

DENGUE-Q

Real Time PCR Kit

REF

G610008

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
DENGUE-Q Real Time PCR Kit	G610008-1	50T

Předchozí REF č.: G2M705021

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

DENGUE-Q Real Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci specifické RNA sérotypů viru dengue v klinických vzorcích (krev, sérum nebo plazma).

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

DENGUE-Q Real Time PCR Kit je produkt pro detekci *in vitro*, navržený jako test na bázi technologie real-time PCR, sestávající z multiplexního dvouzkušavkového testu obsahujícího specifické primery a fluorescenční sondy cílící na sekvence sérotypů dengue DENV1, DENV2, DENV3 a DENV4. Sondy jsou označeny barvivem FAM pro DENV1, Texas Red pro DENV3 a HEX pro interní kontrolu ve zkumavce Primer & Probe Mix-1, a barvivem FAM pro DENV2, Texas Red pro DENV4 a HEX pro interní kontrolu ve zkumavce Primer & Probe Mix-2. Použití sond spojených s fluorescenčním reportérem a zřáhacím barvivem umožňuje detekci RNA specifické pro dengue a interní kontroly označené barvivem HEX v odpovídajících detekčních kanálech přístroje pro real-time PCR.

Souhrn

Virus dengue (DENV) patří do čeledi *Flaviviridae*. Jsou známy 4 sérotypy (DENV 1-4). Genom RNA viru DENV je jednovláknový a má pozitivní orientaci [(+)ssRNA]. Virus dengue je přenášen členovci (zejména komáry *Aedes aegypti* a *A. albopictus*). Existují městské a sylvatické cykly, přičemž první zahrnuje pouze lidi a komáry, druhý především volně žijící zvířata a komáry. Lidské infekce kmeny ze sylvatických cyklů jsou vzácné. Všechny čtyři sérotypy se vyskytují celosvětově v tropických oblastech, kde je přítomen vektor. Po infekci virem DENV je inkubační doba 3–14 dní. Onemocnění začíná horečkou, celkovou nevolností a bolestí svalů a kloubů. 80 % infekcí probíhá relativně mírně a nekomplikovaně. U některých pacientů je onemocnění závažnější a může být v některých případech i život ohrožující. Příznaky dengue se typicky projevují vysokou horečkou (104 °F) spolu s dalšími příznaky, jako je bolest hlavy, bolest svalů, kostí a kloubů, nauzea, zvracení a bolest za očima.

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 (G610008-1)
Dengue Primer and Probe Mix-1 DENV-1 Primer and Probe Mix (FAM) DENV-3 Primer and Probe Mix (Texas Red) Internal Control Primer and Probe Mix (HEX)	G2MA3-1889-2	1 X 250 µl
Dengue Primer and Probe Mix-2 DENV-2 Primer and Probe Mix (FAM) DENV-4 Primer and Probe Mix (Texas Red) Internal Control Primer and Probe Mix (HEX)	G2MA3-1890-2	1 X 250 µl
Dengue Reaction Buffer	G2MA3-2866-1	2 X 1 ml
Positive Control Template	G2MA3-1891-2	1 X 1 ml
qRT-PCR Master Mix	G2MA3-0662-10	1 X 150 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-1	1 X 1 ml

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- SpiNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (kat. č. G2M131420), Genes2Me Pvt. Ltd., nebo QIAamp Viral RNA Mini Kit (52904) (Qiagen)
- 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

Typ vzorku

- Plná krev, sérum, plazma.

Odběr vzorku

- Odeberte periferní krev do zkumavek s EDTA (pro plazmu) a/nebo do zkumavek s aktivátorem srážení (pro sérum) podle pokynů dodávaných se soupravou.
- Přpravujte vzorky při 2–8 °C a uchovávejte při 4 °C.
- Zpracujte vzorky do 72 hodin, ideálně do 36 hodin pro přesné stanovení onemocnění.
- Krev nezmrazujte.
- Se vzorky manipulujte a uchovávejte je opatrně, aby byla zachována jejich stabilita.
- Zajistěte konzistentní teplotu během přepravy, aby se zabránilo změnám.

Příprava vzorku

- Provádějte extrakci RNA z krve s EDTA/séra nebo plazmy pomocí doporučených souprav podle pokynů výrobce.

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.
- Okamžitě použijte RNA pro RT-PCR, aby byla zajištěna citlivá detekce patogenu.
- Extrahovaná RNA by měla být pro budoucí použití uchovávána při -80 °C.

Příprava reakční směsi

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

Tabulka 2.

Komponenty	Zkumavka 1	Zkumavka 2
qRT-PCR Master Mix	1,5 µl	1,5 µl
Dengue Primer and Probe Mix-1	5 µl	--
Dengue Primer and Probe Mix-2	--	5 µl
Dengue Reaction Buffer	18,5 µl	18,5 µl
Vzorek RNA	5 µl	5 µl
Konečný objem	30 µl	30 µl

⚠ Přípravte zkumavku s qRT-PCR 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 RNA nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek RNA 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 a testovaný vzorek v pořadí.

Nastavení kanálů fluorescence

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

Tabulka 3.

Cíl	Reportér	Zhášec
Patogen DENV-1 a 2	FAM	Žádný
Patogen DENV-3 a 4	Texas Red	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)
Reverzní transkripce a denaturace	1	50	05:00
		95	01:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	95	00:05
		55*	00:15

*Data amplifikace jsou sbírána při 55 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – FAM, Texas Red a HEX.

- Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

- Hodnota Ct ≤38 by měla být považována za mezní hodnotu (cut-off) pro odlišení pozitivních a negativních vzorků a mezní hodnota pro interní kontrolu je Ct ≤35.

Validace interní kontroly

- Vyberte pouze testované vzorky pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo HEX a zobrazte graf amplifikace interní kontroly.

Validace Positive Control a No Template Control

- Pro NTC vyberte kanály FAM, Texas Red a HEX a ve všech kanálech ověřte, že nedochází k žádné amplifikaci.

- Pro PC vyberte kanály FAM, Texas Red a HEX a zobrazte graf amplifikace. PC musí amplifikovat s hodnotou Ct ≤33 pro všechny cíle.
- PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání činidel a parametry reakce.

Kvalitativní interpretace výsledků

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

Tabulka 5a. (Zkumavka 1)

Cíle	qPCR signál			
DENV-1 Target Pathogen (FAM)	+	-	-	-
DENV-3 Target Pathogen (Texas Red)	-	+	-	-
Internal Control (HEX)	+/-	+/-	+	-
DENV-1 & 3 Positive Control (FAM, Texas Red & HEX)	+	+	+	-
Výsledek	Pozitivní výsledek pro DENV-1	Pozitivní výsledek pro DENV-3	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5b. (Zkumavka 2)

Cíle	qPCR signál			
DENV-2 Target Pathogen (FAM)	+	-	-	-
DENV-4 Target Pathogen (Texas Red)	-	+	-	-
Internal Control (HEX)	+/-	+/-	+	-
DENV-2 & 4 Positive Control (FAM, Texas Red & HEX)	+	+	+	-
Výsledek	Pozitivní výsledek pro DENV-2	Pozitivní výsledek pro DENV-4	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 specificita	100 %
3.	Pravdivost (bias)	98 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 3 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 3 %
6.	Správnost (vyplývající z pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 200 kopií/ml
8.	Měřicí rozsah	1 – 10 ⁹ kopií/reakci
9.	Linearita	R ² = 0,998
10.	Mezní hodnota (Cut-off)	Hodnota Ct: ≤ 38
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, cholesterolem a hemoglobinem)	Dobře kontrolováno
13.	Zkřížené reakce (Chikungunya, virus západního Nilu, virus žluté horečky, Herpes Simplex Virus 1 a 2 (HSV 1 & 2))	Žádná zkřížená reaktivita
14.	Klinická senzitivita	98 %
15.	Klinická specificita	99 %

Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si pečlivě přečtěte tento návod k použití (IFU) a seznamte 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 použijte 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 plášť.
- 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.
- Zlikvidujte veškerý biologicky nebezpečný odpad v souladu s místními předpisy.

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