

BK-Q

Real Time PCR Kit for BK Virus

REF

G610010

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
BK-Q Real Time PCR Kit for BK Virus	G610010-1	50T

Předchozí REF č.: G2M705421

Toto je neautorizovaný pracovní překlad anglického originálu návodu k použití (IFU) do češtiny, vyhotovený pro interní referenční účely. Rozhodující je vždy anglický originální dokument výrobce; před použitím produktu si jej prosím ověřte.

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

Č.	Obsah	Číslo strany
1.	Účel použití	3
2.	Určený uživatel	3
3.	Princip testu	3
4.	Souhrn	3
5.	Přístroje kompatibilní se soupravou	3
6.	Dodávaný materiál	3
7.	Materiál potřebný, ale nedodávaný	4
8.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	4
9.	Postup testu	4
10.	Nastavení přístroje pro real-time PCR	5
11.	Interpretace výsledků testu	5
12.	Charakteristiky výkonu	6
13.	Varování a bezpečnostní opatření	7
14.	Omezení	7

Účel použití

BK-Q Real Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci DNA BK viru v klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

BK-Q Real-Time PCR Kit je navržena na základě technologie real-time PCR a obsahuje specifické primery a fluorescenční sondy cílící na sekvence BK viru, označené fluorescenčním barvivem FAM a zhášedčem. Použití sond spojených s odlišitelnými barvami umožňuje paralelní detekci specifické DNA BK viru i detekci interní kontroly v odpovídajících detekčních kanálech přístroje pro real-time PCR. Sonda specifická pro interní kontrolu (IC) je označena fluoroforem HEX.

Souhrn

BK virus (BKV) je členem čeledi Polyomavirus, charakterizovaný kruhovou dvouvláknovou strukturou DNA s velikostí genomu přibližně 5 kB. V rámci čeledi Polyomavirus, která zahrnuje 13 známých členů včetně JC viru (JCV) a SV40, sdílí BKV přibližně 75 % své sekvence DNA s JCV. Infekce BK virem se obvykle získává v dětství a často se projevuje příznaky podobnými běžnému nachlazení. Po infekci virus v těle přechází do latentního stavu, kdy u většiny jedinců přetrvává bez závažných obtíží.

Studie ukazují, že téměř 80 % dospělé populace na celém světě má protilátky proti BKV i příbuzným virům, což svědčí o předchozí expozici nebo infekci. Příznaky infekce BK virem se mohou projevovat různými způsoby, včetně změn vidění, jako je rozmazané vidění, změn barvy moči (zabarvení do hnědé nebo červené), bolestivého nebo obtížného močení, kašle, příznaků nachlazení, horečky, bolesti svalů a slabosti. Tyto příznaky se mohou lišit svou závažností a trváním v závislosti na individuálních faktorech, jako je celkový zdravotní stav a funkce imunitního systému.

Přístroje kompatibilní se soupravou

⚠ Zajistěte, aby všechny používané přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics)
- RapiCycler 96 Real Time PCR System (Genes 2Me Private Limited)

Dodávaný materiál

Tabulka 1. (Pro 50 testů)

Obsah soupravy	Kód obsahu soupravy	Množství (G610010-1)
BK Virus Primer & Probe Mix	G2MA3-1989-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-1990-1	1 X 50 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	G2MA3-1991-1	1 X 50 µl
qPCR Master Mix	G2MA3-0657-1	1 X 500 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-1	1 X 1 ml

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- SpiNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M131420), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) (kat. č. 51304)
- Stolní centrifuga
- Vortexer
- Mikropipety (nastavitelné)
- Jednorázové špičky s bariérovým filtrem
- Jednorázové bezpudrové rukavice
- Systém pro real-time PCR

Pokyny pro uchovávání a stabilitu

- Souprava má dobu použitelnosti 12 měsíců od data výroby. Testovací souprava je stabilní do data expirace uvedeného na krabici soupravy a/nebo na obalu jednotlivých komponent, pokud je uchovávána podle specifikace.
- Souprava a její komponenty jsou expedovány a uchovávány při teplotě -30 °C až -10 °C.
- Provádějte experiment při pokojové teplotě (15 °C až 30 °C) a během testování uchovávejte činidla v chladicím zařízení (2 °C až 8 °C).
- Opakovanému zmrazování a rozmrazování (více než 6krát) je třeba se vyhnout.

☀️ Chraňte před přímým slunečním zářením.

Postup testu

Odběr vzorku

- Odeberte krev, sérum a plazmu do odběrových zkumavek podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku dodávaném se soupravou pro odběr vzorků.
- Přeprava odebraného vzorku by měla probíhat v souladu s pokyny uvedenými v příbalovém letáku dodávaném se soupravou pro odběr vzorků.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické DNA by měla být provedena podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na teplotu (2 °C–8 °C) a před použitím krátce vortexujte po dobu 20 sekund.

Příprava reakční směsi

- Připravte reakční směs podle následující tabulky v oblasti pro přípravu činidel (Tabulka 2).

Tabulka 2.

Komponenty	Objem
BK Virus Primer & Probe Mix	01 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	01 µl
qPCR Master Mix	10 µl
Vzorek DNA	08 µl
Konečný objem	20 µl

⚠ Připravte zkumavku s qPCR reakcí na ledu a rychle přejděte k amplifikačnímu kroku. Prodloužená inkubace reakční směsi, zejména při pokojové teplotě, ovlivňuje citlivost testu. Zkumavky před vložením do termocykleru krátce zcentrifugujte. Je třeba zabránit vzniku bublin v reakční směsi, protože interferují s detekcí fluorescence.

- Pro No Template Control (NTC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek DNA nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek DNA nahradíte cílově specifickým Positive Control Template.

Nastavení přístroje pro real-time PCR

- Před nastavením programu na jakémkoli přístroji pro real-time PCR se řiďte uživatelskou příručkou příslušného přístroje.
- Níže je uveden příklad nastavení přístroje BioRad CFX96.

Nastavení PCR přístroje

- Vložte zkumavku/destičku s PCR reakcí do přístroje. Nastavte No Template Control (NTC), Positive Control Template a testovaný vzorek v pořadí.

Nastavení kanálů fluorescence

- Definujte následující nastavení pro výběr kanálu detekce fluorescence (Tabulka 3).

Tabulka 3.

Cíl	Reportér	Zhášeč
BK Virus	FAM	Žádný
Interní kontrola	HEX	Žádný

Nastavení teploty a cyklů PCR

- Definujte následující nastavení teplotního profilu a PCR cyklů. Uložte soubor a spusťte reakci (Tabulka 4).

Tabulka 4.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Denaturace	1	95	03:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	95	00:15
		60*	01:00

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – FAM a HEX.

- Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

- Hodnota Ct ≤35 by měla být považována za mezní hodnotu (cut-off) pro odlišení pozitivních a negativních vzorků. Hodnota nižší nebo rovna 35 se považuje za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Vyberte „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo HEX a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by se neměla amplifikovat v NTC a v pozitivních kontrolách. Pozdní šumový graf amplifikace HEX v jamkách NTC a Positive Control ignorujte.

Validace Positive Control Template a NTC

- Vyberte jamky NTC a Positive Control Template, zvolte kanál FAM a zobrazte graf amplifikace. Křivka NTC musí být plochá bez hodnoty Ct. V případě potřeby upravte hodnotu prahu (threshold) těsně nad NTC. PC musí amplifikovat s hodnotou Ct ≤28 pro kanál FAM.
- Absence amplifikace v NTC značí, že nedošlo ke kontaminaci činidel ani experimentálního prostředí a že pipetování bylo provedeno správně.

■ Amplifikace v PC potvrzuje, že byly dodrženy předem stanovené podmínky uchovávání činidel a parametry reakce

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu FAM a HEX postupně vyberte jamky testovaných vzorků a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte následující tabulkou (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíl	qPCR signál		
BK Virus Pathogen (FAM)	+	-	-
Positive Control (FAM)	+	+	-
Internal Control (HEX)	+	+	-
No Control Template (NTC)	-	-	-/+
Výsledek	Pozitivní výsledek pro BK virus	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

⚠ Pro diagnostické účely by měly být výsledky vždy používány v kombinaci s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných testů, klinický dojem apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s klinickými nálezy, doporučuje se provést doplňující testování k potvrzení výsledku.

Charakteristiky výkonu

Tabulka 6.

Č.	Parametry	Pozorování
1.	Analytická senzitivita	100 %
2.	Analytická specifita	100 %
3.	Pravdivost (bias)	98 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 4 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 3,5 %
6.	Správnost (vyplývající z pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 100 kopií/ml
8.	Měřicí rozsah	10 – 10 ⁹ kopií/reakci
9.	Linearita	R ² = 0,998
10.	Mezní hodnota (Cut-off)	Hodnota Ct: ≤ 35
11.	Kritéria pro odběr a manipulaci se vzorky	Vhodné pokyny pro manipulaci
12.	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek (testováno s lidskou genomovou DNA, cyklosporinem a hemoglobinem)	Dobře kontrolováno
13.	Zkřížené reakce (JC virus, Simian Virus 40 a HSV)	Žádná zkřížená reaktivita
14.	Klinická senzitivita	98 %
15.	Klinická specifita	99 %

Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si pečlivě přečtěte tento návod k použití (IFU) a seznámte se s postupy obsluhy a bezpečnostními opatřeními.
- Pracovní plocha by měla být pravidelně dezinfikována 1 % roztokem chlornanu sodného nebo 75 % etanolem.
- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu jejich expirace.
- Při provádění testu používejte jednorázovou zástěru, rukavice a masku.
- Vzorky by měly být zcela dávkovány do reakční směsi a žádný vzorek by neměl ulpívat na stěně zkumavky.
- Dodržujte nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy při manipulaci se vzorky a přístroji, protože testované vzorky jsou klasifikovány jako nebezpečné.
- Bylo prokázáno, že heparin inhibuje PCR. Nepoužívejte s tímto postupem heparinizované vzorky. Spolehlivost výsledků závisí na řádném odběru vzorků a správných postupech přepravy.
- Používejte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Při manipulaci se vzorky a činidly soupravy používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště.
- Po manipulaci se vzorky a činidly soupravy si důkladně umyjte ruce.
- Činidlo s enzymem a primery/sondami obsahuje v pufru syntetický oligonukleotid. Zabraňte styku činidla s kůží, očima a sliznicemi, což by mohlo způsobit kožní podráždění. Při styku s těmito činidly omyjte postižené místo vodou. Při rozlití těchto činidel postupujte podle vhodných postupů pro zvládání rozlití.
- NEZAMĚŇUJTE, NEMÍCHEJTE ani nekombinujte činidla ze souprav s různými čísly šarží.
- Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci činidel a zajistěte, aby byly případné sraženiny rozpuštěny.
- Všechny testované vzorky musí být považovány za potenciálně infekční nebo biologicky nebezpečné a při manipulaci se vzorky a přístroji musí být dodržována všechna nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy.
- Podmínky uchovávání činidel musí být striktně dodržovány, aby byla zajištěna deklarovaná funkčnost soupravy.
- Nedotýkejte se vnitřku jamek cartridge; používejte sterilní pipetovací špičky a rukavice.
- Zabraňte kontaminaci činidel a vzorků heparinem, protože může interferovat s výsledky testu.

Omezení

- Pro dosažení optimálních výsledků je nezbytné důsledně dodržovat příbalový leták soupravy neboli návod k použití (IFU). Výsledky tohoto testu jsou citlivé na způsob odběru, transportu, uchovávání a zpracování vzorku a jakékoli nesrovnalosti mohou vést k nepřesným výsledkům. Například křížová kontaminace, pokud není během zpracování vzorku řádně kontrolována, může vést k falešně pozitivním výsledkům.
- Test je omezen na specifikovaná extrakční činidla, typy vzorků a příslušné přístroje.
- Pro optimální provedení tohoto testu je nezbytné důsledné dodržování správné laboratorní praxe (GLP).
- Případné mutace v cílových oblastech genomu, na které se váží primery/sondy použité při návrhu soupravy, mohou vést k nekonzistentním výsledkům.
- Stejně jako u jakéhokoli diagnostického testu musí být výsledky testu této soupravy interpretovány podle části „interpretace výsledků“ tohoto návodu, s ohledem na všechny klinické a laboratorní nálezy.

Symboly použité na označení	
Symboly	Definice
	CHRAŇTE PŘED SLUNEČNÍM ZÁŘENÍM
	TEPLOTNÍ OMEZENÍ
	DIAGNOSTICKÝ ZDRAVOTNICKÝ PROSTŘEDEK IN VITRO
	TOUTO STRANOU NAHORU
	ŘÍDTE SE NÁVODEM K POUŽITÍ
	KÓD ŠARŽE
	KATALOGOVÉ ČÍSLO
	DATUM POUŽITELNOSTI
	DATUM VÝROBY
	VÝROBCE
	OBSAH DOSTAČUJÍCÍ PRO <n> TESTŮ
	UPOZORNĚNÍ
	NEPOUŽÍVEJTE, POKUD JE OBAL POŠKOZEN
	ZPLNOMOCNĚNÝ ZÁSTUPCE PRO EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ / EVROPSKOU UNII
	EVROPSKÁ SHODA



Genes 2Me Private Limited Plot No - 33 Sector-5, IMT Manesar, Gurugram, Haryana - 122052 (India), Telefonní čísla: +91 18001 214030 / +91 88000 23600 / +91 8800821778, E-mail: contact@genes2me.com



OBELIS S.A. Bd General Wahis 53 B-1030 Brussels Belgium, Tel: +3227325954, Fax: +3227326003, E-mail: mail@obelis.net