



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Escherichia coli* K1 методом ПЛР

RevoDx *Escherichia coli* K1 qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *E. coli* K1

**Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202408-25 – 25 тестів
IP202408-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	E. coli K1 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	E. coli K1 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль (E. coli K1 Internal Control)	65 мкл	250 мкл
4	Позитивний контроль (E. coli K1 Positive Control)	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контроль (E. coli K1 Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx E. coli K1 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 E. coli K1 RM 1 не можна заморожувати-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 Escherichia coli K1 qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *E. coli* K1.

Негативні результати не виключають наявності інфекції і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Escherichia coli K1 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
- Набір RevoDx E. coli K1 qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, 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

RevoDx Escherichia coli K1 qPCR Kit — це набір для виявлення ДНК *Giardia lamblia* методом ПЛР у реальному часі. Під час реплікації ДНК 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. Для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Загальний опис

Escherichia coli K1 - це вірулентний штам кишкової палички, який асоційовано з неонатальним менінгітом і сепсисом. Характерною особливістю бактерій є наявність капсульного полісахариду (K1), який імітує молекули господаря, що дозволяє знизити розпізнавання імунною системою і уникнути її впливу.

Швидка і точна діагностика *E. coli* K1 має вирішальне значення для своєчасного лікування неонатального менінгіту і сепсису, а також зниження рівня захворюваності, смертності та ризиків розвитку антибіотикорезистентності.

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 в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражуючими 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 кожену 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

Межа виявлення (LoD)

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту *E. coli* K1, до отримання кінцевих концентрацій 1000, 250, 45, 10 та 1.6 КУО/мл. ДНК патогена очищали за допомогою RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 102 КУО/мл.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit було протестовано 111 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК патогену. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 15 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В	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
Коронавірус SARS	Немає гомології
Коронавірус MERS	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус паргрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу типів А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
РНК вірусу гепатиту С для ампліфікаційних технік (6 міжнародний стандарт BOO3)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено

Цитомегаловірус людини для ампліфікаційних технік (1 міжнародний стандарт)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
Вірус гепатиту В для ампліфікаційних технік (4 міжнародний стандарт ВООЗ)	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
Коронавірус SARS-CoV-2 (1 стандарт ВООЗ)	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Передресна контамінація

Було оцінено потенційну передресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР із одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки *E. coli* K1 і 4 негативні зразки. Передресної 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 клінічних зразків. Результати, отримані за допомогою RevoDx *E. coli* K1 qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech, Туреччина), RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech; Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри, тощо)
- 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
- Бокс біологічного захисту

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати набір 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 Наявність внутрішнього контролю (ВК) під час процедури очищення є необхідною. Внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* ДНК, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин. Не додавайте ВК безпосередньо у зразок. Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК/1 мкл буфера для елюції). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції НК чи ампліфікації.

Позитивний контроль Зразок позитивного контролю містить плазмиду зі вставкою. Позитивний зразок слід ампліфікувати в окремій 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 *E. coli* K1 RM 2. Покладіть реагент *E. coli* K1 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 *E. coli* K1 RM 1 та *E. coli* K1 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 *E. coli* K1 RM 1 та 1 мкл *E. coli* K1 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 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
Активация полімерази ("гарячий" старт)	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

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

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами ROX та Cy5.
6. Запустити програму.

Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу 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 ROX (<i>E. coli</i> K1)	Сигнал по каналу CY5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>E. coli</i> K1 виявлена
-	+	ДНК <i>E. coli</i> K1 НЕ виявлена
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx <i>E. coli</i> K1 qPCR Kit	25 тестів	IP202408-25
RevoDx <i>E. coli</i> K1 qPCR Kit	100 тестів	IP202408-100