

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Listeria monocytogenes* методом ПЛР

RevoDx *Listeria monocytogenes* qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Listeria monocytogenes*

Для діагностики *in vitro*

Для професійного використання



Каталожні номери:

IP202253-100 – 100 тестів

IP202253-500 – 500 тестів

Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	<i>L.monocytogenes</i> RM 1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	<i>L.monocytogenes</i> RM 2	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контрольний зразок <i>L.monocytogenes</i> (Positive control <i>L.monocytogenes</i>)	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контрольний зразок <i>L.monocytogenes</i> (Negative control <i>L.monocytogenes</i>)	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx *Listeria monocytogenes* 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. Реагенти *L.monocytogenes* RM 1 та RM 2 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 аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx *Listeria monocytogenes* qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Listeria monocytogenes*.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути провідною причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявності інфекції і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати слід комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx *Listeria monocytogenes* 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 *Listeria monocytogenes* qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з набором для виділення RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Використання інших реагентів для виділення ДНК може негативно вплинути на характеристики набору.
- 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 *Listeria monocytogenes* qPCR Kit — це набір для виявлення ДНК *Listeria monocytogenes* 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.

Прилади

Набір RevoDx *Listeria monocytogenes* qPCR 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 *Listeria monocytogenes* qPCR Kit також може використовуватись з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX.

Загальний опис

Лістеріоз - це захворювання, що викликається бактеріями *Listeria monocytogenes*. Зазвичай інфікування відбувається після вживання зараженої їжі. Сприйнятливими до інфікування в першу чергу є вагітні жінки, новонароджені, люди похилого віку та люди з ослабленою імунною системою. Якщо інфекція не є інвазивною, то викликане захворювання називають гарячковим гастроентеритом. Прояви лістеріозу такі: сепсис, менінгіт (або менінгоенцефаліт), енцефаліт, виразка рогівки, пневмонія, міокардит, а також внутрішньоутробні або цервікальні інфекції у вагітних, які можуть призвести до спонтанного аборт (другий-третій триместр) або

мертворождення.Прояв симптомів залежить від стану інфікованої людини.

Для людей із групи підвищеного ризику, окрім вагітних жінок, симптоми можуть включати лихоманку, болі в м'язах, головний біль, ригідність шиї, сплутаність свідомості, втрату рівноваги та судороги.Вагітні жінки зазвичай відчувають лише лихоманку та інші неспецифічні симптоми, такі як озноб і головний біль.

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 знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі роздільні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтеся 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 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) Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень синтетичного фрагменту гена збудника, щоб отримати кінцеві концентрації 1120, 760, 130, 45 та 24 копії/мл шляхом розведення зразками цільної крові, зібраними у негативних до патогену осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогена очищали за допомогою using RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 22 повторях. Значення межі виявлення

(LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу і становило 72 копії/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 18 повторів із концентрацією 72 копії/мл. Усі 18 зразків були позитивні для мішені, таким було підтверджено, що LoD становить 72 копії/мл.

Інклюзивність

Для послідовностей кожного генотипу, доступних у базах даних NCBI, було проведено інклюзивний аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Listeria monocytogenes qPCR Kit. Результати показали, що ділянки, які розпізнаються 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 Listeria monocytogenes qPCR Kit була оцінена за допомогою аналізу *in silico* та за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Listeria monocytogenes qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір є специфічним до мішеней і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 25 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Listeria monocytogenes 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
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</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</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</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
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
Вірус папагрипу 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
Метатневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Legionella pneumophila</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Mycobacterium tuberculosis</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</i> (PJP)	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus dispar</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat.№: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Cat.№: 08/324)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус	NIBSC (Cat.№: 16/324)	2.0×10 ⁸ МО/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch /1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat.№: 07/296)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat.№: 07/298)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat.№: 07/300)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Cat.№: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Cat.№: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	NIBSC (Cat.№: 08/120)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Cat.№: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Cat.№: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Cat.№: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Cat.№: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення 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 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

Із даним набором можна використовувати всі зразки нуклеїнових кислот, придатні для аналізу методом qPCR. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів безпеки. Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за правильність процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної

практики на преаналітичному етапі «попереднього тестування». Також важливим є повне і точне документування. Після забору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати 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), 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 L.monocytogenes RM 2. Покладіть компонент L.monocytogenes 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 L.monocytogenes RM 1 та L.monocytogenes RM 2. 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 L.monocytogenes RM 1 та 1 мкл L.monocytogenes RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів 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-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК, позитивного контролю та негативного контролю. 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 Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 25 ± 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 (<i>L. monocytogenes</i>)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	Позитивний на <i>Listeria monocytogenes</i>
-	+	Результат валідний. Збудник не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx Listeria monocytogenes qPCR Kit	100 тестів	IP202253-100
RevoDx Listeria monocytogenes qPCR Kit	500 тестів	IP202253-500