

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-036
Детекција SARS - CoV - 2 у орофарингеалном и назофарингеалном брису методом Real time RT PCR				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	5	2025-02-05	др Санда Лазић руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Основни циљ испитивања је детекција SARS - CoV - 2 вируса у назофарингеалном и орофарингеалном брису методом Реверзне Транскрипције - Ланчане Реакције Полимеразе у реалном времену (енг. *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - Real Time RT - PCR*). Присуство вируса се одређује на основу детекције генетичког материјала SARS - CoV - 2 вируса, односно циљне амплификације вирусних гена. Као интерна контрола се увијек користи присуство хумане РНК порјеклом из хуманих ћелија наведених слузница.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Принцип методе се заснива на природном процесу репликације ДНК. Наиме, користећи специфичне прајмере (граничнике) могуће је умножити (амплификовати) жељене циљне секвенце, гене или дијелове гена, било ког генетичког материјала, био он ДНК или РНК, методом PCR - а. Уколико између граничника имамо и специфичну пробу, која је обиљежена флуоресцентном бојом, ту амплификацију је могуће пратити у реалном времену (РТ - PCR). Пробе су олигонуклеотиди који на 5' крају имају флуорофору као репортер боју и пригушивач на 3' крају који флуорофору држи закључаном док је проба интактна. Прајмери и флуоресцентне пробе су дизајнирани тако да одговарају регионима генома специфичним за SARS - CoV - 2 вирус. Амплификациони пакет (кит) који користимо за детекцију SARS - CoV -2 вируса открива присуство двије различите и високо специфичне генске секвенце SARS-CoV-2: Rdrp, E i N регион (FAM канал). Поред тога наш кит садржи и сет за амплификацију хуманог гена, што је наша интерна контрола (HEX канал) којом контролишемо цео процес детекције, од узорковања, преко екстракције до амплификације/детекције. Како детектујемо резултат амплификације у реалном времену? Наиме, током реакције амплификације, ензим ДНК полимераза током умножавања циљних секвенци исеца пробу на 5' крају и одваја репортет боју од пригушивача. То исјецање резултује појавом флуоресцентног сигнала који емитује репортет боја и који се детектује у реалном времену од стране система за детекцију. Мјерењем интензитета флуоресценције у реалном времену омогућава се квалитативна и квантитативна детекција вируса у узорцима.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

За сваки генотип/подтип, вриједности границе детекције (*LoD*) и распони поузданости од 95% су сажети у табели испод.

Циљни ген	Граница детекције (IU/ml)	95% доња граница поузданости	95% горња граница поузданости
Rdrp+N+ E	16867.896	12691.579	30951.473

Прецизност

	Вриједност	Ст. девијације	Варијанта	Коефицијент варијације
--	------------	----------------	-----------	------------------------

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

18000 IU/ ml (FAM)	33.82	0.31	0.10	0.93
18000 IU/ ml (HEX)	33.55	0.37	0.14	1.11
Negative (FAM)	N/A	N/A	N/A	N/A
Negative (HEX)	33.40	0.58	0.34	1.74

Специфичност

Дијагностичка специфичност *PCR* комплета је 100%.

Специфичност теста је процењена испитивањем 20 референтних организама. Комплет за *PCR* у реалном времену за детекцију вируса *SARS CoV 2* није показао никакву унакрсну реактивност са другим потенцијалним унакрсним реактивним маркерима датим у табели испод.

Узорак	Извор
Human Adenovirus	NIBSC (Cat. No: 16/324)
Parainfluenza virus	ATCC VR-93
Influenza A	ATCC VR-95
Influenza A H5ORF1AB	ATCC VR-1609
Influenza A H1ORF1AB	ATCC VR-1672
Influenza A H3N2	ATCC VR-822
Influenza A H7N7	ATCC VR-1641
Influenza B	ATCC VR-101
Parainfluenza 1	ATCC VR-94
Parainfluenza 2	ATCC VR-92

Узорак	Извор
Parainfluenza 3	ATCC VR-93
Parainfluenza 4	ATCC VR-579
Human Metapneumovirus (hMPV)	ATCC VR-3250SD
Human Enterovirus V71	ATCC VR-1432
Human respiratory syncytial virus	ATCC VR-154
Human Coronavirus NL63	ATCC VR-3263SD
Human Coronavirus HKU1	ATCC VR-3262SD
Human Coronavirus 229E	ATCC VR-740
Betacoronavirus 1 OC43	ATCC VR-1558D
MERS Coronavirus	ATCC VR-3248SD

4. ВРСТА УЗОРКА

За потребе лабораторијске дијагностике *SARS - CoV - 2* вируса узима се узорак назофаринкса и/или орофаринкса, стерилним дакронским или најлонским брисевима у једном транспортном медијуму, према упутству за *PCR* методу.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Припрема пацијената се обавља према упутству УП-10-135: Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику, тачка 6.3.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

Узорци се чувају у вирусном транспортном медијуму и могу се чувати на температури од 2 °C до 8 °C до 72 сата након узимања. Ако се очекује кашњење у екстракцији, чувајте узорке на -20° C или ниже. Екстраховане нуклеинске киселине треба чувати на -20° C или ниже.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

У циљу детекције *SARS - CoV - 2* у *PCR* лабораторији се користе:

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

- Биосигурносни кабинет;
- Центрифуге;
- Водено купатило;
- Расхладни уређаји (фрижидери и замрзивачи);
- Вортекс;
- Термоблок;
- *PCR* комора (*DNK/RNK UV - Cleaner box*);
- *RT - PCR* апарат;
- Аутоматске пипете и наставци;
- *PCR* тубе без присуства РНаза;
- Аутоклав.

Реагенси који се користе за детекцију *SARS - CoV - 2 Real time RT PCR* методом су:

- Вирусни транспортни медијум;
- Екстракциони кит за мануелну екстракцију (*DNA/RNA PREP*);
- Амплификациони кит (*DIAGNOVITAL HS SARS-CoV-2*).

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу се одвија према: УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом*; УП-10-138: *Обезбјеђивање и праћење услова радне средине у процесу испитивања*; УП-10-156: *Биосигурност у PCR лабораторији*; УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

При доспијећу узорак у лабораторију додијељује им се уникатни број протокола према упуству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 4.3. Након тога слиједи обрада узорка која подразумева:

1. Естракцију генетичког материјала вируса (РНК молекула);
2. Припрему и покретање ланчане реакције полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*);
3. Интерпретацију резултата.

Поступак екстракције РНК из узорака назо/орофарингеланог бриса

Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у простору за изолацију нуклеинских киселина.

Прије уласка у инфективни блок неопходно је обући сву прописану личну заштитну опрему, као што је дефинисано упутством УП-10-156: *Биосигурност у PCR лабораторији*.

Материјал и опрему намијењене за обраду и рад у просторији за екстракцију користимо искључиво на том простору за описане процедуре и не смије се преносити из једне радне просторије у другу. То је биохазардни дио процедуре.

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

При раду се обавезно користе дупле једнократне нитрилне рукавице без пудера, које се често дезинфикују или мијењају, нарочито ако дође до просипања течности или када постоји сумња на контаминацију.

Обавезно је ношење мантила (скафандера) који је намијењен само за простор за изолацију вирусне РНК.

Зависно од врсте произвођача и начина екстракције (мануелна или аутоматска), разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном и/или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се чувају на видном мјесту у просторији за екстракцију.

- Непосредно прије екстракције узорке извадити из фрижидера и темперирати на собној температури, припремити пипете, наставке са дуплим филтером за пипете, контејнере за лабораторијски отпад, тубе.
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе од 2ml, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- Узорак прије изолације мијешати на вортексу, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, одбацити брис циједећи га о зидове посуде, те пипетирати око 1,5 ml у тубу за чување узорка на -80 °C, а потом слиједити инструкције произвођача екстракционог кита. Овако складиштени узорци се могу чувати годину дана на -20 °C, а на температури од -80 °C и дуже.
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- **Кораци у поступку екстракције су:**
 1. лиза ћелија и ослобађање ћелијских елемената,
 2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолом,
 3. испирање и пречишћавање,
 4. елуција РНК.
- Након последњег корака, тј. елуције РНК, изолована РНК се пребацује у тубе од 1,5ml и уколико се истог дана припрема *Real time PCR* реакција, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20 °C до постављања PCR реакције.
- Послије рада очисти се биосигурносни кабинет и кориштена опрема 70% алкохолом и укључује УВ лампа за стерилизацију простора. Након тога се припремају реагенси и потрошни материјал за следећу екстракцију.

Податке о процесу екстракције уносимо у образац ОБ-10-347: *Радна листа за екстракцију нуклеинске киселине.*

Припрема и покретање реакције ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*)

Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада. Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или потенцијална инхибиција) пожељно је поступке припреме реакције радити у одвојеним просторијама и придржавати се одређених мјера опреза:

- Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорка за *PCR* амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим *PCR* производима или током припреме узорка).
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу морају бити ослобођени ДНаза и РНаза.
- Мастер микс припремати искључиво у просторији са том намјеном.

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

- Све компоненте *PCR* реакције одмрзнути (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције свих.
- Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе.
- Израчунати број реакција за тестирање и налити реагенсе по упутству произвођача (обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају). Препорука је да се припреми мастер микс за још 2 додатне реакције да би се компензовале грешке у пипетирању.
- Припремити стрипове за *PCR* од 8 тубица сходно броју реакција.
- Уколико се као негативна контрола користи dH₂O, она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорака и позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорака са мастер миксом.
- Припремљени мастер микс се кроз прозор преноси у просторију за спајање са узорцима.
- Сва опрема и реагенси који се употребљавају у просторији за мастер микс треба да остану у њој и да се не премјештају или користе у другим просторијама. Након припреме треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Спајање узорака са мастермиксом

У просторији за спајање узорака са мастер миксом потребно је такође користити све мјере опреза већ раније поменуте. Неопходно је пажљиво отворати и затварати тубице са узорцима и избежавати прскање. Узорци се све вријеме држе на апарату за мјешање на температури од 4 - 8 °C (*ThermoMixer C*).

Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће дуже држати затворенима/поклопљенима како би се спрјечила контаминација или инхибиција.

Када се додају сви узорци потребно је провјерити да ли су сви стрипови добро затворени, обиљежени и још једном их ставити на центрифугу како би садржај равномјерно пао на дно био и спреман за *PCR* апарат.

Такође, сва опрема која се употребљава у просторији за спајање узорака треба да остане у њој и да се не премјешта или користи у другим просторијама. Након завршеног рада треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Покретање *PCR* апарата:

- Укључити апарат за *PCR* и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом *Quant Studio 5*).
- Након тога покренути *PCR* реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита.
- Никад не отворати амплификоване *PCR* продукте.
- По завршетку реакције, не отворати реакционе тубе (стрипове), да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима.
- За прецизније инструкције за поставку *PCR* реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.

Податке о реакцији ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*) уносимо у образац ОБ-10-146: *Радна листа пи-си-ар дијагностике*.

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

У *PCR* лабораторији, за детекцију SARS CoV - 2 вируса, постоји двострука интерна контрола квалитета рада. Прва подразумијева присуство интерне контроле (*IC*) у сваком узорку који се анализира. То је хумана РНК у којој детектујемо експресију хуманог гена, конститутивно експримираног у свим хуманим ћелијама. Хумана РНК је поријеклом из бриса пацијената. Другим ријечима, на овај начин имамо контролу квалитета узетог бриса и контролу квалитета изолације РНК као и саме *PCR* реакције. Наиме, уколико не детектујемо *IC* у узорку, понавља се поступак изолације и детекције. У случају истог резултата, понавља се узимање бриса и цио низводни процес детекције SARS - CoV - 2 вируса. Други ниво интерне контроле квалитета подразумијева да у сваком блоку *PCR* реакције имамо негативну и позитивну контролу. У реакцији негативне контроле немамо амплификацију за *IC* док у реакцији позитивне контроле морају бити амплификовани сви вирусни гени и *IC*. Уколико ови услови нису испуњени, понавља се цио процес. Позитивну и негативну контролу обезбјеђује произвођач кита за амплификацију (детекцију SARS - CoV - 2 вируса). Дакле, ове контроле су комерцијалне и поуздане.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Амплификациони кит за *PCR* у реалном времену није показао никакву унакрсну реактивност са другим потенцијалним унакрсним реактивним маркерима датим у табели испод.

Узорак	Извор	Узорак	Извор
Хумани аденовирус	NIBSC (Cat. No: 16/324)	Параинфлуенца 3	ATCC VR-93
Параинфлуенца вирус	ATCC VR-93	Параинфлуенца 4	ATCC VR-579
Инфлуенца А	ATCC VR-95	Хумани Метапнеумовирус (hMPV)	ATCC VR-3250SD
Инфлуенца А H5ORF1AB	ATCC VR-1609	Хумани ентеровирус V71	ATCC VR-1432
Инфлуенца А H1ORF1AB	ATCC VR-1672	Хумани респираторни синцицијални вирус	ATCC VR-154
Инфлуенца А H3N2	ATCC VR-822	Хумани коронавирус NL63	ATCC VR-3263SD
Инфлуенца А H7N7	ATCC VR-1641	Хумани коронавирус HKU1	ATCC VR-3262SD
Инфлуенца Б	ATCC VR-101	Хумани коронавирус 229E	ATCC VR-740
Параинфлуенца 1	ATCC VR-94	Бета коронавирус 1 OC43	ATCC VR-1558D
Параинфлуенца 1	ATCC VR-92	MERS коронавирус	ATCC VR-3248SD

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЈЕНЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Очитавање резултата врши особа обучена за то, специјалиста медицинске микробиологије или молекуларни биолог који су прошли обуку за рад на *PCR* апарату. Резултати се очитавају према упутствима произвођача амплификационих китова и тренутно су само квалитативни: има вирусне РНК или нема.

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-036
		5	2025-02-05	

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Није примјењиво.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати се издају на 24 - 48h.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА

Није примјењиво.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Није примјењиво.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Није примјењиво.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Оригинално упутство за руковање *Quant Studio 5 PCR* апарата.

Оригинално упутство произвођача *Diagnovital HS Sars-CoV-2 RT PCR* кита.

Оригинални научни радови који се баве тематиком *Real Time PCR*-а (Bustin et al, Vandesample et al...).

Оригинални научни радови који се баве детекцијом SARS CoV - 2 вирусне РНК методом *Real Time RT - PCR*.