

RevoDx Набір для виявлення ДНК Bordetella pertussis

RevoDx Bordetella pertussis qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Bordetella pertussis* Для діагностики *in vitro* Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202330-25 – 25 тестів
IP202330-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	B. pertussis RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	B. pertussis RM 2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок B. pertussis (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок B. Pertussis (Negative Control)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx Bordetella pertussis 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 Bordetella pertussis 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 Bordetella pertussis qPCR Kit – набір для ПЛР у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Bordetella pertussis*.

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 Bordetella pertussis 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 Bordetella pertussis qPCR Kit призначений тільки для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному *Bordetella pertussis*, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з набором для виділення ДНК бактерій RevoDx Genomic DNA Purification Kit. Використання з іншими наборами для виділення може сплунути на характеристики роботи набору.
- 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 Bordetella pertussis 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 Bordetella pertussis qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Прилади

Набір RevoDx Bordetella pertussis 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 Bordetella pertussis qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами ROX та HEX.

Загальний опис

Bordetella pertussis - це надзвичайно маленькі, облігатно-аеробні, грамнегативні, нерухомі кокобактерії. *Bordetella pertussis* викликають коклюш – респіраторну інфекцію, що характеризується інтенсивними та спазматичними нападами кашлю, особливо під час другої фази захворювання – пароксизмальної, або «періоду спазматичного кашлю». Більшість хворих на коклюш - це діти віком до одного року. Тяжкість захворювання залежить від віку. Мікроорганізми, який міститься в краплях від кашлю, передаються повітряно-крапельним шляхом та колонізують клітини миготливого епітелію бронхів. Після інкубаційного періоду від одного тижня до 10 днів спостерігаються легкі симптоми, такі як риніт, легкий кашель і чхання (катаральний період), що триває 1-2 тижні. Проліферація бактерій та колонізація ними більшої кількості клітин пригнічує функції війок, що супроводжується збільшенням тяжкості та частоти симптомів - настає пароксизмальний період. Це призводить до клінічної картини,

що характеризується нападами кашлю, які супроводжуються тривалим і утрудненим диханням (часто з характерним свистом). Кашель, який повторюється через різні проміжки часу і зазвичай відбувається протягом кількох хвилин, може тривати 2-3 тижні. Оскільки кашель заважає пероральному прийому, а слиз може викликати блювоту, якщо його проковтнути, хвороба призвести до сильного зневоднення та втрати ваги.

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 знезаражуючими 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 (LoD) була підготовлена серія розведень синтезованого фрагменту гена *Bordetella pertussis* для отримання кінцевих концентрацій 1120, 760, 130, 45 та 24 КУО/мл шляхом розведення у зразках цільної крові, отриманих від негативних щодо наявності ДНК патогену осіб. Бактеріальну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria. Кожне розведення було перевірено у 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) розраховували за допомогою пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 92 КУО/мл. Це значення LoD було підтверджене тестуванням додаткових 20 повторів з розведенням 92 КУО/мл. Всі 20 повторів дали позитивні результати, і, таким чином, було підтверджено, що LoD становить 92 КУО/мл.

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx *Bordetella pertussis* qPCR Kit був проведений для послідовностей усіх генотипів збудника, доступних у базах

даних NCBI. Вирівнювання показало, що ділянки, розпізнані розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями патогена з баз/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx *Bordetella pertussis* qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів та зондів RevoDx *Bordetella pertussis* qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільової мішені і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 25 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx *Bordetella pertussis* 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>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології
<i>Listeria monocytogenes</i>	Немає гомології
<i>Salmonella spp.</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</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>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
Бірус папарипу 1-4 типів	Немає гомології
Бірус грипу А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	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>Haemophilus influenzae</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>Listeria monocytogenes</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Salmonella spp.</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>Neisseria meningitidis</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
Риновірус	NIBSC (Cat. No: 08/324)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус	NIBSC (Cat. No: 16/324)	2.0×108 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)	1.25×105 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 парогрипу 1 типу	NIBSC (Cat. No: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 2 типу	NIBSC (Cat. No: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 3 типу	NIBSC (Cat. No: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парогрипу 4 типу	NIBSC (Cat. No: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення ДНК/РНК 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, тощо)
- 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 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.

Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріовіалу/пробірку з гвинтовою кришкою.

Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК: Для виділення ДНК збудника із зразків 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 НК. 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 Bordetella pertussis RM 2. Покладіть Bordetella pertussis 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. 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 Bordetella pertussis RM 1 та 1 мкл Bordetella pertussis 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 кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксів 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.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

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

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами ROX та HEX

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами ROX та HEX.

6. Запустити програму.

7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу ROX має дорівнювати 25±4, а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати слід інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу ROX (ДНК <i>Bordetella pertussis</i>)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>Bordetella pertussis</i> виявлена
-	+	ДНК <i>Bordetella pertussis</i> не виявлена, результат валідний.
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Bordetella pertussis qPCR Kit	25 тестів	IP202330-25
RevoDx Bordetella pertussis qPCR Kit	100 тестів	IP202330-100