

RevoDx Набір для
виявлення ДНК 4
протозойних збудників
шлунково-кишкових
захворювань методом ПЛР
RevoDx Gastro Parasitic Pathogen
Detection Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення та диференціація ДНК 4 протозойних
збудників інфекцій ШКТ
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202404-24 – 24 тести
IP202404-48 – 48 тестів

Склад набору

	Компонент	24 тести	48 тестів
1	Gastro Parasitic MM 1	336 мкл	672 мкл
2	Gastro Parasitic MM 2	336 мкл	672 мкл
3	Суміш ферментів «Gastro Parasitic» (Enzyme Mix)	48 мкл	96 мкл
4	Внутрішній контрольний зразок (Internal Control)	120 мкл	240 мкл
5	Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	200 мкл	400 мкл
6	Негативний контрольний зразок (Negative Control)	200 мкл	400 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Gastro Parasitic 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. Реагенти Gastro Parasitic 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 Parasitic Pathogen Detection Kit — це ПЛР-тест в режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот 4 специфічних протозойних збудників інфекцій ШКТ. Набір RevoDx Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit використовується для роботи із ДНК та РНК, виділеної зі зразків 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 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 Gastro Parasitic 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 Parasitic Pathogen Detection Kit виявляє наступні протозойні патогени:

Протисти
<ul style="list-style-type: none">• <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 реакціях, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних 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

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 Parasitic Pathogen Detection Kit — це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, в якому між двома праймерами ПЛР знаходиться внутрішній олігонуклеотидний зонд 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній зі зразків пацієнта. Виявлення ДНК збудників здійснюється за допомогою 2 різних реакцій, в яких одночасно виявляється плазмідна ДНК у якості внутрішнього контролю, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

У наступній таблиці наведено перелік патогенів-мішеней у 2 різних реакційних пробірках:

Пробірка №	Цільовий організм/ген	Канал детекції
Gastro Parasitic MM 1	<i>Giardia Lamblia</i>	FAM
	<i>Entamoeba Histolytica</i>	HEX
	<i>Cryptosporidium spp</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro Parasitic MM 2	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	HEX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Прилади

Набір RevoDx Gastro Parasitic 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 Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР 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.
- 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 вкінці 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 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

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 копій/мл шляхом розведення зразків фекалій, отриманих від негативних до патогенів осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК збудника 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 копій/мл, це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 250 копій/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 250 копій/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit був проведений для послідовностей кожного збудника, 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 Parasitic 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 Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit проти послідовностей 22 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 21 збудник були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Gastro Parasitic 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
<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 В19	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 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>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>Streptococcus pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	Не призначена одиниця виміру	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 призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Порівняльні клінічні випробування:

Ефективність роботи набору RevoDx Gastro Parasitic 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 порівняльного 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 Parasitic 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.

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* плазмідну, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції НК, 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). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на один зі 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 ДНК/РНК.

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 Gastro Parasitic Enzyme Mix. Помістіть компоненти Gastro Parasitic Enzyme Mix 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 Gastro Parasitic MM та Gastro Parasitic Enzyme Mix 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. Підготуйте 8 пробірок об'ємом 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей Gastro Parasitic MM 1 та 2. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл відповідного компонента Gastro Parasitic MM 1 або

2 і 1 мкл Gastro Parasitic Enzyme для кожного зразка у підготовані пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 2 лунки (з різними сумішами 1 та 2). Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку, як показано на малюнку нижче. Внести по 5 мкл позитивного контролю та негативного контролю у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

- Повторіть крок 3 для кожного виділеного зразка, позитивного контролю, негативного контролю.



- 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
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 C_t 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 C_t вище 35 для специфічних мішеней. Отже, результати з C_t вище 35 можуть бути проігноровані. 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.

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

Пробірка №	Цільовий організм/ген	Канал детекції
Gastro Parasitic MM 1	<i>Giardia Lamblia</i>	FAM
	<i>Entamoeba Histolytica</i>	HEX
	<i>Cryptosporidium spp</i>	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
Gastro Parasitic MM 2	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	HEX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit	24 тести	IP202404-24
RevoDx Gastro Parasitic Pathogen Detection Kit	48 тестів	IP202404-48