



**RevoDx** Набір для  
виявлення ДНК збудників  
сепсису ПЛЮС  
**RevoDx** Sepsis Pathogen PLUS  
Detection Kit

**Інструкція з використання**

Якісне виявлення ДНК збудників сепсису та генів резистентності  
до антибіотиків

Для діагностики *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:  
IP202470-24 – 24 тести  
IP202470-48 – 48 тестів



## Склад набору

|    | Компонент                                                     | 24 тести | 48 тестів |
|----|---------------------------------------------------------------|----------|-----------|
| 1  | Буферна суміш 1<br>Sepsis PLUS MM 1                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 2  | Буферна суміш 2<br>Sepsis PLUS MM 2                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 3  | Буферна суміш 3<br>Sepsis PLUS MM 3                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 4  | Буферна суміш 4<br>Sepsis PLUS MM 4                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 5  | Буферна суміш 5<br>Sepsis PLUS MM 5                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 6  | Буферна суміш 6<br>Sepsis PLUS MM 6                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 7  | Буферна суміш 7<br>Sepsis PLUS MM 7                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 8  | Буферна суміш 8<br>Sepsis PLUS MM 8                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 9  | Буферна суміш 9<br>Sepsis PLUS MM 9                           | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 10 | Буферна суміш 10<br>Sepsis PLUS MM 10                         | 336 мкл  | 672 мкл   |
| 11 | Ферментна суміш<br>Sepsis PLUS Enzyme Mix                     | 240 мкл  | 480 мкл   |
| 12 | Позитивний контрольний зразок<br>Sepsis PLUS Positive Control | 200 мкл  | 400 мкл   |
| 13 | Негативний контрольний зразок<br>Sepsis PLUS Negative Control | 200 мкл  | 400 мкл   |

## Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Після отримання, всі компоненти RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection 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. Реагенти Sepsis PLUS MM не слід заморожувати-розморожувати більше 3 разів, оскільки це може призвести до зниження чутливості набору. За необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

## Передбачене використання

RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit — це ПЛР-тест в режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот специфічних збудників інфекцій кровотоку, та їх генів антибіотикорезистентності у зразках цільної крові або культур крові.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути остаточною причиною захворювання. 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 для виявлення збудників сепсису RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Набір RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit виявляє наступні бактеріальні та грибові патогени, а також гени резистентності до антибіотиків:

### Грам-негативні бактерії

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumonia*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Neisseria meningitidis</i></li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i></li> <li>• <i>Salmonella spp</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Грам-позитивні бактерії</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus spp</i></li> <li>• <i>Enterococcus faecalis</i></li> <li>• <i>Enterococcus faecium</i></li> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i></li> <li>• <i>Streptococcus agalactiae</i></li> <li>• <i>Streptococcus pyogenes</i></li> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i></li> </ul> |
| <b>Гриби</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida albicans</i></li> <li>• <i>Candida auris</i></li> <li>• <i>Candida glabrata</i></li> <li>• <i>Candida krusei</i></li> <li>• <i>Candida lusitanae</i></li> <li>• <i>Candida parapsilosis</i></li> <li>• <i>Candida tropicalis</i></li> <li>• <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i></li> </ul>                             |
| <b>Гени антибіотикорезистентності</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Резистентність до карбапенемів (blaNDM, blaKPC, blaIMP, blaOXA48, blaVIM)</li> <li>• Метицилінрезистентність (mecA/mecC)</li> <li>• Ванкоміцинрезистентність (vanA/vanB)</li> <li>• Резистентність до колістину</li> <li>• Гени бета-лактамаз розширеного спектру (ESBL) (CTX-M, SHV)</li> </ul>                                    |

### Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Тільки для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових ділянках геномів патогенів, залучені у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Набір валідований для використання зі зразками цільної крові та гемокультур. Тестування з іншими типами зразків може призвести до хибних результатів.
- **Гемокультури містять інгібітори ПЛР, такі як поліанетолсульфонат натрію (SPS). Інгібітор SPS зазвичай недостатньо добре видаляється більшістю методів екстракції ДНК. Для виділення ДНК патогенів зі зразків гемокультури слід використовувати набір для виділення RevoDx DNA Purification Kit from Blood Culture.**
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або недійсних 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

Мультиплексна ПЛР у реальному часі дозволяє одночасно виявляти багато типів мікроорганізмів. При цьому чутливість та специфічність методу висока, а час детекції короткий. Таким чином цей тип аналізу є корисним для виявлення ранніх госпітальних інфекцій.

RevoDx Sepsis v2.0 Pathogen Detection Kit — це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, яка передбачає використання спеціального зонду з флуоресцентною міткою на 5'-кінці і молекулою гасника на 3'-кінці. 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній із зразків пацієнта. Виявлення ДНК збудників сепсису здійснюється за допомогою 10 різних реакцій, в яких одночасно виявляється РНКаз Р людини в якості внутрішнього контролю, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

У наступній таблиці наведено перелік патогенів-мішеней у 10 різних реакційних пробірках:

| Пробірка №        | Цільовий організм/ген                 | Канал детекції |
|-------------------|---------------------------------------|----------------|
| Sepsis PLUS MM 1  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | FAM            |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>          | HEX            |
|                   | <i>Enterococcus faecium</i>           | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 2  | <i>Acinetobacter baumannii</i>        | FAM            |
|                   | <i>Staphylococcus spp</i>             | HEX            |
|                   | Гени резистентності до метициліну     | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 3  | <i>Enterococcus faecalis</i>          | FAM            |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>           | HEX            |
|                   | <i>Klebsiella pneumonia</i>           | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 4  | Гени резистентності до колістину      | FAM            |
|                   | Гени резистентності до ванкоміцину    | HEX            |
|                   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>       | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 5  | <i>Escherichia coli</i>               | FAM            |
|                   | <i>Candida albicans</i>               | HEX            |
|                   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>   | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 6  | Гени резистентності до карбапенемів   | FAM            |
|                   | <i>Streptococcus agalactiae</i>       | HEX            |
|                   | <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 7  | <i>Listeria monocytogenes</i>         | FAM            |
|                   | <i>Haemophilus influenzae</i>         | HEX            |
|                   | <i>Streptococcus pyogenes</i>         | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 8  | Гени бета-лактамаз (ESBL)             | FAM            |
|                   | <i>Candida krusei</i>                 | HEX            |
|                   | <i>Neisseria meningitidis</i>         | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 9  | <i>Candida parapsilosis</i>           | FAM            |
|                   | <i>Salmonella spp</i>                 | HEX            |
|                   | <i>Candida auris</i>                  | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 10 | <i>Candida glabrata</i>               | FAM            |
|                   | <i>Candida lusitanae</i>              | HEX            |
|                   | <i>Candida tropicalis</i>             | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |

## Прилади

Набір RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96, Tianlong Gentier 96, Applied Biosystems QuantStudio5, а також приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite). Але RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

## Загальний опис

Рання діагностика інфекцій кровоносної системи, зокрема бактеріального та грибкового походження, є критично важливою для зниження ризику тяжких ускладнень захворювання (1). Виживаність пацієнтів із сепсисом значною мірою залежить від швидкої та надійної діагностики, адже при тяжкому сепсисі без ефективного антимікробного лікування рівень виживання знижується в середньому на 7,6% щогодини від початку гіпотензії (2).

Традиційний метод посіву крові має обмеження щодо швидкості отримання результату та чутливості. Крім того, він є надзвичайно чутливим до впливу зовнішніх чинників, що може негативно впливати на ефективність лікування. Згідно з опублікованими рекомендаціями, антибіотикотерапію слід розпочинати протягом першої години після появи підозри на

септичний шок або тяжкий сепсис (3). Втім, емпірична антибіотикотерапія в умовах тяжкої інфекції виявляється неадекватною приблизно в третині випадків, що значно підвищує рівень смертності та подовжує тривалість госпіталізації (4). Затримка з призначенням оптимальної антимікробної терапії не лише знижує якість медичної допомоги, а й сприяє зростанню антибіотикорезистентності (5).

#### Використані джерела:

1. Seymour, C. W., Gesten, F., Prescott, H. C., Friedrich, M. E., Iwashyna, T. J., Phillips, G. S., et al. (2017). Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N. Engl. J. Med.* 376, 2235–2244.
2. Degoricija V, Sharma M, Legac A, et al. Survival analysis of 314 episodes of sepsis in medical intensive care unit in university hospital: impact of intensive care unit performance and antimicrobial therapy. *Croat Med J.* 2006;47:385-397.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013;41:580-637.
4. Shorr AF, Micek ST, Welch EC, et al. Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med.* 2011;39:46-51.
5. Zasowski, E. J., Claeys, K. C., Lagnf, A. M., Davis, S. L., and Rybak, M. J. (2016). Time is of the essence: the impact of delayed antibiotic therapy on patient outcomes in hospital-onset enterococcal bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1242–1250.

#### 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 засоби індивідуального захисту
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь що всі 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 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 НК, 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 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 НК і закінчуючи відповідними зонами використання.

#### Характеристики набору

##### Аналітична чутливість:

Для визначення межі виявлення (Limit of Detection, LoD) була підготовлена серія розведень кожного збудника для отримання кінцевих концентрацій 2430, 810, 270, 90 і 30 КУО/мл шляхом розведення зразками цільної негативної до патогенів крові для імітації клінічних зразків. ДНК збудників очищали за допомогою набору RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria. Кожне розведення тестували в 24 повтореннях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Межа виявлення (LoD) становила 200 КУО/мл, це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 200 КУО/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 200 КУО/мл.

##### Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit був проведений для послідовностей кожного збудника, доступних у базах даних NCBI. Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями патогенів з баз/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

##### Перехресна реактивність:

Перехресна реактивність набору для виявлення збудників сепсису RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit проти послідовностей 22 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 21 збудник були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection 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       |
|-------------------------------------|-----------------|
| <i>Bacillus subtilis</i>            | Немає гомології |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i>         | Немає гомології |
| <i>Legionella pneumophila</i>       | Немає гомології |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   | Немає гомології |
| <i>Streptococcus salivarius</i>     | Немає гомології |
| <i>Bordetella pertussis</i>         | Немає гомології |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>        | Немає гомології |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP) | Немає гомології |
| <i>Entamoeba dispar</i>             | Немає гомології |
| <i>Proteus spp.</i>                 | Немає гомології |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | Немає гомології |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>    | Немає гомології |
| <i>Aspergillus niger</i>            | Немає гомології |
| <i>Salmonella spp.</i>              | Немає гомології |
| <i>Serratia marcescens</i>          | Немає гомології |
| Вірус парагрипу 1-4 типів           | Немає гомології |
| Вірус грипу А та В                  | Немає гомології |
| Ентеровірус (напр. EV68)            | Немає гомології |
| Респіраторно-синцитіальний вірус    | Немає гомології |
| Риновірус                           | Немає гомології |
| Аденовірус (напр. С1 Ad. 71)        | Немає гомології |
| Метапневмовірус людини (hMPV)       | Немає гомології |

## Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

| Організм                                         | Джерело                 | Концентрація                 | Результат   |
|--------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------|
| <i>Chlamydia pneumoniae</i>                      | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Legionella pneumophila</i>                    | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Bordetella pertussis</i>                      | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                     | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)              | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Entamoeba dispar</i>                          | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| <i>Aspergillus niger</i>                         | Клінічний зразок        | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Коронавірус людини (229E)                        | NIBSC (Cat. No: 09/132) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Риновірус                                        | NIBSC (Cat. No: 08/324) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Аденовірус                                       | NIBSC (Cat. No: 16/324) | 2.0×10 <sup>8</sup> МО/мл    | Не виявлено |
| Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)        | NIBSC (Cat. No: 07/296) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)             | NIBSC (Cat. No: 07/298) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)                  | NIBSC (Cat. No: 07/300) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1) | NIBSC (Cat. No: 16/194) | 1.25×10 <sup>5</sup> МО/мл   | Не виявлено |
| Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2) | NIBSC (Cat. No: 16/296) | 2.8×10 <sup>5</sup> МО/мл    | Не виявлено |
| Респіраторно-синцитіальний вірус A2              | NIBSC (Cat. No: 08/120) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 1 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/176) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 2 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/178) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 3 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/118) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 4 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/180) | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |

## Порівняльні клінічні випробування:

Ефективність роботи набору для виявлення збудників сепсису RevoDx Sepsis PLUS Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою архівних зразків цільної крові. Для кожного збудника було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у рандомізованому сліпом дослідженні. Всі 20 позитивних зразків і 20 негативних зразків були отримані з лабораторії державної лікарні і попередньо протестовані за допомогою валідованого порівняльного аналізу. Зразки були виділені за допомогою набору RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Sepsis PLUS Pathogen Detection Kit відповідно до інструкції з використання. Для ампліфікації, детектування та аналізу використовували ПЛР-ампліфікатор BIO-RAD CFX96.

За результатами тестування отримали 100% збіг з очікуваними результатами.

## Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення RevoDx Pathogen 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 RevoDx DNA Purification Kit from Blood Culture (Кат. No: IP202225; 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
- Бокс біологічного захисту

## Підготовка зразків

Набір валідовано для використання зі зразками цільної крові чи гемокультур. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає повне і точне тестування.

Зразки можна зберігати за температури 2-8 °C протягом 72 годин після відбору. Якщо екстракція затримується, то зразки слід зберігати за температури -15 °C або нижче. Транспортування клінічного матеріалу має відбуватись відповідно за локального законодавства.

## Протокол

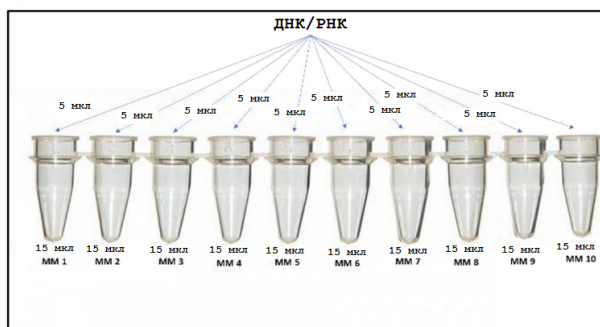
**Виділення ДНК:** Для виділення ДНК збудників слід використовувати набір RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx DNA Purification Kit from Blood Culture. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь 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:** Внутрішній контроль (ВК), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потраплення виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

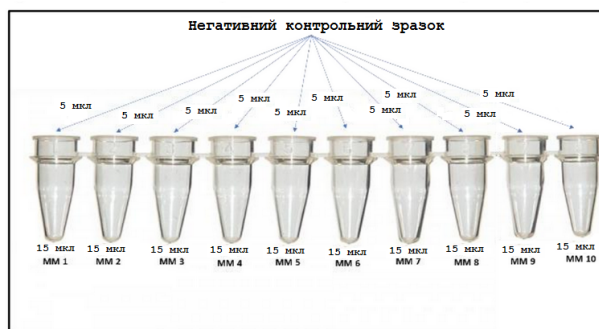
**Позитивний контроль:** Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати  $28 \pm 4$ , інші значення вказують на наявність проблем.

## Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі окрім реагенту Sepsis PLUS Enzyme Mix. Покладіть реагент Sepsis PLUS Enzyme Mix 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 Sepsis PLUS MM та Sepsis PLUS Enzyme Mix 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. Підготуйте 10 пробірок об'ємом 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей Sepsis PLUS MM 1-10. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл Sepsis PLUS MM і 1 мкл Sepsis PLUS Enzyme Mix для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішайте суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 10 лунок (з різними сумішами 1-10). Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку, як показано на малюнку нижче. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.



4. Повторіть крок 3 для кожного виділеного зразка, позитивного контролю та негативного контролю.



5. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 1. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

**Таблиця 1:** Програма ампліфікації

| Назва етапу          | Кількість циклів | Температура | Час    |
|----------------------|------------------|-------------|--------|
| Активация полімерази | 1                | 95°C        | 2 хв   |
| Ампліфікація         | 40               | 95°C        | 10 сек |
|                      |                  | 60°C*       | 20 сек |

\* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5

6. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5.  
 7. Запустити програму.  
 8. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

### Аналіз даних

Значення  $C_t$  для позитивного контролю повинно дорівнювати  $28 \pm 4$ , а негативний контроль у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

| Сигнал по будь-якому каналу FAM / HEX / ROX (цільова ДНК) | Сигнал по каналу Cy 5 (ген РНКаз Р) | Інтерпретація                                                                    |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| +                                                         | +/-                                 | Позитивний на специфічний збудник/ген.                                           |
| -                                                         | +                                   | Збудник/ген не виявлено.                                                         |
| -                                                         | -                                   | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати для цього майстер-міксу. |

**Примітка:** Залежно від приладу, набір може давати хибнопозитивні результати при значенні  $C_t$  вище 35 для визначених мішеней. Відповідно, результати із  $C_t$  вище 35 можуть бути проігноровані. Проте не рекомендується повністю відкидати такий результат; слід оцінювати його у поєднанні з клінічними симптомами пацієнта та іншими діагностичними даними. Консультація з клінічним мікробіологом також може надати цінну інформацію.

Для кожного майстер-міксу в наступній таблиці наведено канали барвника для відповідного цільового організму/цільового гена:

| Пробірка №        | Цільовий організм/ген                 | Канал детекції |
|-------------------|---------------------------------------|----------------|
| Sepsis PLUS MM 1  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>         | FAM            |
|                   | <i>Staphylococcus aureus</i>          | HEX            |
|                   | <i>Enterococcus faecium</i>           | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 2  | <i>Acinetobacter baumannii</i>        | FAM            |
|                   | <i>Staphylococcus spp</i>             | HEX            |
|                   | Гени резистентності до метициліну     | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 3  | <i>Enterococcus faecalis</i>          | FAM            |
|                   | <i>Enterobacter cloacae</i>           | HEX            |
|                   | <i>Klebsiella pneumonia</i>           | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 4  | Гени резистентності до колістину      | FAM            |
|                   | Гени резистентності до ванкоміцину    | HEX            |
|                   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>       | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 5  | <i>Escherichia coli</i>               | FAM            |
|                   | <i>Candida albicans</i>               | HEX            |
|                   | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>   | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 6  | Гени резистентності до карбапенемів   | FAM            |
|                   | <i>Streptococcus agalactiae</i>       | HEX            |
|                   | <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 7  | <i>Listeria monocytogenes</i>         | FAM            |
|                   | <i>Haemophilus influenzae</i>         | HEX            |
|                   | <i>Streptococcus pyogenes</i>         | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 8  | Гени бета-лактамаз (ESBL)             | FAM            |
|                   | <i>Candida krusei</i>                 | HEX            |
|                   | <i>Neisseria meningitidis</i>         | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 9  | <i>Candida parapsilosis</i>           | FAM            |
|                   | <i>Salmonella spp</i>                 | HEX            |
|                   | <i>Candida auris</i>                  | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |
| Sepsis PLUS MM 10 | <i>Candida glabrata</i>               | FAM            |
|                   | <i>Candida lusitanae</i>              | HEX            |
|                   | <i>Candida tropicalis</i>             | ROX            |
|                   | Внутрішній контроль                   | Cy 5           |

#### Інформація для замовлення

| Назва продукту                            | Фасування | Каталожний номер |
|-------------------------------------------|-----------|------------------|
| RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit | 24 тести  | IP202470-24      |
| RevoDx Sepsis Pathogen PLUS Detection Kit | 48 тестів | IP202470-48      |