

RevoDx Набір для виявлення алеля HLA B51 методом ПЛР

RevoDx HLA-B51 qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення алелів HLA-B51
Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання



Каталожні номери:
IP202449-50 – 50 тестів
IP202449-100 – 100 тестів
IP202449-500 – 500 тестів

Склад набору

	Компонент	50 тестів	100 тестів	500 тестів
1	B51 RM 1	700 мкл	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	B51 RM 2	50 мкл	100 мкл	500 мкл
3	B51 Позитивний контрольний зразок, (Positive control)	50 мкл	100 мкл	400 мкл
4	B51 Негативний контрольний зразок, (Negative control)	50 мкл	100 мкл	400 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набір можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx HLA-B51 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 B51 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-B51 qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення носійства гену HLA-B51 у зразках цільної крові. Набір RevoDx HLA-B51 qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx HLA-B51 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-B51 qPCR Kit — це набір для виявлення носійства алелі B51 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-B51 вважається визначальним генетичним фактором ризику хвороби Бехчета (BD), особливо в популяціях з регіонів уздовж стародавнього Шовкового шляху, який включає Близький Схід, Східну Азію та Середземномор'я. Дослідження показали, що носії алеля HLA-B51 більш схильні до розвитку BD порівняно з людьми без цього алеля.

Хвороба Бехчета може проявлятися рецидивуючими виразками ротової порожнини та статевих органів, увечі, ураженнями шкіри та артритом. Виявлення наявності HLA-B51 може допомогти в діагностиці, особливо у пацієнтів з такими симптомами в ендемічних регіонах.

Виявлення наявності алеля HLA-B51 у пацієнтів також допомагає у лікуванні, прогнозуванні перебігу захворювання при хворобі Бехчета. Слід зазначити, що не всі люди з HLA-B51 мають прояви BD, і самої наявності алеля недостатньо для розвитку захворювання. Хоча наявність алеля тісно пов'язана з хворобою Бехчета, сама по собі вона не є діагностичною. Генетичне тестування на HLA-B51 слід проводити для пацієнтів із серйозною клінічною підозрою на BD, особливо в регіонах із високою поширеністю цього захворювання. Однак відсутність HLA-B51 не виключає BD.

Рання та точна діагностика є критичною для покращення перебігу хвороби Бехчета, а саме допомагає запобігти ускладненням, особливо тим, що стосуються очей, кровоносних судин та центральної нервової системи. Через хронічний і рецидивуючий характер захворювання також необхідні регулярне спостереження та моніторинг.

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 незаражувальними 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).
- 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-B51 qPCR Kit був проведений для послідовностей антигену HLA-B51, 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-B51 qPCR Kit була оцінена за допомогою аналізу *in silico*. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HLA-B51 qPCR Kit проти послідовностей інших алелів антигену HLA-B показав, що набір є специфічним до своєї мішені і не дає перехресної реакції з цими алелями.

Перехресна контамінація

Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різнотипових ПЛР із одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки HLA-B51 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 107 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HLA-B51 qPCR Kit, співставні з результатами інших наборів із маркуванням CE.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення геномної ДНК RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Blood (Кат.№: IP201909; IdilBiotech, Туреччина)
- 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

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 і 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. 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 B51 RM 2. Покладіть компонент B51 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 B51 RM 1 та B51 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 B51 RM 1 та 1 мкл B51 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 ДНК, негативного та позитивного контролів.
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	Сигнал по каналу HEX	Інтерпретація
+	+/-	Алель HLA-B51 виявлено
-	+	Результат валідний. Алель HLA-B51 не виявлено
-	-	Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№
RevoDx HLA-B51 qPCR Kit	50 тестів	IP202449-50
RevoDx HLA-B51 qPCR Kit	100 тестів	IP202449-100
RevoDx HLA-B51 qPCR Kit	500 тестів	IP202449-500