

# RevoDx Набір для виявлення ДНК

## Streptococcus pyogenes

### RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit

#### Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Streptococcus pyogenes*  
Для діагностики *in vitro*  
Для професійного використання



Каталожні номери:  
IP202313-25 – 25 тестів  
IP202313-100 – 100 тестів

#### Склад набору

|   | Компонент                                                           | 25 тестів | 100 тестів |
|---|---------------------------------------------------------------------|-----------|------------|
| 1 | Буферна суміш<br><i>S.pyogenes</i> RM 1                             | 350 мкл   | 1400 мкл   |
| 2 | Ферментна суміш<br><i>S.pyogenes</i> RM 2                           | 25 мкл    | 100 мкл    |
| 3 | Позитивний контрольний зразок<br><i>S.pyogenes</i> Positive control | 100 мкл   | 100 мкл    |
| 4 | Негативний контрольний зразок<br><i>S.pyogenes</i> Negative control | 100 мкл   | 100 мкл    |

#### Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx Streptococcus pyogenes 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 *S.pyogenes* 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 Streptococcus pyogenes qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Streptococcus pyogenes*.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути остаточною

причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявності 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 RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методом ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

#### Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- 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 Streptococcus pyogenes qPCR Kit — це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, яка передбачає використання спеціального зонду з флуоресцентною міткою на 5'-кінці і молекулою гасника на 3'-кінці. 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.

Набір передбачає використання спеціального внутрішнього контролю (РНКаза Р людини) для перевірки якості екстракції та ампліфікації.

#### Прилади

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

#### Загальний опис

*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) — це грампозитивні бактеріальні патогени, які можуть викликати широкий спектр інфекцій у людини. Ці патогени також відомі як стрептококи групи А (GAS) і є основною причиною гострого фарингіту або гострого запалення горла, імпетиго, некротичного фасциїту та синдрому токсичного шоку. Окрім цих гострих інфекцій, *S.*

*pyogenes* можуть викликати постстрептококові ускладнення, такі як гостра ревматична лихоманка або постстрептококовий гломерулонефрит, що може призвести до хронічних ускладнень.

*S. pyogenes* в основному передається через прямий контакт з респіраторними краплями від інфікованої людини або прямий контакт з інфікованою ранюю. Він також може виживати до 48 годин на предметах побуту, таких як іграшки, дверні ручки та одяг.

## 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 3ІЗ.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними 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 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) - Аналітичне дослідження чутливості:** Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень синтетичного фрагмента гену збудника, щоб отримати кінцеві концентрації 1120, 760, 130, 45 та 24 КУО/мл шляхом розведення зразками цільної крові, 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 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 92 КУО/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 реплікатів із концентрацією 92 КУО/мл. Усі 20 реплікатів дали позитивні результати для мішені, таким було підтверджено, що LoD становить 92 КУО/мл.

## Інклюзивність:

Для послідовностей кожного генотипу, доступних у базах даних NCBI, було проведено інклюзивний аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit. Результати дослідження 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 Streptococcus pyogenes qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit проти послідовностей 25 патогенів показав, що набір є специфічним до своєї мішені і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 24 збудники були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Streptococcus pyogenes 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>Listeria monocytogenes</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 |
| Вірус папарилу 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>Listeria monocytogenes</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<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| <i>Neisseria meningitidis</i>                          | Клінічний зразок         | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| <i>Aspergillus niger</i>                               | Клінічний зразок         | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Коронавірус людини<br>(229E)                           | NIBSC (Кат.№:<br>09/132) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Риновірус                                              | NIBSC (Кат.№:<br>08/324) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Аденовірус                                             | NIBSC (Кат.№:<br>16/324) | 2.0×10 <sup>8</sup> МО/мл       | Не<br>виявлено |
| Вірус грипу<br>(A/Christchurch<br>/1/2003, H1N1)       | NIBSC (Кат.№:<br>07/296) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус грипу<br>(A/Wyoming/3/2003,<br>H3N2)             | NIBSC (Кат.№:<br>07/298) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус грипу<br>(B/Jiangsu/10/2003)                     | NIBSC (Кат.№:<br>07/300) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус імунodefіциту<br>людини 1 типу (ВІЛ-1,<br>HIV-1) | NIBSC (Кат.№:<br>16/194) | 1.25×10 <sup>5</sup> МО/мл      | Не<br>виявлено |
| Вірус імунodefіциту<br>людини 2 типу (ВІЛ-2,<br>HIV-2) | NIBSC (Кат.№:<br>16/296) | 2.8×10 <sup>5</sup> МО/мл       | Не<br>виявлено |
| Респіраторно-синциті<br>льний вірус А2                 | NIBSC (Кат.№:<br>08/120) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус парогрипу 1<br>типу                              | NIBSC (Кат.№:<br>08/176) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус парогрипу 2<br>типу                              | NIBSC (Кат.№:<br>08/178) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус парогрипу 3<br>типу                              | NIBSC (Кат.№:<br>08/118) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |
| Вірус парогрипу 4<br>типу                              | NIBSC (Кат.№:<br>08/180) | не призначена<br>одиниця виміру | Не<br>виявлено |

## Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202302; idil biotech, Туреччина), RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні 3ІЗ (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

Із даним набором можна використовувати всі зразки нуклеїнових кислот, придатні для аналізів методом qPCR. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров.

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 цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам.

## Протокол

**Виділення ДНК** Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати набір 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 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 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

## Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім S.pyogenes RM 2. Покладіть компонент S.pyogenes RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть 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 S.pyogenes RM 1 та S.pyogenes 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 майстер-суміші додайте 14 мкл S.pyogenes RM 1 та 1 мкл S.pyogenes RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів 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    |
|------------------------|------------------|-------------|--------|
| Активізація 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  $26 \pm 4$ , 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 (Streptococcus pyogenes) | Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль) | Інтерпретація                                           |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| +                                             | +/-                                        | Позитивний на Streptococcus pyogenes                    |
| -                                             | +                                          | Результат валідний. Збудник не виявлено                 |
| -                                             | -                                          | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати |

### Інформація для замовлення

| Назва продукту                         | Фасування  | Кат.№        |
|----------------------------------------|------------|--------------|
| RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit | 25 тестів  | IP202313-25  |
| RevoDx Streptococcus pyogenes qPCR Kit | 100 тестів | IP202313-100 |