

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*)

RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*)

Для діагностики *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202441-25 – 25 тестів

IP202441-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферний розчин Camp RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	Ферментна суміш Camp RM 2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок Camp Internal Control	65 мкл	250 мкл
4	Позитивний контрольний зразок Camp Positive Control	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контрольний зразок Camp Negative Control	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) 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. Реагент Camp RM 1 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 аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачерне використання

Набір RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit – це набір для ПЛР у реальному часі, призначений для

якісного виявлення ДНК *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) у зразках калу та ректальних змивах.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути єдиною та точною причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявність інфекції та не повинні слугувати єдиною підставою для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Їх слід інтерпретувати в поєднанні з клінічними спостереженнями, анамнезом хвороби та епідеміологічними даними.

Набір RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та процедурам діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання

- RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit призначений тільки 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 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

Набір RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) 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 Набір RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit передбачає використання спеціального внутрішнього контролю (РНКаз Р людини) для перевірки якості екстракції та ампліфікації.

Прилади

Набір RevoDx *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) 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 *Campylobacter* spp (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM та Cy5.

Загальний опис

Бактерії *Campylobacter* - це одні з основних причин діарейних захворювань у всьому світі. Види *Campylobacter* є найпоширенішими бактеріальними збудниками гастроентериту в людини. Основним шляхом передачі є харчовий — переважно через вживання недовареного м'яса птиці або зараженого молока. Ці бактерії виявляються у широкому колі теплокровних тварин — зокрема, у сільськогосподарських тварин, які використовуються в харчуванні (птиця, велика рогата худоба, свині), а також у домашніх улюбленців, таких як собаки й коти. Додатковим джерелом зараження можуть бути молюски. Також інфікування можливе через забруднену воду чи під час відпочинку на відкритих водоймах.

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 ЗІЗ.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі 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

Аналітична чутливість: Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) для отримання кінцевих концентрацій 1000, 250, 45, 10 та 1,6 КУО/мл. Бактеріальну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) становило 77 КУО/мл.

Діагностична специфічність: Для визначення діагностичної специфічності RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*,

C. coli) qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК збудника. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність: Перехресна реактивність набору RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів та зондів RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit проти послідовностей 28 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових послідовностей і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 14 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як у *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	Немає гомології
Коронавірус SARS-CoV-2	Немає гомології
Коронавірус людини 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології
SARS – коронавірус	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус паратифу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А і В	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumonia</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenza</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Cat. No:)	Не

	09/132)	виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не виявлено

Примітка: назви подані згідно каталогу виробника

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР із одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування Всього було протестовано 101 клінічний зразок. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx *Campylobacter spp* (*C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*) qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202302; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202303; IdilBiotech, Туреччина) або набір для виділення ДНК/РНК з фекалій RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202428; IdilBiotech, 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.

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК збудника із зразків бажано використовувати RevoDx (Magnetic) Pathogen DNA/RNA Purification Kit або 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: Внутрішній контроль (ВК) використовується для перевірки ефективності екстракції ДНК та

ампліфікації. При цьому такий контроль передбачає ампліфікацію частини гена РНКаз Р людини, як відноситься до конститутивних генів. Внутрішній контроль може бути ендогенний або екзогенний. Екзогенний внутрішній контроль включає транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставку. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx 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 патоген, 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 26 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім Camp RM 2. Покладіть Camp 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 RM-1 and RM-2 на загальну кількість зразків. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
3. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл Camp RM 1 та 1 мкл Camp 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 кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК, позитивного контролю та анегативного контролю у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C*	20 сек

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

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM та Cy5.
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу HEX має дорівнювати 26±4, а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати слід інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК <i>Campylobacter spp</i>)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>Campylobacter spp</i> виявлена
-	+	Цільова ДНК не виявлена, результат валідний.
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx <i>Campylobacter spp</i> (C. jejuni, C. upsaliensis, C. coli) qPCR Kit	25 тестів	IP202441-25
RevoDx <i>Campylobacter spp</i> (C. jejuni, C. upsaliensis, C. coli) qPCR Kit	100 тестів	IP202441-100