



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення
ДНК/РНК 24 збудників
шлунково-
кишкових захворювань
RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК та РНК 24 збудників інфекцій ШКТ

Для діагностики *in vitro*

Тільки для професійного використання



Каталожні номери:
IP202401-24 – 24 тести
IP202401-48 – 48 тестів



Склад набору

	Компонент	24 тести	48 тестів
1	Gastro24 MM 1	336 мкл	672 мкл
2	Gastro24 MM 2	336 мкл	672 мкл
3	Gastro24 MM 3	336 мкл	672 мкл
4	Gastro24 MM 4	336 мкл	672 мкл
5	Gastro24 MM 5	336 мкл	672 мкл
6	Gastro24 MM 6	336 мкл	672 мкл
7	Gastro24 MM 7	336 мкл	672 мкл
8	Gastro24 MM 8	336 мкл	672 мкл
9	Суміш ферментів «Гастро» 1 (Gastro24 Enzyme Mix 1)	144 мкл	288 мкл
10	Суміш ферментів «Гастро» 2 (Gastro24 Enzyme Mix 2)	48 мкл	96 мкл
11	Внутрішній контрольний зразок (Internal Control)	120 мкл	240 мкл
12	Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
13	Негативний контрольний зразок (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Gastro 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, який вказаний на етикетці продукту. Реагенти Gastro24 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 Gastro Pathogen Detection Kit — це ПЛР-тест в режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот 24 специфічних вірусних, бактеріальних і протозойних збудників інфекцій шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Набір RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit слід використовувати зі зразками фекалій та ректальних мазків, отриманих від осіб з ознаками чи симптомами інфекцій ШКТ.

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 варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Набір RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit виявляє наступні бактеріальні, вірусні та протозойні патогени:

Бактерії
• Токсин A/B <i>Clostridium difficile</i> (tcdA/tcdB) • Ентероагративна <i>Escherichia coli</i> (EAEC) (aatA/aggR) • Ентероінвазивна <i>Escherichia coli</i> (EIEC)/Shigella (ipaH) • Ентеропатогенна <i>Escherichia coli</i> (EPEC) (eaeA) • Ентеротоксигенна <i>Escherichia coli</i> (ETEC) (eltA/estA/estB) • <i>Helicobacter pylori</i> • Патогенні види <i>Campylobacter spp</i> (<i>C. jejuni</i>, <i>C. upsaliensis</i>, <i>C. coli</i>) • <i>Plesiomonas shigelloides</i> • <i>Salmonella spp</i> • <i>E. coli</i>, що виробляє шиготоксин (STEC) (stx1/stx2) • <i>E. coli</i>, що виробляє шиготоксин (STEC) O157:H7 • <i>Vibrio cholerae</i> • <i>Vibrio parahaemolyticus</i> • <i>Vibrio vulnificus</i> • <i>Yersinia Enterocolitica</i>
Віруси
• Аденовірус (F40/41) • Астровірус • Норовірус геногруп I та II • Ротавірус А • Саповірус (I, II, IV, V)
Протисти
• <i>Cyclospora cayetanensis</i> • <i>Cryptosporidium spp</i> • <i>Entamoeba histolytica</i> • <i>Giardia Lamblia</i>

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Тільки для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових ділянках геномів патогенів, 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 відбору, 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

Мультиплексна ПЛР у реальному часі дозволяє одночасно виявляти багато типів мікроорганізмів. При цьому чутливість та специфічність методу висока, а час детекції короткий. Таким чином цей тип аналізу є корисним для виявлення ранніх госпітальних інфекцій.

RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit - це набір для ПЛР-аналізу, що передбачає використання флуорогенного зонду, який гібридується з послідовністю між двома праймерами. Такий зонд містить флуоресцентну мітку на 5'-кінці та молекулу гасника на 3'-кінці, яка пригнічує флуоресцентний репортер. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею, а потім руйнується через 5'-3' ендонуклеазну активність ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при цьому 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК/РНК, виділених із зразків пацієнтів. Виявлення ДНК/РНК збудників здійснюється у 8 різних реакційних пробірках, в яких одночасно виявляється транскрибована *in vitro* РНК в якості внутрішнього контролю, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

У наступній таблиці наведено перелік патогенів-мішеней у 8 різних реакційних пробірках:

Пробірка №	Цільовий організм/ген	Канал детекції
Gastro24 MM 1	<i>Campylobacter spp</i> (<i>C. jejuni</i> , <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. coli</i>)	FAM
	<i>Salmonella spp</i>	HEX
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 2	Токсин A/B <i>Clostridium difficile</i> (<i>tcdA/tcdB</i>)	FAM
	<i>Vibrio vulnificus</i>	HEX
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 3	<i>Helicobacter pylori</i>	FAM
	<i>Vibrio cholerae</i>	HEX
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 4	Ентеротоксигенна <i>E. coli</i> (ETEC) (<i>eltA/estA/estB</i>)	FAM
	<i>E. coli</i> , що виробляє шиготоксин (STEC) (<i>stx1/stx2</i>)	HEX
	<i>E. coli</i> , що виробляє шиготоксин (STEC) O157:H7	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 5	Ентероагрегативна <i>E. coli</i> (EAEC) (<i>aatA/aggR</i>)	FAM
	Ентероінвазивна <i>E. coli</i> (EIEC)/ <i>Shigella</i> (<i>ipaH</i>)	HEX
	Ентеропатогенна <i>E. coli</i> (EPEC) (<i>eaeA</i>)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 6	<i>Giardia Lamblia</i>	FAM
	<i>Entamoeba Histolytica</i>	HEX
	<i>Cryptosporidium spp</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 7	Норовірус генотипу I та II	FAM
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	HEX
	Ротавірус A	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Gastro24 MM 8	Сапівірус (I, II, IV, V)	FAM
	Астровірус	HEX
	Аденовірус (F40/41)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Прилади

Набір RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛП 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 Gastro Pathogen Detection Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛП у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

Загальний опис

Інфекції шлунково-кишкового тракту (ШКТ) є серйозною глобальною проблемою для охорони здоров'я, оскільки щорічно вражають мільйони людей і при цьому характеризуються значною захворюваністю та смертністю. Ці інфекції викликаються широким спектром патогенів, включаючи бактерії, віруси та протисти. Точна та своєчасна діагностика шлунково-кишкових інфекцій має вирішальне значення для ефективного лікування пацієнтів та запобігання подальшій передачі.

Неможливо переоцінити важливість швидкої діагностики в лікуванні шлунково-кишкових інфекцій. Вона відіграє вирішальну роль у покращенні результатів лікування пацієнтів, стримуванні поширення інфекцій і зниженні витрат на охорону здоров'я. Оскільки діагностичні технології продовжують розвиватися, інтеграція інструментів швидкої діагностики в рутинну клінічну практику буде важливою для оптимізації лікування інфекцій ШКТ. Ці досягнення не тільки покращують індивідуальний догляд за пацієнтами, але й сприяють досягненню ширших цілей громадської охорони здоров'я, включаючи стримування спалахів і збереження антимікробної ефективності.

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.
- 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 розхідні 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 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

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 МО/мл або копій/мл шляхом розведення зразків фекалій, отриманих від негативних осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогенів очищали за допомогою набору RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення тестували в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Межа виявлення (LoD) становила 250 КУО/мл або МО/мл або копій/мл, це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 250 КУО/мл або МО/мл або копій/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 250 КУО/мл або МО/мл або копій/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit було проведено для послідовностей кожного патогену, доступних у базах даних NCBI. Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з всіма доступними послідовностями патогенів з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність:

Перехресна реактивність набору RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit проти послідовностей 22 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 21 патогенний мікроорганізм, перерахований нижче, було протестовано на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалося.

Нижче наведені результати перехресної реактивності, як у *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>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</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>Neisseria meningitidis</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Немає гомології
Парвовірус B19	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Legionella pneumophila</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Bordetella pertussis</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	Не зазначено	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	2.0×10 ⁸ МО/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не зазначено	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не зазначено	Не виявлено

Порівняльні клінічні випробування:

Ефективність роботи набору RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit оцінювали за допомогою архівних зразків фекалій. 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 аналізу. Зразки були виділені за допомогою набору RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification kit відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit відповідно до інструкції з використання. 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 RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. №: IP202428;; IdilBiotech, Туреччина).
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (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
- Бокс біологічного захисту

Підготовка зразків

Набір валідовано для використання зі зразками фекалій чи ректальних мазків. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через даний біоматеріал.

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 включає точне і повне документування.

Після збору зразки слід зберігати при 2-8°C не довше 24 годин. Для більш тривалого зберігання, заморозити при -15 °C або нижче. Транспортування зразків має відповідати державним або місцевим нормам. Виділені нуклеїнові кислоти зберігати при -15 °C або нижче.

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК/РНК збудників зі зразків фекалій та ректальних мазків слід використовувати набір RevoDx Stool 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: Наявність внутрішнього контролю (ВК) під час процедури очищення ДНК/РНК є необхідною. Внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* плазмиду, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК/РНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification kit. **Не додавайте ВК безпосередньо у зразок.** Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК/1 мкл буфера для елюції). Слабкий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на один із збудників, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК збудника під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції НК.

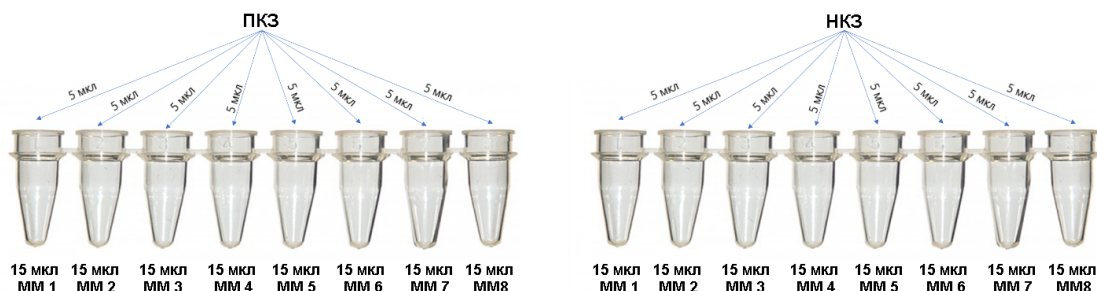
Позитивний контроль: Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Gastro24 Enzyme Mix 1 та 2. Помістіть компоненти Gastro24 Enzyme Mix 1 та 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 Gastro24 MM та Gastro24 Enzyme Mix в залежності від загальної кількості 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. Підготуйте 8 пробірок об'ємом 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей Gastro24 MM 1-8. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл відповідного компонента Gastro24 MM 1-6 і 1 мкл Gastro24 Enzyme Mix 1 у промарковані відповідно пробірки, та по 14 мкл Gastro24 MM 7-8 і 1 мкл Gastro24 Enzyme Mix 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 кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 8 лунок (з різними сумішами 1-8). Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК/РНК у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.



4. Повторіть крок 3 для кожного виділеного зразка, позитивного та негативного контролів..



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	50°C	15 хв
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, ROX та Cy 5

- Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5.
- Запустити програму.
- 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 для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

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

Примітка. Залежно від приладу набір може давати хибнопозитивні результати зі значенням Ct вище 35 для специфічних мішеней. Отже, результати з Ct вище 35 можуть бути проігноровані (особливо якщо в суміші немає позитивного сигналу для інших мішеней). Тим не менш, радимо не відкидати результат повністю, рекомендується оцінювати його в поєднанні з клінічними симптомами пацієнта та іншими діагностичними даними. Звернення до клінічного мікробіолога також може дати цінну інформацію.

Диференціація між EPEC, STEC, O157 і EIEC головним чином досягається шляхом виявлення специфічних генів вірулентності під час ПЛР. Ключові відмінності включають:

- **STEC** (*E. coli*, що продукує шигатоксин): наявність генів **stx** є характерним для STEC.
- **EPEC** (Ентеропатогенна *E. coli*): відсутність генів **stx** у поєднанні з наявністю **eaeA** вказує на EPEC.
- **O157:H7**: специфічні гени-мішені використовуються для диференціації **O157** від інших штамів STEC.
- **EIEC** (Ентероінвазивна *E. coli*): виявлення ґрунтується на ідентифікації гена **ial**, специфічного для EIEC, якого немає в EPEC або STEC.
- **Shigella dysenteriae**: ідентифікація генів **ial** і **stx** у зразку дасть змогу встановити діагноз *Shigella dysenteriae* типу 1.

Розуміння цих генетичних маркерів має вирішальне значення для точної діагностики та ефективного лікування.

У наведеній нижче таблиці підсумовано диференціацію:

Сигнал по каналу ROX у суміші Gastro24 MM 5 (EPEC) (eaeA)	Сигнал по каналу HEX в суміші Gastro24 MM 4 (STEC) (stx1/stx2)	Сигнал по каналу ROX в суміші Gastro24 MM 4 (STEC) O157:H7	Сигнал по каналу HEX в суміші Gastro24 MM 5 (EIEC)/Shigella (ial)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
Позитивний	Негативний	Негативний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ентеропатогенної <i>E. coli</i> (EPEC)
Позитивний або негативний	Позитивний	Негативний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК <i>E. coli</i> , що продукує шигатоксин (STEC)
Позитивний або негативний	Позитивний	Позитивний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК <i>E. coli</i> , що продукує шигатоксин (STEC) O157:H7
Негативний	Негативний	Негативний	Позитивний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ентероінвазивної <i>E. coli</i> (EIEC) (або <i>Shigella</i>)
Негативний	Позитивний	Негативний	Позитивний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ймовірно <i>Shigella dysenteriae</i>
Негативний	Негативний	Негативний	Негативний	Позитивний	Результат валідний. Збудник не виявлено
Негативний	Негативний	Негативний	Негативний	Негативний	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

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

Пробірка №	Цільовий організм/ген	Канал детекції
Gastro24 MM 1	<i>Campylobacter spp</i> (<i>C. jejuni</i> , <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. coli</i>)	FAM
	<i>Salmonella spp</i>	HEX
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 2	Токсин A/B <i>Clostridium difficile</i> (tcdA/tcdB)	FAM
	<i>Vibrio vulnificus</i>	HEX
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 3	<i>Helicobacter pylori</i>	FAM
	<i>Vibrio cholerae</i>	HEX
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 4	Ентеротоксигенна <i>E. coli</i> (ETEC) (eltA/estA/estB)	FAM
	<i>E. coli</i> , що виробляє шигатоксин (STEC) (stx1/stx2)	HEX
	<i>E. coli</i> , що виробляє шигатоксин (STEC) O157:H7	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Gastro24 MM 5	Ентероагрегативна <i>E. coli</i> (EAEC) (aatA/aggR)	FAM
	Ентероінвазивна <i>E. coli</i> (EIEC)/ <i>Shigella</i> (ipaH)	HEX
	Ентеропатогенна <i>E. coli</i> (EPEC) (eaeA)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 6	<i>Giardia Lamblia</i>	FAM
	<i>Entamoeba Histolytica</i>	HEX
	<i>Cryptosporidium spp</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 7	Норовірус генотипів I та II	FAM
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	HEX
	Ротавірус А	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro24 MM 8	Саповірус (I, II, IV, V)	FAM
	Астровірус	HEX
	Аденовірус (F40/41)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit	24 тести	IP202401-24
RevoDx Gastro Pathogen Detection Kit	48 тестів	IP202401-48