

RevoDx Набір для виявлення ДНК CT/NG

RevoDx CT/NG qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Chlamydia trachomatis* і *Neisseria gonorrhoeae*
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202262-100 – 100 тестів
IP202262-500 – 500 тестів



Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	CT/NG RM 1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	CT/NG RM 2	100 мкл	500 мкл
3	CT/NG Позитивний контрольний зразок (Positive control)	100 мкл	200 мкл
4	CT/NG Негативний контрольний зразок (Negative control)	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx CT/NG 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. Компонент CT/NG RM 1 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 CT/NG qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Chlamydia trachomatis* і *Neisseria gonorrhoeae* у сечі, урогенітальних або цервікальних мазках.

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 CT/NG 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 CT/NG qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геномів патогенів, залучених у реакції, 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 комплексу.
- 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 CT/NG — це набір для виявлення ДНК *Chlamydia trachomatis* і *Neisseria gonorrhoeae* методом ПЛР у реальному часі. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується 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 контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Загальний опис

Гонорея - це інфекція, спричинена грамнегативними коками *Neisseria gonorrhoeae*, що є однією з найпоширеніших причин захворювань серед сексуально активних людей. Як і інші інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ), гонорея найчастіше вражає молоде доросле населення. Інфекція характеризується генітальними симптомами, такими як виділення, печіння під час сечовипускання, незвичайні виразки або висип. *N. gonorrhoeae* вражає слизові оболонки репродуктивного тракту, що включають шийку матки, матку та маткові труби у жінок, а також уретру у жінок і чоловіків. Патогени поширюються під час вагінального, анального або орального сексу. Вагітна жінка також може передати інфекцію своїй дитині під час пологів. Зараження можливе навіть за відсутності симптомів у носія збудника.

Chlamydia trachomatis є поширеною бактеріальною інфекцією, що передається статевим шляхом. У більшості випадків захворювання протікає безсимптомно і, таким чином, носій є постійним джерелом інфекції для інших. У немовлят, народжених матерями через інфіковані родові шляхи, можуть виникнути кон'юнктивіт і пневмонія. Крім того, як у чоловіків, так і у жінок можуть спостерігатися клінічні синдроми через інфекцію в загальних ділянках епітелію, включаючи пряму кишку та кон'юнктиву. Інші типи інфекції *C. trachomatis*, у тому числі венерична лімфогранульома та ендемічна трахома -- очна

інфекція, яка поширюється прямим контактом і зазвичай спостерігається в країнах, що розвиваються; обидві інфекції можуть виникати як у чоловіків, так і у жінок. Можливі також інші симптоми, такі як болісне сечовипускання, виділення з піхви у жінок, виділення з пеніса у чоловіків, болючий статевий акт у жінок, кровотеча між менструаціями та після сексу у жінок, біль у яєчках у чоловіків.

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 засоби індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими розчинами.
- Переконайтесь, що всі 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 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 ДНК/РНК, 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 кожную 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) - Аналітичне дослідження чутливості:
Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень кожного збудника, щоб отримати кінцеві концентрації 1320, 560, 120, 42 і 25 КУО/мл, шляхом розведення зразками сечі, зібраними у негативних осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогенів очищали за допомогою RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 99 КУО/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 24 реплікатів із концентрацією 99 КУО/мл. Усі 24 повтори дали позитивні результати для кожної мішені, тому було підтверджено, що LoD становить 99 КУО/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx CT/NG qPCR 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 RevoDx CT/NG qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx CT/NG qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів 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 CT/NG qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не виявлено. Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР

Аналіз перехресної реакції *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>Listeria monocytogenes</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
Вірус парангрипу 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
<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

	зразок	виміру	виявлено
<i>Listeria monocytogenes</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
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)	2.0×10 ⁸ 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 імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Кат.№: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Кат.№: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	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 RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech,Turkey), RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech,Turkey), DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent (Cat. No: IP202319; idil biotech,Turkey)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального (халат, рукавички, окуляри)
- 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, уrogenітальними або цервікальними мазками. Крім того, з набором можна використовувати всі зразки нуклеїнових кислот, придатні для аналізів ПЛР. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані з 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 з клінічних зразків слід використовувати набір RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech,Turkey) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202303; idil biotech,Turkey) або DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent (Cat. No: IP202319; idil biotech,Turkey). 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 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 28 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім СТ/NG RM 2. Покладіть компонент СТ/NG RM 2 на лід. Ретельно перемішати кожен компонент, потім осадити краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.

2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів СТ/NG RM 1 та СТ/NG RM 2 на загальну кількість зразків. 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 кожної майстер-суміші додайте 14 мкл СТ/NG RM 1 та 1 мкл СТ/NG RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним 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 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
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація*	40	95°C	10 сек
		60°C	20 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy5.

6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 28±4, а негативний контроль у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i>)	Сигнал по каналу HEX (ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	+/-	Позитивний на ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i>
-	+	+/-	Позитивний на ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
-	-	+	Результат валідний. Збудник не виявлено
-	-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожні номери
RevoDx CT/NG qPCR Kit	100 тестів	IP202262-100
RevoDx CT/NG qPCR Kit	500 тестів	IP202262-500