

Malaria-Q

Real-Time PCR Kit

REF

G610047

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
Malaria-Q Real-Time PCR Kit	G610047-1	50T

Předchozí REF č.: G2M706221

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

Malaria-Q Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci specifické DNA malarického parazita v klinických vzorcích (krev, sérum nebo plazma).

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

Malaria-Q Real-Time PCR Kit využívá pokročilou technologii real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) k amplifikaci konzervovaných oblastí v DNA malarického parazita, se specifickým zaměřením na extrahovanou DNA ze vzorků lidské plné krve. Souprava využívá specifické sady primerů a sond navržené k vazbě na tyto oblasti, což umožňuje přesnou detekci malarického parazita. Přítomnost parazita je detekována pomocí specifických fluorescenčních oligonukleotidových sond značených barvivem HEX, což zajišťuje vysokou citlivost i specifitu při identifikaci malarických parazitů ve vzorku pacienta. Souprava dále obsahuje cíl interní kontroly značený barvivem Cy5. Tato interní kontrola slouží ke sledování kvality DNA v průběhu celého procesu testu a zajišťuje spolehlivé a přesné výsledky.

Souhrn

Malárie, infekční onemocnění přenášené komáry, způsobené parazity rodu *Plasmodium*, představuje významnou hrozbu pro veřejné zdraví, zejména v tropických a subtropických oblastech. Přenáší se kousnutím infikovaných samic komára rodu *Anopheles* a onemocnění se typicky projeví během 10 až 15 dnů příznaky jako vysoká horečka, třesavka, bolest hlavy, bolesti svalů a únava. Mezi další příznaky mohou patřit nauzea, zvracení, průjem, anémie a žloutenka v důsledku destrukce červených krvinek. Strategie léčby se primárně zaměřují na kontrolu komárů a použití antimalarik. Přestože jsou vynakládány celosvětové snahy o kontrolu a eliminaci malárie, přetrvávají problémy, včetně vzniku parazitů rezistentních vůči lékům a komárů rezistentních vůči insekticidům. Techniky detekce malárie sahají od tradičních metod, jako je mikroskopie krevního nátěru, až po pokročilé molekulární metody, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR). Mikroskopie krevního nátěru, zlatý standard, zahrnuje barvení a vizuální vyšetření krevních vzorků pod mikroskopem za účelem identifikace malarických parazitů, avšak vyžaduje zkušený personál a nemusí být citlivá při nízkých úrovních parazitémie. Rychlé diagnostické testy (RDT) poskytují rychlé výsledky detekcí specifických malarických antigenů, avšak jejich přesnost se může lišit a jsou náchylné k falešně negativním výsledkům, zejména v oblastech s nízkým přenosem. PCR, zejména real-time PCR, vyniká jako nejlepší detekční metoda díky své vysoké citlivosti a specifitě. Amplifikuje DNA parazita, což umožňuje přesnou identifikaci i při nízké hustotě parazitů.

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 (G610047-1)
Malaria Primer & Probe Mix	G2MA3-2981-1	1 X 50 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	G2MA3-2982-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-2017-1	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

- SpiNXT Blood DNA Extraction kit (Cat. G2M181820) NEBO MagNXT Blood DNA isolation Kit (Cat. G2M181921) (Genes 2Me Private Limited) NEBO QIAamp DNA Mini Kit (Cat. 51304)
- 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

Typ vzorku

- Vzorky lidské plné krve.

Odběr vzorku

- Pro detekci malárie metodou RT-PCR odeberte 3-5 ml venózní krve do sterilní, označené zkumavky EDTA po očištění místa venepunkce antiseptikem. Vzorek jemně promíchejte a uchovávejte při 4 °C, pokud bude zpracován do 24 hodin, nebo zmrazte při -20 °C pro delší uchovávání. Zajistěte řádné označení a zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování, aby byla zachována integrita DNA. Dodržujte biobezpečnostní pokyny pro manipulaci a likvidaci a zahrňte do testu RT-PCR kontroly pro validaci výsledků, přičemž zajistěte, že reagenty jsou uchovávány správně a v rámci jejich doby použitelnosti.

Příprava vzorku a extrakce DNA

- Extrahujte DNA z plné krve pomocí vhodné extrakční soupravy podle doporučeného návodu dodaného v příbalovém letáku soupravy. Extrahovanou DNA použijte okamžitě nebo ji uchovávejte při -20 °C, pokud bude použita během několika hodin.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu 2 - 8 °C a před použitím krátce vortexujte po dobu 20 sekund.

Příprava reakční směsi

- Připravte reakční směs podle následující tabulky (Tabulka 2).

Tabulka 2.

Obsah soupravy	Objem
qPCR Master Mix	10 µl
Malaria Primer & Probe Mix	01 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	01 µl
Vzorek DNA	08 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 uvedeného, 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 8 µl Positive Control Template dodávané se soupravou. Okamžitě uzavřete víčko nebo zapečetěte destičku, abyste zabránili kontaminaci. Krátce zcentrifugujte a přistupte k provedení PCR reakce.

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	Zhášeč
Malaria	HEX	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 budou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – HEX 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 je považována za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Vyberte „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo Cy5 a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by neměla být amplifikována v No Template Control. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5 v jamkách NTC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte jamky No Template Control a Positive Control, vyberte kanál HEX a Cy5 a zobrazte graf amplifikace. NTC musí být plochá bez hodnoty Ct. V případě potřeby upravte prahovou hodnotu těsně nad NTC. PC musí být amplifikována s hodnotou Ct ≤ 28 pro kanál HEX a Cy5.
- Žádná amplifikace v NTC znamená absenci kontaminace v reagentech a experimentálním prostředí, jakož i správné pipetování.
- Amplifikace v PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání reagentů a parametry reakce.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu Cy5 a HEX postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou.
- Pro diagnostické účely by výsledky měly být vždy korelovány s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných diagnostických testů, klinické dojmy apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s dostupnými klinickými důkazy, doporučuje se provést doplňující testování k potvrzení výsledků (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cílové organismy	Signál qPCR		
<i>Malaria Target Pathogen (HEX)</i>	+	-	-
<i>Positive Control (HEX a Cy5)</i>	+	+	-
<i>Interní kontrola (Cy5)</i>	+	+	-
<i>No Template Control (NTC)</i>	-	-	+/-
Výsledek	Pozitivní výsledek na malárii	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Charakteristiky výkonu

Tabulka 6.

Č.	Parametry	Pozorování
1	Analytická citlivost	100 %
2	Analytická specifita	100 %
3	Pravdivost (bias)	98 %
4	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 2,5 %
5	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 2,5 %
6	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	99 %
7	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 500 kopií/ml
8	Rozsah měření	10 - 10 ⁹ kopií/reakce
9	Linearita	R ² = 0,998
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, cholesterol a hemoglobin)	Dobře kontrolováno
13	Křížové reakce [virus herpes simplex 1 a 2, cytomegalovirus (CMV), virus chikungunya a virus dengue]	Žádná křížová reaktivita
14	Klinická citlivost	98 %
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 rozlití 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