

RevoDx Набір для виявлення ДНК Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp

RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Giardia Lamblia* / *Entamoeba Histolytica* / *Cryptosporidium spp* з диференціацією

Для діагностики *in vitro*

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP202436-25 – 25 тестів

IP202436-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	GL/EH/CS RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	GL/EH/CS RM 2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок GL/EH/CS (Internal Control)	125 мкл	500 мкл
4	Позитивний контрольний зразок GL/EH/CS (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контрольний зразок GL/EH/CS (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp 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. Реагенти RM 1 та RM 2 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.

Передбачерне використання

Набір RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit – набір для ПЛР у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* та *Cryptosporidium spp* та визначення виду у зразках калу та ректальних змивах.

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 Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp 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

- Набір RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit призначений тільки для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* та *Cryptosporidium spp*, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибно негативних або недейсних 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.

Набір RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp 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.

У наборі RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Прилади

Набір RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp 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 Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX, ROX та Cy5.

Загальний опис

Giardia lamblia, *Entamoeba histolytica* та *Cryptosporidium* spp. є найпростішими паразитами, які переважно викликають шлунково-кишкові інфекції, що зазвичай призводять до діареї. Ці паразити передаються через заражену воду, їжу або контакт від людини до людини, а діагноз встановлюється за клінічною картиною та після лабораторного підтвердження.

G. lamblia (також відомі як *Giardia intestinalis* або *Giardia duodenalis*) — це джугиткові найпростіші, що викликають лямбліоз, і є поширеною причиною діареї, особливо у мандрівників, туристів або тих, хто споживає забруднену воду.

E. histolytica є збудником амєбіази, який включає як кишкові, так і позакишкові інфекції.

Cryptosporidium spp. — група видів паразитів, що викликають криптоспоридіоз, діарейне захворювання. Патогени *Cryptosporidium* стійкі до хлору, що сприяє спалахам інфікування через забруднену воду.

Мультиплексні ПЛР-тести дозволяють одночасне виявлення кількох кишкових патогенів, що корисне за подібної симптоматики або підозрі на зараження декількома організмами (наприклад, у мандрівників, осіб з ослабленим імунітетом або в умовах спалаху).

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 в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі 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 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 синтезованих фрагментів генів *Giardia Lamblia* / *Entamoeba Histolytica* / *Cryptosporidium* spp для отримання кінцевих концентрацій 2430, 810, 270, 90 та 30 КУО/мл шляхом розведення у зразках фекалій, отриманих від негативних щодо патогенів осіб для імітації клінічних зразків. ДНК патогенів

очищали за допомогою набору RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 250 КУО/мл. Це значення LoD було підтверджене тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 250 КУО/мл. Всі 20 повторів дали позитивні результати, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 250 КУО/мл.

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit був проведений для послідовностей усіх генотипів 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 Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів та зондів RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit проти послідовностей 22 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільової мішені і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 21 патогенний мікроорганізм, перерахований нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR 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 (PJP)</i>	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>Streptococcus agalactiae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Парвовірус В19	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)	не призначена одиниця виміру	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)	1.25×105 МО/мл	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ 2, HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×105 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 Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR 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. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору набору RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit. 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/РНК RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: 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

Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані з 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 можна зберігати при 2-8 оС протягом 24 годин. Якщо потрібно зберігати зразки довше, то робити це при температурі -15 оС або нижче. Транспортування зразків має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК збудника із 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 є необхідною. Внутрішній контроль включає транскрибовану in vitro ДНК, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, 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, 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 25 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім GL/EH/CS RM 2. Покладіть GL/EH/CS RM 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 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 GL/EH/CS RM 1 та 1 мкл GL/EH/CS RM 2 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 приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК, позитивного та негативного контролів. 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.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit	25 тестів	IP202436-25
RevoDx Giardia Lamblia / Entamoeba Histolytica / Cryptosporidium spp qPCR Kit	100 тестів	IP202436-100

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 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 позитивного контролю по каналах FAM, HEX та ROX має дорівнювати 28±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>G. lamblia</i>)	Сигнал по каналу HEX (ДНК <i>E.histolytica</i>)	Сигнал по каналу ROX (ДНК <i>Cryptosporidium</i>)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	-	+/-	ДНК <i>Giardia lamblia</i> виявлена
-	+	-	+/-	ДНК <i>Entamoeba histolytica</i> виявлена
-	-	+	+/-	ДНК <i>Cryptosporidium</i> spp виявлена
-	-	-	+	Цільова ДНК не виявлена, результат валідний.
-	-	-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно