

**RevoDx Набір для виявлення ДНК/РНК респіраторних патогенів - 24**

**(RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit)**

**Інструкція з використання**

# Якісне виявлення ДНК/РНК збудників респіраторних захворювань

# Для дігностики *in vitro*

**Тільки для професійного використання**

## Каталожні номери:

**IP202323-24 – 24 тести**

**IP202323-48 – 48 тестів**

### Склад набору

|  | **Назва компонента** | **24 тести** | **48 тестів** |
| --- | --- | --- | --- |
| **1** | Respiro24 MM 1 | 336 мкл | 672 мкл |
| **2** | Respiro24 MM 2 | 336 мкл | 672 мкл |
| **3** | Respiro24 MM 3 | 336 мкл | 672 мкл |
| **4** | Respiro24 MM 4 | 336 мкл | 672 мкл |
| **5** | Respiro24 MM 5 | 336 мкл | 672 мкл |
| **6** | Respiro24 MM 6 | 336 мкл | 672 мкл |
| **7** | Respiro24 MM 7 | 336 мкл | 672 мкл |
| **8** | Respiro24 MM 8 | 336 мкл | 672 мкл |
| **9** | Суміш ферментів Respiro24 (Enzyme Mix) | 192 мкл | 384 мкл |
| **10** | Позитивний контрольний зразок, ПКЗ (Respiro24 Positive Control) | 200 мкл | 400 мкл |
| **11** | Негативний контрольний зразок, НКЗ (Respiro24 Negative Control) | 200 мкл | 400 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection 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. Флакони з Respiro24 MM не слід заморожувати-розморожувати більше 3 разів, оскільки це може призвести до зниження чутливості набору. За 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 Respiratory-24 Pathogen Detection Kit — це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот специфічних бактеріальних і вірусних патогенів у мазках з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), зразках бронхіального аспірату (БАС), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору) від осіб із ознаками та/або симптомами респіраторної інфекції.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути точною та єдиною 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 Respiratory-24 Pathogen Detection Kit призначений для використання кваліфікованим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та процедурам діагностики *in vitro*.

Набір RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit виявляє наступні патогени:

| **Віруси** |
| --- |
| * Вірус грипу А * Вірус грипу A-H1 * Вірус грипу A-H1pdm09 * Вірус грипу A-H3 * Вірус грипу B * Респіраторно-синцитіальний вірус A та B * Риновірус/Ентеровірус * Метапневмовірус * Вірус парагрипу 1 типу * Вірус парагрипу 2 типу * Вірус парагрипу 3 типу * Вірус парагрипу 4 типу * Бокавірус 1/2/3/4 * Коронавірус 229E * Коронавірус NL63 * Коронавірус OC43 * Коронавірус HKU1 * Аденовірус * Коронавірус SARS-CoV-2 |
| **Бактерії** |
| * *Bordetella pertussis* * *Chlamydophila pneumoniae* * *Legionella pneumophila* * *Mycoplasma pneumoniae* * *Streptococcus pneumoniae* |

**Обмеження щодо використання продукту**

* Використовувати тільки за призначенням
* Набір призначений для діагностики in vitro
* Потенційні мутації в цільових областях геномів патогенів, охоплених олігонуклеонами в наборі, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
* Цей набір валідовано для використання з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
* Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних 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

RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit – це ПЛР-аналіз у реальному часі, у якому мічений флуоресцентним барвником зонд гібридизується з матрицею та розщеплюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази Thermus aquaticus (Taq) у міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація кДНК, 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. Графік (стандартна крива), що відображує залежність порогового циклу Ct (по осі Y) від логарифму кількості копій НК Стандартних зразків 1-4 (по осі Х), є прямою лінією.

Метод виконується безпосередньо на ДНК/РНК, виділених зі зразків пацієнта. Виявлення ДНК/РНК збудників респіраторних хвороб здійснюється у 8 різних реакційних пробірках, у яких одночасно виявляється РНКаза Р людини. У наборі використовується РНКаза Р людини як внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені. У наведеній нижче таблиці підсумовано цільові патогени у 8 різних реакційних пробірках:

| **Пробірка №** | **Цільовий організм** | **Канал детекції** |
| --- | --- | --- |
| **Respiro24 MM 1** | Вірус грипу A | FAM |
| Вірус грипу B | HEX |
| Респіраторно-синцитіальний вірус A+B | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 2** | Риновірус/Ентеровірус | FAM |
| *Legionella pneumophila* | HEX |
| Бокавірус 1/2/3/4 | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 3** | *Chlamydophila pneumoniae* | FAM |
| Вірус парагрипу 3 типу | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 4** | Вірус грипу A-H1pdm09 | FAM |
| Коронавірус SARS-CoV-2 | HEX |
| Вірус парагрипу 2 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 5** | Вірус грипу A-H3 | FAM |
| Метапневмовірус | HEX |
| *Mycoplasma pneumoniae* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 6** | Вірус грипу A-H1 | FAM |
| Коронавірус OC43 | HEX |
| *Bordetella pertussis* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 7** | Коронавірус NL63 | FAM |
| Коронавірус HKU1 | HEX |
| Вірус парагрипу 4 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 8** | Аденовірус | FAM |
| Коронавірус 229E | HEX |
| Вірус парагрипу 1 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |

### Прилади

RevoDx Respiratory-24 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 Respiratory-24 Pathogen Detection Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

### Загальний опис

Молекулярна діагностика інфекцій дихальних шляхів є новаторською галуззю в медичному світі, яка має на меті революціонізувати методи виявлення та лікування цих поширених захворювань. Використовуючи передові технології та методи, вчені тепер можуть з безпрецедентною точністю ідентифікувати специфічні патогени, відповідальні за спричинення респіраторних інфекцій. Це означає, що постачальники медичних послуг можуть приймати більш обґрунтовані рішення, коли справа доходить до призначення відповідних варіантів лікування для пацієнтів.

Минули ті часи, коли лікарі покладалися лише на симптоми та фізичне обстеження для діагностики інфекцій дихальних шляхів. Завдяки молекулярній діагностиці тепер вони можуть аналізувати генетичний матеріал вірусів або бактерій, присутніх у зразках пацієнтів, таких як мокротиння, мазки з носа чи горла. Виявляючи унікальні послідовності ДНК або РНК цих патогенів, медичні працівники можуть визначити точну причину інфекції, що дозволяє призначити цілеспрямоване лікування та отримати кращі результати.

Цей інноваційний підхід має численні переваги перед традиційними методами. Це не тільки забезпечує швидші та точніші результати, але й дозволяє ідентифікувати патогени, які раніше не виявлялися. Крім того, це дозволяє виявляти кілька збудників одночасно, що особливо корисно у випадках, коли є підозра на супутні інфекції. Ця інформація має важливе значення для визначення найефективнішого курсу лікування, будь то противірусні препарати чи антибіотики.

Молекулярна діагностика інфекцій дихальних шляхів також відіграє вирішальну роль у зменшенні непотрібних призначень антибіотиків. Надмірне та неправильне використання антибіотиків призвело до появи стійких до ліків бактерій, що становить значну глобальну загрозу. Завдяки точному визначенню патогенів, що викликають інфекцію, медичні працівники можуть уникнути призначення антибіотиків, коли вони не потрібні, таким чином допомагаючи запобігти розвитку стійкості до антибіотиків.

Крім того, ця техніка обіцяє майбутні досягнення в персоналізованій медицині. Оскільки наше розуміння геному людини продовжує розширюватися, дослідники виявляють генетичні варіації, які впливають на сприйнятливість до певних захворювань, включаючи інфекції дихальних шляхів. Молекулярна діагностика може допомогти виявити осіб, які можуть бути піддані підвищеному ризику через їхню генетичну структуру, дозволяючи раніше втручатися та адаптувати профілактичні заходи.

Підсумовуючи, можна сказати, що молекулярна діагностика інфекцій дихальних шляхів кардинально змінює ситуацію в галузі медицини. Використовуючи потужність генетики та передових технологій, ми прокладаємо шлях до більш точної діагностики, цілеспрямованого лікування та покращення результатів лікування пацієнтів. Такий підхід не тільки покращує розуміння причини інфекційних захворювань, але й сприяє глобальним зусиллям у боротьбі зі стійкістю до антимікробних препаратів. Оскільки ця галузь продовжує розвиватися, вона має величезний потенціал для трансформації способів діагностики та лікування інфекцій дихальних шляхів, зрештою покращуючи здоров’я та благополуччя людей у всьому світі.

### 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 вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими 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

#### 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 копій/мл шляхом розведення зразків збудників клінічними зразками, відібраними у негативних осіб, щоб імітувати позитивні клінічні зразки. ДНК збудника очищали за допомогою набору RevoDx для очищення ДНК/РНК патогенів (RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech,Туреччина)). Кожне розведення тестували в 24 повтореннях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Межа виявлення (LoD) для вірусів становила 150 копій/мл, а для бактерій – 200 КУО/мл. Ці значення LoD були підтверджені тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 150 копій/мл для вірусів та 200 КУО/мл для бактерій. Всі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 150 копій/мл для вірусів та 200 КУО/мл для бактерій.

#### Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection 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 для виявлення збудників респіраторних хвороб RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit проти послідовностей 24 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 31 збудник були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection 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 |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Немає гомології |
| *Streptococcus salivarius* | Немає гомології |
| *Pneumocystis jirovecii* (PJP) | Немає гомології |
| *Entamoeba dispar* | 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 |
| JC-поліомавірус | Немає гомології |
| BK-поліомавірус | Немає гомології |
| Парвовірус B19 | Немає гомології |
| Норовірус людини | Немає гомології |
| Вірус Варіелла Зостер (VZV) | Немає гомології |
| Вірус імунодефіциту людини 1 (ВІЛ 1, HIV-1) | Немає гомології |
| Вірус імунодефіциту людини 2 (ВІЛ-2, HIV-2) | Немає гомології |
| Вірус гепатиту С (ВГС, HCV) | Немає гомології |
| Ірус гепатиту В (ВГВ, HBV) | Немає гомології |
| Вірус Ебола | Немає гомології |
| Цитомегаловірус (ЦМВ, CMV) | Немає гомології |
| Вірус Епштейна-Барр (ЕБВ, EBV) | Немає гомології |
| Пареховірус людини | Немає гомології |

**Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР**

| **Організм** | **Джерело** | **Концентрація** | **Результат** |
| --- | --- | --- | --- |
| *Pneumocystis jirovecii* (PJP) | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Entamoeba dispar* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Aspergillus niger* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус кору | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Candida albicans* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Cryptococcus neoformans* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Escherichia coli* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Neisseria meningitidis* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Legionella feeleii* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Klebsiella pneumoniae* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Chlamydia trachomatis* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Mycoplasma hominis* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Neisseria gonorrhoeae* | Клінічний зразок | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1) | NIBSC (Cat. No: 16/194) | 1.25×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 2 (ВІЛ-2) | NIBSC (Cat. No: 16/296) | 2.8×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус гепатиту В (4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT) | NIBSC (Cat. No: 10/266) | 9.55×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус гепатиту С (6th WHO International Standard for Hepatitis C virus RNA) | NIBSC (Cat. No: 18/184) | 2.57×105 МО/мл | Не виявлено |
| Цитомегаловірус (CMV) (1st International Standard) | NIBSC (Cat. No: 09/162) | 5×106 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус Епштейна-Барр (1st International Standard) | NIBSC (Cat. No: 09/260) | 5×106 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус Варіцелла Зостер VZV (1st WHO International Standard) | NIBSC (Cat. No: 19/164) | 1×107 МО/мл | Не виявлено |
| EBOV RNA NP-VP35-GP (WHO Reference Reagent) | NIBSC (Cat. No: 15/222) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Пагвовірус B19 (1st International Standard) | NIBSC (Cat. No: 09/110) | 9.55×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус простого герпесу 1 типу (HSV-1) | NIBSC (Cat. No: 16/368) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус простого герпесу 2 типу (HSV-2) | NIBSC (Cat. No: 17/122) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| JC-поліомавірус (JCV) (1st International Standard) | NIBSC (Cat. No: 14/114) | 1.55×107 МО/мл | Не виявлено |
| BK-поліомавірус (BKV)(1st International Standard) | NIBSC (Cat. No: 14/122) | 2.04×107 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус герпесу 6 типу (HHV-6 Virus 1st WHO International Standard) | NIBSC (Cat. No: 15/266) | 5.63×107 МО/мл | Не виявлено |
| Пареховірус людини | NIBSC (Cat. No: 08/322) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Норовірус людини | NIBSC (Cat. No: 08/318) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| *Mycobacterium tuberculosis* (1st WHO International Standard) | NIBSC (Cat. No: 20/152) | 2×106 МО/мл | Не виявлено |

**Порівняльні клінічні випробування:**

Ефективність роботи набору для виявлення збудників респіраторних хвороб RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою архівних клінічних зразків. Для кожного збудника було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у рандомізованому сліпому дослідженні. Всі 20 позитивних зразків і 20 негативних зразків були отримані з лабораторії державної лікарні і попередньо протестовані за допомогою валідованого порівняльного аналізу. Зразки були виділені за допомогою набору RevoDx для очищення ДНК/РНК патогенів (RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit) відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit відповідно до інструкції з експлуатації. Для ампліфікації, детектування та аналізу використовували ПЛР-ампліфікатор BIO-RAD CFX96.

За результатами тестування отримали 100% збіг з очікуваними результатами.

### Додаткові матеріали та обладнання

* Набір для виділення ДНК/РНК патогенів RevoDx (RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit, Cat. №: IP202302; ІdilВiotech, Туреччина) або набір для магнітного виділення ДНК/РНК патогенів RevoDx (RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit, Cat. №: IP202303; ІdilВiotech, Туреччина) або реагент для виділення ДНК/РНК патогенів DirEXT OneStep (Cat. №: IP202319; ІdilВiotech, 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 з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). 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.

Зразки можна зберігати при 2-8 oC протягом 72 годин після збору. Якщо очікується затримка екстракції, зразки слід зберігати при -15 oC або нижче. Екстраговану нуклеїнову кислоту слід зберігати при -15 oC або нижче. Транспортування зразків має відповідати державним або місцевим нормам.

### Протокол

**Виділення ДНК:** Для виділення ДНК збудника із зразків мазків з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), бронхіального аспірату (БАС), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору), 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 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.

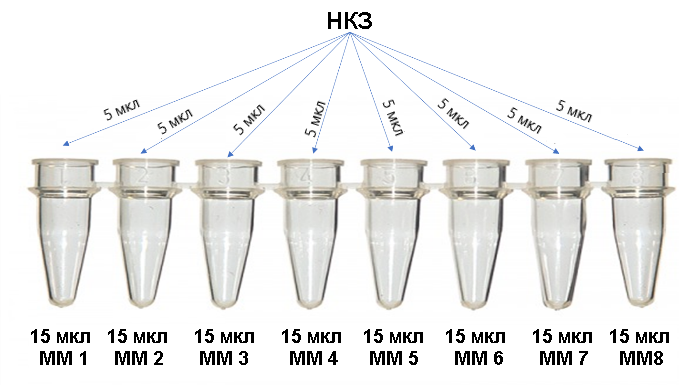
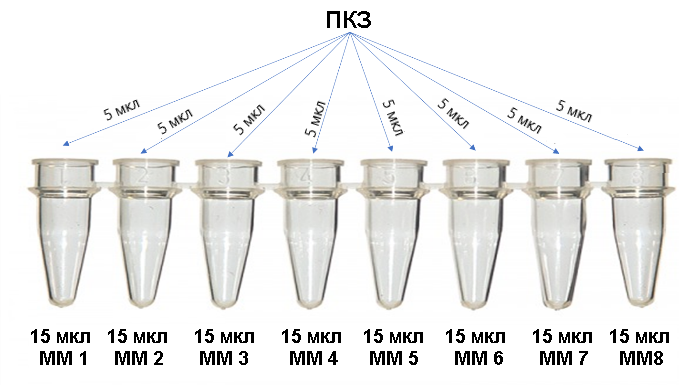
**Позитивний контроль:** Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

#### Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Respiro24 Enzyme Mix. Покладіть суміш ферментів Respiro24 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 Respiro24 MM та Respiro24 Enzyme Mix 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. Підготуйте 8 пробірок 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей Respiro24 MM 1-8. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл Respiro24 MM і 1 мкл Respiro24 Enzyme Mix для кожного зразка у підготовані пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 8 лунок (з різними сумішами 1-8). Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку, як показано на малюнку нижче. Внести по 5 мкл ПКЗ та НКЗ у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

****

1. Повторіть крок 3 для кожного екстрагованого зразка, негативного та позитивного контролю.



**5.** Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 1. Вказати об’єм зразка 20 мкл.

**Таблиця 1:** Програма ампліфікації

| **Назва етапу** | **Кількість циклів** | **Температура** | **Час** |
| --- | --- | --- | --- |
| Синтез кДНК | 1 | 50ºC | 15 хв |
| Активація полімерази | 1 | 95ºC | 2 хв |
| Ампліфікація | 40 | 95ºC | 10 сек |
| 60ºC\* | 20 сек |

**\* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5**

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

**6.** Запустити програму.

**7.** Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

### Аналіз даних

Значення Ct для ПКЗ повинно дорівнювати 26±4, а НКЗ по всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

| **Сигнал по будь-якому каналу FAM / HEX / ROX** | **Сигнал по каналу**  **Cy 5 (ген РНКази Р)** | **Інтерпретація** |
| --- | --- | --- |
| **+** | **+/-** | Позитивний на специфічний збудник |
| **-** | **+** | Збудник не виявлено |
| **-** | **-** | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати для цього майстер-міксу |

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

| **Пробірка №** | **Цільовий організм** | **Канал детекції** |
| --- | --- | --- |
| **Respiro24 MM 1** | Вірус грипу A | FAM |
| Вірус грипу B | HEX |
| Респіраторно-синцитіальний вірус A+B | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 2** | Риновірус/Ентеровірус | FAM |
| *Legionella pneumophila* | HEX |
| Бокавірус 1/2/3/4 | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 3** | *Chlamydophila pneumoniae* | FAM |
| Вірус парагрипу 3 типу | HEX |
| *Streptococcus pneumoniae* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 4** | Вірус грипу A-H1pdm09 | FAM |
| Коронавірус SARS-CoV-2 | HEX |
| Вірус парагрипу 2 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 5** | Вірус грипу A-H3 | FAM |
| Метапневмовірус | HEX |
| *Mycoplasma pneumoniae* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 6** | Вірус грипу A-H1 | FAM |
| Коронавірус OC43 | HEX |
| *Bordetella pertussis* | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 7** | Коронавірус NL63 | FAM |
| Коронавірус HKU1 | HEX |
| Вірус парагрипу 4 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |
| **Respiro24 MM 8** | Аденовірус | FAM |
| Коронавірус 229E | HEX |
| Вірус парагрипу 1 типу | ROX |
| Внутрішній контроль | Cy 5 |

**Інформація для замовлення**

| **Назва продукту** | **Фасування** | **Кат. №** | **Баркод** |
| --- | --- | --- | --- |
| RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit | 24 тестів | IP202323-24 | 8684387210188 |
| RevoDx Respiratory-24 Pathogen Detection Kit | 48 тестів | IP202323-48 | 8684387210195 |