

RevoDx Набір для виявлення алеля HLA-B27 методом ПЛР (без екстракції)

RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit

Інструкція з використання
Якісне виявлення алеля HLA-B27
Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання



Каталожні номери:
IP202425-50 – 50 тестів
IP202425-100 – 100 тестів
IP202425-500 – 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)	50 мкл	100 мкл	400 мкл
4	B27 Негативний контрольний зразок (Negative control)	50 мкл	100 мкл	400 мкл
5	DirExt PLUS	5 мл	10 мл	50 мл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx HLA-B27 Direct 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 аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Призначення

RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit - це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення алелів HLA-B27 у безпосередньо розведених цільній крові. Набір RevoDx HLA-B27 Direct qPCR призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання

- Набір RevoDx HLA-B27 Direct qPCR призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових ділянках геному, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або недійсних результатів.
- Надійні результати залежать від правильного збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Призначений для професійного використання належним чином підготовленим персоналом.
- Для отримання оптимальних результатів ПЛР дотримуйтеся інструкцій.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Опис продукту

RevoDx Direct HLA-B27 — 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. До складу реагенту RM 1 також входять компоненти, які можуть екстрагувати РНК/ДНК з розведеної цільної крові. Таким чином немає необхідності виділяти і очищати РНК/ДНК із зразків цільної крові.

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 спондилітом (АС) 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 Direct qPCR Kit був проведений для послідовностей алелів HLA-B27, доступних в базах даних NCBI. Результати показали, що ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями з Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

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

Перехресна контамінація

Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних досліджень, що були виконані шляхом тестування почергово високопозитивних і негативних зразків: 4 високопозитивних HLA-B27 та 4 негативні зразки HLA-B27 були використані в кожному дослідженні.

Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не містив ознак наявності інгібіторів ПЛР, на що вказує ампліфікація внутрішнього контролю

Клінічне порівняльне дослідження

Всього було протестовано 102 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, зібрані за допомогою RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit сумісні з результатами, отриманими за допомогою інших систем з маркуванням CE.

Порівняльні клінічні випробування

Всього було протестовано 102 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HLA-B27

Direct qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Вода ультрачиста для молекулярної біології та ПЛР
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (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.

Підготовка зразків

З клінічними зразками слід поводитися як з потенційно інфекційними; при цьому слід дотримуватися запобіжних заходів під час збору та обробки зразків. Клініцисти (в тому числі фельдшери, медсестри, лікарі та фахівці, пов'язані з 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 тестування.

Після забору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Підготовка зразків:

В якості вихідного матеріалу слід використовувати цільну кров з EDTA. Для забезпечення точних і надійних результатів, зразки повинні бути ретельно перемішані перед обробкою.

1. Обережно переверніть пробірку, що містить цільну кров з EDTA, кілька разів, щоб переконатися, що зразок є однорідним. Уникайте сильного струшування, щоб запобігти гемолізу.
2. Перенесіть 100 мкл ретельно перемішаної цільної крові з EDTA в мікроцентрифужну пробірку 1,5/2 мл, що не містить DNase/RNase
3. Процентрифугуйте цільну кров при 10 000 g протягом 1 хвилини і видалить надосадову рідину.
4. Додайте 100 мкл води, придатної для ПЛР, і ресуспендуйте осад шляхом вортексування
5. Центрифугуйте при 10 000 g протягом 1 хвилини і видалить надосадову рідину.
6. Додайте 100 мкл DirExt PLUS і ресуспендуйте осад за допомогою вортексінгу.
7. Інкубуйте при 65°C протягом 10 хвилин, а потім інкубуйте при 95°C протягом 10 хвилин.
8. Центрифугуйте при 10 000 g протягом 1 хвилини і використовуйте 5 мкл надосадової рідини для ПЛР.

Точна і ретельна підготовка має вирішальне значення для збереження цілісності та достовірності результатів тесту.

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 B27 RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, а потім коротко центрифугуйте перед використанням. Перенесіть всі реагенти на лід або блок охолодження.
2. Остаточний об'єм майстер-міксу отримують шляхом множення об'ємів окремих реакцій B27 RM 1 і B27 RM 2 на 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

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 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 (HLA-B27)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	Апель HLA-B27 виявлено
-	+	Результат валідний. Апель HLA-B27 не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit	50 тестів	IP202425-50
RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit	100 тестів	IP202425-100
RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit	500 тестів	IP202425-500