

FLT3-Q

Real-Time PCR Kit

FLT3-Q Real-Time PCR Kit pro One PCR

REF

G610025

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
FLT3-Q Real-Time PCR Kit for One PCR	G610025-3	24T

Předchozí REF č.: G2M709021

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.	Souhrn	3
4.	Přístroje kompatibilní se soupravou	3
5.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	3
6.	Odběr a příprava vzorku	3
One PCR Ultra-Fast RT PCR System		
•	Princip testu	4
•	Dodávaný materiál	4
•	Materiál potřebný, ale nedodávaný	4
•	Postup testu	4
7	Interpretace výsledků	15
8	Charakteristiky výkonu	16
9	Varování a bezpečnostní opatření	17
10	Omezení	18

Účel použití

Souprava FLT3-Q Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci interních tandemových duplikací (ITD) a mutace tyrozinkinázové domény (TKD) (D835-I836) v genu FLT3 v genomové DNA extrahované z periferní krve pacientů s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (AML).

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Souhrn

Akutní myeloidní leukémie (AML) je agresivní hematologická malignita charakterizovaná nekontrolovanou proliferací abnormálních myeloidních buněk v kostní dřeni. Mutace genu FLT3, včetně interních tandemových duplikací (ITD) a mutací tyrozinkinázové domény (TKD) (D835-I836), se vyskytují u 20–30 % případů AML, což vede ke konstitutivní aktivaci receptoru FLT3 a podporuje přežití a proliferaci leukemických buněk. Mutace FLT3-ITD jsou spojeny se špatnou prognózou, vyšší mírou relapsu a nižším celkovým přežitím, zatímco mutace FLT3-TKD mohou ovlivňovat odpověď na léčbu.

Celosvětově je AML diagnostikováno přibližně 120 000 nových případů ročně, s vysokou úmrtností. Ve Spojených státech je každý rok diagnostikováno více než 20 000 nových případů AML s odhadovaným počtem 11 000 úmrtí. V Indii je incidence AML 4–5 případů na 100 000 obyvatel, s vysokou úmrtností v důsledku pozdní diagnózy a omezeného přístupu k cílené terapii.

Mezi běžné příznaky patří přetrvávající únava, horečka, častá infekce, nevysvětlitelné podlitiny, krvácení a anémie.

Diagnostické metody pro mutace FLT3 zahrnují RT-PCR, Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace (NGS) a fragmentovou analýzu. RT-PCR nabízí rychlou, citlivou a specifickou detekci, což z ní činí zásadní nástroj pro identifikaci mutací FLT3 a řízení léčebných rozhodnutí. Inhibitory FLT3, jako je midostaurin a gilteritinib, významně zlepšily výsledky u pacientů s AML s mutací FLT3, což zdůrazňuje potřebu včasného a přesného screeningu mutací.

Přístroje kompatibilní se soupravou

- **One PCR:** Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited)
- Zajistěte, aby všechny používané přístroje byly řádně instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

Pokyny pro uchovávání a stabilitu

- Komponenty soupravy jsou expedovány při teplotě 10 °C až 30 °C a musí být uchovávány při teplotě 2 °C až 8 °C.
 - Všechny komponenty mají dobu použitelnosti 12 měsíců od data výroby.
 - Souprava zůstává stabilní do data expirace uvedeného na krabici nebo obalu, pokud je uchovávána podle těchto pokynů.
- ☀ Pro zachování optimální funkčnosti je nezbytné chránit soupravu před přímým slunečním zářením.

Odběr a příprava vzorku

- Odeberte vzorek plné krve do odběrových zkumavek s EDTA podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku soupravy pro odběr vzorků.
- Vzorky přepravujte podle pokynů uvedených v soupravě pro odběr vzorků a zajistěte, aby zůstaly při teplotě 2 °C až 8 °C.
- Se vzorky zacházejte opatrně, aby byla zachována jejich stabilita a zabránilo se teplotním výkyvům během přepravy.

One PCR: Ultra-Fast RT PCR System

Princip testu

Souprava FLT3-Q Real-Time PCR Kit využívá pokročilou technologii real-time PCR v kombinaci s analýzou na gelu ve dvoukumavkové PCR reakci ke kvalitativní detekci dvou klíčových mutací genu FLT3: mutace tyrozinkinázové domény (TKD) (D835Y) a interních tandemových duplikací (ITD) v extrahované DNA lidských klinických vzorků. Je speciálně navržena pro bezproblémovou integraci se systémem One PCR Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited), který automatizuje celý proces extrakce DNA a real-time PCR analýzy.

Souprava obsahuje dvě cartridge (Cartridge-1 a Cartridge-2), které obsahují proprietární činidla společnosti Genes 2Me potřebná pro extrakci nukleových kyselin a PCR amplifikaci. Test je dvoukumavkový test využívající speciálně navržené fluorescenční sondy a primery. **Zkumavka 1:** Detekce FLT3-TKD se provádí pomocí real-time PCR se sondou značenou barvivem FAM, zatímco interní kontrola je detekována sondou značenou barvivem HEX, což zajišťuje spolehlivost testu. **Zkumavka 2:** Detekce FLT3-ITD je založena na gelové elektroforéze PCR produktu, protože mutace ITD zahrnují inserce proměnlivé délky, které mění velikost ampliconu. Vzhledem k této variabilitě velikosti má tradiční sondová RT-PCR potíže s efektivní detekcí mutací ITD. Místo toho analýza PCR produktů na gelu umožňuje jasné odlišení vzorků divokého typu od ITD-pozitivních vzorků na základě posunu velikosti pruhů. Tento kombinovaný přístup zajišťuje citlivou, specifickou a přesnou detekci obou typů mutací, což usnadňuje diagnostiku AML a výběr léčby.

Během procesu amplifikace je fluorescence emitována a měřena systémem One PCR, což poskytuje výsledky v real time pro přesnou a včasnou diagnostiku.

Dodávaný materiál

Tabulka 1. (Pro 24 testů)

Obsah soupravy	Popis	Kód obsahu soupravy	Množství (G610025-3)
Cartridge FLT3-Q	Cartridge-1	G2MA3-2878-1	24 X 1T
	Cartridge-2 (RM 1, 2)	G2MA3-2879-1	24 X 1T
	Adaptér pro Cartridge-2	G2MA3-2880-1	24 X 1T
Pufry	Rekonstituční pufr	G2MA3-2817-1	1 X 1 ml
FLT3-Q PC	Pozitivní kontrola	G2MA3-0686-2	2 X 1T

Poznámka: Pokyny pro pipetování

Můžete opakovaně použít pipety s pevným objemem nebo použít pipety s nastavitelným objemem podle potřeby k dosažení požadovaného objemu.

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Souprava / nádoba pro odběr vzorků
- Mikropipeta s pevným objemem (Genes 2Me Private Limited)
- Jednorázové špičky s bariérovým filtrem (10 µl, 25 µl a 200 µl)
- Voda bez nukleáz (NFW)
- Jednorázové bezpudrové rukavice
- Mikrozukmavky
- One PCR Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited) (IG2M5001UF)

Postup testu

Kontrola kvality pro 24reakční soupravu

- Systém One PCR zjednodušuje celý proces tím, že kombinuje extrakci jednoho vzorku a real-time PCR amplifikaci v jednom běhu.
- Pro každý test se soupravou FLT3-Q Real-Time PCR Kit vyjměte ze soupravy Cartridge-1 a Cartridge-2.

Pracovní postup One PCR a podrobné instrukce:

Krok 1: Zapnutí přístroje

1. Zapněte přístroj:

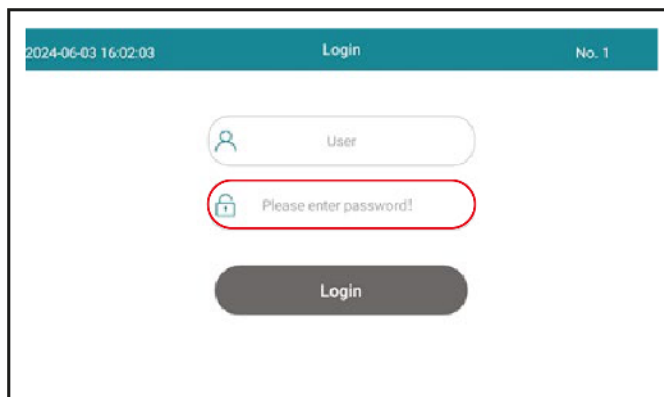
Vyhledejte vypínač na zadní straně přístroje One PCR a zapněte jej. Přístroj se spustí, inicializuje a provede vlastní test (Obrázek 1).



Obrázek 1: Přepněte vypínač do polohy „ON“ na zadní straně přístroje

2. Přihlášení do přístroje:

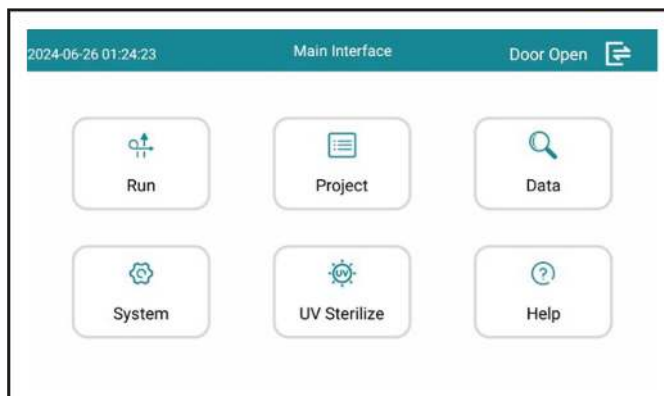
Po vyzvání zadejte přihlašovací údaje svého účtu (výchozí heslo: 1234) (Obrázek 2).



Obrázek 2: Přihlašovací rozhraní uživatele

3. Přístup do hlavního rozhraní:

Na hlavní obrazovce se zobrazí 6 možností: Run (Spustit), Project (Projekt), Data, System (Systém), UV Sterilize (UV sterilizace) a Help (Nápověda), společně s tlačítkem Door Open (Otevřít dveře) (Obrázek 3).

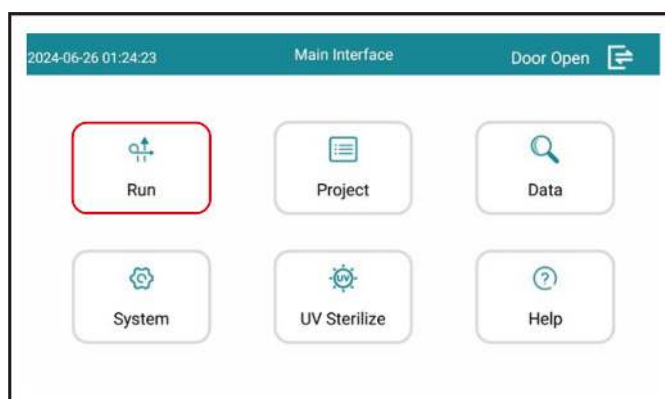


Obrázek 3: Hlavní rozhraní přístroje

Krok 2: Zadání údajů o pacientovi

1. Manuální zadání ID pacienta:

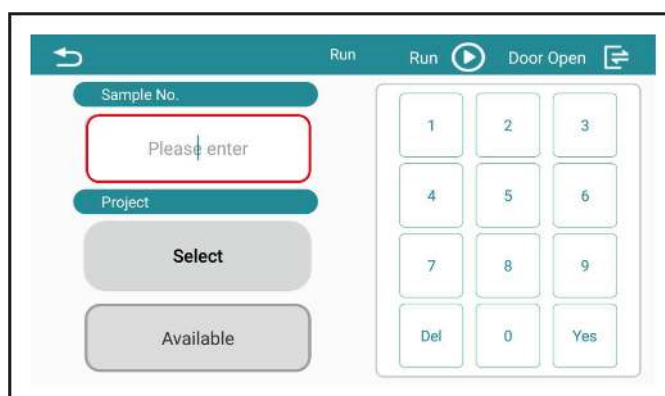
Přejděte na záložku „Sample“ (Vzorek) a zadejte ID pacienta (Obrázek 5).



Obrázek 5: Manuální zadání čísla vzorku / ID pacienta

2. Skenování ID pacientů:

Alternativně můžete pomocí čtečky čárových kódů zadat ID pacientů do sloupce „Sample No.“ (Číslo vzorku) (Obrázek 6).



Obrázek 6: Funkce čtečky čárových kódů pro automatizované zadání čísla vzorku / ID pacienta

4. Vyberte možnost „Run“:

Pro pokračování stiskněte možnost „Run“ (Obrázek 4).



Obrázek 4: Výběr možnosti „Run“ v hlavním rozhraní přístroje

3. Naskenujte QR kód Cartridge-1:

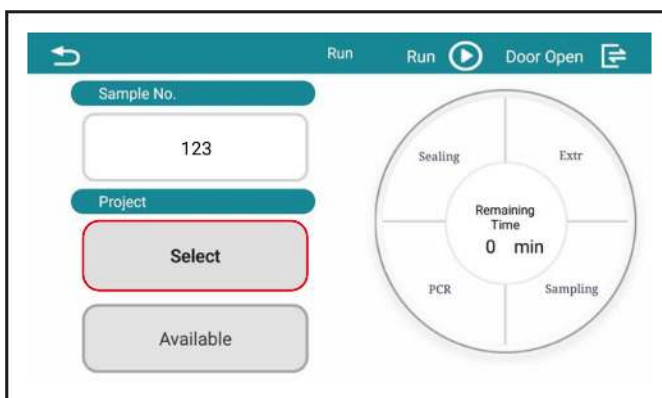
Zajistěte, aby byl QR kód na Cartridge-1 viditelný pro skenování. Naskenováním QR kódu se program automaticky vybere (Obrázek 7).



Obrázek 7: Skener QR kódu pro automatizovaný výběr programu

4. Manuální výběr programu:

Pokud skenování není možné, klikněte na „Select“ (Vybrat) a zvolte přednastavený program „FLT3-Q“ (Obrázek 8).



Obrázek 8: Manuální výběr programu z přednastaveného seznamu

Krok 3: Příprava cartridge

1. Připravte Cartridge-1:

Pevně poklepejte na Cartridge-1, aby se kapalina usadila, a zkontrolujte přítomnost vzduchových bublin (Obrázek 9).



Obrázek 9: Poklepání Cartridge-1 na desce stolu

2. Odloupněte fólii Cartridge-1:

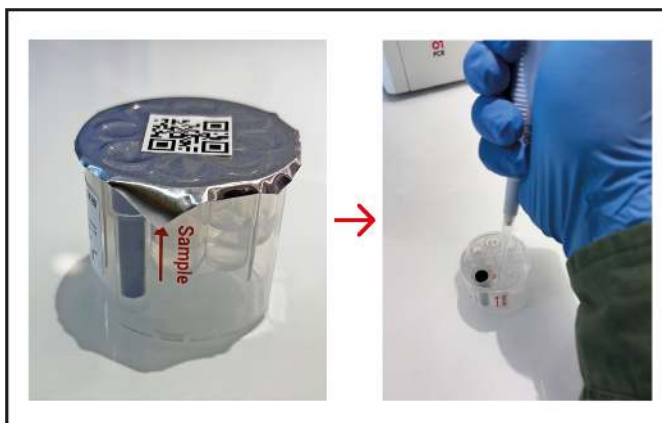
Opatrně odloupněte ochrannou fólii z Cartridge-1 (Obrázek 10).



Obrázek 10: Odloupnutí fólie Cartridge-1

3. Přidejte vzorek pacienta do Cartridge-1:

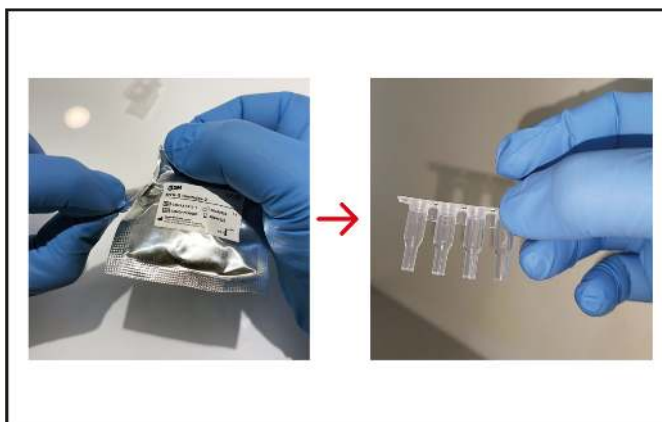
Do jamky „A“ Cartridge-1, označené červeně nápisem „Sample“ (Vzorek), přidejte 200 µl vzorku pacienta (Obrázek 11).



Obrázek 11: Přidání vzorku do jamky „Sample“ Cartridge-1

4. Připravte Cartridge-2:

Otevřete balení Cartridge-2. Poklepáním na Cartridge-2 usadíte lyofilizovaný materiál (Obrázek 12).



Obrázek 12: Otevření Cartridge-2

5. Přidejte rekonstituční pufr:

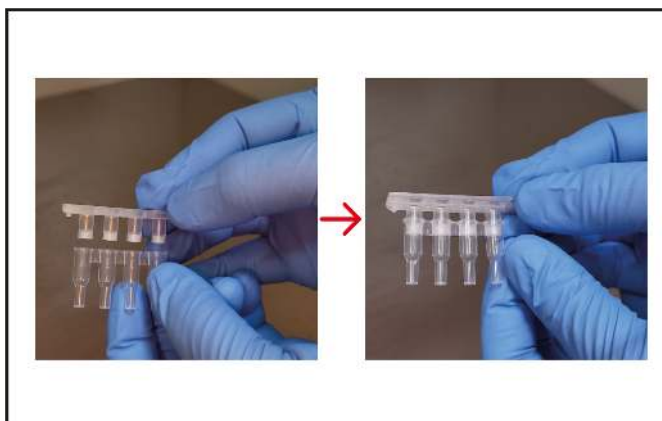
Odstraňte víčka zkumavek z Cartridge-2 a podle potřeby přidejte a důkladně promíchejte 10 μ l rekonstitučního pufru do pozic A a B (Obrázek 13).



Obrázek 13: Rekonstituce lyofilizovaných činidel v Cartridge-2

6. Připevněte Cartridge-2 k adaptéru:

Pro zpracování připevněte k Cartridge-2 dodaný adaptér pro zkumavky (Obrázek 14).



Obrázek 14: Připevnění adaptéru k Cartridge-2

7. Umístěte adaptér:

Zajistěte, aby prodloužená přechínající část adaptéru byla umístěna v pozici A (Obrázek 15).

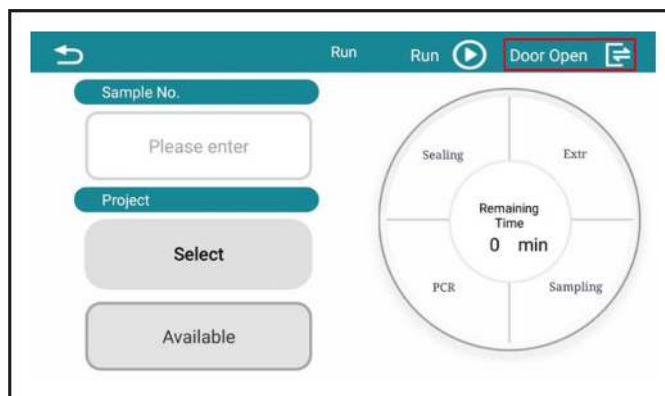


Obrázek 15: Správná orientace připevnění adaptéru na Cartridge-2

Krok 4: Vložení cartridge

1. Otevřete dvířka přístroje:

Stisknutím tlačítka „Door Open“ (Otevřít dveře) v pravém horním rohu obrazovky otevřete dvířka přístroje (Obrázek 16).



Obrázek 16: Otevření dvířek přístroje

2. Vložte Cartridge-1:

Pro správné umístění zarovnejte plochý výřez Cartridge-1 s plochou stranou přístroje (Obrázek 17).



Obrázek 17: Správná orientace pro vložení Cartridge-1 do přístroje

3. Vložte Cartridge-2:

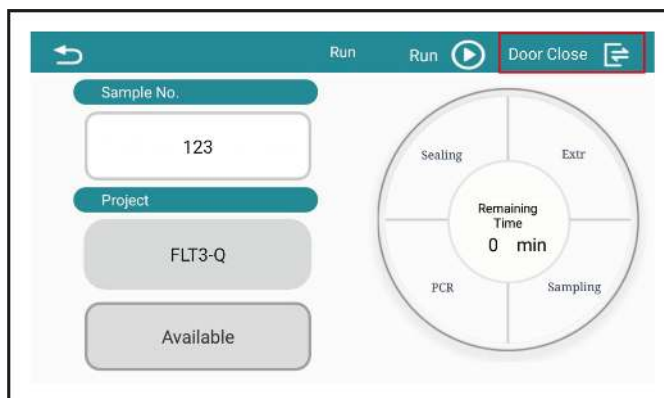
Umístěte Cartridge-2 do příslušné pozice (A, B, C a D) podle instalační příručky (Obrázek 18).



Obrázek 18: Správná orientace pro vložení Cartridge-2 do přístroje

3. Zavřete dvířka přístroje:

Stisknutím tlačítka „Door Close“ (Zavřít dveře) zavřete dvířka (Obrázek 19).

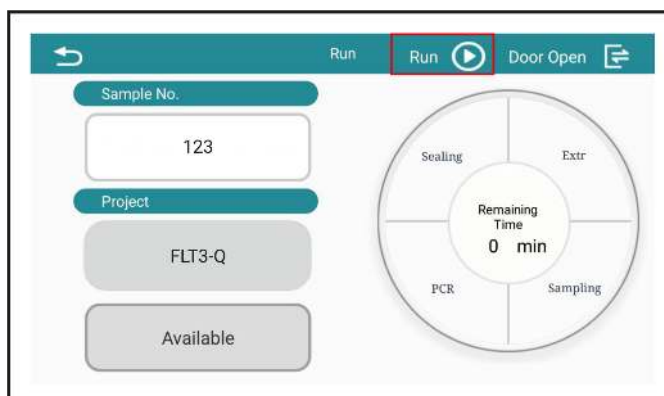


Obrázek 19: Zavření dvířek přístroje

Krok 5: Spuštění přístroje

1. Zahajte běh:

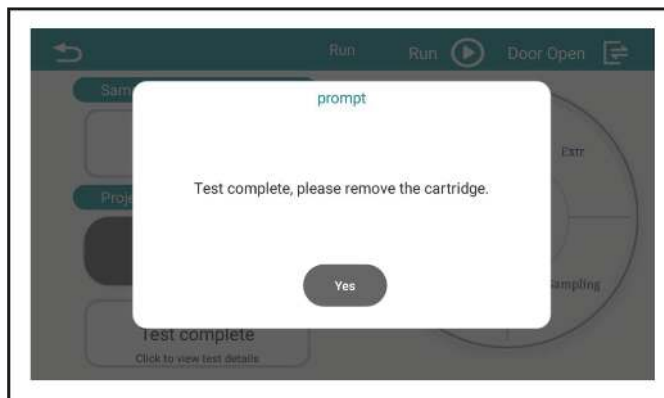
Stisknutím tlačítka „Run“ zahájíte extrakci vzorku a Real-Time PCR amplifikaci. Systém vzorky zpracuje automaticky (Obrázek 20).



Obrázek 20: Kliknutím na „Run“ zahájíte běh One PCR

2. Dokončení běhu:

Po dokončení běhu vyzve přístroj k vyjmutí cartridge (Obrázek 21).



Obrázek 21: Výzva přístroje k vyjmutí cartridge po dokončení běhu

Krok 6: Vyjmutí cartridge

Otevřete dvířka a opatrně vyjměte cartridge:

Po dokončení běhu otevřete dvířka a opatrně vyjměte Cartridge-1 i Cartridge-2 (Obrázek 22).

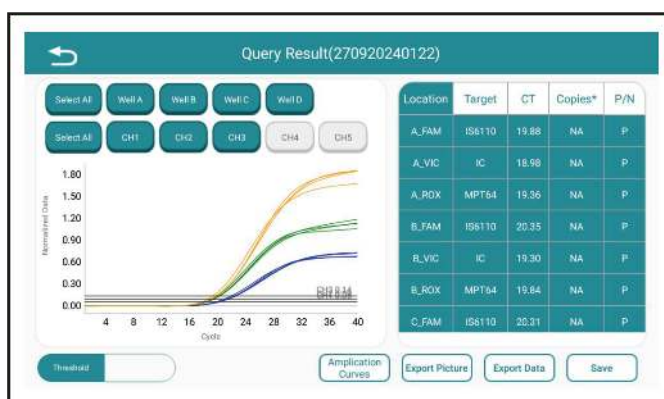


Obrázek 22: Otevření dvířek přístroje a vyjmutí cartridge

Krok 7: Zobrazení výsledků

1. Zobrazení výsledků:

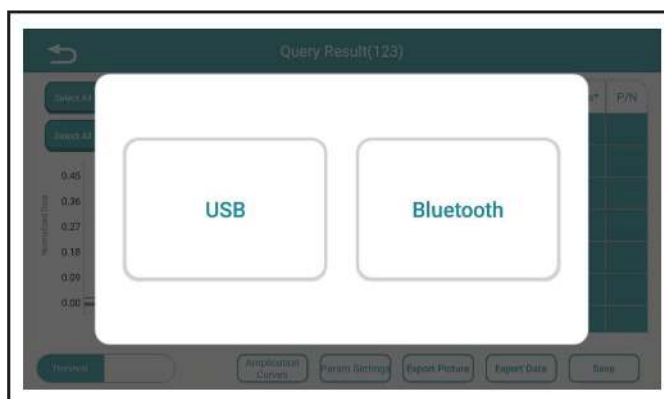
Po dokončení běhu software zobrazí výsledky pro každý vzorek jako pozitivní nebo negativní (P/N), včetně hodnot Ct a amplifikačních křivek (Obrázek 23).



Obrázek 23: Výsledky vygenerované softwarem One PCR po dokončení běhu

2. Export reportů:

Pomocí funkce „Export“ exportujte data prostřednictvím možností „USB“ nebo „Bluetooth“ (Obrázek 24).

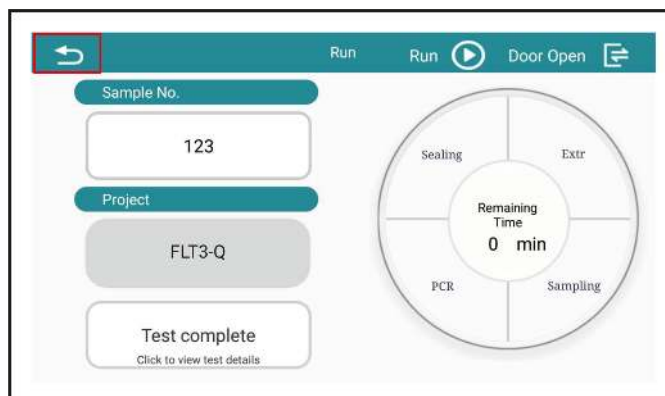


Obrázek 24: Možnosti exportu dat vygenerovaných po běhu

Krok 8: Zobrazení uložených výsledků

1. Přístup k předchozím běhům:

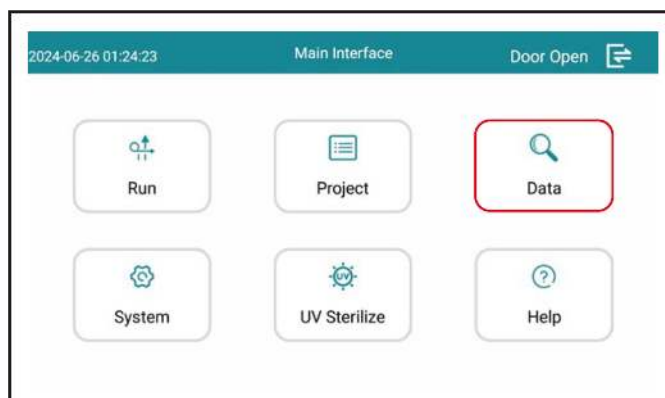
Kliknutím na ikonu „↶“ přejdete do hlavního rozhraní (Obrázek 25).



Obrázek 25: Přejchod do hlavního rozhraní pro přístup k předchozím běhům

2. Zobrazení dat:

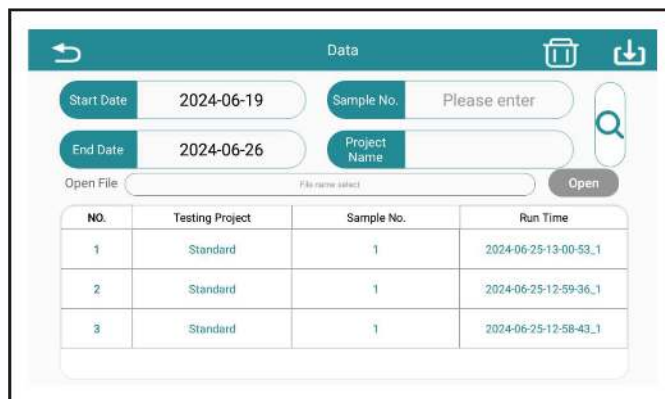
Vyberte možnost „Data“ pro zobrazení seznamu předchozích běhů (Obrázek 26).



Obrázek 26: Kliknutím na „Data“ v hlavním rozhraní zobrazíte uložené výsledky

3. Vyberte uložený běh k zobrazení:

Ze seznamu uložených běhů vyberte požadovaný soubor pro zobrazení dat a amplifikačních křivek daného běhu (Obrázek 27).



Obrázek 27: Výběr požadovaného běhu pro zobrazení dat a amplifikačních křivek

Krok 9: Vypnutí přístroje

1. Vypnutí:

Vypněte přístroj pomocí vypínače umístěného na zadní straně (Obrázek 28).



Obrázek 28: Přepnutí vypínače do polohy „off“ na zadní straně přístroje

Interpretace výsledků

Tabulka 2.

Cílové organismy		Signál real time PCR		
TKD Target (FAM)		-	+	-
Pozitivní kontrola (FAM)		+	+	-
Kontrola bez templátu		-	-	+/-
Interní kontrola (HEX)		+	+	-
Výsledek		Kvalitativně pozitivní výsledek	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Poznámka: Zkumavka 2: Detekce FLT3-ITD se provádí pomocí gelové elektroforézy PCR produktu.

Charakteristiky výkonu

Tabulka 3.

Č.	Parametry	Pozorování
1	Přesnost	Opakovatelnost v rámci běhu: CV 2,86 %
2		Opakovatelnost mezi dny: CV 2,90 %
3		Reprodukovatelnost mezi pracovišti: CV 3,15 %
4		Reprodukovatelnost mezi obsluhou: CV 3,13 %
5	Analytická senzitivita	Meze detekce: LOD TKD – 1 % frekvence genové mutace; ITD – 25 bp
6	Analytická specifická	Studie interference: hemoglobin – 2 g/l, NaCl – 150 mM a BSA – 0,2 % (w/v), lidská genomová DNA – $\geq 10^6$ kopií/ml → nebyla zjištěna žádná interference
7		Studie zkřížené reaktivity: gen KRAS – 1×10^6 kopií/ml, gen BRAF – 1×10^6 kopií/ml, gen EGFR – 1×10^6 kopií/ml → nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita
8	Klinická senzitivita	98 %
9	Klinická specifická	98 %

Výpočet klinického hodnocení			
Diagnostická přesnost			
Výsledek testu	Onemocnění přítomno	Onemocnění nepřítomno	Celkem
Pozitivní	TP=49	FP=1	TP+FP=50
Negativní	FN=1	TN=49	FN+TN=50
Celkem	TP+FN=50	FP+TN=50	100

TP: pravdivě pozitivní výsledek; FP: falešně pozitivní výsledek; TN: pravdivě negativní výsledek; FN: falešně negativní výsledek.

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 a různé pomůcky používané při testování musí být pravidelně dezinfikovány 1 % roztokem chlornanu sodného nebo 75 % alkoholem.
 - Tento test je určen pouze pro diagnostiku *in vitro*.
 - Se všemi klinickými vzorky zacházejte, jako by obsahovaly infekční agens; vždy používejte vhodné ochranné prostředky, včetně rukavic a laboratorních plášťů.
 - Postupy provádějte v dobře větraném prostoru a dodržujte pokyny pro odpovídající úroveň biologické bezpečnosti podle typu vzorku.
 - Zabraňte křížové kontaminaci používáním nových rukavic a pipetovacích špiček pro každý vzorek a kontrolu.
 - Veškerý biologicky nebezpečný odpad, jako jsou špičky, použité cartridge, rukavice apod., likvidujte v souladu s místními předpisy.
 - Zajistěte řádnou kalibraci a údržbu přístrojů, aby nedocházelo k chybným výsledkům.
 - Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
 - Uchovávejte činidla řádně při teplotě 2 °C až 8 °C a zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování.
 - Před použitím zajistěte, aby rekonstituční pufr a ostatní komponenty byly vyrovnány na pokojovou teplotu.
 - Používejte vodu bez nukleáz a certifikovaný spotřební materiál, abyste zabránili kontaminaci.
 - Nemíchejte činidla z různých šarží soupravy.
 - V případě rozlití dezinfikujte postižené místo vhodným dezinfekčním prostředkem a bezpečně zlikvidujte kontaminovaný materiál.
 - Nevystavujte soupravu přímému slunečnímu záření ani extrémním teplotám, protože by to mohlo ovlivnit její funkčnost.
 - Při odtrhávání krytu Cartridge-1 na ni jemně poklepejte, abyste zabránili vylití činidel; případné rozlití okamžitě očistěte.
 - Při manipulaci s Cartridge-1 se vyvarujte třesení nebo jejího obracení, aby nedošlo k úniku činidel.
 - Zajistěte správné plnění rekonstitučním pufrům do Cartridge-2: u jednozkumavkových testů přidejte do zkumavky A; u dvouzkumavkových testů do zkumavek A a B; u třízkumavkových testů do zkumavek A, B a C; u čtyřzkumavkových testů do zkumavek A, B, C a D.
 - Zajistěte, aby byla Cartridge-2 vložena do přístroje ve správné orientaci (A, B, C, D), aby nedošlo k záměně výsledků.
 - Při pipetování do jamek cartridge zajistěte přesné dávkování objemu, aby nedošlo k falešným výsledkům.
 - Zajistěte, aby byly cartridge v přístroji řádně usazeny; volné uložení může způsobit poruchu.
 - Pravidelně kalibrujte a udržujte přístroj One PCR, aby byl zajištěn přesný teplotní cyklus a detekce fluorescence.
 - 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.

Symbole použité na označení

Symbole	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