

## 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

	Назва компонента	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, ПКЗ (Positive control)	50 мкл	100 мкл	400 мкл
4	B27 Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative control)	50 мкл	100 мкл	400 мкл

#### Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C (не більше 6 календарних днів). Всі компоненти RevoDx HLA-B27 Direct qPCR слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Зберігання при більш високих температурах слід уникати. При правильному зберіганні всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці продукту. B27 RM 1 флакон не можна заморозувати-розморожувати більше 3 разів, оскільки це може призвести до зниження чутливості. В іншому випадку розділіть їх на аликвоти зручного розміру 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 використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічних лабораторій, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та діагностичних процедур *in vitro*.

#### Обмеження щодо використання

- Набір RevoDx HLA-B27 Direct qPCR призначений лише для діагностики *in vitro*.
- Потенційні мутації в цільових ділянках геному, що покриваються олігонуклеотидами в наборі 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 HLA-B27 ПЛР-аналіз в режимі реального часу - це ПЛР-аналіз на основі флуорогенних зондів, в якому між двома ПЛР-праймерами знаходиться внутрішній олігонуклеотидний зонд з флуороцентною міткою, прикріпленою на 5'-кінці, і гасячою молекулою, яка пригнічує флуоресцентний репортер на 3'-кінці. Під час реплікації ДНК у процесі ПЛР внутрішній олігонуклеотид гібридується з шаблоном і перетравлюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) по мірі подовження ПЛР-праймера.

Внутрішній олігонуклеотид розщеплюється, тільки якщо відбувається реплікація ДНК, розділяючи флуоресцентні молекули і молекули гасителя. Продукти ПЛР виявляються протягом декількох хвилин шляхом моніторингу збільшення флуоресценції, яке відбувається експоненціально з послідовними циклами ампліфікації ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) визначається як дробовий номер циклу, на якому флуоресценція перевищує фіксований поріг. У ПЛР-аналізі HLAB27 в режимі реального часу використовується внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені. До складу RM 1 також входять реагенти, 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 допомагає імунній системі розрізнити власні та чужорідні клітини. 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 цих захворювань. ПЛР-діагностика HLA-B27 є чутливим і специфічним методом виявлення наявності цього алеля, і він відіграє вирішальну роль у діагностиці та лікуванні таких захворювань, як анкілозуючий спондиліт та інші спондилоартропатії.

#### Інформація про безпеку

З клінічними зразками слід поводитися як з потенційно інфекційними; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від інфекційних агентів.

- Всі отримані відходи слід розглядати як потенційно інфекційні. З ними слід поводитися та утилізувати відповідно до наявних норм безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У разі контакту ретельно промийте шкіру водою.
- Уникайте розливу або утворення аерозолів.
- Ніколи не вприскуйте розчини в рот.
- Не їжте, не пийте і не паліть у робочих зонах лабораторії.
- Мийте руки після роботи зі зразками та реагентами.
- Вся інформація про MSDS доступна за запитом.
- Під час роботи завжди одягайте захисний лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні захисні окуляри.
- До і після процедури ретельно дезінфікуйте всі робочі поверхні свіжоприготованим 10% хлорним розчином або протівірусним засобом.
- Під час роботи з цією системою переконайтеся, що вона не містить DNase/RNase.
- Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до належної лабораторної практики, щоб запобігти перехресному забрудненню.
- Використовуйте тільки відкалібровані піпетки, завжди мийте наконечники піпеток між перенесеннями рідини (рекомендується використовувати аерозольбар'єрні наконечники).
- Тримайте набір подалі від будь-яких джерел забруднюючих нуклеїнових кислот, особливо ампліфікованих нуклеїнових кислот.
- В ідеалі операції слід виконувати в трьох окремих місцях. (наприклад, для очищення ДНК/РНК, підготовка ПЛР, ампліфікація), щоб запобігти контамінації.
- Все обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні зберігатися в приміщенні, де і не повинні переміщатися між окремими зонами. Рукавички слід зняти та утилізувати перед тим, як покинути одну зону і перейти до іншої. Лабораторні халати повинні бути специфічними для кожної зони і ніколи не носити їх за межами цієї зони.

#### 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. Вирівнювання показало, 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 висококопозитивних і негативних зразків: 4 висококопозитивних HLA-B27 та 4 негативні зразки HLA-B27 були використані в кожному дослідженні. Перехресної контамінації не спостерігалося, 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 промаркованими CE.

## Порівняльні клінічні випробування

Всього було протестовано 102 клінічні зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HLA-B27 Direct qPCR Kit, співставні 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 ЗІЗ (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

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 етапі «дотестового» тестування, тому дуже важливо, щоб документація була точною та вичерпною. 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

### Підготовка зразка.

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

### Наступні кроки описують цю процедуру:

- Обережно переверніть пробірку, що містить цільну кров з EDTA, кілька разів, щоб

переконатися, що зразок є однорідним. Уникайте сильного струшування, щоб запобігти гемолізу.

- Перенесіть 100 мкл ретельно перемішаної цільної крові з EDTA в мікроцентрифужну пробірку 1,5/2 мл, що не містить DNase/RNase

- Процентрифугуйте цільну кров при 10 000 г протягом 1 хвилини і відкиньте надосадову рідину.

- Додайте 100 мкл води, придатної для ПЛР, і ресуспендуйте осад шляхом вортексування

- Центрифугуйте при 10 000 г протягом 1 хвилини і відфільтруйте надосадову рідину.

- Додайте 100 мкл DirExt PLUS і ресуспендуйте осад за допомогою вортексінгу.

- Інкубуйте при 65°C протягом 10 хвилин, а потім інкубуйте при 95°C протягом 10 хвилин.

- Центрифугуйте при 10 000 г протягом 1 хвилини і використовуйте 5 мкл надосадової рідини для ПЛР.

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

### Внутрішній контроль

Внутрішній контроль, спрямований на РНКазу Р, необхідний для перевірки того, що нуклеїнова кислота присутня в кожному зразку і використовується для кожного зразка, що обробляється. Це також слугує для контролю екстракції, щоб переконатися, що зразки з негативним результатом містять нуклеїнову кислоту для тестування.

## Позитивний контроль

Для того щоб можна було оцінити експеримент, значення Ct позитивного контролю має дорівнювати  $25 \pm 4$ , в іншому випадку це вказує на проблему.

## 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 загальний об'єм зразка. При розрахунку загального об'єму зразка слід враховувати кількість негативних/позитивних контролів і клінічних зразків. Для запобігання можливим помилкам при піпетуванні рекомендується додати додатковий зразок до загального об'єму вибірки.

3. Для приготування майстер-міксу додайте 14 мкл B27 RM 1 і 1 мкл B27 RM 2 для кожного зразка в пробірку з еталонною сумішшю. Пробірку встряхніть і коротко прокрутіть в мікроцентрифугу. Додайте 15 мкл майстер-міксу для кожного зразка в пробірку для ПЛР. Додайте по 5 мкл ДНК кожного зразка, негативного і позитивного контролю в пробірки. Струшуйте недовго та обережно.

4. Введіть умови циклізації для системи ПЛР-детекції в реальному часі: 95°C протягом 2 хв, 1 цикл;

95°C протягом 10 секунд, 60°C протягом 20 секунд, 40 циклів (Таблиця 3). Введіть 20 мкл як об'єм зразка.

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. Флуорогенні дані збираються при 60°C. Слід вибрати канали FAM та HEX.

6. Запустити прогін.

7. Для програмування та аналізу результатів зверніться до посібника користувача відповідного приладу

## Аналіз даних

Значення Ct для ПКЗ повинно дорівнювати  $25 \pm 4$ , 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
+	+/-	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