

LP-MP Multiplex

Real-Time PCR Kit

REF

G610007

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
LP-MP Multiplex Real-Time PCR Kit	G610007-1	50T

Předchozí REF č.: G2M707921

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

LP-MP Multiplex Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci bakteriální DNA *Legionella pneumophila* (LP) / *Mycoplasma pneumoniae* (MP) v klinických vzorcích (nasofaryngeální tekutina, sputum a výtěr z krku).

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

LP-MP Multiplex Real-Time PCR Kit je navržen jako jednozkumavkový test využívající technologii PCR k detekci bakteriální DNA *Legionella pneumophila* (LP) a *Mycoplasma pneumoniae* (MP) ve vzorcích lidských nasofaryngeálních (NP) nebo orofaryngeálních (OP) výtěrů. Směs primerů a sond LP-MP obsahuje specifické primery a fluorescenční sondy zaměřené na sekvence LP, MP a interní kontroly (IC). Sondy jsou značeny fluorescenčními reportérovými a zhasacími barvivy. Díky použití sond spojených s rozlišitelnými barvivy umožňuje tento systém paralelní kvalitativní detekci specifické DNA LP a MP v kanálech FAM a HEX/VIC a IC v kanálu Cy5 přístroje pro real-time PCR.

Souhrn

Legionella pneumophila je gramnegativní, aerobní bakterie, která je také jednou z hlavních příčin legionářské nemoci, závažné formy zápalu plic způsobené *L. pneumophila*, a rovněž mírnějšího onemocnění známého jako horečka Pontiac. Legionella se přenáší především prostřednictvím aerosolizovaných kapének vody. Mezi běžné zdroje patří klimatizační systémy, vířivky, chladicí věže a vodovodní systémy, zejména ve velkých budovách, jako jsou hotely, nemocnice a výletní lodě. Bakterie se vdechuje do plic, když osoba nadechne kontaminovanou mlhu, což vede k infekci. Časná diagnostika a včasná antibiotická léčba jsou nezbytné a diagnostiku lze provádět pomocí technik real-time PCR.

M. pneumoniae je aerobní gramnegativní bakterie postrádající buněčnou stěnu, která je odpovědná za vznik zápalu plic, zejména jeho mírnější formy, často označované jako „chodící zápal plic“. Je jedním z nejmenších známých volně žijících organismů a postrádá buněčnou stěnu, což ji odlišuje od mnoha jiných bakterií. *M. pneumoniae* se šíří respiračními kapénkami, když infikovaná osoba kašle nebo kýchá. Může se také šířit blízkým kontaktem s infikovanou osobou. *M. pneumoniae* je často diagnostikována na základě klinických symptomů, avšak k potvrzení detekce bakteriální DNA se používají laboratorní testy jako RT-PCR.

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 (G610007-1)
LP-MP Primer & Probe Mix	G2MA3-8140-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-8141-1	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

- 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 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

Odběr vzorku

- Vzorky z dýchacích cest (včetně nasofaryngeálních a orofaryngeálních výtěrů) by měly být odebrány do sterilní nádoby a víčko by mělo být utaženo podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku dodaném v sadě pro odběr vzorků.
- Po odběru by měl být vzorek okamžitě umístěn do sterilní nádoby a co nejrychleji odeslán do laboratoře.
- Transportní médium může udržet organismy po dlouhou dobu; doporučuje se, aby byly vzorky během přepravy chlazeny při teplotě 2 °C až 8 °C nebo uchovávány na mokrém ledu.
- Vzorky lze uchovávat až čtyři dny při teplotě mezi 2 °C a 8 °C.

Příprava vzorku

- Extrakce nukleové kyseliny specifického patogena respirační infekce by měla probíhat podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku soupravy / IFU.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu 2 °C -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
LP-MP Primer & Probe Mix	01 µl
qPCR Master Mix	10 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 výše uvedeného stejného nastavení reakce, přičemž vzorek DNA nahradíte vodou DNase Free Water.
- Pro Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek nukleové kyseliny (DNA) nahradíte cílově specifickou šablonou 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	Zháseč
<i>L. pneumophila</i>	FAM	Žádný
<i>M. pneumoniae</i>	HEX/VIC	Žádný
Interní kontrola	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	95	03:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	95	00:15
		60*	01:00

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – FAM, HEX/VIC a Cy5.

- Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

Hodnota Ct ≤35 by měla být považována za mezní hodnotu (cut-off) pro rozlišení mezi pozitivními a negativními výsledky. Hodnota nižší nebo rovna ≤35 se považuje za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Pro analýzu interní kontroly vybírejte pouze „testované vzorky“. Vyberte barvivo Cy5 a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by neměla být amplifikována v No Template Control (NTC) a Positive Control. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5 v NTC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte jamky No Template Control a Positive Control, zvolte kanály FAM, HEX/VIC 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 ≤28 pro každý cíl.
- 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.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálech FAM, HEX/VIC a Cy5 postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíl	qPCR signál			
<i>L. pneumophila</i> (FAM)	+	-	-	-
<i>M. pneumoniae</i> (HEX/VIC)	-	+	-	-
Interní kontrola (Cy5)	+/-	+/-	+	-
Výsledek	Pozitivní výsledek pro <i>L. pneumophila</i>	Pozitivní výsledek pro <i>M. pneumoniae</i>	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Charakteristiky výkonu

Tabulka 6.

Č.	Parametry	Pozorování
1.	Analytická citlivost	100 %
2.	Analytická specifita	100 %
3.	Pravdivost (bias)	99 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 2 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 2 %
6.	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 100 kopií/ml
8.	Rozsah měření	1 - 10 ⁹ kopií/reakce
9.	Linearita	R ² = 0,999
10.	Mezní hodnoty (cut-off)	Hodnota Ct: ≤35
11.	Kritéria pro odběr a manipulaci se vzorky	Řádné pokyny pro manipulaci
12.	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek [lidská genomová DNA, nosní sprej a antibakteriální léčba]	Dobře kontrolováno
13.	Křížové reakce (<i>Chlamydia pneumoniae</i> , VZV, <i>Neisseria meningitidis</i> a HSV 1 & 2)	Žádná křížová reaktivita
14.	Klinická citlivost	98 %
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 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 rozliti 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.
- 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