

RevoDx Набір для виявлення алеля HLA-B27

RevoDx HLA-B27 qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення алеля HLA-B27

Для діагностики *in vitro*

Для професійного використання

Каталожні номери:

IP202410-50 – 50 тестів

IP202410-100 – 100 тестів

IP202410-500 – 500 тестів



Склад набору

	Компонент	50 тестів	100 тестів	500 тестів
1	B27 RM 1	700 мкл	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	B27 RM 2	50 мкл	100 мкл	500 мкл
3	B27 Позитивний контрольний зразок (Positive control B27)	50 мкл	100 мкл	400 мкл
4	B27 Негативний контрольний зразок (Negative control B27)	50 мкл	100 мкл	400 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx HLA-B27 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 B27 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 HLA-B27 qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення алелю HLA-B27 у зразках цільної крові.

Набір RevoDx HLA-B27 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 HLA-B27 qPCR Kit призначений для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових областях геному людини, 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 HLA-B27 qPCR Kit — це набір для виявлення алеля B27 антигену HLA-B 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.

Загальний опис

HLA-B27 відноситься до специфічного білка лейкоцитарного антигену людини (HLA) — ключового компонента імунної системи. Він відіграє певну роль у розпізнаванні імунною системою «своїх» та «чужих» клітин. Наявність HLA-B27 тісно пов'язана з певними аутоімунними захворюваннями, зокрема анкілозуючим спонділітом (AC) та іншими спондилоартропатіями. Виявлення та діагностика HLA-B27 важливі для оцінки ризику та прогнозу для цих захворювань.

ПЛР-діагностика HLA-B27 є чутливим і специфічним методом виявлення присутності цього алеля, який відіграє важливу роль у діагностиці та лікуванні відповідних захворювань.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня.
- 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

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx HLA-B27 qPCR Kit був проведений для послідовностей антигену HLA-B27, доступних у базах даних NCBI. Вирівнювання показало, що ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями з баз/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx HLA-B27 qPCR Kit була оцінена за допомогою аналізу *in silico*. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HLA-B27 qPCR Kit проти послідовностей інших алелів антигену B27 показав, що набір буде специфічним до цільової мішені і не буде перехресно реагувати з цими алелями.

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 HLA-B27 і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що визначено з ампліфікації внутрішнього контролю.

Порівняльні клінічні випробування

Всього було протестовано 102 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HLA-B27 qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Blood (Кат.№: IP201909; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту
- 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 щодо збудників, що передаються через кров (чи інший біоматеріал, який використовується). 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 та повне документування. Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК із клінічних зразків слід використовувати набір RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Blood. 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 B27 RM 2. Покладіть компонент B27 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 B27 RM 1 та B27 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 майстер-суміші додайте 14 мкл B27 RM 1 та 1 мкл B27 RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК, негативного та позитивного контролів 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/Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX./Cy5
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Примітка: Залежно від партії набору детекція внутрішнього контролю може відбуватись за каналом HEX або Cy5. Рекомендовано проводити детекцію за двома каналами

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 25±4, а негативний контроль 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/Cy5	Інтерпретація
+	+/-	Алель HLA-B27 виявлено
-	+	Результат валідний. Алель HLA-B27 не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx HLA-B27 qPCR Kit	50 тестів	IP202410-50
RevoDx HLA-B27 qPCR Kit	100 тестів	IP202410-100
RevoDx HLA-B27 qPCR Kit	500 тестів	IP202410-500