

RevoDx Набір для виявлення діарейних штамів *Escherichia* *coli* (DEC)

RevoDx Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) Detection Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК діарейних штамів *Escherichia coli* (DEC)

**Для використання у діагностиці *in vitro*
Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:
IP202450-25 – 25 тестів
IP202450-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	Буферна суміш 1 DEC MM 1	350 мкл	1400 мкл
2	Буферна суміш 2 DEC MM 2	350 мкл	1400 мкл
3	Ферментна суміш DEC Enzyme Mix	50 мкл	200 мкл
4	Внутрішній контрольний зразок DEC Internal Control	125 мкл	500 мкл
5	Позитивний контрольний зразок DEC Positive Control	100 мкл	200 мкл
6	Негативний контрольний зразок DEC Negative Control	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) 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 DEC MM 1 та MM 2 не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Escherichia coli*, що викликають діарею, зі зразків фекалій та ректальних мазків, отриманих від осіб із симптомами гастроінтестинальних інфекцій.

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 Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Набір виявляє наступні штами:

Бактерії
• Ентероартеративні <i>Escherichia coli</i> (EAEC) (aatA/aggR) • Ентероінвазивні <i>Escherichia coli</i> (EIEC)/<i>Shigella</i> (ial) • Ентеропатогенні <i>Escherichia coli</i> (EPEC) (eaeA) • Ентеротоксигенні <i>Escherichia coli</i> (ETEC) (eltA/estA/estB) • <i>E. coli</i>, що продукують шигатоксин (STEC) (stx1/stx2) • <i>E. coli</i>, що продукують шигатоксин (STEC) O157:H7

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях 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 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 Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК/РНК, виділених із зразків пацієнтів. Виявлення ДНК/РНК бактерій здійснюється у 2 різних реакційних пробірках, у яких одночасно виявляється РНКаз Р людини. У наборі використовується РНКаз Р людини як внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

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

Пробірка	Цільовий мікроорганізм	Канал детекції
DEC MM 1	Ентеротоксигенні <i>E. coli</i> (ETEC) (eltA/estA/estB)	FAM
	<i>E. coli</i> , що продукують шигатоксин (STEC) (stx1/stx2)	HEX
	<i>E. coli</i> , що продукують шигатоксин (STEC) O157:H7	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
DEC MM 2	Ентероагративні <i>Escherichia coli</i> (EAEC) (aatA/aggR)	FAM
	Ентероінвазивні <i>E. coli</i> (EIEC)/ <i>Shigella</i> (ial)	HEX
	Ентеропатогенні <i>E. coli</i> (EPEC) (eaeA)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Загальний опис

Діарейні штами *Escherichia coli* (DEC) утворюють групу штамів *E. coli*, які є патогенними для людини та викликають діарею. Представники цієї групи мають різні фактори вірулентності, які дозволяють колонізувати шлунково-кишковий тракт і призводити до діареї різних типів.

Діагностика діарейної кишкової палички (DEC) є важливою для ефективного лікування пацієнтів, контролю спалахів, епідеміологічного нагляду та ефективного використання ресурсів охорони здоров'я. Точна та своєчасна діагностика дозволяє призначати цілеспрямоване лікування та впроваджувати профілактичні заходи для зменшення кількості діарейних захворювань.

Ентероагративні *Escherichia coli* (EAEC) прикріплюються до слизової оболонки кишківника у формі багатшарових скупчень і виробляють токсини та інші вірулентні фактори, які викликають тривалу водянисту діарею. Відмінною характеристикою штамів EAEC є велика вірулентна плазмідна рАА, що присутня у більшості EAEC і містить кілька важливих генів, які сприяють вірулентності EAEC:

- aggR кодує активатор транскрипції AggR, головний регулятор, який контролює експресію багатьох генів вірулентності на плазміді рАА та бактеріальній хромосомі. AggR регулює експресію фimbрі, дисперсину та інших факторів, необхідних для характерної адгезії EAEC до кишкових епітеліальних клітин.
- aatA є частиною оперону aat, який кодує білок-транспортер AatA, який бере участь у транспортуванні білка дисперсину на поверхню бактерії. Дисперсин допомагає EAEC розподілятися в слизовому шарі, при цьому запобігає утворенню грудок і сприяє ефективній колонізації кишківника та утворенню біоплівки.

Ентеропатогенні *Escherichia coli* (EPEC) прилипають до кишкового епітелію і викликають характерні ураження (attaching and effacing lesions, A/E). Ці ураження порушують слизову оболонку кишківника, що призводить до порушення всмоктування та діареї. Також генетичний матеріал бактерій EPEC містить локус для знищення ентероцитів (locus of enterocyte effacement, LEE), який містить eae, що кодує інтимін. Продукт гену eae є вирішальним у механізмі патогенезу бактерій і тому є важливою діагностичною мішенню.

***Escherichia coli*, що продукують шигатоксин (STEC)** — це група патогенних штамів *E. coli*, які можуть викликати низку шлунково-кишкових захворювань різного ступеня, від легкої діареї до важких, небезпечних для життя станів, таких як геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром (ГУС). Ключовим фактором патогенності STEC є вироблення токсинів Shiga, які спричиняють серйозні симптоми та ускладнення. Токсин Shiga може бути 2 типів - Stx1 і Stx2.

***Escherichia coli*, що продукують шигатоксин (STEC) O157:H7** - це патогенний серотип, що є одним із найбільш досліджених через зв'язок зі спалахами захворювань харчового походження та потенціал спричинити серйозні ускладнення. Діагностичні та профілактичні заходи зосереджені на виявленні збудника в харчових продуктах і зразках калу, забезпеченні безпеки харчових продуктів і ефективній боротьбі зі спалахами.

Ентероінвазивні *Escherichia coli* (EIEC) - це група кишкових паличок, які тісно пов'язана з видами *Shigella* як генетично, так і функціонально. EIEC викликають захворювання шляхом проникнення та розмноження в епітеліальних клітинах товстої кишки, що призводить до запальної реакції, яка призводить до діареї (водянистою або дизентерійною (кривавою)).

Ген ial, також відомий як ген локусу, асоційованого з інвазією, є важливим генетичним маркером, який використовується для диференціації EIEC від інших типів *E. coli*. Ген ial міститься у плазміді pINV, яка є важливою для забезпечення інвазивних властивостей як EIEC, так і *Shigella*.

Виявлення як генів ial, так і stx у клінічному зразку свідчить про наявність *Shigella dysenteriae* типу 1. Ця комбінація генів є характерною для цього патогену, який відомий своїми інвазивними властивостями та продукуванням токсину, що призводить до важкої дизентерійної хвороби.

Ентеротоксигенні *Escherichia coli* (ETEC) є найпоширенішою причиною діареї, особливо в країнах, що розвиваються, а

також серед мандрівників у ці регіони. ETEC відрізняються своєю здатністю виробляти ентеротоксини, які призводять до секреції кишкової рідини та діареї.

Відомо, що ентеротоксигенна *Escherichia coli* (ETEC) виробляє два основних типи ентеротоксинів: термолабільний токсин (LT) і термостабільний токсин (ST). Ці токсини є ключовими факторами вірулентності, які призводять до водянистої діареї, характерної для інфекцій ETEC.

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 незаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожну зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.
- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Характеристики набору

Межа виявлення (LoD) - Аналітичне дослідження чутливості:

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень синтетичних фрагментів генів збудників, щоб отримати кінцеві концентрації 2430, 810, 270, 90 та 30 КУО/мл шляхом розведення зі зразками фекалій, зібраними у негативних осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК патогенів очищали за допомогою RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 250 копій/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 зразків із концентрацією 250 КУО/мл. Усі 20 реплікатів зразків виявились позитивними, таким було підтверджено, що LoD становить 250 КУО/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) 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 Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) Detection Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) Detection Kit проти послідовностей 22 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів патогенів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 21 патогенний мікроорганізм, перерахованих нижче, був протестований на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) Detection Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. 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
Вірус паратрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Парвовірус В19	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	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 (Кат.№: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch /1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат.№: 07/296)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат.№: 07/298)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат.№: 07/300)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)	NIBSC (Кат.№: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2)	NIBSC (Кат.№: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус А2	NIBSC (Кат.№: 08/120)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 1 типу	NIBSC (Кат.№: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 2 типу	NIBSC (Кат.№: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 3 типу	NIBSC (Кат.№: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 4 типу	NIBSC (Кат.№: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Порівняльні клінічні випробування:

Ефективність роботи набору RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit оцінювали за допомогою архівних 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 Stool Pathogen DNA/RNA Purification kit відповідно до інструкції до продукту. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) 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 та РНК патогенів із фекалій RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification kit (Кат.№: 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.

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі зразками фекалій чи ректальними мазками. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.

Після збору 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 збудників з клінічних зразків 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 НК 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 або відсутній сигнал 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 збудників 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 DEC Enzyme Mix. Покладіть суміш ферментів DEC 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 DEC MM 1-2 та DEC 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 дві пробірки 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей DEC MM 1-2. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл відповідної суміші DEC MM та 1 мкл DEC Enzyme Mix для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішайте суміш піпетуванням або на вортексі та осадіть 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. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. 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 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, HEX, ROX та Cy 5

6. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX, ROX та Cy 5.
 7. Запустити програму.
 8. 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 каналу FAM / Cy5 / ROX (цільова послідовність)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	Позитивний на <i>Escherichia coli</i>
-	+	Результат валідний. Збудник не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Визначення EPEC, STEC, O157 і EIEC відбувається завдяку виявленню специфічних генів вірулектності.

Ключові відмінності включають:

- **STEC** (*E. coli*, що продукують шигатоксин): наявність генів **stx**
- **EPEC** (Ентеропатогенні *E. coli*): відсутність генів **stx** у поєднанні з наявністю **eaeA**
- **O157:H7**: специфічні гени-мішені
- **EIEC** (Ентероінвазивні *E. coli*): наявність гена **ial**
- **Shigella dysenteriae**: ідентифікація генів **ial** і **stx**

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

У наведеній нижче таблиці підсумовано диференціацію:

Сигнал по каналу ROX у суміші DEC MM 2 (EPEC) (eaeA)	Сигнал по каналу HEX в суміші DEC MM 1 (STEC) (stx1/stx2)	Сигнал по каналу ROX в суміші DEC MM 1 (STEC) O157:H7	Сигнал по каналу HEX в суміші DEC MM 2 (EIEC)/Shigella (ial)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
Позитивний	Негативний	Негативний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ентеропатогенної E. coli (EPEC)
Позитивний або негативний	Позитивний	Негативний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК E. coli, що продукує шигатоксин (STEC)
Позитивний або негативний	Позитивний	Позитивний	Негативний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК E. coli, що продукує шигатоксин (STEC) O157:H7
Негативний	Негативний	Негативний	Позитивний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ентероінвазивної E.coli (EIEC) (або Shigella)
Негативний	Позитивний	Негативний	Позитивний	Позитивний або негативний	Виявлена ДНК ймовірно Shigella dysenteriae
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 барвника для відповідного цільового організму/цільового гена:

Пробірка	Цільовий мікроорганізм	Канал детекції
DEC MM 1	Ентеротоксигенна E. coli (ETEC) (eltA/estA/estB)	FAM
	E. coli, що продукує шигатоксин (STEC) (stx1/stx2)	HEX
	E. coli, що продукує шигатоксин (STEC) O157:H7	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5
DEC MM 2	Ентероагрегативна Escherichia coli (EAEC) (aatA/aggR)	FAM
	Ентероінвазивна E. coli (EIEC)/Shigella (ial)	HEX
	Ентеропатогенна E. coli (EPEC) (eaeA)	ROX
	Внутрішній контроль	Cy 5

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit	25 тестів	IP202450-25
RevoDx Diarrheagenic Escherichia coli (DEC) Detection Kit	100 тестів	IP202450-100