



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Leptospira* spp **RevoDx** *Leptospira* spp qPCR Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення ДНК *Leptospira* spp
Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202525-25 – 25 тестів
IP202525-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш Leptospira RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш Leptospira RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль Leptospira Internal Control	65 мкл	250 мкл
4	Позитивний контроль Leptospira Positive Control	50 мкл	100 мкл
5	Негативний контроль Leptospira 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 Leptospira 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 Leptospira 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 Leptospira spp qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК Leptospira spp у зразках цільної крові, спинномозковій рідині та сечі у осіб з симптомами лептоспірозу.

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 Leptospira 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 Leptospira 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 Leptospira spp qPCR 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 гібридизується 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.

Набір передбачає використання спеціального внутрішнього контролю (РНКаз Р людини) для перевірки якості екстракції та ампліфікації.

Загальний опис

Лептоспіроз — це поширене в усьому світі зоонозне захворювання, що спричинене патогенними видами *Leptospira*, які є спіралеподібними грамнегативними бактеріями з ряду *Spirochaetales*. Зараження людини зазвичай відбувається через прямий або непрямий контакт із сечею інфікованих тварин, особливо гризунів. Клінічні прояви можуть варіювати від легких грибоподібних симптомів до тяжких ускладнень, таких як хвороба Вейля або легеневий геморагічний синдром. Оскільки ранні симптоми є неспецифічними, а перебіг хвороби може швидко ускладнюватися, своєчасна та точна діагностика має вирішальне значення.

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 3ІЗ.
- 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 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 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

Межа виявлення (LoD) - Аналітичне дослідження чутливості: Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту патогена до отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 та 1,6 КУО/мл. Патогену ДНК отримали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу і становило 98 КУО/мл.

Діагностична специфічність:

Для оцінки діагностичної специфічності набору RevoDx Leptospira spp qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, негативних за ДНК *Leptospira spp.* Жоден із протестованих зразків не дав позитивного результату на цільову ДНК. Діагностична специфічність набору RevoDx Leptospira spp qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність:

Перехресна реактивність набору RevoDx Leptospira 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 Leptospira 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 29 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Leptospira 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 людини	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
SARS-коронавірус	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Метанеємовірус людини	Немає гомології
Вірус паратифу 1-4	Немає гомології
Грип А та В	Немає гомології
Ентеровірус	Немає гомології
Респіраторний синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Chlamydia pneumoniae	Немає гомології
Haemophilus influenzae	Немає гомології
Legionella pneumophila	Немає гомології
Mycobacterium tuberculosis	Немає гомології
Streptococcus pneumoniae	Немає гомології
Streptococcus pyogenes	Немає гомології
Bordetella pertussis	Немає гомології
Mycoplasma pneumoniae	Немає гомології
Pneumocystis jirovecii	Немає гомології

(PJP)	
Candida albicans	Немає гомології
Staphylococcus epidermidis	Немає гомології
Streptococcus salivarius	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
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 паратифу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Вірус паратифу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Вірус паратифу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Вірус паратифу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Перехресна контамінація

Потенційна перехресна контамінація між зразками була оцінена шляхом проведення п'яти реакцій, у яких чергувалися позитивні зразки з високою концентрацією ДНК *Leptospira spp* та негативні зразки (по 4 позитивних і 4 негативних на кожну постановку). Жодних ознак перехресної контамінації не було виявлено. Крім того, жоден із зразків не продемонстрував наявності інгібіторів ПЛР, що підтверджується успішною ампліфікацією внутрішнього контролю.

Клінічне порівняльне дослідження

Усього було протестовано 101 клінічний зразок. За результатами дослідження, дані, отримані за допомогою набору RevoDx Leptospira spp qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів, що мають маркування CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення ДНК RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (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 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 Внутрішній контроль (ВК) використовується для перевірки ефективності екстракції ДНК та ампліфікації. При цьому такий контроль передбачає ампліфікацію частини гена РНКаз Р людини, як відноситься до конститутивних генів. Внутрішній контроль може бути ендогенний або екзогенний. Екзогенний внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставку. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx Purification Kit. **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). Слабкий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на патоген, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК збудника під час використання компонентів ПЛР. Значення C_t внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції ДНК/РНК.

Позитивний контроль Позитивний контрольний зразок включає плазмиду, що містить вставку. Позитивний контроль ампліфікується в окремій реакційній пробірці. Значення C_t позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Leptospira RM 2. Покладіть компонент Leptospira 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 Leptospira RM 2 та Leptospira 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 Leptospira RM 1 та 1 мкл Leptospira RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів 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 ДНК, позитивного контролю та негативного контролю 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	Температура	Час
Активція полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація*	40	95°C	10 сек
		60°C	20 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX

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

Аналіз даних

Значення C_t для позитивного контролю повинно дорівнювати 26 ± 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 каналу FAM (Leptospira spp)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК Leptospira spp ВИЯВЛЕНА
-	+	ДНК Leptospira spp НЕ ВИЯВЛЕНА
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx Leptospira spp qPCR Kit	25 тестів	IP202525-25
RevoDx Leptospira spp qPCR Kit	100 тестів	IP202525-100