



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення
Haemophilus influenzae / Human
Metapneumovirus / Mycoplasma
pneumoniae з диференціацією
RevoDx Haemophilus influenzae - Human
Metapneumovirus - Mycoplasma pneumoniae qPCR
Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК/РНК Haemophilus influenzae / Human
Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202501-25 – 25 тестів
IP202501-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш HI/MPV/MP RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш HI/MPV/MP RM 2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок HI/MPV/MP Positive Control	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок HI/MPV/MP Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae 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 HI/MPV/MP RM 1 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 Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae — це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот Haemophilus influenzae, метапневмовірусу людини та Mycoplasma pneumoniae у мазках з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), зразках бронхіального аспірату (BAS), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору) від осіб із ознаками та/або симптомами респіраторної інфекції.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути точною та єдиною причиною захворювання. Негативні результати не виключають інфекції та не повинні використовуватися як єдина основа для прийняття рішень про лікування пацієнта. Негативні результати необхідно поєднувати з клінічними спостереженнями, історією захворювання та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae призначений для використання кваліфікованим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та процедурам діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати тільки за призначенням
- Набір призначений для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових областях геномів патогенів, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). Тестування з іншими типами зразків може призвести до хибних результатів.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних 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

RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae — 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.

Прилади

Набір RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae 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 Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

Загальний опис

Haemophilus influenzae, метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV) та Mycoplasma pneumoniae - це патогени, які викликають респіраторні інфекції. Точна та вчасна діагностика цих збудників є критичною для ефективного лікування, контролю епідеміологічної ситуації та можливості введення заходів захисту громадського здоров'я. Раннє виявлення дозволяє проводити цілеспрямовану антибактеріальну або противірусну терапію, і при цьому знизити ризик розвитку ускладнень, стійкості до антибіотиків та зловживання антимікробної терапії широкого спектру дії. Мультиплексна діагностика особливо корисна при виявленні ко-інфекцій, оптимізації плану лікування та отримання кращих результатів терапії. До того ж, вчасна діагностика дозволяє контролювати розповсюдження патогенів та оптимізувати використання ресурсів у медичних закладах.

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 та/або копій/мл шляхом розведення клінічними зразками від негативних до патогенів осіб для імітації клінічних зразків. ДНК/ПНК збудників очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення тестували в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Межа виявлення (LoD) становила 200 КУО/мл та/або копій/мл, це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 200 КУО/мл та/або копій/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 200 КУО/мл та/або копій/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae 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 RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae проти послідовностей 28 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 28 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae. 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Немає гомології
<i>Enterobacter cloacae</i>	Немає гомології
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Немає гомології
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus aureus</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus faecalis</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus faecium</i>	Немає гомології
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Enterococcus 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 папарипу 1-4	Немає гомології
Грип А та В	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Аденовірус	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterobacter cloacae</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Staphylococcus aureus</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus faecalis</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus faecium</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<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>Streptococcus pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Bordetella pertussis</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus 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
Аденовірус	NIBSC (Cat. No: 2.0×10 ⁸ IU/ml)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено

	16/324)		
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 ⁵ IU/ml	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ IU/ml	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 Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae оцінювали за допомогою архівних клінічних зразків. Для кожного збудника було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у рандомізованому сліпому 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 Pathogen DNA/RNA Purification Kit відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae 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 (Cat. №: IP202302; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. №: IP202303; IdilBiotech, Туреччина) або реагент DirEXT OneStep (Cat. №: IP202319; IdilBiotech, 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.

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані з 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 включає точне і повне документування.

Зразки можна зберігати при 2-8 °C протягом 72 годин після збору. Якщо очікується затримка екстракції, зразки слід зберігати при -15 °C або нижче. Екстраговану нуклеїнову кислоту слід зберігати при -15 °C або нижче. Транспортування зразків має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК збудника із зразків мазків з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), бронхіального аспірату (BAS), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору), слід використовувати набір RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit, або реагент DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтеся 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 потрапляння 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 C_t позитивного контролю має дорівнювати 25 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HI/MPV/MP Enzyme Mix. Покладіть HI/MPV/MP Enzyme Mix на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадите 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 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 RM 1 та 1 мкл RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішайте суміш піпетуванням або на вортексі та осадите 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. Внести по 5 мкл 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, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Синтез кДНК	1	50°C, 15 хв
Активція полімерази	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами HEX, FAM, ROX, Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами HEX, FAM, ROX, Cy5
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення C_t для позитивного контролю повинно дорівнювати 25 ± 4 , а негативний контроль по всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (Haemophilus influenzae)	Сигнал по каналу HEX (Метапневмовірус людини)	Сигнал по каналу ROX (Mycoplasma pneumoniae)	Сигнал по каналу Cy5 (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	-	+/-	ДНК Haemophilus influenzae ВІЯВЛЕНА
-	+	-	+/-	ДНК метапневмовірусу людини ВІЯВЛЕНА
-	-	+	+/-	ДНК Mycoplasma pneumoniae ВІЯВЛЕНА
-	-	-	+	Цільова ДНК НЕ ВІЯВЛЕНА. Результат валідний.
-	-	-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae	25 тестів	IP202501-25
RevoDx Haemophilus influenzae / Human Metapneumovirus / Mycoplasma pneumoniae	100 тестів	IP202501-100