



AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)

Zestaw do wykrywania sekwencji DNA specyficznych dla pałeczek
Helicobacter pylori techniką **Real Time PCR**

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
BAC45-100	100 reakcji

Zestaw diagnostyczny jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych. Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu diagnostycznego.

TRANSPORT

Transport zestawu **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** odbywa się w suchym lodzie. Po otrzymaniu przesyłki należy ją natychmiast rozpakować. Jeżeli stwierdzono uszkodzenie taśmy zabezpieczającej pudełko transportowe, uszkodzenie plomby opakowania handlowego lub brak suchego lodu w styropianowym pudełku transportowym należy o tym fakcie niezwłocznie powiadomić producenta zestawu.

SKŁADNIKI ZESTAWU

Nazwa	Opis	BAC45-100 100 reakcji	Kolor wieczka probówki
RM	Mieszanina reakcyjna	2 × 550 µL	zielony
PC	Kontrola pozytywna	1 × 300 µL	czerwony
NC	Kontrola negatywna	1 × 300 µL	niebieski
IC	Kontrola wewnętrzna	2 × 750 µL	przeźroczysty
WATER	Woda	1 × 1500 µL	biały

WARUNKI PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- Składniki zestawu należy przechowywać w -20°C.
- **UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.**
- Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania składników zestawu, w szczególności składnika **RM**. 10 cykli zamrożenia i rozmrożenia składnika **RM** nie wpływa znacząco na jakość zestawu.
- Termin ważności zestawu podany jest na opakowaniu.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

OPIS ZESTAWU

Zastosowanie

Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** jest przeznaczony do wykrywania sekwencji DNA specyficznych dla pałeczek *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* jest gram-ujemną bakterią powszechnie zasiedlającą powierzchnię komórek nabłonkowych błony śluzowej żołądka. Jej obecność zwiększa ryzyko wystąpienia schorzeń takich jak: zapalenie żołądka typu B (mogące prowadzić do powstania nowotworu) i wrzody trawienne. Obecnie wiadomo, że zakażenie bakterią *Helicobacter pylori* odpowiada za około 80% przypadków choroby wrzodowej żołądka i 90% przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy. Długotrwałe zakażenie tą bakterią zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów, takich jak rak żołądka i chłoniaki błony śluzowej żołądka. Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do potwierdzenia lub wykluczenia obecności DNA badanych pałeczek w analizowanym preparacie.

Zasada działania

Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** zawiera startery umożliwiające namnożenie oraz rozróżnienie fragmentów genomów *Helicobacter pylori*. Detekcja obecności DNA pałeczek następuje dzięki specyficznym sondom typu TaqMan®, które przyłączając się do powstających ampliconów (powielanych fragmentów DNA) ulegają hydrolizie. Podczas hydrolizy z sond uwalniany jest barwnik fluorescencyjny FAM, który następnie wykrywany jest przez układ optyczny urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR. Odpowiednio dobrane sekwencje sondy i starterów zapewniają wysoką specyficzność reakcji.

W celu zwiększenia wiarygodności wyników, zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** zawiera system kontroli wewnętrznej, który można wykorzystać do monitorowania prawidłowego

przebiegu procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz reakcji Real Time PCR. Składnik **RM**, poza układem sondy i starterów służących do wykrywania sekwencji specyficznych dla badanego patogenu, zawiera układ sondy i starterów służący do namnożenia i detekcji kontroli wewnętrznej. Detekcja kontroli wewnętrznej odbywa się dzięki uwalnianiu przez sondę barwnika fluorescencyjnego HEX. Dodatni wynik dla kontroli wewnętrznej stanowi potwierdzenie prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych i reakcji Real Time PCR.

POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na wykryciu obecności bakterii *Helicobacter pylori* w pobranych próbkach **wyłącznie** w połączeniu z zestawem do ekstrakcji DNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

UWAGA 1. Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR posiadającymi możliwość detekcji barwników fluorescencyjnych HEX, FAM. Pełną listę kompatybilnych urządzeń do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

UWAGA 2. Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** nie zawiera barwnika normalizacyjnego ROX. W przypadku urządzeń wymagających normalizacji, należy do składnika RM dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

SPECYFIKACJA TECHNICZNA

Kontrola jakości	Zgodna z ISO 13485: Wyroby medyczne – System zarządzania jakością
Optymalna ilość DNA dodawana do reakcji	Do 400 ng
Czułość diagnostyczna	Zestaw wykrywa 96,07% sekwencji <i>Helicobacter pylori</i> opublikowanych w bazie NCBI.
Specyficzność diagnostyczna	Zestaw nie wykrywa innych bakterii z rodzaju <i>Helicobacter</i> i nie prowadzi do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich dla preparatów zawierających materiał genetyczny pochodzący od człowieka
Limit detekcji (LOD95)	3,55 genomy DNA/reakcję

EKSTRAKCYJA DNA

Do ekstrakcji DNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumnkowych), gdyż zapewniają one uzyskanie preparatów DNA o odpowiedniej jakości. Preparaty DNA należy przechowywać w 2-8°C (krótki okres przechowywania), w -20°C lub niższej temperaturze (długi okres przechowywania). Ilość wymaganego materiału zależy od użytej metody ekstrakcji DNA. Do kontroli prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji DNA można wykorzystać system kontroli wewnętrznej zawarty w zestawie. W tym celu na początkowym etapie procesu ekstrakcji DNA do próbki należy dodać składnik **IC**. Objętość dodanego składnika **IC** zależy od zastosowanej objętości buforu elucyjnego zestawu do ekstrakcji DNA. Należy dodać 5 µL składnika **IC** na każde 50 µL użytego buforu elucyjnego.

UWAGA 3. Próbkę do badań należy pobierać do sterylnych probówek. Przed procesem ekstrakcji DNA, próbki muszą być przechowywane przez okres czasu i w warunkach gwarantujących stabilność materiału genetycznego wykrywanego patogenu.

UWAGA 4. W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumnkowe, preparat DNA może zawierać związki, które istotnie zmniejszają wydajność reakcji PCR. Prowadzi to do obniżenia czułości testu, a w skrajnych przypadkach do braku amplifikacji DNA.

REAKCJA REAL TIME PCR

1. Określić liczbę preparatów DNA poddawanych analizie (**n**).
2. Rozmrozić składniki zestawu. Po rozmrożeniu, dokładnie wymieszać zawartość probówek i krótko je zwirować. **Składniki po rozmrożeniu przechowywać w 2-8°C lub na lodzie.**

UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.

3. Określić ilość preparatu DNA dodawanego do reakcji (**x** µL).

UWAGA 5. Optymalna ilość DNA dodawanego do reakcji nie powinna przekraczać 400 ng. Duże ilości DNA dodawanego do reakcji PCR mogą hamować aktywność polimerazy DNA i obniżyć czułość testu.

WARIANT I: Kontrola wewnętrzna została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji DNA.

UWAGA 6. Należy postąpić według wariantu I, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany do kontrolowania poprawności procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1. Dokładnie wymieszać ze sobą $(n + 3) \times 11$ µL składnika **RM** oraz $(n + 3) \times (9 - x)$ µL wody.
- 4.2. Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po $(20 - x)$ µL przygotowanej mieszaniny.
- 4.3. Do **n** probówek reakcyjnych dodać po **x** µL przygotowanych preparatów DNA. Do jednej z pozostałych dwóch probówek reakcyjnych dodać **x** µL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej **x** µL składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.

WARIANT II: Kontrola wewnętrzna nie została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji DNA.

UWAGA 7. Należy postąpić według wariantu II, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany wyłącznie do kontrolowania prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1. Dokładnie wymieszać ze sobą $(n + 3) \times 11$ µL składnika **RM** oraz $(n + 3) \times (8,5 - x)$ µL wody.
- 4.2. Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po $(19,5 - x)$ µL przygotowanej mieszaniny.
- 4.3. Do **n** probówek reakcyjnych nanieść **x** µL przygotowanych preparatów DNA oraz **0,5** µL składnika **IC** (kontrola wewnętrzna).
- 4.4. Do jednej z pozostałych dwóch probówek dodać $(x + 0,5)$ µL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej $(x + 0,5)$ µL składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.
5. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
6. Probówki reakcyjne umieścić w urządzeniu do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i wykonać reakcję zgodnie z temperaturowym profilem reakcji.

Etap	Temperatura	Czas	Odczyt fluorescencji	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	5 min		1
Denaturacja	95°C	10 s	FAM, HEX	} 45
Amplifikacja	58°C	25 s		

UWAGA 8. Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia probówek reakcyjnych.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Prawidłowy wynik reakcji Real Time PCR przedstawiono w tabeli poniżej:

Rodzaj próbki	FAM	HEX	Wynik
Kontrola pozytywna	+	-	Prawidłowy
Kontrola negatywna	-	+	Prawidłowy
Oznaczenie 1	+	+	Dodatni
Oznaczenie 2	+	-	Dodatni
Oznaczenie 3	-	+	Ujemny

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji z $Cq \leq 40$

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji lub amplifikację ze wzrostem fluorescencji z $Cq > 40$

Wynik określany jako dodatni potwierdza obecność sekwencji specyficznych dla bakterii *Helicobacter pylori* w badanej próbce. Wynik ujemny oznacza brak obecności lub obecność poniżej granicy wykrywalności, sekwencji specyficznych dla bakterii *Helicobacter pylori* w badanej próbce.

UWAGI DODATKOWE

- Zastosowane sondy TaqMan® posiadają tzw. ciemne wygaszacze (dark quenchers), które nie generują dodatkowych sygnałów fluorescencyjnych. W urządzeniach do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR, które tego wymagają (np. RotorGene 6000), jako typ wygaszacza należy wybrać opcję „none”.
- Urządzenie do przeprowadzania reakcji Real Time PCR powinno posiadać kalibrację (tzw. Kompensację kolorów) dla barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych w zestawie.
- Zestaw **AmpliTest *Helicobacter pylori* (Real Time PCR)** został zoptymalizowany do przeprowadzenia reakcji w objętości 20 μ L. Zmiana objętości reakcji może istotnie wpłynąć na niektóre parametry testu, w tym na osiągnięty limit detekcji.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Należy zachować szczególną ostrożność podczas ekstrakcji DNA. Materiał biologiczny uzyskany od zwierząt traktować jako **potencjalnie skażony**.
- Ekstrakcję DNA oraz detekcję obecności bakterii *Helicobacter pylori* powinien wykonać odpowiednio przeszkolony personel w laboratorium spełniającym odpowiednie wymogi i dopuszczonym do pracy ze skażonym materiałem biologicznym. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas ekstrakcji DNA nie doszło do krzyżowego zanieczyszczenia preparatów DNA ekstrahowanych równolegle.
- W celu maksymalnego wyeliminowania fałszywych wyników należy przestrzegać następujących zasad:
 - w miarę możliwości wyznaczyć osobne stanowiska do ekstrakcji DNA, przygotowania reakcji Real Time PCR oraz jej wykonania/analizy;
 - zmieniać odzież ochronną (fartuch laboratoryjny, rękawice jednorazowe) pomiędzy etapami ekstrakcji DNA oraz przygotowania reakcji Real Time PCR;
 - powierzchnie stanowisk roboczych należy przemywać środkami usuwającymi/niszczącymi DNA;
 - należy stosować jedynie sterylne końcówki z filtrem dedykowane do pipet automatycznych;

- podczas przygotowywania reakcji Real Time PCR, składnik **PC** należy dodać jako **ostatni**. Przed jego dodaniem, w miarę możliwości, należy zamknąć próbówki z dodanymi preparatami DNA i składnikiem **NC**;
- Podczas pracy z zestawem nie wolno jeść, pić ani palić papierosów.
- Należy umyć ręce bezpośrednio po zakończeniu pracy z zestawem.
- W przypadku bezpośredniego kontaktu składników zestawu ze skórą lub oczami, należy przemyć te miejsca obficie wodą.
- Zaleca się, aby zestawy z przekroczonym terminem ważności lub niewykorzystane składniki zestawu były utylizowane jak laboratoryjne odpady jednorazowego użytku.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Przebieg reakcji Real Time PCR

Zaistniały problem	Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
	FAM	HEX		
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli pozytywnej	-	+	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik NC zamiast PC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika PC lub składnik RM jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć złą jakość składnika RM (niewłaściwe przechowywanie, niewłaściwe warunki transportu, przekroczenie terminu ważności).
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli negatywnej	+	+	Kontaminacja składnika RM lub NC	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że doszło do kontaminacji składnika RM lub NC
	+	-	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik PC zamiast NC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej.
	-	-	Nie dodano składnika NC lub składnik RM jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że składnik RM jest złej jakości.
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla badanej próbki	-	-	Nie dodano kontroli wewnętrznej IC na jednym z etapów wykonywanego badania.	Ustalić, czy dodano kontroli wewnętrznej IC na założonym etapie wykonywania testu. Powtórzyć reakcję Real Time PCR z dodaną kontrolą wewnętrzną.
			Niska wydajność ekstrakcji DNA i/lub obecne inhibitory reakcji Real Time PCR Zbyt duże stężenie preparatu DNA Zła jakość składnika RM .	Zmierzyć stężenie preparatu DNA i w razie konieczności powtórzyć reakcję z mniejszą ilością DNA dodanego do reakcji. Przy dalszym braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA oraz dla kontroli negatywnej założyć złą jakość składnika RM . Przy amplifikacji na kanale HEX dla kontroli negatywnej oraz braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA, założyć zanieczyszczenie preparatu DNA inhibitorami reakcji PCR lub niską wydajność ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych

Zaistniały problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
Istotnie wyższe wartości C_q uzyskiwane na kanale HEX dla badanych próbek w porównaniu z wartością C_q uzyskaną dla kontroli negatywnej ($\Delta C_q > 2$)	Niska wydajność ekstrakcji DNA z badanej próbki.	W celu ustalenia przyczyn niskiej wydajności ekstrakcji DNA należy skontaktować się z producentem zastosowanego zestawu do ekstrakcji kwasów nukleinowych.

OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestaw **AmpliTest (Real Time PCR)** można składać drogą mailową.

KONTAKT

Obsługa klienta

+48 739 223 268
contact@amplicon.pl