



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для
виявлення ДНК *Plesiomonas*
shigelloides методом ПЛР
RevoDx *Plesiomonas shigelloides*
qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Plesiomonas shigelloides*

Для використання у діагностиці *in vitro*

Тільки для професійного використання

**Каталожні номери:
IP202443-25 – 25 тестів
IP202443-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш <i>P. shigelloides</i> RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш <i>P. shigelloides</i> RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль <i>P. shigelloides</i> Internal Control	65 мкл	250 мкл
4	Позитивний контроль <i>P. shigelloides</i> Positive Control	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контроль <i>P. shigelloides</i> Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx *Plesiomonas shigelloides* 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 *P. shigelloides* RM 1 не можна заморожувати-розморожувати понад 3 разів, це може призвести до зниження чутливості. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть реагенти на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК бактерій *Plesiomonas shigelloides*.

Негативні результати не виключають інфікування *Plesiomonas shigelloides* 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.

RevoDx *Plesiomonas shigelloides* 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

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному бактерій *Plesiomonas shigelloides*, 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 *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit - 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 *St* (пороговий цикл) - це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення. У наборі RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Загальний опис

Plesiomonas shigelloides - це унікальні бактерії з родини *Enterobacteriaceae*, відмінною особливістю яких є оксидазопозитивність. У Китаю та Японії відомі тим, що викликають діарею у мандрівників, при цьому зараження відбувається через воду та харчові продукти. Гастроентерит, що викликається *Plesiomonas shigelloides*, може мати різні форми - від секреторної водянистої діареї до більш тяжких дизентеріє подібних станів і навіть більш хронічних випадків, що тривають кілька тижнів.

Бактерії *P. shigelloides* наявні у прісноводних та естуарних середовищах, при цьому можуть мати різних хазяїв, наприклад, амфібій, птахів та рибу. Спалахи відповідних захворювань зазвичай пов'язані зі споживанням заражених морепродуктів, таких як краби, устриці та риба, а також води із забруднених джерел. Окрім шлунково-кишкових захворювань, бактерії можуть викликати серйозні позакишкові інфекції, що включають менінгіт у новонароджених і сепсис, які часто характеризуються високим рівнем смертності. Таким чином, моніторинг та контроль якості води є важливим для запобігання потенційним спалахам.

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.
- Відбувайте 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 вторинного стандарту бактерій *Plesiomonas shigelloides* для отримання кінцевих концентрацій 1000, 250, 45, 10 та 1.6 копій/мл. Бактеріальну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Значення LoD становило 54 копій/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, що мали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК *Plesiomonas shigelloides*. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

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

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С (Hepatitis C virus)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (Human Cytomegalovirus, HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (Hepatitis B virus)	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
SARS-коронавірус	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології

Вірус парагрипу 1-4 типу	Немає гомології
Вірус грипу А/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
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Примітка: назви подані згідно каталогу виробника

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР з одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки на *Plesiomonas shigelloides* та 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 109 клінічних зразки. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx *Plesiomonas shigelloides* qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції 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) або 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/стріп-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл
- Бокс біологічного захисту

Протокол

Екстракція вірусної РНК Для екстракції бактеріальної ДНК з клінічних зразків бажано використовувати RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit або 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 Використання внутрішнього контролю (ВК) під час екстракції нуклеїнових кислот є необхідним. Внутрішній контроль представляє собою *in vitro* транскрибовану РНК, що містить вставку. Цей контрольний зразок використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР. На кожний зразок необхідно додавати 2,5 мкл внутрішнього контролю у буфер для лізису (Lysis Solution) набору RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. **Не додавайте внутрішній контроль безпосередньо у клінічний зразок.** В залежності від кінцевого об'єму елюата можна розрахувати необхідний об'єм внутрішнього контролю, а саме 0,05 мкл ВК/1 мкл буферу для елюції (Elution Buffer). Слабкий сигнал внутрішнього контролю або його відсутність може спостерігатись при ампліфікації високопозитивних зразків, оскільки відбувається конкурування за компоненти реакції між ВК та цільовою послідовністю. Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок містить плазмідну зі вставкою. Позитивний контроль має ампліфікуватись в окремій реакційній 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 P. shigelloides RM 2. Покладіть P. shigelloides RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадить 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 RM-1 and 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 P. shigelloides RM 1 та 1 мкл P. shigelloides 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 зразку та негативного контрольного зразку у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу: 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
Активізація 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.
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 P. shigelloides)	Сигнал по каналу CY5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК P. shigelloides виявлена
-	+	ДНК P. shigelloides НЕ виявлена
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Plesiomonas shigelloides qPCR Kit	25 тестів	IP202443-25
RevoDx Plesiomonas shigelloides qPCR Kit	100 тестів	IP202443-100