

RevoDx Набір для виявлення ДНК мікобактерій туберкульозу

RevoDx MTBC qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК мікобактерій комплексу *Mycobacterium tuberculosis*
Для використання у *in vitro* діагностиці.
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201921-25 – 25 тестів
IP201921-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 Тестів	100 Тестів
1	MTBC RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	MTBC RM-2	25 мкл	100 мкл
3	MTBC Внутрішній контроль, ВК (Internal Control)	125 мкл	500 мкл
4	MTBC Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
5	MTBC Негативний контрольний зразок (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx MTBC 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 MTBC RM-1 та RM-2 не можна заморозувати-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 MTBC qPCR Kit – це набір реагентів для виявлення ДНК мікобактерій групи *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*). Набір RevoDx MTBC qPCR Kit валідований для використання з такими клінічними зразками як мокротиння, бронхоальвеолярний лаваж або бронхіальний секрет. Набір RevoDx MTBC qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів з MTBC-інфекцією та для формування стратегії терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами.

Обмеження щодо використання продукту

- RevoDx MTBC qPCR Kit призначений для використання для *in vitro* діагностики.
- Потенційні мутації в цільових ділянках генів MTBC, залучених у реакції, можуть призвести до

хибного негативних результатів тестування.

- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибного негативних або невалідних результатів тесту.
- Набір RevoDx MTBC qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів з MTBC-інфекцією та для формування стратегії терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами.
- 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

MTBC Real-Time PCR – набір для виявлення ДНК збудників туберкульозу методом ПЛР у реальному часі. 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 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. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Загальний опис

Разом з іншими спорідненими бактеріями *M. tuberculosis* утворює групу *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) – один вид, як визначено дослідженнями гібридизації ДНК/ДНК. MTBC включає 7 представників, серед яких *M. tuberculosis*, основний збудник туберкульозу людини; *M. bovis*, який викликає туберкульоз великої рогатої худоби і включає вакцинний штам *M. bovis BCG*; *M. africanum*, основний збудник туберкульозу в Західній Африці; *M. microti*, який вражає полівок і рідко інфікує людей; *M. canettii*, рідкісний штам MTBC, який утворює гладкі та блискучі колонії, причому всі відомі випадки на даний момент зафіксовані для осіб, які побували на Сомалійському півострові; *M. pinnipedii*, також відомі як тюленева паличка. *Mycobacterium tuberculosis* має кільцеві хромосоми довжиною близько 4 200 000 нуклеотидів. Вміст G+C становить близько 65%. Геном містить близько 4000 генів. Гени, які кодують ліпідний обмін, є дуже важливою частиною бактеріального геному, при цьому 8% геному бере участь у цьому процесі. Пізні види групи *Mycobacterium tuberculosis* демонструють 95-100% спорідненість ДНК на основі досліджень гомології ДНК, а послідовність гена 16S рРНК абсолютно однакова для всіх видів.

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 вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь що усі 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 набору (limit of detections, LoD), була підготовлена серія розведень ДНК *Mycobacterium tuberculosis* для отримання кінцевих концентрацій 2430, 810, 270, 90 та 30 КУО/мл шляхом розведення зразками цільної крові, зібраної у негативних до патогену осіб для імітації клінічних зразків. ДНК очищували за допомогою RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) обчислювали пробіт-аналізом. Значення межі виявлення (LoD) становило 45 КУО/мл. Це значення було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів. Всі репліканти виявились позитивними і таким чином було підтверджено, що LoD становить 45 КУО/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx MTBC qPCR Kit було протестовано 134 негативних клінічних зразка ДНК MTBC від окремих донорів. Було використано 61 клінічний зразок мокротиння і 73 зразки бронхоальвеолярного лаважу або бронхіального секрету. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx MTBC qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

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 MTBC 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 127 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx MTBC qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202302; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Набір для знезараження збудників туберкульозу
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (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 Перед екстракцією ДНК обробіть клінічні зразки за допомогою набору Tuberculosis Decontamination Kit. Для виділення ДНК із клінічних зразків слід використовувати RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic 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. **Не додавайте ВК безпосередньо у зразок.** Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК на 1 мкл буфера для елюції). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на MTBC, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК MTBC під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 33 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції ДНК/РНК.

Позитивний контроль Позитивний контроль включає плазмиду, що містить вставку. Позитивний контроль ампліфікується в окремій реакційній пробірці. Значення Ct позитивного контрольного зразка повинні дорівнювати 26 ± 4 , інші значення вказують на проблему при ампліфікації.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім MTBC RM 2. Компонент MTBC RM 2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадить 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 та 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. В окрему пробірку внести реагенти із розрахунку 14 мкл MTBC RM 1 та 1 мкл MTBC RM 2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, позитивного контролю та негативного контролю у відповідні пробірки. Осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 4. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація*	45	95°C	10 сек
		60°C	30 сек
		68°C	10 сек

* Детекція флуоресценції при 68°C за каналами FAM та HEX

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 68°C за каналами FAM та HEX.
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 26 ± 4 , а негативний контроль у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (MTBC)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+ / -	ДНК MTBC виявлено
-	+	Результат валідний. ДНК MTBC не виявлено
-	-	Результат невалідний. Перевірити зразок повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx MTBC qPCR Kit	25 тестів	IP201921-25
RevoDx MTBC qPCR Kit	100 тестів	IP201921-100