

MDR-Q

Real-Time PCR Kit (Antimicrobial Resistance)

REF

G610016

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
MDR-Q Real-Time PCR Kit (Antimicrobial Resistance)	G610016-1	50T

Předchozí REF č.: G2M707521

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	7
12.	Charakteristiky výkonu	10
13.	Varování a bezpečnostní opatření	11
14.	Omezení	11

Účel použití

MDR-Q Real-Time PCR Kit (Antimicrobial Resistance) se používá k detekci genů souvisejících s mnohočetnou lékovou rezistencí (rezistence vůči antimikrobiálním látkám – AMR) v lidských klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

MDR-Q Real-Time PCR Kit (Antimicrobial Resistance) je založen na technologii real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) pro kvalitativní detekci osmnácti genů antimikrobiální rezistence (AMR), včetně genů udělujících rezistenci vůči karbapenémům, vankomycinu, meticilinu, kolistinu, beta-laktamázám s rozšířeným spektrem účinku (ESBL), AmpC β-laktamáze, trimethoprimu/sulfamethoxazolu (SXT) a plazmidem zprostředkované rezistenci vůči chinolonům (PMQR). Test využívá specifické oligonukleotidové primery a duálně značené fluorescenční hydrolyzační sondy, které se váží na konzervované oblasti rezistentních genů. Každá sonda je na 5' konci značena reportérovým barvivem a na 3' konci zhášecem. Během PCR amplifikace se sondy hybridizují se svými komplementárními cíli DNA. Jak Taq polymeráza prodlužuje primery, štěpí navázanou sondu prostřednictvím své exonukleázové aktivity 5' → 3', čímž oddělí reportér od zhášecí, což vede ke zvýšení fluorescence úměrnému množství přítomné cílové DNA.

Test se provádí v pěti samostatných reakčních zkumavkách, z nichž každá je určena k detekci odlišné sady rezistentních genů:

Zkumavka 1: Cílí na geny rezistence vůči karbapenémům: včetně VIM značeného FAM, OXA-48 značeného HEX, IMP s Texas Red/ROX a NDM značeného Cy5.

Zkumavka 2: Cílí na geny rezistence vůči vankomycinu a ESBL, včetně genu rezistence vůči meticilinu mecA značeného FAM, CTX-M značeného HEX, vanA značeného Texas Red/ROX a genu rezistence vůči kolistinu MCR-1 značeného Cy5.

Zkumavka 3: Cílí na geny rezistence vůči vankomycinu a ESBL, včetně TEM značeného FAM, vanB značeného HEX, SHV značeného Texas Red/ROX a genu rezistence AmpC β-laktamáze citM značeného Cy5.

Zkumavka 4: Cílí na geny rezistence vůči trimethoprimu/sulfamethoxazolu (SXT), včetně dfrA1 značeného FAM, dfrA5 značeného HEX a sul2 značeného Texas Red/ROX a genu plazmidem zprostředkované rezistence vůči chinolonům (PMQR) aac6'-Ib-cr značeného Cy5.

Zkumavka 5: Cílí na geny rezistence vůči karbapenémům: včetně KPC značeného FAM, OXA-23 značeného HEX a interní kontroly značené Cy5.

Souhrn

Antimikrobiální léková rezistence (AMR) označuje schopnost mikroorganismů, včetně bakterií, virů, hub a parazitů, odolávat účinkům léků určených k jejich zničení nebo potlačení jejich růstu. Tento jev představuje závažnou globální hrozbu pro zdraví, neboť narušuje účinnost antibiotik, antivirotik, antimykotik a antiparazitik, čímž ztěžuje léčbu infekcí a zvyšuje riziko závažného onemocnění, komplikací a úmrtí. Účinná léčba infekce závisí na přesné identifikaci patogenu(ů) a správné volbě antibiotik. Přesné profilování antimikrobiální citlivosti (AST) patogenu je proto pro léčbu základního onemocnění zásadní.

Tato souprava obsahuje komplexní soubor činidel a protokolů pro přesnou a účinnou detekci a rozlišení genů antimikrobiální rezistence kódujících rezistenci vůči antibiotikům – karbapenémům, vankomycinu, meticilinu, kolistinu, beta-laktamázám s rozšířeným spektrem účinku (ESBL), AmpC β-laktamáze, trimethoprimu/sulfamethoxazolu (SXT) a plazmidem zprostředkované rezistenci vůči chinolonům (PMQR) pomocí systému Real Time 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 (G610016-1)
Primer and Probe Mix 1	G2MA3-3047-1	1 X 50 µl
Primer and Probe Mix 2	G2MA3-3048-1	1 X 50 µl
Primer and Probe Mix 3	G2MA3-3049-1	1 X 50 µl
Primer and Probe Mix 4	G2MA3-3050-1	1 X 50 µl
Primer and Probe Mix 5	G2MA3-3051-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-3052-1	1 X 250 µl
qPCR Master Mix	G2MA3-0658-2	1 X 1 ml
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-1	3 X 1 ml

- Komponenty v soupravách z různých šarží nelze vzájemně zaměňovat.

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Souprava pro odběr vzorků
- MagNXT Tissue & body fluids Nucleic acid extraction kit (G2M212121) (Genes 2Me Private Limited) NEBO QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- 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

- Odeberte plnou krev podle platných norem a pokynů.

Odběr vzorku

- Odeberte plnou krev podle platných norem a pokynů.
- Přeppravujte vzorky při teplotě 2-8 °C a uchovávejte při 4 °C.
- Zpracujte vzorky do 36 hodin pro dosažení přesných výsledků.
- Manipulujte se vzorky a uchovávejte je pečlivě, aby byla zachována jejich stabilita.
- Zajistěte konstantní teplotu během přepravy, aby se zabránilo změnám.

Příprava vzorku

- Extrahujte DNA ze vzorku pomocí komerčně dostupné soupravy pro extrakci virové DNA a postupujte podle všech pokynů dodaných se soupravou.

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 v oblasti pro přípravu činidel (Tabulka 2).

Tabulka 2.

Obsah soupravy	Zkumavka 1	Zkumavka 2	Zkumavka 3	Zkumavka 4	Zkumavka 5
qPCR Master Mix	04 µl	04 µl	04 µl	04 µl	04 µl
Primer and Probe Mix 1	01 µl	-	-	-	-
Primer and Probe Mix 2	-	01 µl	-	-	-
Primer and Probe Mix 3	-	-	01 µl	-	-
Primer and Probe Mix 4	-	-	-	01 µl	-
Primer and Probe Mix 5	-	-	-	-	01 µl
RNase/DNase Free Water	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Sample DNA	05 µl	05 µl	05 µl	05 µl	05 µl
Konečný objem	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	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 uvedeného, přičemž vzorek DNA nahradíte specifickou 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.

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 3a, Tabulka 3b, Tabulka 3c, Tabulka 3d a Tabulka 3e).

Tabulka 3a (Zkumavka 1).

Cílový název	Reportér	Zhášeč
VIM	FAM	Žádný
OXA-48	HEX	Žádný
IMP	Texas Red	Žádný
NDM	Cy5	Žádný

Tabulka 3b (Zkumavka 2).

Cílový název	Reportér	Zhášec
<i>mecA</i>	FAM	Žádný
<i>CTX-M</i>	HEX	Žádný
<i>vanA</i>	Texas Red	Žádný
<i>MCR-1</i>	Cy5	Žádný

Tabulka 3c (Zkumavka 3).

Cílový název	Reportér	Zhášec
<i>TEM</i>	FAM	Žádný
<i>vanB</i>	HEX	Žádný
<i>SHV</i>	Texas Red	Žádný
<i>citM</i>	Cy5	Žádný

Tabulka 3d (Zkumavka 4).

Cílový název	Reportér	Zhášec
<i>dfrA1</i>	FAM	Žádný
<i>dfrA5</i>	HEX	Žádný
<i>sul2</i>	Texas Red	Žádný
<i>aac6'-Ib-cr</i>	Cy5	Žádný

Tabulka 3e (Zkumavka 5).

Cílový název	Reportér	Zhášec
<i>KPC</i>	FAM	Žádný
<i>OXA-23</i>	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	35	95	00:15
		62*	01:00

*Data amplifikace budou sbírána při 62 °C po dobu 35 cyklů pro cílové kanály – FAM, HEX, Texas Red a Cy5.

- Po nastavení výše uvedených podmínek 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 vzorky. Hodnota nižší nebo rovna 35 je považována za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Vyberte pouze „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly ve zkumavce 5. Vyberte barvivo Cy5 pro zobrazení grafu amplifikace interní kontroly.
- Interní kontrola by neměla být amplifikována v No Template Control. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5 v jamce NTC ve zkumavce 5 ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte NTC a Positive Control Template, vyberte FAM, HEX, Texas Red 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 kanály FAM, HEX, Texas Red a Cy5 ve zkumavce 1, 2, 3 a 4 a pro kanály FAM, HEX a Cy5 ve zkumavce 5.
- NTC potvrzuje absenci kontaminace v reagentcích, jakož i správné pipetování a jeho prostředí. PC potvrzuje podmínky uchovávání reagentcií a parametry reakce podle předpisu.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu FAM, HEX, Texas Red a Cy5 postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou (Tabulka 5a, Tabulka 5b, Tabulka 5c, Tabulka 5d a Tabulka 5e).

Tabulka 5a (zkumavka 1).

Cílové organismy	Signál qPCR					
VIM (FAM)	+	-	-	-	-	-
OXA-48 (HEX)	-	+	-	-	-	-
IMP (Texas Red)	-	-	+	-	-	-
NDM (Cy5)	-	-	-	+	-	-
Positive Control (FAM, HEX, Texas Red & Cy5)	+	+	+	+	+	-
No Template Control (NTC)	-	-	-	-	-	+/-
Výsledek	Pozitivní výsledek na VIM	Pozitivní výsledek na OXA-48	Pozitivní výsledek na IMP	Pozitivní výsledek na NDM	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5b (zkumavka 2).

Cílové organismy		Signál qPCR					
<i>mecA</i> (FAM)		+	-	-	-	-	-
<i>CTX-M</i> (HEX)		-	+	-	-	-	-
<i>vanA</i> (Texas Red)		-	-	+	-	-	-
<i>MCR-1</i> (Cy5)		-	-	-	+	-	-
Positive Control (FAM, HEX, Texas Red & Cy5)		+	+	+	+	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-	-	-	+/-
Výsledek		Pozitivní výsledek na <i>mecA</i>	Pozitivní výsledek na <i>CTX-M</i>	Pozitivní výsledek na <i>vanA</i>	Pozitivní výsledek na <i>MCR-1</i>	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5c (zkumavka 3).

Cílové organismy		Signál qPCR					
<i>TEM</i> (FAM)		+	-	-	-	-	-
<i>vanB</i> (HEX)		-	+	-	-	-	-
<i>SHV</i> (Texas Red)		-	-	+	-	-	-
<i>citM</i> (Cy5)		-	-	-	+	-	-
Positive Control (FAM, HEX, Texas Red & Cy5)		+	+	+	+	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-	-	-	+/-
Výsledek		Pozitivní výsledek na <i>TEM</i>	Pozitivní výsledek na <i>vanB</i>	Pozitivní výsledek na <i>SHV</i>	Pozitivní výsledek na <i>citM</i>	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5d (zkumavka 4).

Cílové organismy		Signál qPCR					
<i>dfrA1</i> (FAM)		+	-	-	-	-	-
<i>dfrA5</i> (HEX)		-	+	-	-	-	-
<i>sul2</i> (Texas Red)		-	-	+	-	-	-
<i>aac6'-lb-cr</i> (Cy5)		-	-	-	+	-	-
Positive Control (FAM, HEX, Texas Red & Cy5)		+	+	+	+	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-	-	-	+/-
Výsledek		Pozitivní výsledek na <i>dfrA1</i>	Pozitivní výsledek na <i>dfrA5</i>	Pozitivní výsledek na <i>sul2</i>	Pozitivní výsledek na <i>aac6'-lb-cr</i>	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 5e (zkumavka 5).

Cílové organismy		Signál qPCR			
<i>KPC</i> (FAM)		+	-	-	-
<i>OXA-23</i> (HEX)		-	+	-	-
Interní kontrola (Cy5)		+	+	+	-
Positive Control (FAM & HEX)		+	+	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-	+/-
Výsledek		Pozitivní výsledek na <i>KPC</i>	Pozitivní výsledek na <i>OXA-23</i>	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

⚠ Pro diagnostické účely by výsledky měly být vždy používány v kombinaci s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných testů, klinické dojmy apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s klinickými důkazy, 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)	98 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 3 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 3 %
6.	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 100 kopií/ml
8.	Rozsah měření	10 - 10 ⁹ kopií/reakce
9.	Linearita	R ² = 0,998
10.	Mezní hodnoty (cut-off)	Hodnota Ct: ≤36
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, NaCl a BSA a plná krev)	Dobře kontrolováno
13.	Křížové reakce (Mycobacterium tuberculosis, Haemophilus influenzae a meticilin-senzitivní Staphylococcus)	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 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 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.

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