

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Helicobacter pylori*

RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Helicobacter pylori*

Для діагностики *in vitro*

Для професійного використання

Каталожні номери:

IP202405-25 – 25 тестів

IP202405-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	25 тестів	100 тестів
1	<i>H. pylori</i> RM 1	350 мкл	1400 мкл
2	<i>H. pylori</i> RM 2	25 мкл	100 мкл
3	<i>H. pylori</i> Внутрішній контрольний зразок (Internal control)	65 мкл	250 мкл
4	<i>H. pylori</i> Позитивний контрольний зразок (Positive control)	50 мкл	100 мкл
5	<i>H. pylori</i> Негативний контрольний зразок (Negative control)	50 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx *Helicobacter pylori* 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 *H. pylori* RM 1 не можна заморожувати-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 *Helicobacter pylori* qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Helicobacter pylori* у зразках калу та зразках біопсії шлунку. Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути остаточною причиною захворювання. Негативні результати не виключають наявності інфекції і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методом ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, залучених у реакції, можуть призвести до

хибнонегативних результатів тесту.

- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних 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 *Helicobacter pylori* qPCR Kit — це набір для виявлення ДНК *Helicobacter pylori* 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 ДНК, 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 перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Прилади

Набір RevoDx *Helicobacter pylori* 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 *Helicobacter pylori* qPCR Kit також може використовуватись з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX.

Загальний опис

Helicobacter pylori - грамнегативні бактерії, які колонізують шлунок людини. Бактерії відомі своєю спіральною формою (звідси приставка «геліко») і є основною причиною різних шлунково-кишкових розладів, наприклад, гастриту і виразкової хвороби. *H. pylori* вражають слизову оболонку шлунка, де можуть зберігатися роками або навіть десятиліттями, за умов відсутності лікування. Бактерії унікальні своєю здатністю виживати у висококислому середовищі шлунка, виробляючи уреазу, фермент, який нейтралізує шлункову кислоту. Інфікування *H. pylori* зазвичай відбувається в дитинстві та може призвести до хронічного запалення слизової оболонки шлунка, потенційно збільшуючи ризик розвитку більш серйозних захворювань, таких як рак шлунка. Лікування, зазвичай, включає комбінацію антибіотиків і препаратів, що пригнічують кислотність, для знищення інфекції та сприяння загоєнню будь-яких пов'язаних з нею уражень шлунка.

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

Ліміт детекції (LoD) - Аналітичне дослідження чутливості

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту *H. pylori*, щоб отримати кінцеві концентрації 1000, 200, 40, 8 та 1.6 КУО/мл. ДНК патогена очищали за допомогою RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 73 КУО/мл.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК *H. pylori*. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx *Helicobacter pylori* qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір є специфічним до своєї мішені і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx *Helicobacter pylori* 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
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Цитомегаловірус (HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В	Немає гомології
Коронавірус SARS-CoV-2	Немає гомології

Коронавірус людини 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології
Коронавірус SARS	Немає гомології
Коронавірус MER	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу типів А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	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 pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. №: 09/132)	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Cat. №: 08/324)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. №: 07/296)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. №: 07/298)	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. №: 07/300)	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус A2	NIBSC (Cat. №: 08/120)	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Cat. №: 08/176)	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Cat. №: 08/178)	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Cat. №: 08/118)	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Cat. №: 08/180)	Не виявлено

*Деякі назви наведено згідно каталогу виробника

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 *H. pylori* 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 112 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx Helicobacter pylori qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення ДНК/РНК RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202428; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202032; IdilBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат.№: IP202303; 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.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудника з клінічних зразків слід використовувати Набір для виділення ДНК з фекалій (RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit) або Набір для виділення ДНК патогенів (RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit) або Набір для виділення ДНК патогенів на магнітних частинках (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 нуклеїнових кислот. 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 *H. pylori* оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК *H. pylori* під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4, інші значення вказують на проблему під час екстракції ДНК/РНК.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність

проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім *H.pylori* RM 2. Покладіть компонент *H.pylori* 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 *H.pylori* RM 1 та *H.pylori* 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 майстер-суміші додайте 14 мкл *H.pylori* RM 1 та 1 мкл *H.pylori* 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 приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої РНК, позитивного контрольного зразка та негативного контрольного зразка 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 FAM та HEX

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°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 ПКЗ повинно дорівнювати 26±4, а НКЗ у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити. Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM	Сигнал по каналу HEX	Інтерпретація
+	+/-	Позитивний на <i>Helicobacter pylori</i>
-	+	Результат валідний. Збудник не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx Helicobacter pylori qPCR Kit	25 тестів	IP20240 5-25
RevoDx Helicobacter pylori qPCR Kit	100 тестів	IP20240 5-100