RevoDx Набір для виявлення ДНК Ureaplasma Parvum/Urealyticum методом ПЛР

RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне визначення ДНК *Ureaplasma parvum* та *Ureaplasma urealyticum*
Для діагностики *in vitro*

Каталожні номери:
IP202306-50 – 50 тестів
IP202306-100 – 100 тестів
IP202306-500 – 500 тестів

CE IVD

Склад набору

	Назва компоненту	50 тестів	100 тестів	500 тестів
1	UPar/UUrea RM 1	700 мкл	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	UPar/UUrea RM 2	50 мкл	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контрольний зразок UPar/UUrea (UPar/UUrea Positive Control)	100 мкл	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контрольний зразок UPar/UUrea (UPar/UUrea Negative Control)	100 мкл	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільні до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагент UPar/UUrea RM 1 не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть реагенти на кілька аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК *Ureaplasma Parvum* та *Ureaplasma Urealyticum* у сечі, цервікальних та урогенітальних зразках. Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути провідною причиною захворювання. Негативні результати не виключають інфікування і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.
Набір RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та діагностики in vitro.

Обмеження щодо використання продукту

- Набір nRevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit ризначений лише для діагностики *in vitro.*
- Потенційні мутації в цільових областях геному *Ureaplasma Parvum* та *Ureaplasma Urealyticum*, 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 відбору, 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 Ureaplasma Parvum/Urealyticum Real-Time PCR assay - це набір для ПЛР-аналізу, що передбачає використання флуорогенного зонду, який гібридизується з послідовністю між двома праймерами. Такий зонд містить флуоресцентну мітку на 5'-кінці та молекулу гасника на 3'-кінці, яка пригнічує флуоресцентний репортер.
Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридизується з ДНК-матрицею, а потім руйнується через 5'-3' ендонуклеазну активність ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при цьому 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 Ureaplasma Parvum/Urealyticum real-time PCR assay використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Загальний опис

Ureaplasma parvum - це вид бактерій роду *Ureaplasma*, який належить до родини *Mycoplasmataceae*. *Ureaplasma parvum* були ідентифіковані як коменсальні представники мікробіому матки здорових жінок репродуктивного віку. *Ureaplasma parvum* часто виявляють в сечовивідних або статевих шляхах. Ці бактерії можуть передаватися статевим шляхом. *Ureaplasma parvum* є умовно-патогенними збудниками урогенітального тракту людини, що можуть спричиняти розвиток хоріоамніоніту, внутрішньоутробних захворювань та внутрішньоутробної смертності плода. Існують дані, що генетичний фонд жінки впливає на несприятливий результат вагітності при інтраамніотичном інфікуванні *Ureaplasma parvum.* Інфікуванні може викликати біль під час сечовипускання, печіння, нетипові виділення, а також почервоніння і запалення.

Ureaplasma urealyticum належать до бактерій, які можуть викликати інфекції сечовивідних шляхів і піхви. Мікроорганізми можуть передаватися від матері до дитини під час пологів або статевим шляхом. *Ureaplasma urealyticum* виявляється у більшості сексуально активних людей, при цьому носійство є безсимптомним. *Ureaplasma urealyticum* можуть сприяти неонатальним інфекціям та негативним наслідкам пологів. Також *U. urealyticum* є однією з причин стерильної піурії. Бактерії можуть спричиняти передчасні пологи та розриви оболонок плоду, запалення плаценти, вроджену пневмонію, бактеріємію, менінгіт, ураження легень плода та смерть немовля. *Ureaplasma urealyticum* впливає на виношування вагітності. Крім того, цей збудник може латентно інфікувати ворсинки хоріона вагітних жінок і таким чином далі впливати на вагітність.

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.
- Ніколи не піпетуйте розчини за допомогою рота.
- В лабораторній зоні не можна вживати їжу, напої та палити.
- Необхідно мити руки після контакту зі зрізками та реагентами.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі у лабораторії необхідно користуватись засобами індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними 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 калібровані дозатори та завжди змінюйте наконечники під час роботи з різними рідинами (бажано використовувати наконечники з аерозольним фільтром).
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктів ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація) для уникнення контамінації.
- 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 ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія розведень патогену для отримання кінцевих концентрацій 1320, 560,120, 42 та 25 копій/мл, шляхом розведення зразками сечі, зібраними у негативних на патоген осіб, для імітації клінічних зразків. Бактеріальну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторах. Значення LoD становило 98 копій/мл. Цей LoD був додатково підтверджений тестуванням 20 позитивних зразків.

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів набору RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealytıcum qPCR Kit було проведено для послідовностей кажного доступного генотипу у базах даних NCBI та GISAID. Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з всіма доступними послідовностями генотипів з Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealytıcum qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealytıcum qPCR Kitпроти послідовностей 26 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 25 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealytıcum qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалося.

Нижче наведені результати перехресної реактивності, як у *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Bacillus subtilis	Немає гомології
Chlamydia pneumoniae	Немає гомології
Haemophilus influenzae	Немає гомології
Legionella pneumophila	Немає гомології
Mycobacterium tuberculosis	Немає гомології
Streptococcus salivarius	Немає гомології
Streptococcus pyogenes	Немає гомології
Bordetella pertussis	Немає гомології
Mycoplasma pneumoniae	Немає гомології
Pneumocystis jirovecii (PJP)	Немає гомології
Enterococcus dispar	Немає гомології
Listeria monocytogenes	Немає гомології
Neisseria meningitidis	Немає гомології
Proteus spp.	Немає гомології
Saccharomyces cerevisiae	Немає гомології
Schizosaccharomyces pombe	Немає гомології
Aspergillus niger	Немає гомології
Salmonella spp.	Немає гомології
Serratia marcescens	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу A/B	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Ріновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
Chlamydia pneumoniae	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Haemophilus influenzae	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Legionella pneumophila	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Mycobacterium tuberculosis	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Streptococcus pyogenes	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Bordetella pertussis	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено

Mycoplasma pneumoniae	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Pneumocystis jirovecii (PJP)	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Enterococcus dispar	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Listeria monocytogenes	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Neisseria meningitidis	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Aspergillus niger	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не заявлено	Не виявлено
Ріновірус	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не заявлено	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (Cat. No: 16/324)	2.0×10^8 копій/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10^5 копій/мл	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10^5 копій/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не заявлено	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202302; idil biotech,Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202303; idil biotech,Туреччина) або DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent (Кат. No: IP202319; idil biotech,Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (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
- Бокс біологічного захисту
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному час

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі зразками сечі, цервікальними та урогенітальними зразками. Проте, більшість нуклеїнових кислот, що придатні до ПЛР аналізу можуть бути використані з цим набором. 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.

Після відбору зразки можна зберігати за кімнатній температурі не більше 4 годин. Транспортування зразків має здійснюватись відповідно до місцевого законодавства.

Протокол

Виділення ДНК Для екстракції бактеріальної ДНК вірусу з клінічних зразків бажано використовувати такі набори: щоб запобігти контамінації. RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit або DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent. Використання інших реагентів може негативно вплинути на результати. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника обраного набору для виділення нуклеїнових кислот. Для запобігання контамінації бажано проводити всі операції в трьох окремих зонах (виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікація).

Внутрішній контроль Внутрішній контроль, мішенню якого є РНКаза P людини, має бути у кожному досліджувальному зразку для підтвердження потрапляння виділеної нуклеїнової кислоти у реакційні пробірки. Також внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції нуклеїнових кислот.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 25 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім UPar/UUrea RM 2. Покладіть UPar/UUrea RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім обсадить краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів UPar/UUrea RM 1 та UPar/UUrea 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 UPar/UUrea RM 1 та 1 мкл UPar/UUrea RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним 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 контрольного зразка та негативного контрольного зразка у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно з протоколом: 95°C 2 хв, 1 цикл; 95°C 10 сек, 60°C 20 сек , 40 циклів (Таблиця 3).Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Активація полімерази ("гарячий" старт)	1	95ºC, 2 хв
Ампліфікація*	40	95ºC, 10 сек
		60ºC, 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 данних

Значення Ct позитивного контролю по каналах FAM та ROX має дорівнювати 25±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 (ДНК *Ureaplasma Parvum*)	**Сигнал по каналу ROX (ДНК *Ureaplasma Urealyticum*)**	**Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)**	**Інтерпретація**
+	**-**	**+/-**	ДНК *Ureaplasma Parvum* виявлена
-	**+**	**+/-**	ДНК *Ureaplasma Urealyticum* не виявлена
-	**-**	**+**	Цільова ДНК не виявлена
-	**-**	**-**	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	**Фасування**	**Кат No.**
RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit	50 тестів	IP202306-50
RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit	100 тестів	IP202306-100
RevoDx Ureaplasma Parvum/Urealyticum qPCR Kit	500 тестів	IP202306-500