



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Cryptosporidium* spp методом ПЛР

RevoDx *Cryptosporidium* spp qPCR Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення ДНК *Cryptosporidium* spp
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202439-25 – 25 тестів
IP202439-100 – 100 тестів**

Компоненти набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	CS RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	CS RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль (CS Internal Control)	65 мкл	250 мкл
4	Позитивний контроль (CS Positive Control)	50 мкл	100 мкл
5	Негативний контроль (CS Negative Control)	50 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx Cryptosporidium spp 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 CS RM 1 не можна заморозувати-розморозувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморозування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Cryptosporidium* spp.

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 Cryptosporidium spp 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 Cryptosporidium spp 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 Cryptosporidium spp qPCR Kit - це набір для ПЛР-аналізу, що передбачає використання флуорогенного зонду, який гібридується 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 гібридується 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 RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Загальний опис

Криптоспоридії — це найпростіші паразити, які вражають багатьох хребетних тварин, в тому числі людину, і викликають гострий гастроентерит. Типові симптоми захворювання, такі як біль у животі та діарея, можуть нагадувати симптоми холери. У здорових людей хвороба зазвичай самоликвідується, але у пацієнтів з ослабленим імунітетом, наприклад, хворих на ВІЛ/СНІД, криптоспоридіоз може викликати затяжні інфекції, які часто протікають важко і можуть завершитися летальним результатом.

Через значний вплив на людей з імунodefіцитом, криптоспоридіоз вважається однією з найнебезпечніших опортуністичних інфекцій для ослаблених пацієнтів. Для лікування та контролю захворювання дуже важливо впроваджувати чутливі та специфічні діагностичні тести. Ці тести є життєво важливими для ефективного епідеміологічного нагляду та зниження рівня захворюваності, особливо у вразливих групах населення.

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 зразками 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.
- Поводьтесь 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 (limit of detections, LoD)

Для визначення ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту патогену для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 та 1.6 копій/мл. ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Ліміт детекції становив 79 копій/мл.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit було протестовано 105 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 Cryptosporidium spp qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір є специфічним до своєї мішені і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не виявлено.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Цитомегаловірус (HCMV)	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 MER	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 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 BOO3)	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
Коронавірус SARS-CoV-2 (1 стандарт BOO3)	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 A2	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

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 *Cryptosporidium* spp і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалося, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування

Всього було протестовано 108 клінічних зразків. Результати, отримані за допомогою RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202428; 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
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати набір RevoDx Stool 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 ДНК/РНК 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 CS RM 2. Покладіть компонент CS RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів CS RM 1 та CS 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 CS RM 1 та 1 мкл CS RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішайте 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
Активация полімерази ("горячий" старт)	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 хв
		60°C, 20 хв

* 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.
7. 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 (ДНК <i>Crypto. spp</i>)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>Crypto. spp</i> виявлена
-	+	ДНК <i>Crypto. spp</i> НЕ виявлена. Результат валідний.
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit	25 тестів	IP202439-25
RevoDx Cryptosporidium spp qPCR Kit	100 тестів	IP202439-100