонозного походження.

Аналіз COV19RNA.CE RT-PCR здатний виявити вірусну РНК з меншою кількістю кроків обробки зразка, забезпечуючи швидкі результати та дійсно низький ризик перехресного забруднення досліджуваного зразка.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір **COV19RNALYO.CE** заснований на хімії в реальному часі, яка використовує спеціальні Праймери та Проби.

РНК SARS-CoV-2, вилучена з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, повторно транскрибується та ампліфікується за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Multiplex RT-PCR заснована на реакції в одній пробірці, що виконується для кожного зразка. Мультиплексний аналіз спеціально спрямований на дві області SARS-CoV-2 (RdRp та N) та ендogenous (GAPDH) внутрішній контроль (IC). Ендogenous IC, екстрагований, повторно транскрибований та ампліфікований тим часом, служить контролем забору/екстракції/ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації хорошого забору респіраторних зразків і, зрештою, ідентифікації інгібіторів реакції.

Важлива примітка:

Набір Праймерів і Проб для геномної послідовності SARS-CoV-2 (ген N) рекомендований Центром контролю та профілактики захворювань (CDC).

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат продукту з кодом COV19RNALYO.CE містить реактиви на 100 тестів.

Компонент	Вміст	COV19RNALYO.CE 100 Реакцій
A КОД: ALL/MM-8 КОЛЬОРОВИЙ КОД: СИНИЙ	5 x Майстер-Мікс	x 1 флакон (Розчинити з об'ємом ALL/RB, зазначеним на етикетці флакона)
RB КОД: ALL/RB КОЛЬОРОВИЙ КОД: СИНИЙ	Буфер для відновлення Майстер-Мікс	x 1 флакон/0.40 мл (ml)
B КОД: COV19/CB КОЛЬОРОВИЙ КОД: ЖОВТИЙ	Ліофілізовані Праймери/Проби для гена RdRp, гена N і гена GAPDH	x 2 флакони (Розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
C КОД: ALL/C КОЛЬОРОВИЙ КОД: ЧЕРВОНИЙ	MG Вода	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
NTC КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВИЙ КОД: БІЛИЙ	Негативний контроль	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
CTRL КОД: COV19/CTRL Позитивний Контроль RdRp/N КОЛЬОРОВИЙ КОД: РОЖЕВИЙ	Ліофілізований ДНК-Позитивний контроль для гена RdRp, гена N	x 2 флакони (Розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Інструкція	Інструкція з використання	1

Важлива примітка:

За запитом, Dia.Pro може поставити реактиви для 200 тестів, як повідомляється нижче:

1. Компонент А	x 2 флакони
2. Компонент RB	x 2 флакони/0.04 мл (ml)
3. Компонент В	x 4 флакони
4. Компонент С	x 2 флакони/1.5 мл (ml)
5. NTC	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
6. CTRL	x 4 флакони
7. Вкладиш інструкції	x 1
Кількість тестів	200
Код	COV19RNALYO.CE.200

Е. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір COV19RNALYO.CE після отримання необхідно зберігати при температурі +2 °C (°C)/+25 °C (°C).

Після розчинення Компонент В (код COV19/CB) і Компонент CTRL (код COV19/CTRL) стабільні протягом 90 днів при -20 °C (°C). Якщо компоненти будуть використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах; слід уникати повторного розморожування та заморожування. Дозволено лише три процеси розморожування.

Після розчинення Компонент ALL/MM-8 стабільний до 90 днів при -20 °C (°C). Якщо компонент буде використовуватися лише періодично, його слід заморожувати в аліквотах; слід уникати повторного розморожування та заморожування. Дозволено лише п'ять процесів розморожування.

F. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
- Набір для екстракції РНК.
- MG EtOH.
- Термоблок.
- Мікроцентрифуга.
- Стіжки для пробірок.
- Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
- Безнуклеазні мікропробірки.

9. Мікропробірки на 0.2 мл (ml) або мікропланшети для ПЛР, рекомендовані виробниками інструментів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без присипки.
11. Термоциклер для ПЛР в режимі реального часу (*).
12. Адсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

(*) **Увага:** Валідаційне калібрування чистих барвників (Файл Компоненту Pure Spectra) і фону (Файл Компоненту Фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен мати глибоку підготовку щодо використання термоциклерів для визначення у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та володіти кваліфікацією в протоколах ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Набір має використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я або аналогічним органом) для проведення такого типу аналізу.
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та Компонентів та при проведенні тесту.
7. Компоненти А/СВ чутливі до світла. Не піддавайте їх дії сильного світла.
8. Уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скопчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками людини слід поводитися відповідно до останніх рекомендацій CDC та ВООЗ з біобезпеки щодо поводження та обробки зразків, пов'язаних із коронавірусною хворобою, 2019 року.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
17. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.
18. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції і переходячи до Зони ампліфікації та Зони аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні кроки.
19. Рекомендується використовувати одноразовий пластиковий посуд для приготування рідких компонентів або перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
20. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції зразків, повинні бути оброблені як потенційно

інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.

21. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
22. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для первинного діагностичного тестування на COVID-19 Центр контролю захворювань, Атланта, США (CDC) рекомендує збирати та тестувати **верхні дихальні шляхи** (мазки з носоглотки та ротоглотки) та **нижні дихальні шляхи** (мокротиння, якщо можливо) у пацієнтів із продуктивним кашлем. Не рекомендується викликати виділення мокротиння. Зразки слід відібрати якомога швидше після ідентифікації Особи, яка Підлягає Обслідуванню (PUI), незалежно від часу появи симптомів.

1. Зберіть 2-3 мл (ml) бронхоальвеолярного виділення та зразок трахеального аспірату в стерильну, герметичну ємність для збору мокротиння, з кришкою, що закручується, або в стерильний сухий контейнер. Охолодіть зразок при 2-8 °C (°C) (≤ 48 год).
2. Попросіть пацієнта прополоскати рот водою, а потім відхаркати мокротиння при глибокому кашлі безпосередньо в стерильну, герметичну ємність для збору мокротиння, з кришкою, що закручується, або в стерильний сухий контейнер. Охолодіть зразок при 2-8 °C (°C) (≤ 48 год).
3. Для зразків з носоглотки (NP) і ротоглотки (OP) використовуйте тільки тампони з синтетичного волокна з пластиковими стержнями. Не використовуйте тампони з альгінату кальцію або тампони з дерев'яними стержнями, оскільки вони можуть містити речовини, які інактивують деякі віруси та пригнічують ПЛР-тестування. Помістіть тампони негайно в стерильні пробірки, що містять 2-3 мл (ml) вірусного транспортного середовища. Зразки NP і OP слід зберігати в окремих флаконах. Охолодіть зразок при 2-8 °C (°C) (≤ 5 днів).
4. Зберіть 2-3 мл (ml) назофарингальної рідини/аспірату або назального аспірату в стерильну, герметичну ємність для збору мокротиння, з кришкою, що закручується, або в стерильний сухий контейнер. Охолодіть зразок при 2-8 °C (°C) (≤ 48 год).
5. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
6. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
7. Зразки, які необхідно зберігати протягом тривалого періоду, повинні зберігатися при -70 °C (°C). Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
8. При використанні заморожених зразків розморожуйте зразки безпосередньо перед екстрагуванням, щоб уникнути випадків деградації нуклеїнових кислот.
9. Для подальшого серологічного дослідження рекомендовано відбір зразків сироватки (гострого зразка та реконвалесцентного разка).
10. Усі зразки, зібрані для лабораторних досліджень, слід розглядати як потенційно інфекційні.
11. Медичні працівники (HCW), які збирають або транспортують клінічні зразки, повинні суворо дотримуватися рекомендацій щодо запобігання інфекціям і контролю, а також національних або міжнародних правил щодо транспортування інфекційних речовин, щоб мінімізувати можливість впливу патогенів.

I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-Мікс:

Компонент А

- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент А з об'ємом Компонента RB (код: ALL/RB), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Добре перемішайте.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Компонент RB

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона.
- Перенесіть 400 мкл (µl) Компонента RB (код: ALL/RB) у флакон з Компонентом А (код: ALL/MM-8).

Праймери/Проби для гена RdRp, гена N та гена GAPDH:

Компонент В

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

NTC. Готовий до використання.

Позитивний Контроль для гена RdRp і N:

Компонент CTRL

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані та регулярно піддаватися дезактивації (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір COV19RNALYO.CE призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp Viral RNA Mini з кодом: 52904 (QIAGEN), набором NucleoSpin Virus з кодом: FC140983 (Macherey-Nagel) і набором QIAamp MinElute Virus Spin з кодом 57704 (QIAGEN). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.
3. **Термоциклери для визначення в режимі реального часу.** Набір COV19RNALYO.CE призначений для використання тільки в поєднанні з Термоциклерами для визначення в режимі реального часу ABI 7500, програмне забезпечення SDS, версія 1.3.1 (Applied Biosystems) і системою для визначення в режимі реального часу CFX96, програмне забезпечення CFX manager, версія 1.7, Biorad™.
4. Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтесь, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки.
3. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтесь, що використовуєте правильний протокол аналізу.
4. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
5. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
6. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
7. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція РНК

Крок екстракції геномної РНК Уханського COVID-19 має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Респираторні зразки/ Сироватка	Набір Nucleospin Virus	740983	MN™
	Набір QIAamp Viral RNA mini®	52904	QIAGEN™
	Набір QIAamp Virus MinElute®	57704	QIAGEN™

Виділення РНК повинно проводитися тільки згідно з інструкцією, наданою виробником (QIAGEN™; MN™).

Важлива примітка: У процедурах екстракції необхідно суворо використовувати наступні об'єми:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм елюювання мкл (µl)
Набір Nucleospin Virus	400	60
Набір QIAamp Viral RNA mini®	140	60
Набір QIAamp Virus MinElute®	200	100

РНК, зібрану із зразків, не використану під час дослідження, слід зберігати замороженою (-18 °C (°C)/-22 °C (°C)).

Важлива примітка:

Значення Ct Внутрішнього Контролю для негативного зразка використовується для оцінки того, чи були процедури збору зразка та процедури виділення РНК виконані правильно (див. розділ Q).

N.2 Постановка реакції

Набір COV19RNALYO.CE призначений для використання тільки з Термоциклерами для визначення в режимі реального часу ABI 7500, програмне забезпечення SDS, версія 1.3.1 (Applied Biosystems) і Системою для визначення в режимі реального часу CFX96, програмне забезпечення CFX manager, версія 1.7, Biorad™.

N.2.1 Підготовка RT-PCR

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі O. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операції, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі I.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Позитивного контролю (підготовленого, як описано в розділі I).

Важлива примітка:

1- Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Реакційну Суміш** для **Зразків, NTC та позитивного контролю (CTRL)**, як показано в таблиці нижче:

Приготування для Реакційної Суміші

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер Мікс	4 мкл (µl)	48 мкл (µl)
B	Праймери/Пробірки	2 мкл (µl)	24 мкл (µl)
C	Вода MG	4 мкл (µl)	48 мкл (µl)
Загальний об'єм		10 мкл (µl)	120 мкл (µl)

- Додайте 10 мкл (µl) суміші для ампліфікації в кожен реакційну пробірку або лунку для мікропланшета.

- Додайте 10 мкл (цл) **Зразків, NTC, CTRL** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Коротко центрифугуйте реакційні пробірки при 2000 об/хв (грм).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операцій налаштування, описаних у Розділах N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

N.3.1 Температурний профіль RT-PCR

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	20 хвилин
1	1	95°C (°C)	10 хвилин
2	45	95 °C (°C)	15 секунд
		58 °C (°C) (*)	45 секунд

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

N.3.2 Вибір Детекторів

Дотримуючись інструкцій з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (CFX96 і ABI7500), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення Гену RdRp/Гену N/Внутрішнього Контролю

Виявлення	Репортер	Гасник
POL (Ген RdRp)	FAM	Нефлуоресцентний
NUC (Ген N)	Cy5	Нефлуоресцентний
Внутрішній Контроль (IC)	JOE/VIC	Нефлуоресцентний
Пасивний Стандарт (ABI7500)	ROX	

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Аналізу:

Мікроплашет або пробірки

	1	2	3
A	CTRL		
B	NTC		
C	Зразок 1		
D	Зразок 2		
E	Зразок 3		
F	Зразок 4		
G	Зразок 5		
H	Зразок 6		

Легенда: NTC = Негативний Контроль; CTRL = Позитивний контроль ДНК COVID-19 на ген RdRp і ген N; Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що оцінюються.

Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перед початком аналізу:

- Встановіть «Baseline/Початкові умови» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови базова лінія

- Встановіть вручну «Threshold/Popir» флуоресценції FAM/Cy5/JOE/VIC

«Threshold/Popir»	ABI™PRISM® 7500 SDS
FAM (POL)	0.15
Cy5 (NUC)	0.15
JOE (IC)	0.15

«Threshold/Popir»	BIORAD™ CFX96®
FAM (POL)	250
Cy5 (NUC)	250
JOE (IC)	150

Р.2 Аналіз даних

Перевірка на Позитивному Контролі проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення Ct очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

Перевірка	Вимоги
CTRL	Ct (Пороговий цикл) < 28.5

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Для кожного зразка вважається, що значення Внутрішнього Контролю JOE/VIC Ct підтверджує забір, екстракцію та виявлення РНК SARS-CoV-2, як описано в таблиці нижче:

POL - FAM	NUC - CY5	Внутрішній Контроль - JOE/VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	Ct < 33	ВІРНО
		Ct ≥ 33 або невизначено	ВІРНО*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	Ct < 33	ВІРНО
		Ct ≥ 33 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	Ct < 33	НЕДІЙСНИЙ***
		Ct ≥ 33 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	Ct < 33	НЕДІЙСНИЙ***
		Ct ≥ 33 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

*Висока початкова концентрація РНК SARS-CoV-2 у зразку може призвести до ЗМЕНШЕННЯ або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу для внутрішнього контролю IC через конкуренцію реагентів.

**Проблеми можуть виникнути під час збору (початковий зразок містить недостатню кількість клітин) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів) або під час етапу ампліфікації (неефективна або відсутня ретротранскрипція/ампліфікація), що призведе до неправильного результату. Процедура тестування необхідно повторити, починаючи з етапу екстракції та/або використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

***Проблеми можуть виникнути на етапі екстракції або під час етапу ампліфікації (неефективна або відсутня ретротранскрипція/ампліфікація), що призведе до неправильного результату. Процедура тестування необхідно повторити, починаючи з етапу екстракції та/або використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта. Якщо результат підтвердиться двічі, зразок може бути позитивним на інший сарбековірус.

Результати, отримані за допомогою цього продукту, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта. Можливі наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

	POL- FAM	NUC- CY5	JOE	Результат	Перевірити
ЗРАЗОК невідомий	+	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ Позитивний	ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація РНК SARS-CoV-2 може призвести до ЗАНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю IC за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	+	-	-/+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі забору/ ампліфікації	1. що вибрано барвник CY5 для виявлення NUC, а барвники JOE/VIC - для виявлення IC; 2. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 3. що набір правильно зберігався; 4. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили лунку; 5. що процедура екстракції була виконана правильно.

ЗРАЗОК невідомий	-	+	-/+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі забору/ампліфікації	1. що вибрано барвник FAM для виявлення POL, а барвники JOE/VIC - для виявлення IC; 2. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 3. що набір правильно зберігався; 4. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили лунку; 5. що процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі або неправильне функціонування приладів	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрано барвник FAM для виявлення POL, барвник CY5 для виявлення NUC, а барвники JOE/VIC - для виявлення IC; 4. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірку; 7. що процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
CTRL	+	+	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	ВАЖЛИВО: НЕМАЄ сигналу Внутрішнього Контролю І.С. на CTRL через ендогенний контроль.
CTRL	-	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрано барвник FAM для виявлення POL і барвник CY5 для виявлення NUC; 4. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірку.
CTRL	-	+	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в процедурі	1. що вибрано барвник CY5 для виявлення NUC; 2. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 3. що набір правильно зберігався; 4. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили лунку.
CTRL	+	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в процедурі	1. що вибрано барвник FAM для виявлення POL; 2. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 3. що набір правильно зберігався; 4. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили лунку.
NTC	-	-	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	ВАЖЛИВО: НЕМАЄ сигналу Внутрішнього Контролю І.С. на NTC через ендогенний контроль.
NTC	+	-	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти незаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.
NTC	-	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти незаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути помилкової передачі даних.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ITS. Оцінку ефективності проводили в лабораторіях DiaPro на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

R.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа Виявлення**.

Межа виявлення (LOD): це найменша кількість цільового значення, яку може виявити система із заданою ймовірністю.

Для тестів NAT це виражається як найменша концентрація **аналіту**, яка за багаторазової перевірки дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) була визначена шляхом тестування граничних розведень зразка, кількісно визначеного на реагенті для дослідження NIBSC на РНК Sars-CoV-2 (код 19/304).

Розведення зразків у номінальних 750 копій/мл (copies/ml) та 500 копій/мл (copies/ml) були перевірені в 20 повторях.

Для набору COV19RNALYO.CE значення LOD було визначено як кількість цільових значень, що дали позитивний результат у 19 з 20 повторів.

На основі отриманих результатів розраховано межу виявлення у 100% системи в 750 копій/мл (copies/ml).

Межа виявлення у 85% системи розрахована в 500 копій/мл (copies/ml).

Результати представлені в таблицях нижче:

750 копій/мл (copies/ml)		Ген RdRp		Разом
		Позитивний	Негативний	
Ген N	Позитивний	18	1	19
	Негативний	1	0	1
		19	1	20

500 копій/мл (copies/ml)		Ген RdRp		Разом
		Позитивний	Негативний	
Ген N	Позитивний	16	0	16
	Негативний	1	3	4
		17	3	20

R.2 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

R.2.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.

Цей параметр було вивчено шляхом дослідження 25 зразків мазків з носоглотки негативних на РНК SARS-CoV-2:

Негативні зразки РНК SARS-CoV-2

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	25
ХИБНО ПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	25
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Специфічність системи становить 100%.

R.2.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що прилад дає позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.

Для набору з кодом COV19RNALYO.CE параметр досліджували шляхом аналізу 47 зразків назофарингеальних мазків РНК SARS-CoV-2:

Позитивні зразки РНК SARS-CoV-2

СПРАВЖНИЙ ПОЗИТИВНИЙ	47
ХИБНО НЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	47
ЧУТЛИВІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Чутливість системи становить 100%.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	100%

R.2.3 Панель кваліфікації

Ефективність набору Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex Real-Time RT-PCR з кодом COV19RNALYO.CE було перевірено за допомогою Програми QCMD 2020 SARS-CoV-2 EQA (код. SCV2_20 - C1).

Панель містить позитивні, негативні та інтерферуючі зразки у вигляді матриці типу мазків (Transport Medium - TM).

Зразки були очищені за допомогою набору QIAamp Viral RNA mini відповідно до процедури виробника.

Отримані результати представлені в таблиці нижче:

Код	Цільове значення	Кореляція зразків	Ct POL	Ct NUC	Ct IC
SCV2_101C1-01	Coronavirus 229E	3.93dPCR хч/мл (ср/мл)	Не визначений	Не визначений	30.13
SCV2_101C1-02	SARS-CoV2	4.12dPCR хч/мл (ср/мл)	29.46	28.43	29.16
SCV2_101C1-03	SARS-CoV2	3.15dPCR хч/мл (ср/мл)	32.45	31.41	30.09
SCV2_101C1-04	SARS-CoV2	2.82dPCR хч/мл (ср/мл)	33.29	32.31	29.19
SCV2_101C1-05	SARS-CoV2	2.82dPCR хч/мл (ср/мл)	33.44	32.33	29.44

R.2.4 Чутливість до Модифікацій SARS-CoV-2

Здатність набору COV19RNALYO.CE виявляти нові модифікації SARS-CoV-2 була вивчена шляхом аналізу серійних розведень доступних Контролів РНК, наданих постачальниками Міжнародних Референсів (наприклад, AMPLIRUN від Vircell, Іспанія).

Контролі Модифікацій були протестовані від 1E+04 копій/мкл (copies/μl) до 5E-01 копій/мкл (copies/μl), зберігаючи в якості референта контроль AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA (код MBC137-R).

Набір з кодом COV19RNALYO.CE продемонстрував однакову чутливість для всіх тестованих контролів Модифікацій РНК, зі здатністю успішно виявляти обидві цільові області (N і RdRp) до 1E+00 копій/мкл (copies/μl). Через відсутність Міжнародних Референсних Препаратів для всіх модифікацій SARS-CoV-2, які сьогодні циркулюють у всьому світі, Dia.Pro провела біоінформаційне дослідження з оцінкою гомології послідовності ампліфікованих цільових областей.

Завдяки дизайну, виконаному на добре збережених послідовностях структурних високостабільних генів SARS-CoV-2, Біоінформаційне Дослідження показало сильну гомологію Праймерів і Проб, що використовуються в наборі, з усіма модифікаціями вірусів, які циркулюють і сьогодні зберігаються в найважливіших міжнародних базах даних.

Отримані результати детально описані в технічному файлі продукту.

R.3 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти тільки цільову послідовність РНК.

Аналітичну специфічність аналізу COV19RNALYO.CE SARS-CoV-2 РНК вивчали таким чином:

1. Набір Праймерів/Проб гена RdRp був обраний для аналізу цільових послідовностей геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (BioEdit Sequence Alignment Editor, Oligo Analyzer і Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір Праймерів/Проб гена N було обрано з тих, що опубліковані Центром контролю та профілактики захворювань (CDC) Атланти.
3. Набір Праймерів/Проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи має будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, гомологію з Уханьським Covid-19, а також програмним забезпеченням «ClustalW», щоб

порівняти цільові послідовності геному різних генотипів токсоплазми.

4. Специфічність була покращена шляхом вибору жорстких умов реакції.
5. Зразки, отримані від панелі пацієнта, який страждав від інфекцій, викликаних потенційно інтерферуючими організмами, були отримані з Європейського архіву вірусів (Марсель, Франція).

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Область RdRp	Область N
HCoV-NL63	Негативний	Негативний
HCoV-229E	Негативний	Негативний
HCoV-OC43	Негативний	Негативний
MERS-CoV	Негативний	Негативний
SARS-CoV	Негативний	Позитивний*

*розбіжні результати між двома цільовими областями можуть означати гомологію в послідовності області N між SARS-CoV та SARS-CoV-2. Область RdRp демонструє ідеальну специфічність.

Для кращої перевірки аналітичної специфічності набору з кодом COV19RNALYO.CE було протестовано додатковий контроль SARS-CoV (1.2E+04 копій/мкл (copies/μl)).

У цьому випадку не було виявлено перехресної реактивності в обох цільових регіонах, що означає повну специфічність набору COV19RNALYO.CE для SARS-CoV-2.

T. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу. Зокрема, точне піпетування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення РНК SARS-CoV-2.

Визначення РНК SARS-CoV-2 у зразку пацієнта має великі медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.



Виявлення можливого випадку виникнення у людини збудника, що викликає важкі гострі респіраторні захворювання, має бути негайно повідомлено місцевим та національним органам охорони здоров'я. Відповідно до Міжнародних правил охорони здоров'я (IHR) 2005 протягом 24 годин про всі події, які можуть становити надзвичайну ситуацію у сфері громадського здоров'я.

Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

U. ЛІТЕРАТУРА

1. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. V.M. Corman et al. www.eurosurveillance.org
2. Real-Time RT-PCR panel for detection 2019-novel coronavirus. Center for disease control and prevention (CDC).
3. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. HKU ; LKS faculty of medicine school of public health.
4. Interim guidelines for collecting, handling and testing clinical specimens from person under investigation (PUIs) for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Center for disease control and prevention (CDC).
5. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. World Health Organization (WHO) 17th of January 2020.
6. Polmonite da nuovo coronavirus (2019-nCoV) in Cina. 0001997-22/01/2020-DGPRE-DGPRE-P. Ministero della Salute, direzione generale della prevenzione sanitaria.
7. Development of a quantitative assay for SARS coronavirus and correlation of GAPDH mRNA with SARS coronavirus in clinical specimens. S.C.C. Wong et al.; J Clin Pathol 2005;58:276-280.

V. СИМВОЛИ

ЛЕГЕНДА			
	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики in vitro		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
	Знак відповідності CE		Дата виготовлення



ВИРОБНИК

DIA.PRO

*Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*

ТОВ ДІА.ПРО

*Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

*ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua*

