

GCP-Q Comprehensive

Real Time PCR Kit

pro gastrointestinální infekce

REF

G610003

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
GCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit pro gastrointestinální infekce	G610003-1	25T

Předchozí REF č.: G2M803621

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	4
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	6
12.	Varování a bezpečnostní opatření	9
13.	Omezení	10

Účel použití

GCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit pro gastrointestinální infekce je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci patogenů způsobujících gastrointestinální infekce v různých klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

GCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit pro gastrointestinální infekce je molekulární diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, který umožňuje rozlišit 14 hlavních původců gastrointestinálních infekcí. Patří mezi ně Astrovirus, Rotavirus, Norovirus genotyp I, Norovirus genotyp II, Adenovirus, Clostridium difficile, Campylobacter spp., Salmonella spp., enteroinvazivní E. coli (EIEC)/Shigella spp., verotoxigenní E. coli (VTEC), Yersinia enterocolitica, Entamoeba histolytica, Cryptosporidium spp. a Giardia duodenalis extrahovaní z lidských biologických vzorků, včetně vzorků stolice. Tento test je určen jako pomůcka při diagnostice infekcí způsobených původci gastrointestinálních infekcí v kombinaci s dalšími klinickými a laboratorními nálezy. Exogenous Internal Control Template je syntetická molekula DNA, která je součástí soupravy pro kontrolu inhibice PCR a celého procesu PCR. Ve všech zkumavkách Ready Mix je značena sondou Texas Red. Detekce je založena na fluorescenci emitované fluorofory značenými pro každý cíl a měření pomocí čtyřkanálového detekčního systému RT-PCR. Složení jednotlivých zkumavek je následující:

Ready Mix 1 obsahuje Taq DNA polymerázu, reverzní transkriptázu, PCR pufr a dNTP Mix, forward a reverse primery a duálně značené sondy specifické pro Astrovirus (HEX), Rotavirus (Cy5) a pro Exogenous Internal Control Template (Texas Red).

Ready Mix 2 obsahuje Taq DNA polymerázu, reverzní transkriptázu, PCR pufr a dNTP Mix, forward a reverse primery a duálně značené sondy specifické pro Norovirus genotyp I (FAM), Norovirus genotyp II (HEX), Adenovirus (Cy5) a pro Exogenous Internal Control Template (Texas Red).

Ready Mix 3 obsahuje Taq DNA polymerázu, PCR pufr a dNTP Mix, forward a reverse primery a duálně značené sondy specifické pro genomy Clostridium difficile (FAM), Campylobacter spp. (HEX), Salmonella spp. (Cy5) a pro Exogenous Internal Control Template (Texas Red).

Ready Mix 4 obsahuje Taq DNA polymerázu, PCR pufr a dNTP Mix, forward a reverse primery a duálně značené sondy specifické pro genomy verotoxigenní E. coli (VTEC) (FAM), enteroinvazivní E. coli (EIEC)/Shigella spp. (HEX), Yersinia enterocolitica (Cy5) a pro Exogenous Internal Control Template (Texas Red).

Ready Mix 5 obsahuje Taq DNA polymerázu, PCR pufr a dNTP Mix, forward a reverse primery a duálně značené sondy specifické pro Entamoeba histolytica (FAM), Cryptosporidium spp. (HEX), Giardia duodenalis (Cy5) a pro Exogenous Internal Control Template (Texas Red).

Souhrn

Zánět sliznice gastrointestinálního traktu se označuje jako gastroenteritida. Mezi běžné bakterie a viry způsobující gastroenteritidu patří Salmonella spp., Campylobacter spp., Norovirus, Adenovirus, Clostridium difficile a Rotavirus. Děti v rozvojových zemích jsou náchylnější k onemocnění a úmrtnosti. Gastroenteritida celosvětově postihuje 3 až 5 miliard dětí ročně a na její následky umírá 1,5 až 2,5 milionu dětí.

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 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics)
- Genes2Me RapiCycler 96 Real Time PCR System (Genes 2Me Private Limited)

Dodávaný materiál

Tabulka 1. (Pro 25 testů)

Obsah soupravy	Kód obsahu soupravy	Množství (G610003-1)
Ready Mix 1	G2MA3-0474-1	1 X 500 µl
Ready Mix 2	G2MA3-0475-1	1 X 500 µl
Ready Mix 3	G2MA3-0476-1	1 X 500 µl
Ready Mix 4	G2MA3-0477-1	1 X 500 µl
Ready Mix 5	G2MA3-0478-1	1 X 500 µl
Positive Control 1	G2MA3-0481-1	1 X 20 µl
Positive Control 2	G2MA3-0482-1	1 X 20 µl
Positive Control 3	G2MA3-0483-1	1 X 20 µl
Positive Control 4	G2MA3-0484-1	1 X 20 µl
Positive Control 5	G2MA3-0485-1	1 X 20 µl
RT Enzyme Mix	G2MA3-0479-1	1 X 14 µl
Exogenous Internal Control Template	G2MA3-0480-1	1 X 135 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-4	1 X 500 µl

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- MagNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M212121); SpiNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M131420), QIAamp® DNA Mini Kit (51304) a QIAamp Viral RNA Mini Kit (52904)
- Stolní mikrocetrifuga
- 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

- Vzorky žaludeční biopsie nebo stolice by měly být odebrány do sterilní nádoby a víčko utaženo podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku soupravy pro odběr vzorků.
- Po odběru by měl být vzorek okamžitě vložen do sterilní nádoby a co nejrychleji předán do laboratoře.
- Transportní médium může udržovat organismy po dlouhou dobu; doporučuje se, aby byly vzorky během přepravy chlazeny při teplotě 2–8 °C nebo uchovávány na mokrém ledu.
- Vzorky lze uchovávat až čtyři dny při teplotě 2 °C až 8 °C.

Příprava vzorku

- Extrakce cílové DNA/RNA z odebraných vzorků by měla probíhat podle doporučeného návodu dodaného s extrakční soupravou.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu 2 °C až 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.

Komponenta	Ready Mix 1	Ready Mix 2	Ready Mix 3	Ready Mix 4	Ready Mix 5
Ready Mix	19,75 µl	19,75 µl	20 µl	20 µl	20 µl
RT Enzyme Mix	0,25 µl	0,25 µl	-	-	-
Exogenous Internal Control Template*	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Vzorek DNA/RNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Konečný objem	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

*Exogenous Internal Control Template je syntetická molekula DNA odvozená z lidského genomu. Pokud je přidávána v kroku extrakce, měla by být přidána v množství 5 µl/vzorek. Pokud je přidávána přímo do PCR master mixu ke kontrole inhibice PCR, měla by být do každé reakce v Ready Mix přidána 0,2 µl Exogenous Internal Control Template.

- Zkumavku s qPCR reakcí připravte 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 reakci Negative Control (NC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž nukleovou kyselinu vzorku nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž ve všech pěti zkumavkách Positive Control nahradíte DNA vzorku 5 µl Positive Control (1–5) dodaného se soupravou.

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 Negative Control (NC), Positive Control a testovaný vzorek v pořadí.

Nastavení kanálů fluorescence

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

Tabulka 3.

Komponenty	FAM	HEX	Cy5	Texas Red
Ready Mix 1	-	Astrovirus	Rotavirus	Exogenous Internal Control
Ready Mix 2	Norovirus GI	Norovirus GII	Adenovirus	Exogenous Internal Control
Ready Mix 3	<i>C. difficile</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Exogenous Internal Control
Ready Mix 4	<i>E. coli</i> (VTEC)	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>Y. enterocolitica</i>	Exogenous Internal Control
Ready Mix 5	<i>E. histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia duodenalis</i>	Exogenous Internal Control

Nastavení teploty a cyklů PCR

- Definujte následující nastavení pro teplotní profil a PCR cykly. Uložte soubor a spusťte reakci (Tabulka 4).

Tabulka 4.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Reverzní transkripce a denaturace	1	50	15:00
		95	05:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	97	00:15
		60*	01:00
-	1	32	00:20

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály FAM, Cy5, Texas Red a HEX. Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

Hodnota Ct 30 se považuje za mezní hodnotu (cut-off) pro rozlišení mezi pozitivními a negativními výsledky. Hodnota nižší nebo rovna 30 se považuje za pozitivní.

Validace interní / exogenní kontroly

- Pro analýzu Exogenous Internal Control vybírejte pouze „testované vzorky“. Použijte barvivo Texas Red a zkontrolujte graf amplifikace Exogenous Internal Control.
- Exogenous Internal Control by nemělo být amplifikováno v negativní kontrole a pozitivních kontrolách, pokud bylo přidáno v kroku extrakce.
- Exogenous Internal Control by mělo být amplifikováno v negativní kontrole a pozitivních kontrolách, pokud bylo přidáno při přípravě reakce.

Validace Positive Control a Negative Control

- Vyberte NC (Negative Control) a PC (Positive Control), poté zvolte kanály FAM, Cy5, HEX a Texas Red pro zobrazení amplifikačních grafů.
- Všechny PC od PC1 do PC5 musí být amplifikovány pro všechny příslušné cíle v jejich příslušných fluorofórových kanálech.
- Jakákoli amplifikace v NC, jiná než v kanálu Texas Red (Exogenous Internal Control), znamená, že v reagenciích a experimentálním prostředí nedošlo ke kontaminaci a že byla použita správná pipetovací technika.
- Amplifikace v PC s hodnotou Ct ≤30 pro každý cíl a příslušný kanál potvrzuje, že reagentie byly řádně uchovávány podle stanovených podmínek uchovávání a experimentálních podmínek.
- **Poznámka:** Hodnota RFU pro jednotlivé cíle se může lišit v závislosti na použitém přístroji.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálech FAM, HEX, Cy5 a Texas Red postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Postupujte podle níže uvedené tabulky pro kvalitativní interpretaci výsledků (Tabulka 5).

Tabulka 5a (Ready Mix 1).

Cíl		qPCR signál				
Astrovirus Target Pathogen (HEX)		+	+	-	-	-
Rotavirus Target Pathogen (Cy5)		+	-	+	-	-
Exogenous Internal Control (Texas Red)		+/-	+/-	+/-	+	-
Výsledek		Pozitivní výsledek pro Astrovirus a Rotavirus	Pozitivní výsledek pro Astrovirus	Pozitivní výsledek pro Rotavirus	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5b (Ready Mix 2).

Cíl		qPCR signál							
Norovirus GI Target Pathogen (FAM)		+	+	+	-	+	-	-	-
Norovirus GII Target Pathogen (HEX)		+	+	-	+	-	+	-	-
Adenovirus Target Pathogen (Cy5)		+	-	+	+	-	-	+	-
Exogenous Internal Control (Texas Red)		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Výsledek		Pozitivní výsledek pro E. coli (VTEC) a EIEC/Shigella a Y. enterocolitica	Pozitivní výsledek pro E. coli (VTEC) a EIEC/Shigella	Pozitivní výsledek pro E. coli (VTEC) a Y. enterocolitica	Pozitivní výsledek pro EIEC/Shigella a Y. enterocolitica	Pozitivní výsledek pro E. coli (VTEC)	Pozitivní výsledek pro EIEC/Shigella	Pozitivní výsledek pro Y. enterocolitica	Negativní výsledek
									Neplatný výsledek

Tabulka 5c (Ready Mix 3).

Cíl		qPCR signál							
C. difficile Target Pathogen (FAM)		+	+	+	-	+	-	-	-
Campylobacter spp. Target Pathogen (HEX)		+	+	-	+	-	+	-	-
Salmonella spp. Target Pathogen (Cy5)		+	-	+	+	-	-	+	-
Exogenous Internal Control (Texas Red)		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Výsledek		Pozitivní výsledek pro C. difficile, Campylobacter spp. a Salmonella spp.	Pozitivní výsledek pro C. difficile a Campylobacter spp.	Pozitivní výsledek pro C. difficile a Salmonella spp.	Pozitivní výsledek pro Campylobacter spp. a Salmonella spp.	Pozitivní výsledek pro C. difficile	Pozitivní výsledek pro Campylobacter spp.	Pozitivní výsledek pro Salmonella spp.	Negativní výsledek
									Neplatný výsledek

Tabulka 5d (Ready Mix 4).

Cíl			qPCR signál							
<i>E. coli</i> (VTEC) Target Pathogen (FAM)			+	+	+	-	+	-	-	-
<i>EIEC/Shigella</i> Target Pathogen (HEX)			+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> Target Pathogen (Cy5)			+	-	+	+	-	-	+	-
Exogenous Internal Control (Texas Red)			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Výsledek			Pozitivní výsledek pro <i>E. coli</i> (VTEC) a <i>EIEC/Shigella</i> a <i>Y. enterocolitica</i>	Pozitivní výsledek pro <i>E. coli</i> (VTEC) a <i>EIEC/Shigella</i>	Pozitivní výsledek pro <i>E. coli</i> (VTEC) a <i>Y. enterocolitica</i>	Pozitivní výsledek pro <i>EIEC/Shigella</i> a <i>Y. enterocolitica</i>	Pozitivní výsledek pro <i>E. coli</i> (VTEC)	Pozitivní výsledek pro <i>EIEC/Shigella</i>	Pozitivní výsledek pro <i>Y. enterocolitica</i>	Negativní výsledek
										Neplatný výsledek

Tabulka 5e (Ready Mix 5).

Cíl			qPCR signál							
<i>E. histolytica</i> Target Pathogen (FAM)			+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Cryptosporidium</i> spp. Target Pathogen (HEX)			+	+	-	+	-	+	-	-
<i>G. duodenalis</i> Target Pathogen (Cy5)			+	-	+	+	-	-	+	-
Exogenous Internal Control (Texas Red)			+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Výsledek			Pozitivní výsledek pro <i>E. histolytica</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. a <i>G. duodenalis</i>	Pozitivní výsledek pro <i>E. histolytica</i> a <i>Cryptosporidium</i> spp.	Pozitivní výsledek pro <i>E. histolytica</i> a <i>G. duodenalis</i>	Pozitivní výsledek pro <i>Cryptosporidium</i> spp. a <i>G. duodenalis</i>	Pozitivní výsledek pro <i>E. histolytica</i>	Pozitivní výsledek pro <i>Cryptosporidium</i> spp.	Pozitivní výsledek pro <i>G. duodenalis</i>	Negativní výsledek
										Neplatný 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 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 zvládnutí 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

EC REP

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