** RevoDx** **Набір для виявлення ДНК Gardnerella vaginalis**

**(RevoDx** **Gardnerella Vaginalis qPCR Kit)**

**Інструкція з використання**

**Якісне визначення ДНК *Gardnerella vaginalis***

**Для діагностики *in vitro.***

**Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:**

**IP202248-100 – 100 тестів**

**IP202248-500 – 500 тестів**

**Склад набору**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Назва компонента** | **100 тестів** | **500 тестів** |
| **1** | G. Vaginalis RM 1 | 1400 мкл | 5 x 1400 мкл |
| **2** | G. Vaginalis RM 2 | 100 мкл | 500 мкл |
| **3** | G. Vaginalis Позитивний контрольний зразок, ПКЗ (Positive control) | 100 мкл | 200 мкл |
| **4** | G. Vaginalis Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative control) | 100 мкл | 200 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Yf,jhb можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Gardnerella Vaginalis 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. Компоненти набору G. Vaginalis RM 1 та RM 2 не можна заморожувати та розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При 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 Gardnerella Vaginalis qPCR Kit — це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК *Gardnerella vaginalis*.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути точною 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 Gardnerella Vaginalis 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 Gardnerella Vaginalis qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro.*
* Потенційні мутації в цільових областях геному *G. vaginalis*, покритих олігонуклеотидами в наборі, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
* Цей набір валідовано для використання з набором для виділення RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria. Використання інших комплектів для очищення може негативно вплинути на характеристики комплекту.
* 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 Gardnerella Vaginalis qPCR Kit — це набір для виявлення ДНК *G. vaginalis* методом ПЛР у реальному часі. 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. Для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

**Загальний опис**

*Gardnerella vaginalis* — це анаеробна бактерія, яка мешкає в нормальній вагінальній флорі. Зазвичай у вагінальній флорі переважають види лактобактерій, але коли мікроорганізми, такі як Gardnerella, починають надмірно розмножуватись і стають домінуючими видами, це призводить до бактеріального вагінозу (БВ). Вважається, що бактерії передаються статевим шляхом між партнерами та можуть утворювати біоплівку, яка прогресує до БВ. БВ є найпоширенішою причиною вагінальних виділень. З клінічних наслідків БВ асоціюється з передчасними пологами та підвищеним ризиком зараження вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) та іншими інфекціями, що передаються статевим шляхом (ІПСШ). *G. vaginalis* пов’язана з бактеріальним вагінозом, який може протікати безсимптомно або мати такі симптоми, як виділення з піхви, подразнення піхви та «рибний» запах.

**Інформація про безпеку**

* 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 в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючиими 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**

**Межа виявлення (LoD) - Аналітичне дослідження чутливості:** Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень збудника, щоб отримати кінцеві концентрації 2430, 810, 270, 90 і 30 КУО/мл, шляхом розведення зразками сечі, зібраними у негативних осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогена очищали за допомогою RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria. Кожне розведення було перевірено в 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 79 КУО/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 реплікатів із концентрацією 79 КУО/мл. Усі 20 реплікатів дали позитивні результати, таким чином було підтверджено, що LoD становить 79 КУО/мл.

**Інклюзивність:**

Для послідовностей кожного генотипу, доступних у базах даних NCBI, було проведено аналіз інклюзивності *in silico* праймерів і зондів RevoDx Gardnerella Vaginalis qPCR Kit. Вирівнювання продемонструвало, що ділянки, розпізнані розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями генотипів з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

**Перехресна реактивність:**

Перехресна реактивність набору RevoDx Gardnerella Vaginalis qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Gardnerella Vaginalis qPCR Kit проти послідовностей 26 показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 25 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Gardnerella Vaginalis 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** |
| *Bacillus subtilis* | Немає гомології |
| *Chlamydia pneumoniae* | Немає гомології |
| *Haemophilus influenzae* | Немає гомології |
| *Legionella pneumophila* | Немає гомології |
| *Mycobacterium tuberculosis* | 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 |
| *Listeria monocytogenes* | Немає гомології |
| *Neisseria meningitidis* | 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 |
| Аденовірус (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 |
| *Haemophilus influenzae* | 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 |
| *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 |
| *Listeria monocytogenes* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Neisseria meningitidis* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Aspergillus niger* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Коронавірус людини (229E) | NIBSC (Кат.№: 09/132) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Риновірус | NIBSC (Кат.№: 08/324) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Аденовірус | NIBSC (Кат.№: 16/324) | 2.0×108 МО/мл | 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 імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1) | NIBSC (Кат.№: 16/194) | 1.25×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2) | NIBSC (Кат.№: 16/296) | 2.8×105 МО/мл | Не виявлено |
| Респіраторно-синцитільний вірус A2 | NIBSC (Кат.№: 08/120) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 1 типу | NIBSC (Кат.№: 08/176) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 2 типу | NIBSC (Кат.№: 08/178) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 3 типу | NIBSC (Кат.№: 08/118) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 4 типу | NIBSC (Кат.№: 08/180) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |

**Додаткові матеріали та обладнання**

* Набір для виділення RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria (Кат.№: IP201917; IdilBiotech, 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**

Цей набір валідовано для використання із зразками сечі, урогенітальними або цервікальними мазками. Крім того, з набором можна використовувати всі зразки нуклеїнових кислот, придатних для аналізів які підходять для аналізів qPCR. 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 зразки при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування зразків повинно відповідати національним або місцевим правилам.

**Протокол**

**Виділення ДНК** Для виділення ДНК збудника із зразків слід використовувати RevoDx Genomic 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 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 28 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

**Протокол ПЛР**

**1.** Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім G. Vaginalis RM 2. Покладіть компонент G. Vaginalis RM 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 G. Vaginalis RM 1 та G. Vaginalis RM 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.** Для приготування майстер-суміші додайте 14 мкл G. Vaginalis RM 1 та 1 мкл G. Vaginalis RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку. Внести по 5 мкл ПКЗ та НКЗ 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** |
| Активація полімерази | 1 | 95ºC | 2 хв |
| Ампліфікація\* | 40 | 95ºC | 10 сек |
| 60ºC | 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 Ct для ПКЗ повинно дорівнювати 28±4, а НКЗ у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для інтерпретувати наступним чином:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Сигнал по каналу FAM** | **Сигнал по каналу HEX** | **Інтерпретація** |
| + | **+/-** | Позитивний на *Gardnerella vaginalis* |
| - | **+** | Результат валідний. Збудник не виявлено |
| - | - | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати |

**Інформація для замовлення**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ННазва продукту** | **Фасування** | **Каталожний номер** |
| RevoDx Gardnerella Vaginalis qPCR Kit | 100 тестів | IP202248-100 |
| RevoDx Gardnerella Vaginalis qPCR Kit | 500 тестів | IP202248-500 |