

# GeneProof®

## *Borrelia burgdorferi*

### PCR Kit



### *in vitro* Diagnostics

Souprava je určena pro profesionální použití ve specializovaných klinických a výzkumných laboratořích.

#### Složení soupravy

Cat. No	Interní standard je součástí MasterMixu pro kontrolu inhibice			Obsahuje interní standard samostatně pro kontrolu inhibice a izolačního procesu		
	BB/ISIN/025 25 reakcí	BB /ISIN/050 50 reakcí	BB /ISIN/100 100 reakcí	BB /ISEX/025 25 reakcí	BB /ISEX/050 50 reakcí	BB /ISEX/100 100 reakcí
<b>MASTERMIX</b> <i>Borrelia burgdorferi</i>	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl	1 x 750 µl	2 x 750 µl	4 x 750 µl
<b>POSITIVE CONTROL</b> <i>Borrelia burgdorferi</i> 10 <sup>2</sup> kopií/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	2 x 200 µl
<b>INTERNAL STANDARD</b> <i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-	-	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl

#### Podmínky skladování a přepravy

Souprava je doporučeno přepravovat při teplotách v rozmezí -20 °C až -80 °C. Souprava je stabilní při teplotě -20°C 9 měsíců od data výroby. Opětovné zmrazování a rozmrazování MasterMixu, Interního standardu anebo Pozitivní kontroly může vést ke snížení kvality detekce. Výrobce proto doporučuje připravený MasterMix rozalíkovat po 30 µl přímo do PCR zkumavek a takto skladovat při -20 °C. Pozitivní kontrolu a interní standard je možné skladovat při 4 °C.

## Informace o patogenu

*Borrelia burgdorferi* sensu lato je původcem multiorgánového onemocnění - Lymské boreliózy. Toto onemocnění je přenášeno nakaženými klíštěti a probíhá ve třech stadiích. První stadiem je typické výskytem erythema chronicum migrans; ve druhém stadiu dochází k hematogennímu rozsevu s kožními příznaky a eventuelně k infekci CNS (aseptická meningitidis, radikuloneuropathie, lymfocytární meningitidis, oční infekce, apod.); arthritis, acrodermatitis chronica atrophicans a parézy končetin jsou příznaky III stadia onemocnění. V laboratorní diagnostice lymské boreliózy převládají nepřímé diagnostické metody založené na detekci specifických sérových protilátek IgM a IgG nebo intrathekálních protilátek metodou ELISA nebo konfirmační metodou imunoblottingu (western blot). Z důvodů dlouhodobého přetrvávání sérových protilátek, relativně vysoké séroprevalence antiboreliových protilátek u lidí žijících v endemických oblastech, existence séronegativních forem lymské boreliózy, možné zkřížené reaktivity nebo nemožností vyšetřit klinické materiály jako biopsie (kožní), synoviální tekutinu, apod. je pro stanovení diagnózy vhodné sérologické metody doplnit přímým průkazem borélií. PCR diagnostika je jediná klinicky využitelná metoda přímé diagnostiky boreliózy a velmi dobře doplňuje stávající nabídku sérologických testů. Tato citlivá metoda umožňuje průkaz borélií v prakticky jakémkoliv typu klinického materiálu. V primární akutní fázi onemocnění je možno borelie detekovat ve vzorcích kožních biopsií a později, ve fázi hematogenního rozsevu i při pozdějších rekurencích boreliózy, mohou být prokazovány ve vzorcích periferní krve a moči. V pozdějších fázích onemocnění je metoda PCR používána pro detekci borélií v mozkomíšním moku nebo v synoviální tekutině; dále i v tekutině sklivce při pozdní fázi oční boreliózy. Klinické vzorky pro průkaz *B. burgdorferi* metodou PCR je nutné odebírat v takových fázích onemocnění, kdy lze přítomnost patogena v odebraných materiálech očekávat. Je také možné preventivně vyšetřit odstraněné klíště.

## Princip metody

PCR kit je určen pro detekci klinicky významných kmenů patogenních baktérií spadajících do skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*). Metoda detekce je založena na principu amplifikace chromozomálního genu kódujícího 16S rDNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy, tzv. (real-time PCR). Přítomnost DNA borélií ve vzorku je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce a účinnost DNA izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro JOE fluorofor. Detekční souprava využívá technologii "hot start" minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. To umožňuje velmi vysokou citlivost laboratorní detekce borélií ve vzorcích tělních tekutin (líkvor, synoviální tekutina, krev, sérum, moč) anebo tkání. Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

PCR soupravy firmy GeneProof jsou konstruovány tak, aby je bylo možno používat na real-time přístrojích různých výrobců. *Borrelia burgdorferi* PCR Kit byl validován na následujících přístrojích:

Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science)  
Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science)  
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)  
LightCycler® 2.0 (Roche)  
LightCycler® 480 System (Roche)  
SLAN Real-time Quantitative PCR Fluorescent Detection System (Shanghai Odin Scienc & Technology Co.)

Podrobné informace o použití PCR kitů na konkrétních přístrojích naleznete na [www stránkách výrobce \(www.geneproof.com\)](http://www.geneproof.com) anebo si je vyžádejte u dodavatele souprav.

Pro použití soupravy na jiných real-time přístrojích kontaktujte prosím výrobce: [support@geneproof.com](mailto:support@geneproof.com)

## Upozornění:

- Souprava je vyrobena v souladu s evropskou Směrnicí Rady 98/79/ES jako diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.
- Při manipulaci s pozitivní kontrolou nebo při práci s klinickým materiálem dbejte zvýšené opatrnosti, při nesprávné manipulaci by mohlo dojít ke kontaminaci a tím ke znehodnocení složek soupravy nebo MasterMixu! Za znehodnocení soupravy nesprávnou manipulací nebo skladováním výrobce neručí.
- Soupravu je po použití doporučeno likvidovat podle aktuální právní úpravy s ohledem na skutečnost, že souprava neobsahuje žádné nebezpečné, infekční nebo toxické látky, které by podléhaly zvláštním bezpečnostním předpisům a použité obalové materiály jsou vyrobeny z papíru a z polypropylenu.

## Návod k použití

### Odběr a uchovávání vzorků

Odběr kožní biopsie je nutno provést z místa přísátí klíštěte nebo z oblastí „exanthema migrans“. Vzorek je třeba sterilně odebrat a vložit do zkumavky „nasucho“ bez transportního média, uchovat nebo transportovat při +4 °C do 24h. Vzorek nesrážlivé periferní krve se odebrá do EDTA a transportuje při +4 °C do 24h do laboratoře. Vzorky mozkomíšního moku, synoviální tekutiny z postižených kloubů a vzorky moči se odebírají do zkumavky bez transportního média, uchovávají a transportují se při +4°C do 24h nebo dlouhodobě při -20 až -80 °C. V případě, že je požadováno vyšetření odstraněného klíštěte, je třeba členovce ihned po odstranění z rány sterilně uchovat při -20 až -80 °C a co nejdříve dopravit do laboratoře. Při delším skladování je potřeba všechny vzorky uchovávat zamražené při -20°C.

### DNA izolace

Izolaci DNA je možno provádět na trhu dostupnými izolačními soupravami dle příslušných protokolů pro izolaci příslušného mikroorganismu. Výrobce doporučuje následující izolační soupravy: PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof).

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard (IS), pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

#### PCR Kit ISIN (Cat. No. BB/ISIN...)

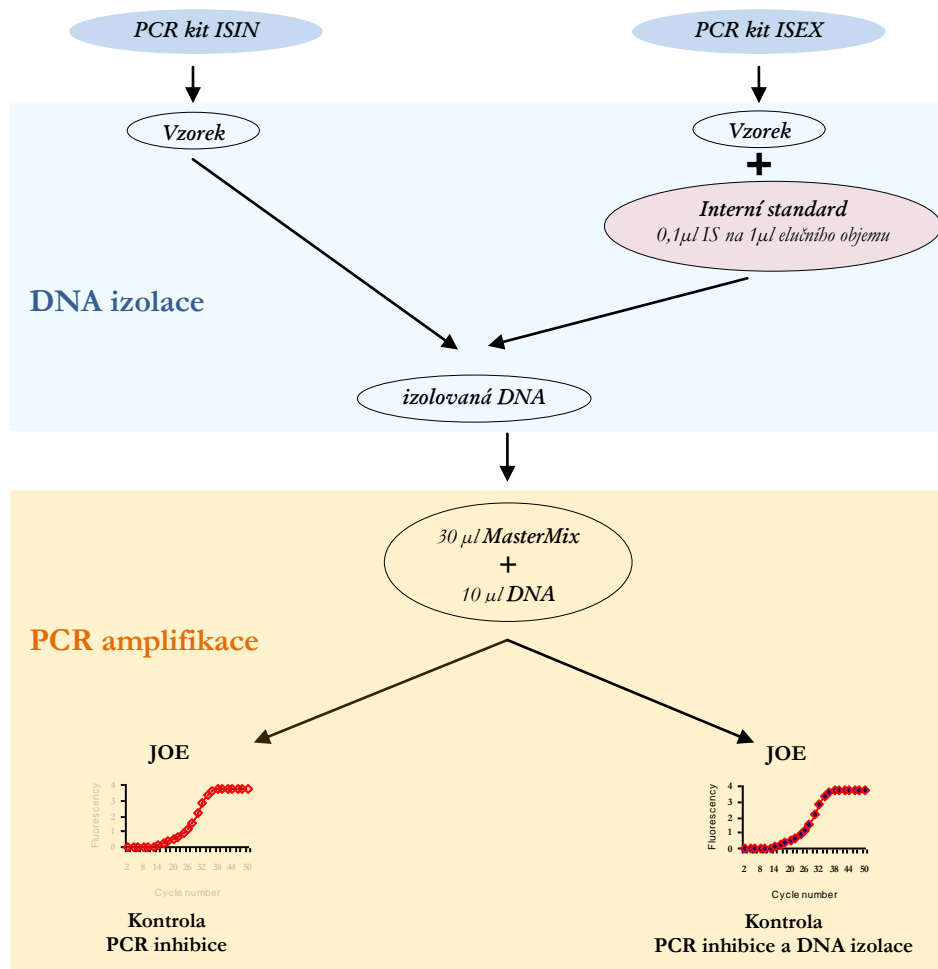
V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přímo součástí zkumavky s MasterMixem. Tato varianta kitu umožňuje účinnou kontrolu inhibice PCR reakce.

#### PCR Kit ISEX (Cat. No. BB/ISEX...)

V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít jak ke kontrole inhibice PCR reakce, tak i ke kontrole účinnosti izolace DNA.

Při použití ISEX varianty PCR kitů je IS přidáván přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu tak, aby na 1 µl výsledného elučního objemu připadlo 0,1 µl IS:

Eluční objem	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Interní standard	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl



## PCR amplifikace

1. Do zkumavky přidat **30  $\mu$ l MasterMixu** a **10  $\mu$ l izolátu DNA** nebo **10  $\mu$ l Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 40  $\mu$ l.
2. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

### Amplifikační program:

UDG dekontaminace 37 °C/2 min.  
počáteční denaturace 95 °C/10 min.

denaturace 95 °C/5 sec.  
annealing 60°C/ 40 sec. – čtení fluorescenčního signálu  
extenze 72°C/ 20 sec.  
počet cyklů 45

## Kvalitativní vyhodnocení detekce

