

RevoDx Набір для виявлення інфекцій, що передаються статевим шляхом ІПСШ-15 патогенів

RevoDx STI Pathogen Detection Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення ДНК збудників інфекцій, що передаються
статевим шляхом (ІПСШ)**

Для використання у діагностиці *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202229-24s/24sl/24sh – 24 тести

IP202229-48s/48sl/48sh – 48 тестів



Склад набору

	Компонент	24 тести	48 тестів
1	8-лунковий стрип «ІПСШ» (STI)	24+4 стрипи	48+8 стрипів
2	Позитивний контрольний зразок ІПСШ (STI Positive Control)	100 мкл	200 мкл
3	Негативний контрольний зразок ІПСШ (STI Negative Control)	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevDx STI Pathogen Detection Kit для виявлення збудників ІПСШ 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. Стрипи не можна заморозувати-розморозувати, оскільки це може призвести до зниження чутливості набору.

Передбачене використання

Набір RevDx STI Pathogen Detection Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот специфічних бактеріальних, вірусних, протозойних та грибкових збудників у зразках сечі, урогенітальних мазках або мазках з шийки матки у пацієнтів, що мають та не мають симптоми.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути провідною причиною захворювання. Негативні результати не виключають інфікування і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.

Набір призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Набір для виявлення збудників ІПСШ RevDx виявляє наступні бактеріальні, вірусні, протозойні та грибкові патогени:

Бактерії
<ul style="list-style-type: none">• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>• <i>Chlamydia trachomatis</i>• <i>Mycoplasma genitalium</i>• <i>Mycoplasma hominis</i>• <i>Ureaplasma urealyticum</i>• <i>Ureaplasma parvum</i>• <i>Treponema pallidum</i>• <i>Gardnerella vaginalis</i>• <i>Haemophilus Ducreyi</i>• <i>Streptococcus agalactiae</i>
Віруси
<ul style="list-style-type: none">• Вірус простого герпесу типу 1 (HSV1)• Вірус простого герпесу типу 2 (HSV2)
Гриби
<ul style="list-style-type: none">• <i>Candida albicans</i>• <i>Candida glabrata</i>
Найпростіші
<ul style="list-style-type: none">• <i>Trichomonas vaginalis</i>

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Тільки для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових ділянках геномів патогенів, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Набір валідований для використання зі зразками сечі, урогенітальними мазками або мазками з шийки матки. 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

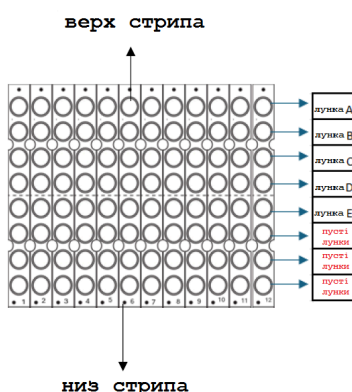
Мультиплексна ПЛР у реальному часі дозволяє одночасно виявляти багато типів мікроорганізмів. При цьому чутливість та специфічність методу висока, а час детекції короткий. Таким чином цей тип аналізу є корисним для виявлення раних госпітальних інфекцій.

RevoDx STI Pathogen Detection Kit - це набір для ПЛР-аналізу, що передбачає використання флуорогенного зонду, який гібридується з послідовністю між двома праймерами. Такий зонд містить флуоресцентну мітку на 5'-кінці та молекулу гасника на 3'-кінці, яка пригнічує флуоресцентний репортер. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею, а потім руйнується через 5'-3' ендонуклеазну активність ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при цьому 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, виділений із зразків пацієнта. Виявлення ДНК збудників ІПСШ здійснюється за допомогою 5 різних реакцій, в яких одночасно виявляється РНКаз Р людини в якості внутрішнього контролю, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

У наведеній нижче таблиці підсумовано цільові патогени у 5 різних реакційних пробірках.

Пробірка №	Цільовий організм	Канал детекції
Лунка А	<i>Chlamydia trachomatis</i>	FAM
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HEX
	<i>Mycoplasma hominis</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Лунка В	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	HEX
	<i>Ureaplasma parvum</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Лунка С	<i>Treponema pallidum</i>	FAM
	<i>Candida albicans</i>	HEX
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Лунка D	<i>Haemophilus Ducreyi</i>	FAM
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HEX
	Вірус простого герпесу типу 2 (HSV2)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Лунка Е	<i>Candida glabrata</i>	FAM
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	HEX
	Вірус простого герпесу типу 1 (HSV1)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5



Прилади

Набір RevoDx STI 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 STI 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, що передаються статевим шляхом (ІПСШ), є основною причиною безпліддя, тривалої інвалідності, позаматкової вагітності та передчасних пологів. ІПСШ підвищують ризик розвитку раку статевих органів і є важким медичним, соціальним та економічним явищем для багатьох людей у всьому світі (1).

ІПСШ можуть бути викликані різними збудниками, серед яких бактерії, віруси, гриби та найпростіші. Затримка з постановкою діагнозу є одним із факторів, що ускладнює боротьбу з цими захворюваннями. Багато людей з ІПСШ не мають жодних ознак чи симптомів. Людина може почуватися здоровою і не знати, що має ІПСШ. Єдиний спосіб дізнатися про наявність таких патогенів — це тестування (2).

Стратегії, спрямовані на розширення скринінгу та тестування на ІПСШ серед населення, можуть допомогти людям з ІПСШ отримати лікування, покращити стан їхнього здоров'я та зменшити ймовірність поширення ІПСШ серед інших людей. Лікування ІПСШ, відмінних від ВІЛ, може допомогти запобігти ускладненням від ІПСШ, але не запобігає поширенню ВІЛ (3).

Список джерел

1. Warr, A. J., Pintye, J., Kinuthia, J., Drake, A. L., Unger, J. A., McClelland, R. S., et al. (2019). Sexually transmitted infections during pregnancy and subsequent risk of stillbirth and infant mortality in Kenya: a prospective study. *Sex. Transm. Infect.* 95, 60–66. doi: 10.1136/sextrans-2018-053597
2. Scapaticci M, Rin G Da, Bartolini A (2020) Comparison between a novel molecular tool and conventional methods for diagnostic classification of bacterial vaginosis: is integration of the two approaches necessary for a better evaluation? *New Microbiol* 43: 121–126.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). STDs and HIV — CDC Fact Sheet. Отримано з <https://www.cdc.gov/std/hiv/stdfact-std-hiv.htm>

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.
- Ніколи не піпетуйте розчини за допомогою рота.
- В лабораторній зоні не можна вживати їжу, напої та палити.
- Необхідно мити руки після контакту зі зрізками та реагентами.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі у лабораторії необхідно користуватись засобами індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі 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 калібровані дозатори та завжди змінюйте наконечники під час роботи з різними рідинами (бажано використовувати наконечники з аерозольним фільтром).
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктів ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація) для уникнення контамінації.
- 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 кожену 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

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 сечі, відібраних у негативних до патогенів осіб для імітування клінічних зразків. ДНК збудників очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторах. Ліміт детекції був розрахований за допомогою пробіт-аналізу. Значення LoD становило 200 КУО/мл. Цей LoD був додатково підтверджений тестуванням 20 позитивних зразків.

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx STI Pathogen 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 всіма доступними послідовностями генотипів з Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx STI Pathogen Detection Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx STI Pathogen Detection Kit проти послідовностей 28 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 28 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx STI Pathogen Detection Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як у *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реакції *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 pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii (PJP)</i>	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 парагрипу 1-4	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. С1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	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 pyogenes</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 (PJP)</i>	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 (кат. №: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (кат. №: 16/324)	2.0×10 МО/мл ⁸	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (кат. №: 07/296)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (кат. №: 07/298)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (кат. №: 07/300)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Вірус імунodefіциту людини 1 (ВІЛ-1)	NIBSC (кат. №: 16/194)	1.25×10 МО/мл ⁵	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 (ВІЛ-2)	NIBSC (кат. №: 16/296)	2.8×10 МО/мл ⁵	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини А2	NIBSC (кат. №: 08/120)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 1	NIBSC (кат. №: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 2	NIBSC (кат. №: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 3	NIBSC (кат. №: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 4	NIBSC (кат. №: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Порівняльні клінічні випробування

Ефективність набору RevoDx STI Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою використання архівних клінічних зразків сечі, урогенітальних мазків або мазків з шийки матки. Для кожного патогену було використано 20 позитивних та 20 негативних зразки у рандомізованому сліпом дослідженні. Всі зразки були заздалегідь протестовані за допомогою FDA валідованих ампліфікаторів у державній лікарні. Зразки виділяли за допомогою набору RevoDx DNA Purification Kit from Bacteria відповідно до інструкції, а потім проводили ПЛР-реакцію за допомогою набору RevoDx STI Pathogen Detection Kit відповідно до інструкції. Для ампліфікації, детектування та аналізу використовували ПЛР-систему BIO-RAD CFX96 в режимі реального часу. Згідно з результатами, було отримано 100% збіг з очікуваними результатами.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення ДНК/РНК 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
- 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 валідований для використання зі зразками сечі, урогенітальними мазками або мазками з шийки матки. Крім того, всі зразки нуклеїнових кислот, які підходять для аналізів методом ПЛР, можна використовувати з набором для виявлення збудників ІПСШ RevoDx STI. 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 преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.

Після збору не зберігайте зразки при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування зразків повинно відповідати національним або місцевим правилам.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника із зразків сечі, урогенітальних мазків або мазків з шийки матки 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, 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 (Hs_RPP30), 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 Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 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. Ретельно перемішайте 8-лунковий стрип «STI» струшуванням та осадіть краплі короткочасним центрифугуванням, перш ніж відкривати кришку.
2. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 5 лунок 8-лунового стрипа «STI». Стрипи готові до

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

Пробірка №	Цільовий організм	Канал детекції
Лунка А	<i>Chlamydia trachomatis</i>	FAM
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HEX
	<i>Mycoplasma hominis</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Су 5
Лунка В	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	HEX
	<i>Ureaplasma parvum</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Су 5
Лунка С	<i>Treponema pallidum</i>	FAM
	<i>Candida albicans</i>	HEX
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Су 5
Лунка D	<i>Haemophilus Ducreyi</i>	FAM
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HEX
	Вірус простого герпесу типу 2 (HSV2)	ROX
	Внутрішній контроль	Су 5
Лунка Е	<i>Candida glabrata</i>	FAM
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	HEX
	Вірус простого герпесу типу 1 (HSV1)	ROX
	Внутрішній контроль	Су 5

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx STI Pathogen Detection Kit	24 тести	IP202229-24
RevoDx STI Pathogen Detection Kit	48 тестів	IP202229-48