

JAK2-Q

Real Time PCR Kit

REF

G610029

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
JAK2-Q Real Time PCR Kit	G610029-1	50T

Předchozí REF č.: G2M802621

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	3
8.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	4
9.	Postup testu	4
10.	Nastavení přístroje pro real-time PCR	4
11.	Interpretace výsledků testu	5
12.	Charakteristiky výkonu	6
13.	Varování a bezpečnostní opatření	7
14.	Omezení	7

Účel použití

JAK2-Q Real Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci mutace v genu JAK2 v DNA extrahované z klinických vzorků.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

JAK2-Q Real Time PCR Kit je navržen jako jednozkumavkový systém real-time PCR obsahující specifické primery a fluorescenční sondy zaměřené na sekvenční pro detekci mutace V617F. JAK2-Q Real-Time PCR Kit umožňuje detekci bodové mutace 1849 (G->T) V617F v genu JAK2, která se vyskytuje s vysokou frekvencí u několika chronických myeloproliferativních onemocnění. Obsahuje reagenty a enzymy pro specifickou amplifikaci a pro detekci amplikonu specifické mutace 1849 (G->T) V617F ve fluorescenčním kanálu HEX. Dále obsahuje kontrolu divokého typu (wild type) v kanálu FAM, která identifikuje případnou inhibici PCR a purifikaci DNA.

Souhrn

Gen JAK2 hraje klíčovou roli v tvorbě krevních buněk. Specifická mutace tohoto genu, nazývaná V617F, je spojena s určitými krevními nádorovými onemocněními známými jako myeloproliferativní neoplazie (MPN). Tyto stavy způsobují, že kostní dřeň produkuje příliš mnoho krevních buněk, což vede k příznakům, jako je únava, krevní sraženiny, zvětšená slezina (splenomegalie), krvácení a trombóza. Ačkoli jsou k dispozici konvenční diagnostické metody, jako je krevní nátěr, biopsie kostní dřeně a cytogenetické studie, tyto mohou být invazivní, časově náročné nebo méně citlivé. JAK2-Q Real Time PCR Kit nabízí vysoce citlivé a specifické, neinvazivní řešení s rychlými výsledky, které umožňuje včasnou detekci, stratifikaci rizika, vedení léčby a monitorování onemocnění, což z něj činí pokročilý diagnostický nástroj pro management MPN. JAK2-Q Real Time PCR Kit je moderní test, který tuto mutaci detekuje rychle a přesně a pomáhá lékařům tyto stavy včas diagnostikovat a vést účinnou léčbu. Detekuje mutaci JAK2 V617F spojenou s myeloproliferativními neoplazmi (MPN), včetně polycythemia vera, esenciální trombocytemie a primární myelofibrózy, které převážně postihují dospělé nad padesát let.

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 (G610029-1)
JAK2 WT & Mut Primer & Probe Mix	G2MA3-1942-1	1 X 50 µl
Positive Control Template WT	G2MA3-1943-1	1 X 50 µl
Positive Control Template Mut	G2MA3-1944-1	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

- Souprava pro odběr vzorku EDTA
- MagNXT Tissue & Body Fluids NAE Extraction Kit (G2M212121-1XRT), Genes 2Me Private Limited, nebo QIAamp DNA Blood 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 vzorky krve podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku soupravy pro odběr vzorků.
- Přeprava odebraného vzorku by měla probíhat v souladu s pokyny uvedenými na příbalovém letáku dodaném se soupravou pro odběr vzorků.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické DNA by měla probíhat podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku soupravy.

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	Objem
qPCR Master Mix	10 µl
JAK2 WT & Mut Primer and Probe Mix	01 µl
RNase/DNase Free Water	04 µl
Vzorek DNA	05 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 Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek DNA nahradíte oběma templáty Positive Control samostatně (cílově specifický Positive Control Template pro WT a Mut Jak2).

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	Reportér	Zhášeč
JAK2 Wild Type	FAM	Žádný
JAK2 Mutant Type	HEX	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	95	03:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	45	95	00:15
		60*	01:00

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 45 cyklů pro příslušné cílové kanály – FAM a HEX.

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

Interpretace výsledků testu

Hodnota Ct 40 se považuje za mezní hodnotu (cut-off) pro rozlišení mezi pozitivními a negativními výsledky. Hodnota nižší nebo rovna 40 se považuje za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Pro analýzu kontroly divokého typu (wild type) vybírejte pouze „testované vzorky“. Vyberte barvivo FAM a zkontrolujte graf amplifikace interní kontroly. Kontrola divokého typu by neměla být amplifikována v No Template Control (NTC). Pozdní šumový amplifikační graf FAM v jamkách NTC a PC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte NTC a PC, zvolte kanály FAM a HEX a zkontrolujte amplifikační grafy. NTC musí být plochá křivka bez hodnot Ct. V případě potřeby upravte prahovou hodnotu (threshold) těsně nad úroveň NTC. PC musí být amplifikován s hodnotou Ct ≤28 pro JAK2 divokého typu v kanálu FAM a JAK2 mutovaného typu v kanálu HEX. Žádná amplifikace v NTC znamená, že v reagentiích a experimentálním prostředí nedošlo ke kontaminaci a byla použita správná pipetovací technika. Amplifikace v PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání reagentií a parametry reakce.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálech FAM a HEX 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			
JAK2 WT Primer/Probe (FAM)	+	-	+	-
JAK2 Mut Primer/Probe (HEX)	-	+	+	-
Výsledek	Pozitivní výsledek WT: Ve vzorku DNA je přítomna pouze alela WT	Pozitivní výsledek Mut: Ve vzorku DNA je přítomna pouze alela Mut	Heterozygotní pozitivní výsledek: Ve vzorku DNA jsou přítomny obě alely, WT i Mut	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)	97 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 4,5 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 4,5 %
6.	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	97 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 0,3 % mutace
8.	Rozsah měření	10 - 10 ⁹ kopií/reakce
9.	Linearita	R ² = 0,99
10.	Mezní hodnoty (cut-off)	Hodnota Ct: ≤40
11.	Kritéria pro odběr a manipulaci se vzorky	Řádné pokyny pro manipulaci
12.	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek (testováno s krví, nosními spreji a antibakteriálními léky; nebyl zjištěn žádný negativní dopad)	Dobře kontrolováno
13.	Křížové reakce (Influenza A/B, RSV, SARS-CoV-2 a Mycobacterium tuberculosis)	Žádná křížová reaktivita
14.	Klinická citlivost	96 %
15.	Klinická specifita	98 %

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 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 rozlítí těchto činidel postupujte podle vhodných postupů pro zvládání rozlítí.
- 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 reagentů 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 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