

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Moraxella* *catarrhalis* / *Haemophilus* *influenzae* / *Streptococcus* *pyogenes*

RevoDx *Moraxella catarrhalis* / *Haemophilus influenzae* / *Streptococcus pyogenes* qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* та *Streptococcus pyogenes*

Для діагностики *in vitro*

Тільки для професійного використання



Каталожні номери:
IP202451-24 – 24 тести
IP202451-48 – 48 тестів
IP202451-96 – 96 тестів

Склад набору

	Компонент	24 тести	48 тестів	96 тестів
1	MC/Hi/SP RM 1	336 мкл	672 мкл	1344 мкл
2	MC/Hi/SP RM 2	24 мкл	48 мкл	96 мкл
3	Позитивний контрольний зразок (MC/Hi/SP Positive Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок (MC/Hi/SP Negative Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes 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 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 аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit — це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення та ідентифікації нуклеїнових кислот *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* та *Streptococcus pyogenes* у мазках з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), зразках бронхіального аспірату (BAS), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору) від осіб із ознаками та/або симптомами респіраторної інфекції.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути точною та єдиною причиною захворювання. Негативні результати не виключають інфекції та не повинні використовуватися як єдина основа для прийняття рішень про лікування пацієнта. Негативні результати необхідно поєднувати з клінічними спостереженнями, історією захворювання та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes 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 продукту

- Використовувати тільки за призначенням
- Набір призначений для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових областях геномів патогенів, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних або недійсних результатів тесту.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
- Дотримуйтеся інструкцій з використання до наборів для отримання оптимальних результатів ПЛР.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Опис продукту

RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit – це ПЛР-аналіз у реальному часі, у якому мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з матрицею та розщеплюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) у міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація кДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) – це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній зі зразків пацієнта. У наборі використовується РНКаз Р людини як внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

Прилади

RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes 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 набір також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX і Cy5.

Загальний опис

Moraxella catarrhalis, *Haemophilus influenzae* та *Streptococcus pyogenes* - це патогени, які часто асоційовані з респіраторними інфекціями. Діагностика цих патогенів включає клінічну оцінку та лабораторні тести для підтвердження присутності цих бактеріальних збудників.

M. catarrhalis в основному викликає респіраторні інфекції, до яких належать середній отит у дітей, синусит і загострення хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) у дорослих.

H. influenzae може викликати різноманітні інфекції, такі як пневмонія, середній отит, синусит, а у важких випадках інвазивні захворювання, такі як менінгіт або епіглотит (особливо у невакцинованих осіб).

S. pyogenes (стрептокок групи А) відомий тим, що викликає фарингіт (ангіну), шкірні інфекції (імпетиго) та більш серйозні захворювання, такі як скарлатина, ревматична лихоманка та постстрептококовий гломерулонефрит.

Детекція вищезазначених патогенів часто відбувається у складі мультиплексного тесту, оскільки останній дозволяє швидко і одночасно виявлення збудників, що корисно при респіраторних інфекціях, що мають ьподібну симптоматику.

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 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 шляхом розведення зразків збудників клінічними зразками, відібраними у негативних до патогенів осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК збудників очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302; idil biotech, Туреччина). Кожне розведення тестували в 24 повтореннях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Межа виявлення (LoD) для вірусів становила 122 КУО/мл. Ці значення LoD були підтверджені тестуванням додаткових 20 повторів з розведеннями 119 КУО/мл. Всі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 119 КУО/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx *Moraxella catarrhalis* / *Haemophilus influenzae* / *Streptococcus pyogenes* qPCR 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 для виявлення збудників респіраторних хвороб RevoDx *Moraxella catarrhalis* / *Haemophilus influenzae* / *Streptococcus pyogenes* qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx *Moraxella catarrhalis* / *Haemophilus*

influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit проти послідовностей 28 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 28 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR 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>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Немає гомології
<i>Enterobacter cloacae</i>	Немає гомології
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Немає гомології
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus aureus</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus faecalis</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus faecium</i>	Немає гомології
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</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>Salmonella spp.</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
Вірус паратрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу типів A та B	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterobacter cloacae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Staphylococcus aureus</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus faecalis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus faecium</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<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>Streptococcus pneumoniae</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>Enterococcus dispar</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус	NIBSC (Cat. No: 16/324)	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 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 призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус паратрипу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Порівняльні клінічні випробування:

Ефективність роботи набору для виявлення збудників респіраторних хвороб RevoDx Moraxella catarrhalis /

Haemophilus influenzae / *Streptococcus pyogenes* qPCR Kit оцінювали за допомогою архівних клінічних зразків. Для кожного збудника було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у рандомізованому сліпому дослідженні. Всі 20 позитивних зразків і 20 негативних зразків були отримані з лабораторії державної лікарні і попередньо протестовані за допомогою валідованого порівняльного аналізу. Зразки були виділені за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit відповідно до інструкції. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx *Moraxella catarrhalis* / *Haemophilus influenzae* / *Streptococcus pyogenes* qPCR 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 RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. №: IP202302; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. №: IP202303; IdilBiotech, Туреччина) або реагент DirEXT OneStep (Cat. №: IP202319; 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

Цей набір валідовано для використання з мазками з носоглотки та ротоглотки, назофарингеальним аспіратом/лаважом, бронхоальвеолярним лаважом (BAL), бронхіальним аспіратом (BAS), мокротинням і спинномозковою рідиною (CSF). Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

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

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

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК збудника із зразків мазків з носоглотки та ротоглотки, назофарингеального аспірату/лаважу, бронхоальвеолярного лаважу (BAL), бронхіального аспірату (BAS), мокротиння та спинномозкової рідини (ліквору), слід використовувати набір RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit, або реагент DirEXT OneStep Pathogen DNA/RNA Extraction Reagent. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника обраного набору для виділення 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), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потрапляння виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль: Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 25 ± 4 , інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім MC/Hi/SP RM2. Покладіть суміш ферментів MC/Hi/SP RM2 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 MC/Hi/SP RM1 та MC/Hi/SP 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 майстер-суміші додайте 14 мкл MC/Hi/SP RM1 та 1 мкл MC/Hi/SP 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 у кожну лунку. Внести по 5 мкл позитивного контролю та негативного контролю у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

4. 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 Cy5

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

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю по каналах FAM, HEX та ROX повинно дорівнювати 25±4, а негативний контроль по всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК M. catarrhalis)	Сигнал по каналу HEX (ДНК H. influenzae)	Сигнал по каналу ROX (ДНК S. pyogenes)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	-	+/-	ДНК M. catarrhalis виявлена
-	+	-	+/-	ДНК H. influenzae виявлена
-	-	+	+/-	ДНК S. pyogenes виявлена
-	-	-	+	Цільова ДНК не виявлена, результат валідний.
-	-	-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. №
RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit	24 тестів	IP202451-24
RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit	48 тестів	IP202451-48
RevoDx Moraxella catarrhalis / Haemophilus influenzae / Streptococcus pyogenes qPCR Kit	96 тестів	IP202451-96