

HPV-Q

Real-Time PCR Kit

REF

G610013

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
HPV-Q Real-Time PCR Kit	G610013-1	50T

Předchozí REF č.: G2M706721

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	6
12.	Charakteristiky výkonu	7
13.	Varování a bezpečnostní opatření	7
14.	Omezení	8

Účel použití

HPV-Q Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený ke kvalitativní detekci HPV-16, HPV-18 a 12 dalších vysoce rizikových genotypů HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) v klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

HPV-Q Real-Time PCR Kit je kvalitativní test určený k detekci 14 vysoce rizikových genotypů lidského papilomaviru (HPV), včetně HPV 16 a HPV 18, v klinických vzorcích. Tato souprava využívá technologii real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) a amplifikuje konzervované oblasti pomocí specifických sad primerů a sond zaměřených na extrahovanou virovou DNA HPV 16, HPV 18 a 12 dalších genotypů HPV, spolu s interní kontrolou lidského genu (Beta-Actin). Souprava umožňuje simultánní běh čtyř polymerizačních reakcí v jedné zkumavce, přičemž detekuje čtyři různé cíle. Detekci amplikonů umožňují oligonukleotidové sondy značené čtyřmi rozlišitelnými fluorescenčními barvami. Pro odlišnou detekci HPV16 a HPV18 jsou zahrnuty specifické sondy značené HEX a FAM, zatímco 12 sloučených vysoce rizikových genotypů (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) je značeno barvivem Texas Red; sonda cíle interní kontroly značená barvivem Cy5 navíc zajišťuje kvalitu extrahované DNA v průběhu celého procesu testu.

Souhrn

Infekce lidským papilomavirem (HPV) je malý neobalený dvouvláknový DNA virus, který se replikuje v jádru dlaždicových epitelových buněk a vyvolává hyperproliferativní léze. Infekce HPV je hlavní příčinou rakoviny děložního čípku a zároveň relevantním faktorem u dalších anogenitálních nádorů (anus, vulva, vagina a penis) a nádorů hlavy a krku. HPV se přenáší převážně sexuálním kontaktem a většina sexuálně aktivních žen a mužů se v určitém okamžiku svého života nakazí, přičemž někteří se mohou nakazit opakovaně. K dnešnímu dni bylo identifikováno 100 různých genotypů HPV, přičemž přibližně 40 z nich je známo, že infikuje lidskou anogenitální sliznici. HPV16 a HPV18 jsou hlavními genotypy odpovědnými za přibližně 70 % všech případů rakoviny děložního čípku na celém světě. Ačkoli většina infekcí HPV nakonec sama vymizí a většina prekancerózních lézí spontánně odezní, představují pro ženy vyšší riziko vzniku chronických prekancerózních lézí, které mohou progredovat do invazivní rakoviny děložního čípku. Ženy s oslabenou imunitou, například s neléčenou infekcí HIV, mají 6krát vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny děložního čípku.

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 (G610013-1)
Primer and Probe Mix	G2MA3-1806-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-1805-1	1 X 50 µl
qPCR Master Mix	G2MA3-0657-1	1 X 500 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-2	1 X 1,5 ml

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Souprava pro odběr vzorku – Cervi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott) nebo odběr moči se zkumavkou Colli-Pee (Novosanis), nebo souprava SurePath™ Vial and comb collection kit (BD), nebo vaginální SELF FLOQSwabs® (Copan)
- SpiNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M131420) NEBO MagNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M212121), Genes 2Me Private Limited, NEBO QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- 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

- Odeberte vzorek (moč, cervix nebo výtěry z cervikálního kanálu) podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku soupravy.
- Jakmile je vzorek výtěru odebrán, měl by být okamžitě vložen do transportní zkumavky 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 4 dny při teplotě 2 °C až 8 °C.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické DNA HPV by měla probíhat podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku extrakční soupravy. Extrahovaná DNA by měla být použita ihned, případně uchovávána při teplotě -20 °C, pokud je plánováno její pozdější použití.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyořte 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	Objem
qPCR Master Mix	10 µl
Primer and Probe Mix	01 µl
Vzorek DNA	09 µl
Konečný objem	20 µl

⚠ 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 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 ve zkumavce.

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.

Název cíle	Název detektoru	Reportér	Zhášeč
Human Papilloma Virus 16	HPV 16	HEX	Žádný
Human Papilloma Virus 18	HPV 18	FAM	Žádný
Human Papilloma Virus 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 & 68	HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 & 68	Texas Red	Žádný
Interní kontrola	IC	Cy5	Žádný

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)
Denaturace	1	50	02:00
		95	10:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	10	95	00:15
		62	00:20
	30	95	00:15
		58*	00:30

*Data amplifikace jsou sbírána při 58 °C po dobu 30 cyklů pro příslušné cílové kanály – FAM, Texas Red, HEX a Cy5.

- Po nastavení výše uvedených podmínek uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

Hodnota Ct nižší nebo rovna ≤ 28 se považuje za mezní hodnotu (cut-off) pro rozlišení mezi pozitivními a negativními výsledky. Hodnota nižší nebo rovna ≤ 28 se považuje za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Pro analýzu interní kontroly vybírejte pouze „testované vzorky“. Vyberte barvivo Cy5 a zkontrolujte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by neměla být amplifikována v NTC. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5 v NTC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte jamky negativní a pozitivní kontroly, zvolte kanály FAM, HEX, Texas Red a Cy5 a zkontrolujte graf amplifikace. NTC musí být plochý bez hodnoty Ct. V případě potřeby upravte prahovou hodnotu (threshold) těsně nad úroveň NTC. PC musí být amplifikován s hodnotou Ct 18 ± 3 pro kanály FAM, HEX, Texas Red a Cy5. Žádná amplifikace v NTC znamená, že v reagentech a experimentálním prostředí nedošlo ke kontaminaci a byla použita správná pipetovací technika.
- Amplifikace v PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání reagentů a parametry reakce.
- **Poznámka:** Relativní fluorescence cíle IC (Cy5) se může jevit nižší ve srovnání s ostatními cíli.

Kvalitativní interpretace výsledků

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

Tabulka 5.

Cíl	qPCR signál					
Human Papilloma Virus 16 (HEX)	+	+	-	-	-	-
Human Papilloma Virus 18 (FAM)	+	-	+	-	-	-
Human Papilloma Virus 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 & 68 (Texas Red)	+	-	-	+	-	-
Interní kontrola (Cy5)	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Výsledek	Pozitivní kontrola	Pozitivní výsledek pro HPV16	Pozitivní výsledek pro HPV18	Pozitivní výsledek pro HPV 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68	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 citlivost	100 %
2.	Analytická specifita	100 %
3.	Pravdivost (bias)	99 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 4 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 3,5 %
6.	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 1000 kopií/ml
8.	Rozsah měření	10 - 10 ⁹ kopií/reakce
9.	Linearita	R ² = 0,999
10.	Mezní hodnoty (cut-off)	Hodnota Ct: ≤28
11.	Kritéria pro odběr a manipulaci se vzorky	Řádné pokyny pro manipulaci
12.	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek [genomová DNA člověka, bilirubin a hemoglobin]	Dobře kontrolováno
13.	Křížové reakce (Herpes simplex virus 1 a 2 (HSV-1 a -2), cytomegalovirus (CMV), Chlamydia trachomatis)	Žádná křížová reaktivita
14.	Klinická citlivost	99 %
15.	Klinická specifita	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 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 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 rozliti 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.
- Nedotýkejte se vnitřních stěn jamek cartridge; používejte sterilní pipetovací špičky a rukavice.
- Zabraňte kontaminaci reagensů a vzorků heparinem, neboť může ovlivnit 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 důsledně 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