****

**RevoDx Набір для виявлення ДНК/РНК збудників менінгіту/енцефаліту**

**(RevoDx Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit)**

**Інструкція з використання**

**Якісне виявлення ДНК/РНК збудників менінгіту/енцефаліту**

**Для діагностики *in vitro***

**Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:**

**IP202228-24 – 24 тести**

**IP202228-48 – 48 тестів**

**Склад набору**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Назва компонента** | **24 тести** | **48 тестів** |
| **1** | ME MM 1 | 336 мкл | 672 мкл |
| **2** | ME MM 2 | 336 мкл | 672 мкл |
| **3** | ME MM 3 | 336 мкл | 672 мкл |
| **4** | ME MM 4 | 336 мкл | 672 мкл |
| **5** | ME MM 5 | 336 мкл | 672 мкл |
| **6** | ME MM 6 | 336 мкл | 672 мкл |
| **7** | Суміш ферментів МЕ 1 (ME Enzyme Mix 1) | 120 мкл | 240 мкл |
| **8** | Суміш ферментів МЕ 2 (ME Enzyme Mix 2) | 24 мкл | 48 мкл |
| **9** | Позитивний контрольний зразок ME, ПКЗ (МЕ Positive Control) | 100 мкл | 100 мкл |
| **10** | Негативний контрольний зразок МЕ, НКЗ (ME Negative Control) | 100 мкл | 100 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Набори потрібно транспортувати у замороженому вигляді. Усі компоненти RevoDx Meningitis/Encephalitis 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 компонентами Meningitis/Encephalitis 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 Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit — це ПЛР-тест в режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот специфічних бактеріальний, вірусних та грибкових збудників у зразках спинномозкової рідини (ліквору), отриманих за допомогою люмбальної пункції в осіб із ознаками та /або симптоми менінгіту та/або енцефаліту.

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 енцефаліту та менінгіту RevoDx Meningitis/Encephalitis 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 Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit виявляє наступні бактеріальні, вірусні та грибкові патогени:

|  |
| --- |
| **Бактерії** |
| * *Streptococcus agalactiae*
* *Streptococcus pneumoniae*
* *Neisseria meningitidis*
* *Haemophilus influenzae*
* *Listeria monocytogenes*
* *Escherichia coli* K1
* *Mycobacterium tuberculosis*
 |
| **Віруси** |
| * Цитомегаловірус (ЦМВ, CMV)
* Вірус Епштейна-Барр (EBV)
* Вірус Варіелла-Зостер (VZV)
* Пареховірус людини (HPeV)
* Ентеровірус
* Вірус простого герпесу 1 типу (HSV1)
* Вірус простого герпесу 2 типу (HSV2)
* Вірус герпесу 6 типу (HHV 6)
* Вірус герпесу 7 типу (HHV 7)
* Вірус епідемічного паротиту (Mumps virus)
 |
| **Гриби** |
| * *Cryptococcus neoformans/gattii*
 |

**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 цереброспінальної рідини (CSF). Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
* 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 Meningitis/Encephalitis 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 менінгіту та енцефаліту здійснюється за допомогою 6 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 6 різних реакційних пробірках:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пробірка №** | **Цільовий організм** | **Канал детекції** |
| **ME MM 1** | Цитомегаловірус (CMV) | FAM |
| *Streptococcus agalactiae* | HEX |
| *Cryptococcus neoformans/gattii* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 2** | *Listeria monocytogenes* | FAM |
| *Neisseria meningitidis* | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae*  | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 3** | Вірус Епштейна-Барр (EBV) | FAM |
| *Haemophilus influenzae* | HEX |
| *Escherichia coli* K1 | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 4** | Вірус Варіцелла-Зостер (VZV) | FAM |
| Вірус герпесу 7 типу (HHV 7) | HEX |
| Вірус простого герпесу 2 типу (HSV2) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 5** | *Mycobacterium tuberculosis* | FAM |
| Вірус герпесу 6 типу (HHV 6) | HEX |
| Вірус простого герпесу 1 типу (HSV1) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 6** | Ентеровірус | FAM |
| Вірус епідемічного паротиту | HEX |
| Пареховірус людини (HPeV) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |

**Прилади**

Набір RevoDx Meningitis/Encephalitis 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 Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

**Загальний опис**

Інфекції нервової системи є потенційно небезпечними для життя та спричиняються такими патогенами як бактерії, віруси та гриби. Швидке розпізнавання та лікування інфекції центральної нервової системи (ЦНС) має вирішальне значення для виживання пацієнтів, оскільки ці інфекції мають високу захворюваність і смертність. Інфекції ЦНС включають менінгіт, енцефаліт і абсцеси мозку (1).

Раннє розпізнавання патогенів, які спричинюють захворювання, має вирішальне значення для належного лікування інфекції центральної нервової системи та покращення його результатів. Запізнення в діагностиці та лікуванні бактеріального менінгіту та HSV-менінгоенцефаліту пов’язане із захворюваністю та смертністю. І навпаки, непотрібне антимікробне лікування та госпіталізація можуть призводити до резистентності до антимікробних препаратів, дисбактеріозу та збільшення витрат на охорону здоров’я (2).

**Список літератури**

1. R.A. Giovane, P.D. Lavender. Central nervous system infections. Prim Care Clin Off Pract, 45 (2018), pp. 505-518.

2. Liesman RM, Strasburg AP, Heitman AK, Theel ES, Patel R, Binnicker MJ. Evaluation of a Commercial Multiplex Molecular Panel for Diagnosis of Infectious Meningitis and Encephalitis. J Clin Microbiol. 2018 Mar 26;56(4):e01927-17.

**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 або МО/мл, або копій/мл шляхом розведення зразків цереброспінальної рідини, 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 250 КУО/мл або МО/мл, або копій/мл, це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 250 КУО/мл або МО/мл, або копій/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 250 КУО/мл або МО/мл, або копій/мл.

### **Інклюзивність:**

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Meningitis/Encephalitis 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 менінгіту та енцефаліту RevoDx Meningitis/Encephalitis 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 Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 29 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Meningitis/Encephalitis 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** |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Немає гомології |
| *Klebsiella pneumonia* | Немає гомології |
| *Enterobacter cloacae* | Немає гомології |
| *Acinetobacter baumannii* | Немає гомології |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | Немає гомології |
| *Staphyloccocus aureus* | Немає гомології |
| *Enterococcus faecalis* | Немає гомології |
| *Enterococcus faecium* | Немає гомології |
| *Candida albicans* | Немає гомології |
| *Bacillus subtilis* | Немає гомології |
| *Chlamydia pneumoniae* | Немає гомології |
| *Legionella pneumophila* | Немає гомології |
| *Streptococcus salivarius* | Немає гомології |
| *Streptococcus pyogenes* | Немає гомології |
| *Bordetella pertussis* | Немає гомології |
| *Mycoplasma pneumoniae* | Немає гомології |
| *Pneumocystis jirovecii* (PJP) | Немає гомології |
| *Enterococcus 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 паргрипу 1-4 типів | Немає гомології |
| Вірус грипу А і В | Немає гомології |
| Респіраторно-синцитіальний вірус  | Немає гомології |
| Аденовірус (напр. C1 Ad. 71) | Немає гомології |
| Метапневмовірус людини (hMPV) | Немає гомології |

**Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Організм** | **Джерело** | **Концентрація** | **Результат** |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Klebsiella pneumonia* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Enterobacter cloacae* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Acinetobacter baumannii* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Staphyloccocus aureus* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Enterococcus faecalis* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Enterococcus faecium* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Candida albicans* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Chlamydia pneumoniae* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Legionella pneumophila* | Клінічний зразок | Не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Streptococcus pyogenes* | 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 |
| *Enterococcus 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 |
| 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 А2 | 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 менінгіту та енцефаліту RevoDx Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою архівних зразків цереброспінальної рідини. 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 Meningitis/Encephalitis 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).
* 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 цереброспінальної рідини (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 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 цереброспінальну рідину при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цереброспінальної рідини має відповідати державним або місцевим нормам.

**Протокол**

**Виділення ДНК:** Для виділення ДНК збудника зі зразків цереброспінальної рідини слід використовувати набір RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria. 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, окрім ME Enzyme Mix 1 та 2. Покладіть копнонент ME Enzyme Mix 1-2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
2. Кінцевий об’єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об’ємів ME MM та ME Enzyme Mix 1 або 2 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 6 пробірок об’ємом 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей МЕ MM 1-6. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл ME MM 1-5 і 1 мкл МЕ Enzyme Mix 1 та 14 мкл ME MM 6 і 1 мкл МЕ Enzyme Mix 2 для кожного зразка у підготовані пробірки.

**Рис.1:** Схема приготування майстер-міксів.



1. 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 6 лунок (з різними сумішами 1-6). 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.

**Рис 2:** Схема внесення зразка.



**5.** Повторіть крок 4 для кожного виділеного зразка, ПКЗ та НКЗ, як показано на рисунку 3.

**Рис. 3:** Схема внесення контрольних зразків.

** **

**6.** 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** |
| Синтез кДНК | 1 | 50ºC | 15 хв |
| 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**

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

**8.** Запустити програму.

**9.** 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 |
| **-** | **+** | Збудник 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:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пробірка №** | **Цільовий організм** | **Канал детекції** |
| **ME MM 1** | Цитомегаловірус (CMV) | FAM |
| *Streptococcus agalactiae* | HEX |
| *Cryptococcus neoformans/gattii* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 2** | *Listeria monocytogenes* | FAM |
| *Neisseria meningitidis* | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae*  | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 3** | Вірус Епштейна-Барр (EBV) | FAM |
| *Haemophilus influenzae* | HEX |
| *Escherichia coli* K1 | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 4** | Вірус Варіцелла-Зостер (VZV) | FAM |
| Вірус герпесу 7 типу (HHV 7) | HEX |
| Вірус простого герпесу 2 типу (HSV2) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 5** | *Mycobacterium tuberculosis* | FAM |
| Вірус герпесу 6 типу (HHV 6) | HEX |
| Вірус простого герпесу 1 типу (HSV1) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **ME MM 6** | Ентеровірус | FAM |
| Вірус епідемічного паротиту | HEX |
| Пареховірус людини (HPeV) | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |

**Інформація для замовлення**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Назва продукту** | **Фасування** | **Кат. №** | **Баркод** |
| RevoDx Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit | 24 тести | IP202228-24 | 8683079717578 |
| RevoDx Meningitis/Encephalitis Pathogen Detection Kit | 48 тестів | IP202228-48 | 8683079717585 |