

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Bordetella pertussis/parapertussis*

RevoDx *Bordetella pertussis/parapertussis* qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Bordetella pertussis/parapertussis* з диференціацією Для діагностики *in vitro* Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202331-25 – 25 тестів
IP202331-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	<i>B. pertussis/parapertussis</i> RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	<i>B. pertussis/parapertussis</i> RM 2	25 мкл	100 мкл
3	Позитивний контрольний зразок <i>B. pertussis/parapertussis</i> , (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контрольний зразок <i>B. pertussis/parapertussis</i> , (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/parapertussis* 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/parapertussis* 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 аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

Набір RevoDx *Bordetella pertussis/parapertussis* qPCR Kit – набір для ПЛР у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Bordetella pertussis* та *B. Parapertussis* та визначення виду. Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений патоген може не бути провідною 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/parapertussis* 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 *Bordetella pertussis/parapertussis* qPCR Kit призначений тільки для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному *Bordetella pertussis/parapertussis*, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- 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/parapertussis* 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/parapertussis* qPCR Kit використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Прилади

Набір RevoDx *Bordetella pertussis/parapertussis* 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 DT (DT-prime, DT-lite). Але RevoDx *Bordetella pertussis/parapertussis* qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами HEX, ROX та Cy5.

Загальний опис

Бордетели — це дрібні грамнегативні аеробні коккобактерії. Рід *Bordetella* включає види *B. pertussis* і *B. parapertussis*, які викликають кашлюк (коклюш) у людини. Слизова оболонка дихальних шляхів людини є природним місцем існування *B. pertussis* та *B. parapertussis*. Передача майже завжди відбувається безпосередньо від людини до людини. Пацієнти найбільш інфекційно небезпечні під час ранньої катаральної фази захворювання і залишаються заразними протягом приблизно 5 тижнів. Кашлюк є поширеною та небезпечною дитячою хворобою серед нещеплених груп населення.

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.
 - 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).

Характеристики набору

Аналітична чутливість

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень синтезованого фрагменту гена *Bordetella pertussis/parapertussis* для отримання кінцевих концентрацій 1120, 760, 130, 45 та 24 КУО/мл шляхом розведення у зразках цільної крові, отриманих від негативних щодо наявності ДНК бордетели осіб. Бактеріальну ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Bacteria. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. 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/parapertussis* 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/parapertussis* 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/parapertussis* 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/parapertussis* 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
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. С1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневіовірус 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)	2.0×10 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 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

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення ДНК/РНК RevoDx Pathogen

DNA/RNA Purification Kit (Кат. №: IP202302; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. №: IP202303; IdilBiotech, Туреччина) або реагент DirEXT OneStep (Кат. №: 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 забору 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 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 Bordetella pertussis/parapertussis RM 2. Покладіть Bordetella pertussis/parapertussis 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/parapertussis RM 1 та 1 мкл Bordetella pertussis/parapertussis 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. 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 3. 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 HEX, ROX та Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами 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 HEX та 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 HEX (ДНК B.parapertussis)	Сигнал по каналу ROX (ДНК B.pertussis)	Сигнал по каналу Cy5 (Внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	+/-	ДНК B. parapertussis виявлена
-	+	+/-	ДНК B. pertussis виявлена
-	-	+	Цільова ДНК не виявлена, результат валідний.
-	-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx Bordetella pertussis/parapertussis qPCR Kit	25 тестів	IP202331-25
RevoDx Bordetella pertussis/parapertussis qPCR Kit	100 тестів	IP202331-100