

Hướng dẫn sử dụng

RealStar[®] Bordetella PCR Kit 1.0

09/2022 VI

RealStar[®]

Bordetella PCR Kit 1.0

Để sử dụng với

ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96[™] Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

Mx 3005P[™] QPCR System (Stratagene)

Rotor-Gene[®] 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

VERSANT[®] kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)



531013



96



09 2022



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Mục lục

1.	Mục đích sử dụng	6
2.	Thành phần bộ kit	6
3.	Bảo quản	6
4.	Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp	7
5.	Kiến thức khái quát	8
6.	Mô tả sản phẩm	10
6.1	Hệ thống realtime PCR	12
7.	Cảnh báo và thận trọng	12
8.	Quy trình	14
8.1	Chuẩn bị mẫu.....	14
8.2	Pha hóa chất phản ứng (Master Mix).....	15
8.3	Thiết lập phản ứng.....	17
9.	Lập trình hệ thống realtime PCR	18
9.1	Cài đặt.....	18
9.2	Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm).....	18
9.3	Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm	19
10.	Phân tích dữ liệu	19
10.1	Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán.....	20
10.1.1	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính).....	20
10.1.2	Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính).....	20
10.2	Diễn giải kết quả	21
10.2.1	Phân tích định tính	21

11.	Đánh giá hiệu suất	22
11.1	Độ nhạy phân tích	22
11.2	Độ đặc hiệu phân tích	23
11.3	Độ đúng (Precision)	24
12.	Hạn chế	26
13.	Kiểm soát chất lượng	27
14.	Hỗ trợ kỹ thuật	27
15.	Tài liệu	27
16.	Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm	28
17.	Giải thích các ký hiệu	29

1. Mục đích sử dụng

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* dựa trên công nghệ realtime PCR để phát hiện định tính và phân biệt giữa DNA đặc hiệu của *Bordetella pertussis* và *Bordetella parapertussis*.

2. Thành phần bộ kit

Bảng 1: Thành phần bộ kit

Màu nắp	Thành phần	Số lọ	Thể tích [μl/lọ]
Xanh lam	Master A	8	60
Tím	Master B	8	180
Xanh lá cây	Internal Control	1	1000
Đỏ	Positive Control	1	250
Trắng	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

3. Bảo quản

- Sản phẩm RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được vận chuyển với đá khô. Các thành phần của bộ kit cần được bảo quản đông lạnh. Nếu có từ một thành phần trở lên không đông lạnh tại thời điểm nhận hoặc các ống bị hỏng trong quá trình vận chuyển, vui lòng liên hệ với Altona Diagnostics GmbH để được hỗ trợ.
- Tất cả các thành phần phải được bảo quản ở nhiệt độ -25 °C đến -15 °C tại thời điểm nhận.

- Tránh đông - rã đông hóa chất phản ứng Master Mix (nhiều hơn hai lần) vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của xét nghiệm. Các hóa chất cần được chia vào các ống nhỏ (aliquot) và bảo quản lạnh trong trường hợp chúng được sử dụng một cách không liên tục.
- Bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ +2 °C đến +8 °C trong vòng không quá 2 giờ.
- Không để hóa chất phản ứng Master A và Master B tiếp xúc với ánh sáng.

4. Vật liệu và thiết bị cần thiết nhưng không được cung cấp

- Hệ thống realtime PCR thích hợp (xem chương 6.1 Hệ thống realtime PCR)
- Hệ thống hoặc bộ kit tách chiết nucleic acid phù hợp (xem chương 8.1 Chuẩn bị mẫu)
- Máy ly tâm để bàn có rôto dùng cho ống phản ứng 2 ml
- Máy ly tâm có rôto dùng cho đĩa microtiter, trong trường hợp sử dụng đĩa phản ứng 96 giếng
- Máy vortex
- Các đĩa phản ứng 96 giếng hoặc ống phản ứng phù hợp với nắp đậy (quang học) tương ứng
- Pipet (có thể điều chỉnh)
- Đầu tip có lọc (dùng một lần)
- Găng tay không bột (dùng một lần)

LƯU Ý



Vui lòng đảm bảo rằng tất cả các thiết bị được sử dụng đã được cài đặt, hiệu chuẩn, kiểm tra và bảo trì theo hướng dẫn và khuyến nghị của nhà sản xuất.

LƯU Ý

i

Nên sử dụng rôto 72 giếng cùng với các ống phản ứng 0,1 ml thích hợp trong trường hợp sử dụng Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) hoặc Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Kiến thức khái quát

Bordetella pertussis và *Bordetella parapertussis* là tác nhân gây bệnh ho gà - bệnh ho cấp tính rất dễ lây lan ở người [1, 2]. Các loài khác thuộc chi *Bordetella* cũng có thể gây ra bệnh đường hô hấp ở người. *Bordetella holmesii* gần đây nhất có liên quan đến loại bệnh giống ho gà [3, 4] và *Bordetella bronchiseptica* lây nhiễm cho nhiều loại động vật có vú, bao gồm cả con người đôi khi cũng gây ra bệnh ho. Các tình trạng nhiễm trùng nặng có thể xảy ra ở những người bị suy giảm hệ miễn dịch [5].

Tất cả các loài *Bordetella* gây ra bệnh đường hô hấp ở người đều mang các phần tử DNA có thể chuyển vị được gọi là trình tự xen đoạn (IS). Các trình tự xen đoạn này thường xuất hiện trong nhiều bản sao trên mỗi bộ gen (xem bảng 2) cho phép thiết kế các hệ thống PCR có độ nhạy cao.

Bảng 2: Trình tự xen đoạn *Bordetella* IS481 và IS1001, theo Loeffelholz [6]

Sự hiện diện/số bản sao trên mỗi bộ gen ¹				
Trình tự xen đoạn	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. bronchiseptica</i> ²
IS481	+/>50	-/NA	+/8-10	(+) ³ /ND
IS1001	-/NA	+/~20	-/NA	(+) ⁴ /1-7

- Ký hiệu và từ viết tắt: +, xuất hiện trong tất cả các mẫu phân lập; (+), xuất hiện ở một số mẫu phân lập; -, không có mặt ở tất cả các mẫu phân lập; NA, không áp dụng; ND, không xác định.
- Chỉ các mẫu phân lập *B. bronchiseptica* có nguồn gốc từ người.
- Một trong số 73 mẫu phân lập từ người cho kết quả dương tính.
- Bốn trong số 73 mẫu phân lập từ người cho kết quả dương tính.

Với hơn 50 bản sao trên mỗi bộ gen [7], trình tự xen đoạn IS481 là mục tiêu thuận lợi để phát hiện *Bordetella pertussis*. Mục tiêu này cũng xuất hiện ở *Bordetella holmesii* với số bản sao dao động từ 8 đến 10 bản sao trên mỗi bộ gen [7] và hiếm khi được tìm thấy ở chủng *Bordetella bronchiseptica* [8].

Bộ gen *Bordetella parapertussis* mang khoảng 20 bản sao của trình tự xen đoạn IS1001, tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện PCR có độ nhạy cao, nhưng chúng cũng được tìm thấy ở một số chủng *Bordetella bronchiseptica* có số lượng bản sao từ 1 đến 7 bản sao trên mỗi bộ gen [7].

Có những khác biệt trong nhu cầu chẩn đoán giữa các cơ sở y tế lâm sàng và y tế công cộng. Trong môi trường lâm sàng, mục tiêu chẩn đoán là tối ưu hóa độ nhạy (không bỏ sót trường hợp), đồng thời mang lại kết quả nhanh chóng. Điều này giúp đảm bảo phương pháp điều trị thích hợp và ngăn ngừa lây truyền nhiều hơn. Trong môi trường y tế công cộng, mức độ đặc hiệu cao (ở hầu hết các quốc gia, có thể ghi nhận tình trạng lây nhiễm *B. pertussis*, nhưng không ghi nhận được sự lây nhiễm với các loài *Bordetella* khác) là yêu cầu cần thiết để tránh các biện pháp can thiệp y tế công cộng không cần thiết và không hiệu quả [9].

Nhằm ưu tiên báo cáo độ nhạy cao nhất đồng thời thu được độ đặc hiệu cao nhất, RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 lấy IS481 làm mục tiêu để phát hiện *Bordetella pertussis* và lấy IS1001 để phát hiện *Bordetella parapertussis*.

- [1] Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1771-9.
- [2] He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA*. 1998 Aug 19;280(7):635-7.
- [3] Rodgers L, Martin SW, Cohn A, Budd J, Marcon M, Terranella A, Mandal S, Salamon D, Leber A, Tondella M-L, Tatti K, Spicer K, Emanuel A, Koch E, McGlone L, Pawloski L, LeMaile-Williams M, Tucker N, Iyer R, Clark TA, DiOrio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010–2011. *Clin. Infect. Dis*. 2013 Feb; 56:322–331.

- [4] Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):4347-8.
- [5] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):326-82.
- [6] Loeffelholz M. Towards Improved Accuracy of *Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. J Clin Microbiol. 2012 Jul, 50(7):2186-2190.
- [7] Reischl U, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. J Clin Microbiol. 2001 May;39(5):1963-6.
- [8] Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12).
- [9] <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/index.html>

6. Mô tả sản phẩm

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 là xét nghiệm chẩn đoán *in vitro* dựa trên công nghệ realtime PCR để phát hiện định tính và phân biệt giữa DNA đặc hiệu của *Bordetella pertussis* và *Bordetella parapertussis*.

Xét nghiệm bao gồm một hệ thống khuếch đại dị thể (nội chuẩn) để xác định chất ức chế PCR tiềm năng và để xác nhận tính toàn vẹn của hóa chất trong bộ kit.

Công nghệ realtime PCR sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các trình tự mục tiêu đặc hiệu và các đầu dò đặc hiệu mục tiêu để phát hiện DNA đã được khuếch đại. Các đầu dò được dán nhãn bằng thuốc nhuộm có gắn đầu huỳnh quang và đầu dập (quencher).

Các đầu dò đặc hiệu cho DNA của *Bordetella pertussis* (IS481) được đánh dấu huỳnh quang FAM™ trong khi các đầu dò đặc hiệu cho DNA của *Bordetella parapertussis* (IS1001) được đánh dấu huỳnh quang Cy5. Đầu dò đặc hiệu cho chất nội chuẩn (IC) được đánh dấu huỳnh quang JOE™.

Việc sử dụng các đầu dò mang thuốc nhuộm riêng biệt giúp phát hiện đồng thời DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481) và DNA đặc hiệu cho *Bordetella parapertussis* (IS1001) cũng như phát hiện chất nội chuẩn trong các kênh nhận diện tương ứng của hệ thống realtime PCR.

Xét nghiệm này bao gồm hai quá trình trong một ống nghiệm:

- PCR khuếch đại DNA mục tiêu và chất nội chuẩn
- Phát hiện đồng thời các sản phẩm khuếch đại PCR bằng đầu dò được đánh dấu thuốc nhuộm huỳnh quang

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 bao gồm:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = chứng nội

Positive Control = chứng dương

Water (PCR grade) = nước (chuẩn PCR)

Master A và Master B chứa tất cả các thành phần (đệm PCR, DNA polymerase, muối magiê, đoạn mồi và đầu dò) để cho phép khuếch đại qua trung gian PCR và phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481), DNA đặc hiệu cho *Bordetella parapertussis* (IS1001) và chất nội chuẩn (Internal Control) trong một lần thiết lập phản ứng.

6.1 Hệ thống realtime PCR

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 đã được phát triển và kiểm định theo được sử dụng với các hệ thống realtime PCR sau:

- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

7. Cảnh báo và thận trọng

Đọc kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi sử dụng sản phẩm.

- Trước khi sử dụng lần đầu, hãy kiểm tra sản phẩm và các thành phần nhằm đảm bảo:
 - Sự nguyên vẹn
 - Đủ số lượng, loại và dung tích (xem chương 2. Thành phần bộ kit)
 - Ghi nhãn chính xác
 - Vẫn trong trạng thái đông lạnh khi đến nơi
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Mẫu bệnh phẩm phải luôn được xử lý dưới dạng mẫu truyền nhiễm và/hoặc nguy hiểm sinh học theo đúng quy trình an toàn phòng thí nghiệm.
- Đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần, áo khoác phòng thí nghiệm và kính bảo vệ mắt khi xử lý mẫu vật.

- Không để vi khuẩn và nuclease (DNase/RNase) nhiễm vào mẫu thử và các thành phần của bộ kit.
- Luôn sử dụng đầu tip dùng một lần, có lọc và không chứa DNase/RNase.
- Luôn đeo găng tay bảo vệ không bột dùng một lần khi xử lý các bộ phận của bộ kit.
- Sử dụng các khu vực làm việc riêng và tách biệt cho các hoạt động (i) chuẩn bị mẫu; (ii) thiết lập phản ứng và (iii) khuếch đại/phát hiện. Quy trình làm việc trong phòng thí nghiệm nên tiến hành theo một hướng nhất quán. Luôn đeo găng tay dùng một lần ở từng khu vực và thay găng tay trước khi vào một khu vực khác.
- Để vật tư và dụng cụ ở các khu vực làm việc riêng biệt và không di chuyển các vật dụng này từ khu vực này sang khu vực khác.
- Bảo quản vật liệu dương tính và/hoặc có khả năng dương tính tách biệt với tất cả các thành phần khác của bộ kit.
- Không mở các ống/đĩa phản ứng sau khi khuếch đại để tránh nhiễm bản các amplicon.
- Có thể sử dụng các chất kiểm chuẩn bổ sung theo hướng dẫn hoặc yêu cầu trong các quy định hoặc tổ chức kiểm định của địa phương, tiểu bang và/hoặc liên bang.
- Không hấp tiệt trùng (autoclave) các ống phản ứng sau khi thực hiện kỹ thuật PCR vì cách làm này không làm giảm nucleic acid đã khuếch đại và sẽ có nguy cơ làm nhiễm bản khu vực phòng thí nghiệm.
- Không sử dụng các thành phần của bộ kit đã hết hạn sử dụng.
- Thải bỏ mẫu và chất thải xét nghiệm theo các quy định an toàn tại địa phương.

8. Quy trình

8.1 Chuẩn bị mẫu

DNA tách chiết được là là nguyên liệu ban đầu cho RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

Chất lượng DNA tách chiết được có tác động lớn đến hiệu suất của toàn bộ hệ thống xét nghiệm. Nên đảm bảo hệ thống tách chiết nucleic acid tương thích với công nghệ realtime PCR. Các bộ kit và hệ thống sau đây phù hợp cho việc tách chiết nucleic acid:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Các hệ thống và bộ kit tách chiết nucleic acid thay thế cũng có thể tương thích. Người dùng cần kiểm định tính phù hợp của quy trình tách chiết nucleic acid để sử dụng với RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0.

Nếu sử dụng quy trình chuẩn bị mẫu dạng cột ly tâm có đệm rửa chứa ethanol, thì cần thực hiện thêm bước ly tâm trong 1 phút ở tốc độ khoảng 17.000 x g (~ 13.000 rpm) (sử dụng ống thu mới) trước khi rửa giải nucleic acid.

THẬN TRỌNG



Nếu hệ thống chuẩn bị mẫu của bạn đang sử dụng đệm rửa có chứa ethanol, cần loại bỏ mọi dấu vết ethanol trước khi rửa giải nucleic acid. Ethanol là chất ức chế realtime PCR mạnh.

THẬN TRỌNG

Việc sử dụng giá thể RNA là rất quan trọng đối với hiệu quả tách chiết và tính ổn định của nucleic acid tách chiết được.

Để biết thêm thông tin và được hỗ trợ kỹ thuật về cách xử lý trước và chuẩn bị mẫu, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

8.2 Pha hóa chất phản ứng (Master Mix)

Tất cả hóa chất và mẫu phải được rã đông hoàn toàn, trộn (bằng pipet hoặc vortex nhẹ) và ly tâm trong thời gian ngắn trước khi sử dụng.

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 có chứa chất nội chuẩn (IC) dị loại, có thể được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế PCR hoặc như một biện pháp kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu (tách chiết nucleic acid) và làm chất kiểm soát ức chế PCR.

- ▶ Trong trường hợp IC được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế PCR nhưng không phải là chất kiểm soát quy trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hóa chất phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Chứng nội (IC)	1 µl	12 µl
Thể tích Master Mix (Thể tích hoá chất phản ứng)	21 µl	252 µl

- ▶ Nếu IC được sử dụng làm chất kiểm chuẩn cho quy trình chuẩn bị mẫu và như một chất kiểm soát ức chế PCR, thêm IC vào quy trình tách chiết nucleic acid.

- ▶ Bất kể phương pháp/hệ thống nào được sử dụng để tách chiết nucleic acid, **không được** thêm trực tiếp IC vào bệnh phẩm. IC phải luôn được thêm vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải. Thể tích IC phải thêm vào luôn luôn và chỉ phụ thuộc vào thể tích của sản phẩm rửa giải. Thể tích này chiếm 10 % thể tích sản phẩm rửa giải. Chẳng hạn, nếu nucleic acid sẽ được rửa giải trong 60 µl dung dịch đệm rửa giải hoặc nước thì cần thêm 6 µl IC mỗi mẫu vào hỗn hợp bệnh phẩm/đệm ly giải.
- ▶ Trường hợp IC được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, vui lòng thiết lập hóa chất phản ứng Master Mix theo sơ đồ hút nhả pipet sau:

Số lượng phản ứng (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Thể tích Master Mix (Thể tích hoá chất phản ứng)	20 µl	240 µl

THẬN TRỌNG

Nếu IC (chất nội chuẩn) được thêm vào trong quá trình chuẩn bị mẫu, thì chỉ ít chứng âm cần bao gồm IC.

THẬN TRỌNG

Bất kể sử dụng phương pháp/hệ thống nào để tách chiết nucleic acid, không được bổ sung trực tiếp IC vào bệnh phẩm.

8.3 Thiết lập phản ứng

- ▶ Pipet 20 µl Master Mix cho vào các giếng cần sử dụng của đĩa phản ứng 96 giếng hoặc ống phản ứng có độ quang học phù hợp.
- ▶ Thêm 10 µl mẫu (sản phẩm rửa giải từ quá trình tách chiết nucleic acid) hoặc 10 µl chất kiểm chuẩn (đối chứng âm hoặc đối chứng dương).

Thiết lập phản ứng	
Hóa chất phản ứng	20 µl
Mẫu hoặc chất kiểm chuẩn	10 µl
Tổng thể tích	30 µl

- ▶ Đảm bảo sử dụng các chứng dương và ít nhất một chứng âm nằm trong Master Mix (hóa chất phản ứng) được sử dụng trong từng lần chạy.
- ▶ Trộn kỹ các mẫu và chất kiểm chuẩn với Master Mix bằng cách hút nhả pipet.
- ▶ Đậy đĩa phản ứng 96 giếng bằng nắp đậy thích hợp hoặc màng dán quang học và đóng các ống phản ứng bằng nắp đậy thích hợp.
- ▶ Ly tâm đĩa phản ứng 96 giếng trong máy ly tâm có rotor dành cho đĩa microtiter trong 30 giây với tốc độ khoảng 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

9. Lập trình hệ thống realtime PCR

Để biết thông tin cơ bản về việc cài đặt và lập trình các hệ thống realtime PCR khác, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn lập trình chi tiết liên quan đến việc sử dụng RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

9.1 Cài đặt

- Xác định các thông số cài đặt sau:

Cài đặt	
Thể tích phản ứng	30 µl
Tốc độ gia nhiệt	Mặc định
Tham chiếu thụ động	ROX™

9.2 Bộ phận phát hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm)

- Xác định bộ phận hiện huỳnh quang (thuốc nhuộm):

Mục tiêu	Bộ phận phát hiện	Chất phát huỳnh quang (reporter)	Chất dập huỳnh quang (quencher)
DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella pertussis</i>	Target IS481	FAM™	(Không)
DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella paraptussis</i>	Target IS1001	Cy5	(Không)
Chứng nội (IC)	Internal Control	JOE™	(Không)

9.3 Chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm

- Xác định chương trình nhiệt độ và ghi nhận màu thuốc nhuộm:

	Bước	Số chu kỳ lặp lại	Ghi nhận tín hiệu	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [phút:giây]
Biến tính	Giữ	1	-	95	02:00
Khuếch đại	Chu kỳ	45	-	95	00:15
			Có	58	00:45
			-	72	00:15

10. Phân tích dữ liệu

Để biết thông tin cơ bản về phân tích dữ liệu trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng tham khảo hướng dẫn sử dụng của hệ thống tương ứng.

Để tham khảo hướng dẫn chi tiết về phân tích dữ liệu được tạo ra từ RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 trên một số hệ thống realtime PCR cụ thể, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi (xem chương 14. Hỗ trợ kỹ thuật).

10.1 Tính hợp lệ của các lần chạy xét nghiệm chẩn đoán

10.1.1 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán hợp lệ (định tính)

Một lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **hợp lệ** khi thoả mãn các điều kiện kiểm soát sau:

Mã kiểm chuẩn	Kênh nhận diện		
	FAM™	Cy5	JOE™
Chứng dương [<i>Bordetella pertussis</i> và <i>Bordetella parapertussis</i>]	+	+	+/-*
Chứng âm	-	-	+

* Sự hiện diện hay vắng mặt của một tín hiệu trong kênh JOE™ không liên quan đến tính hợp lệ của lần chạy thử nghiệm.

10.1.2 Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán không hợp lệ (định tính)

Lần chạy xét nghiệm chẩn đoán **định tính** được coi là **không hợp lệ** khi (i) quá trình chạy chưa hoàn tất hoặc (ii) không đáp ứng bất kỳ điều kiện kiểm soát nào đối với một lần chạy chẩn đoán **hợp lệ**.

Trong trường hợp lần chạy xét nghiệm chẩn đoán bị coi là **không hợp lệ**, lặp lại xét nghiệm bằng cách sử dụng nucleic acid tinh khiết còn lại hoặc bắt đầu lại từ các mẫu ban đầu.

10.2 Diễn giải kết quả

10.2.1 Phân tích định tính

Kênh nhận diện			Diễn giải kết quả
FAM™	Cy5	JOE™	
+	+	+	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella pertussis</i> và <i>Bordetella parapertussis</i> . ^{1,2}
+	-	+	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella pertussis</i> . ¹
-	+	+	Phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella parapertussis</i> . ²
-	-	+	Không phát hiện DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella pertussis</i> và <i>Bordetella parapertussis</i> . Mẫu không chứa đủ lượng DNA đặc hiệu cho <i>Bordetella pertussis</i> hoặc <i>Bordetella parapertussis</i> để có thể phát hiện.
-	-	-	PCR bị ức chế hoặc hóa chất bị hỏng. Lặp lại xét nghiệm với mẫu ban đầu hoặc thu thập và xét nghiệm mẫu mới.

* Việc phát hiện chất nội chuẩn (IC) trong kênh nhận diện JOE™ là không bắt buộc đối với các kết quả dương tính trong kênh nhận diện FAM™ hoặc kênh nhận diện Cy5. Tải lượng cao DNA của *Bordetella pertussis* (IS481) và/hoặc *Bordetella parapertussis* (IS1001) trong mẫu có thể làm giảm hoặc mất tín hiệu chất nội chuẩn (IC).

¹ Một tín hiệu dương tính trong kênh FAM™ cũng có thể do sự xuất hiện của DNA *Bordetella holmesii* hoặc *B. bronchiseptica* trong mẫu.

² Một tín hiệu dương tính trong kênh Cy5 cũng có thể do sự xuất hiện của DNA *Bordetella bronchiseptica* trong mẫu.

11. Đánh giá hiệu suất

11.1 Độ nhạy phân tích

Độ nhạy phân tích của RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được định nghĩa là nồng độ (bản sao/ μ l sản phẩm rửa giải) của các phân tử DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481) hoặc *Bordetella parapertussis* (IS1001) có thể được phát hiện với tỷ lệ dương tính là 95 %. Độ nhạy phân tích được xác định bằng cách phân tích dãy pha loãng bậc liên tiếp của *Bordetella pertussis* (IS481) DNA và *Bordetella parapertussis* (IS1001) DNA.

Bảng 3: Kết quả PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481)

Nồng độ đầu vào [bản sao/ μ l]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ biểu hiện [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	8	44
0,032	18	8	44
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

Bảng 4: Kết quả PCR được sử dụng để tính toán độ nhạy phân tích đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella parapertussis* (IS1001)

Nồng độ đầu vào [bản sao/μl]	Số mẫu lặp	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ biểu hiện [%]
31,600	18	18	100
10,000	18	18	100
3,160	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	14	78
0,100	18	9	50
0,032	18	2	11
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

Độ nhạy phân tích của RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được xác định bằng phân tích probit:

- Đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481), độ nhạy phân tích là 0,74 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95% (CI): 0,39–2,08 bản sao/μl]
- Đối với việc phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella parapertussis* (IS1001), độ nhạy phân tích là 0,60 bản sao/μl [khoảng tin cậy 95% (CI): 0,35–1,54 bản sao/μl]

11.2 Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được đảm bảo bằng việc lựa chọn kỹ lưỡng các oligonucleotide (đoạn mồi và đầu dò). Các oligonucleotide được kiểm tra bằng phân tích so sánh trình tự với các trình tự được cung cấp rộng rãi để đảm bảo sẽ phát hiện được tất cả các kiểu gen *Bordetella* liên quan.

Độ đặc hiệu phân tích của RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được đánh giá bằng cách xét nghiệm một nhóm RNA/DNA bộ gen tách chiết từ vi khuẩn liên quan đến *Bordetella pertussis* và *Bordetella parapertussis* và các tác nhân gây bệnh khác gây ra các triệu chứng tương tự như *Bordetella pertussis* và *Bordetella parapertussis*.

RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 không phản ứng chéo với bất kỳ mầm bệnh nào trong số các mầm bệnh sau:

- Adenovirus ở người 1
- Adenovirus ở người 4
- Virus đường ruột, Coxsackie A3
- Metapneumovirus ở người A2
- Metapneumovirus ở người B2
- Virus cúm A
- Virus cúm B
- Virus parainfluenza ở người 1
- Virus parainfluenza ở người 2
- Virus parainfluenza ở người 3
- Virus parainfluenza ở người 4a/b
- Virus hợp bào hô hấp ở người A
- Virus hợp bào hô hấp ở người B
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Chlamydomphila psittaci*
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycobacterium avium*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella petrii*
- *Bordetella trematum*
- *Bordetella hinzii*
- *Bordetella avium*
- *Bordetella bronchiseptica* IS481-

11.3 Độ đúng (Precision)

Độ đúng (Precision) của RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 được xác định là biến động trong một lần xét nghiệm, biến động giữa các lần xét nghiệm và biến động giữa các lô sản xuất khác nhau. Biến động tổng số được tính toán bằng cách kết hợp 3 phân tích.

Dữ liệu về sự biến động được thể hiện dưới dạng độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên dựa trên các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t). Trên mỗi mẫu, ít nhất có 6 mẫu lặp được phân tích về sự biến động trong mỗi xét nghiệm, giữa các xét nghiệm và giữa các lô.

Bảng 5: Dữ liệu chính xác để phát hiện DNA đặc hiệu cho *Bordetella pertussis* (IS481) và *Bordetella parapertussis* (IS1001)

<i>Bordetella pertussis</i> (IS481) và <i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)		Chu kỳ ngưỡng trung bình (C_t)	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Sự biến động trong xét nghiệm	Mục tiêu IS481	30,84	0,12	0,40
	Mục tiêu IS1001	30,44	0,14	0,46
Sự biến động giữa các xét nghiệm	Mục tiêu IS481	30,83	0,12	0,37
	Mục tiêu IS1001	30,63	0,20	0,65
Sự biến động giữa các lô	Mục tiêu IS481	30,76	0,12	0,38
	Mục tiêu IS1001	30,45	0,10	0,34
Biến động tổng số	Mục tiêu IS481	30,79	0,12	0,40
	Mục tiêu IS1001	30,56	0,20	0,65

Bảng 6: Dữ liệu chính xác để phát hiện chất nội chuẩn/chứng nội

Chứng nội (IC)	Chu kỳ ngưỡng trung bình (C_t)	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên [%]
Sự biến động trong xét nghiệm	27,05	0,15	0,55
Sự biến động giữa các xét nghiệm	26,71	0,16	0,61
Sự biến động giữa các lô	26,94	0,17	0,63
Biến động tổng số	26,82	0,23	0,84

12. Hạn chế

- Cần tuân thủ nghiêm ngặt hướng dẫn sử dụng để thu được kết quả tối ưu.
- Việc sử dụng sản phẩm này chỉ giới hạn ở nhân sự được hướng dẫn và đào tạo chuyên sâu về các kỹ thuật realtime PCR và quy trình chẩn đoán *in vitro*.
- Cần phải có quy định thực hành tốt phòng thí nghiệm (GLP) để thực hiện đúng xét nghiệm này. Cần hết sức cẩn thận để bảo vệ độ tinh khiết của các thành phần trong bộ kit và các lần thiết lập phản ứng. Tất cả các hóa chất phải được giám sát chặt chẽ về tạp chất và tình trạng nhiễm chéo. Bất kỳ loại hóa chất nào nghi ngờ có vấn đề đều phải được thải bỏ.
- Cần thiết lập các quy trình thu thập, vận chuyển, bảo quản và xử lý mẫu thích hợp để thực hiện tối ưu xét nghiệm này.
- Xét nghiệm này không được sử dụng trực tiếp trên mẫu vật. Các phương pháp tách chiết nucleic acid thích hợp phải được tiến hành trước khi sử dụng xét nghiệm này.
- Sự xuất hiện của chất ức chế PCR (ví dụ như heparin) có thể gây ra kết quả âm tính giả hoặc không hợp lệ.
- Các đột biến tiềm ẩn trong vùng mục tiêu của bộ gen *Bordetella pertussis* (IS481) và *Bordetella parapertussis* (IS1001) được bao bọc bởi các đoạn môi và/hoặc đầu dò được sử dụng trong bộ dụng cụ có thể dẫn đến việc không phát hiện được sự hiện diện của mầm bệnh.
- Với xét nghiệm chẩn đoán, kết quả RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 phải được diễn giải dựa trên tất cả các phát hiện lâm sàng và kết quả xét nghiệm.
- Nhiều loài *Bordetella* mang các phần tử chuyển vị DNA, được gọi là trình tự xen đoạn (IS). Đáng chú ý là IS481 hiện diện với số lượng bản sao cao trong bộ gen của *Bordetella pertussis* và IS1001 xảy ra trong bộ gen của *Bordetella parapertussis*. Phần tử chuyển vị IS481 cũng được tìm thấy với số lượng bản sao trung bình trong bộ gen của *Bordetella holmesii* và với tỷ lệ rất thấp trong bộ gen của một số chủng *Bordetella bronchiseptica*. Phần tử chuyển vị IS1001 cũng có thể có số lượng bản sao thấp trong bộ gen của *Bordetella bronchiseptica*.

13. Kiểm soát chất lượng

Theo Hệ thống Quản lý Chất lượng của Altona Diagnostics GmbH được chứng nhận EN ISO 13485, mỗi lô RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 đều được kiểm tra theo các thông số kỹ thuật đã ấn định trước để đảm bảo chất lượng sản phẩm nhất quán.

14. Hỗ trợ kỹ thuật

Để được cung cấp dịch vụ hỗ trợ khách hàng, vui lòng liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của chúng tôi:

Email: support@altona-diagnostics.com

Số điện thoại: +49-(0)40-5480676-0

15. Tài liệu

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Thương hiệu và tuyên bố miễn trừ trách nhiệm

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAAsymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene).

Tên, nhãn hiệu đã đăng ký v.v. được sử dụng trong tài liệu này, ngay cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy, không thể coi là không được pháp luật bảo vệ.
















RealStar® Bordetella PCR Kit 1.0 là bộ dụng cụ chẩn đoán đã có CE theo chỉ thị chẩn đoán *in vitro* 98/79/EC của Châu Âu.

Sản phẩm không được FDA thông qua hoặc phê chuẩn.

Không hiện diện ở tất cả các quốc gia.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; bảo lưu mọi quyền.

17. Giải thích các ký hiệu

Biểu tượng	Giải thích
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>in vitro</i>
	Mã lô
	Màu nắp
	Số catalogue
	Nội dung
	Mã số
	Thành phần
	Mã giao dịch toàn cầu của sản phẩm
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng
	Chứa đủ cho "n" xét nghiệm/phản ứng (rxns)
	Giới hạn nhiệt độ
	Hạn sử dụng
	Nhà sản xuất
	Thận trọng: Nêu rõ các hướng dẫn hoặc quy trình vận hành, nếu không được tuân thủ một cách chính xác, có thể dẫn đến các vấn đề thương tích về người hoặc ảnh hưởng đến hiệu suất của sản phẩm. Liên hệ với bộ phận hỗ trợ kỹ thuật của Altona Diagnostics để được hỗ trợ.
	Lưu ý: Thông tin cung cấp cho người dùng là hữu ích nhưng không cần thiết cho nhiệm vụ hiện tại.

Biểu tượng

Giải thích



Phiên bản

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

