****

**RevoDx Набір для виявлення ДНК збудників сепсису**

(RevoDx Sepsis Pathogen 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:**

**IP202201-24 – 24 тести**

**IP202201-48 – 48 тестів**

**Склад набору**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Назва компонента** | **24 тести** | **48 тестів** |
| **1** | Sepsis MM 1 | 336 мкл | 672 мкл |
| **2** | Sepsis MM 2 | 336 мкл | 672 мкл |
| **3** | Sepsis MM 3 | 336 мкл | 672 мкл |
| **4** | Sepsis MM 4 | 336 мкл | 672 мкл |
| **5** | Sepsis MM 5 | 336 мкл | 672 мкл |
| **6** | Sepsis MM 6 | 336 мкл | 672 мкл |
| **7** | Sepsis MM 7 | 336 мкл | 672 мкл |
| **8** | Sepsis MM 8 | 336 мкл | 672 мкл |
| **9** | Суміш ферментів «Сепсис» (Sepsis Enzyme Mix) | 192 мкл | 384 мкл |
| **10** | Позитивний контрольний зразок, ПКЗ (Positive Control) | 100 мкл | 100 мкл |
| **11** | Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative Control) | 100 мкл | 100 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Sepsis Pathogen 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. Флакони з компонентом Sepsis 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 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. Набір RevoDx Sepsis Pathogen Detection Kit використовується для роботи із ДНК, виділеної зі зразків цільної крові або зразків гемокультури, які виявлені як позитивні.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути остаточною причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявність 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 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 Detection Kit виявляє наступні бактеріальні та грибкові патогени, а також гени резистентності до антибіотиків:

|  |
| --- |
| **Грам-негативні бактерії** |
| * *Pseudomonas aeruginosa*
* *Klebsiella pneumonia*
* *Enterobacter cloacae*
* *Escherichia coli*
* *Acinetobacter baumannii*
* *Stenotrophomonas maltophilia*
* *Neisseria meningitidis*
* *Haemophilus influenzae*
 |
| **Грам-позитивні бактерії** |
| * *Staphyloccocus aureus*
* *Staphyloccocus spp*
* *Enterococcus faecalis*
* *Enterococcus faecium*
* *Streptococcus pneumoniae*
* *Streptococcus agalactiae*
* *Streptococcus pyogenes*
* *Listeria monocytogenes*
 |
| **Гриби** |
| * *Candida albicans*
* *Candida spp*
* *Cryptococcus neoformans/gattii*
 |
| **Гени антибіотикорезистентності** |
| * Резистентність до карбапенемів (blaNDM, blaKPC, blaIMP, blaOXA48, blaVIM)
* Метицилінрезистентність (mecA/mecC)
* Ваноміцинрезистентність (vanA/vanB)
* Резистентність до колістину
* Гени бета-лактамаз розширеного спектру (ESBL) (CTX-M, TEM, SHV)
 |

**Обмеження щодо використання продукту**

* Використовувати лише за призначенням
* Тільки для діагностики *in vitro*
* Потенційні мутації в цільових ділянках геномів патогенів, що покриваються олігонуклеотидами набору, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
* Набір валідований для використання зі зразками цільної крові та гемокультур. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних 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 технічно здатна виявляти одночасно багато типів мікроорганізмів у різних типах зразків. Чутливість та специфічність цього методу досить висока, а час виявлення короткий, що корисно для раннього виявлення інфекцій.

RevoDx Sepsis Pathogen Detection Kit –- це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, в якому між двома праймерами ПЛР знаходиться внутрішній олігонуклеотидний зонд 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній із зразків пацієнта. Виявлення ДНК збудників збудників сеспсису здійснюється за допомогою 8 різних реакцій, в яких одночасно виявляється РНКаза Р людини в якості внутрішнього контролю, який контролює виділення та ампліфікацію мішені. У наступній таблиці наведено перелік патогенів-мішеней у 8 різних реакційних пробірках:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пробірка №** | **Цільовий організм/ген** | **Канал детекції** |
| **Sepsis MM 1** | *Pseudomonas aeruginosa* | FAM |
| *Staphyloccocus aureus* | HEX |
| *Enterococcus faecium* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis MM 2** | *Acinetobacter baumannii* | FAM |
| *Staphyloccocus spp* | HEX |
| Метицилінрезистентність | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 3** | *Enterococcus faecalis* | FAM |
| *Enterobacter cloacae* | HEX |
| *Klebsiella pneumonia* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 4** | Резистентність до колістину | FAM |
| Ваноміцинрезистентність | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae*  | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 5** | *Escherichia coli* | FAM |
| *Candida albicans* | HEX |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 6** | Резистентність до карбапенемів | FAM |
| *Streptococcus agalactiae* | HEX |
| *Cryptococcus neoformans/gattii* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 7** | *Listeria monocytogenes* | FAM |
| *Candida spp* | HEX |
| *Neisseria meningitidis* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Sepsis** **MM 8** | Гени бета-лактамаз розширеного спектру (ESBL) | FAM |
| *Haemophilus influenzae* | HEX |
| *Streptococcus pyogenes* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |

**Прилади**

Набір RevoDx Sepsis Pathogen 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 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 кровотоку, у тому числі спричинених бактеріями та грибками, має ключове значення для зменшення серйозних наслідків, пов’язаних з інфекцією, таких як значні ризики захворюваності та смертності (1). Рівень виживаності пацієнтів із сепсисом головним чином залежить від швидкої та надійної діагностики, оскільки у випадку тяжкого сепсису без ефективного антимікробного лікування спостерігається зниження виживаності в середньому на 7,6% за годину від початку гіпотензії (2)

Звичайний метод, посів крові, має деякі недоліки щодо бажаної швидкості та чутливості. Крім того, на нього впливають різні фактори, що може знизити ймовірність позитивного результату. Деякі опубліковані рекомендації рекомендують введення антибіотиків протягом 1 години пацієнтам із підозрою на септичний шок або важкий сепсис (3). Під час важкої інфекції емпірична антибіотикотерапія є недоцільною приблизно в одній третині випадків, і це значно збільшує смертність і тривалість перебування в лікарні (4). Крім того, затримки в оптимальній антимікробній терапії можуть призвести до низької якості медичної допомоги, а також підвищити стійкість до антибіотиків (5).

**Список літератури**

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 ЗІЗ.
* На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими розчинами.
* Переконайтесь що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
* Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лаборіях, 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 зразків цільної крові, щоб імітувати клінічні зразки. ДНК збудника очищали за допомогою набору RevoDx для очищення ДНК бактерій (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 Detection Kit був проведений для послідовностей кожного збудника, доступних у базах даних NCBI. Вирівнювання показало, що ділянки, розпізнані 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 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 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 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** |
| *Bacillus subtilis* | Немає гомології |
| *Chlamydia pneumoniae* | Немає гомології |
| *Legionella pneumophila* | Немає гомології |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Немає гомології |
| *Streptococcus salivarius* | Немає гомології |
| *Bordetella pertussis* | Немає гомології |
| *Mycoplasma pneumoniae* | Немає гомології |
| *Pneumocystis jirovecii (PJP)* | Немає гомології |
| *Entamoeba dispar* | Немає гомології |
| *Proteus spp.* | Немає гомології |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Немає гомології |
| *Schizosaccharomyces pombe* | Немає гомології |
| *Aspergillus niger* | Немає гомології |
| *Salmonella spp.* | Немає гомології |
| *Serratia marcescens* | 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 |
| Аденовірс (напр. C1 Ad. 71) | Немає гомології |
| Метапневмовірус людини (hMPV) | Немає гомології |

**Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Організм** | **Джерело** | **Концентрація** | **Результат** |
| *Chlamydia pneumoniae* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Legionella pneumophila* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Bordetella pertussis* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Mycoplasma pneumoniae* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Pneumocystis jirovecii* (PJP) | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Entamoeba dispar* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Aspergillus niger* | 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) | 2.0×108 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 імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1) | NIBSC (Cat. No: 16/194) | 1.25×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2) | NIBSC (Cat. No: 16/296) | 2.8×105 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 Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою архівних зразків цільної крові. 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 для очищення ДНК бактерій (RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria) відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Sepsis 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 ДНК з бактерій RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria (Cat. No: IP201917; ІdilВiotech, Туреччина) або Набір для виділення ДНК з гемокультур RevoDx DNA Purification Kit from Blood Culture (Cat. No: IP202225; ІdilВiotech, Туреччина).
* Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
* Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри, тощо)
* 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**

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 етапі «попереднього тестування», і дуже важливо, щоб відповідна документація була точною та повною.

Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам.

**Протокол**

**Виділення ДНК:** Для виділення ДНК збудника зі зразків цільної крові слід використовувати набір RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria, а для зразків із гемокультур –- 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 НК. 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 РНКаза 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 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

**Протокол ПЛР**

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок. Що стосується 8-лункових стрипів «Sepsis», ретельно перемішайте реагенти струшуванням та осадіть краплі короткочасним центрифугуванням, перш ніж відкривати кришку.
2. Кінцевий об’єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об’ємів Sepsis MM та Sepsis Enzyme Mix на загальну кількість зразків (досліджувані клінічні зразки плюс ПКЗ та НКЗ). Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується додати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
3. Підготуйте 8 пробірок об’ємом 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей Sepsis MM 1-8. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл Sepsis MM і 1 мкл Sepsis Enzyme Mix для кожного зразка у підготовані пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 8 лунок (з різними сумішами 1-8). Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку, як показано на малюнку нижче. Внести по 5 мкл ПКЗ та НКЗ у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

****

**3.** Повторіть крок 2 для кожного виділеного зразка, ПКЗ та НКЗ.



**4.** 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** |
| Активація полімерази | 1 | 95ºC | 2 хв |
| Ампліфікація | 40 | 95ºC | 10 сек |
| 60ºC\* | 20 сек |

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

**5.** Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5.

**6.** Запустити програму.

**7.** Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

**Аналіз даних**

Значення Ct для ПКЗ повинно дорівнювати 28±4, а НКЗ 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** | **Сигнал по каналу****Cy 5 (ген РНКази Р)** | **Інтерпретація** |
| **+** | **+/-** | Позитивний на специфічний збудник/ген |
| **-** | **+** | Збудник/ген не виявлено |
| **-** | **-** | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати для цього майстер-міксу |

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Лунка#** | **Цільовий організм/ген** | **Канал детекції** |
| **Лунка A** | *Pseudomonas aeruginosa* | FAM |
| *Staphyloccocus aureus* | HEX |
| *Enterococcus faecium* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка B** | *Acinetobacter baumannii* | FAM |
| *Staphyloccocus spp* | HEX |
| Метицилінрезистентність | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка C** | *Enterococcus faecalis* | FAM |
| *Enterobacter cloacae* | HEX |
| *Klebsiella pneumonia* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка D** | Резистентність до колістину | FAM |
| Ваноміцинрезистентність | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae*  | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка E** | *Escherichia coli* | FAM |
| *Candida albicans* | HEX |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка F** | Резистентність до карбапенемів | FAM |
| *Streptococcus agalactiae* | HEX |
| *Cryptococcus neoformans/gattii* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка G** | *Listeria monocytogenes* | FAM |
| *Candida spp* | HEX |
| *Neisseria meningitidis* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |
| **Лунка H** | Гени бета-лактамаз розширеного спектру (ESBL) | FAM |
| *Haemophilus influenzae* | HEX |
| *Streptococcus pyogenes* | ROX |
| Внутрішній уонтроль | Cy 5 |

**Інформація для замовлення**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Назва продукту** | **Фасування** | **Каталожний номер** | **Баркод** |
| RevoDx Sepsis Pathogen Detection Kit | 24 tests | IP202201-24 | 8683079717295 |
| RevoDx Sepsis Pathogen Detection Kit | 48 tests | IP202201-48 | 8683079717301 |