

PML-RARA

Real-Time PCR Kit

PML-RARA Real-Time PCR Kit for One PCR

REF

G610024

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
PML-RARA Real-Time PCR Kit	G610024-3	24T

Předchozí REF č.: G2M708821

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.	Souhrn	3
4.	Přístroje kompatibilní se soupravou	3
5.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	3
6.	Odběr a příprava vzorku	3
One PCR Ultra-Fast RT PCR System		
•	Princip testu	4
•	Dodávaný materiál	4
•	Materiál potřebný, ale nedodávaný	4
•	Postup testu	4
7	Interpretace výsledků	15
8	Charakteristiky výkonu	16
9	Varování a bezpečnostní opatření	17
10	Omezení	18

Účel použití

PML-RARA Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci fúzního transkriptu PML-RARA včetně izoform bcr1, bcr2 a bcr3 v lidských klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Souhrn

Akutní promyelocytární leukemie (APL), podtyp akutní myeloidní leukemie (AML-M3), je charakterizována unikátní genetickou anomálií, při které dochází k translokaci mezi chromosomy 15 a 17. Tato fúze spojuje gen pro receptor alfa kyseliny retinové (RARA) na chromosomu 17 s genem PML na chromosomu 15. Fúze vzniká na různých zlomových místech, což vede ke třem odlišným fúzním transkriptům označovaným jako BCR1, BCR2 a BCR3. BCR1, přítomný u přibližně 50–55 % případů, spojuje exon 6 genu PML s exonem 3 genu RARA. BCR2, vyskytující se u 5–10 % případů, zahrnuje variabilní část exonu 6 genu PML spojenou s exonem 3 genu RARA. BCR3, přítomný u 30–40 % případů, spojuje exon 3 genu PML s exonem 3 genu RARA. Tato zlomová místa vytvářejí fúzní transkripty různých délek, označované jako dlouhá, variantní a krátká forma.

Přístroje kompatibilní se soupravou

- One PCR Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited)
- Zajistěte, aby všechny používané přístroje byly řádně instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

Pokyny pro uchovávání a stabilitu

- Komponenty soupravy jsou expedovány při teplotě 10 °C až 30 °C a musí být uchovávány při teplotě 2 °C až 8 °C.
- Všechny komponenty mají dobu použitelnosti 12 měsíců od data výroby.
- Souprava zůstává stabilní do data expirace uvedeného na krabici nebo obalu, pokud je uchovávána podle těchto pokynů.

☀ Pro zachování optimální funkčnosti je nezbytné chránit soupravu před přímým slunečním zářením.

Odběr a příprava vzorku

- Odebírejte vzorky periferní krve a/nebo kostní dřeně do zkumavek s EDTA podle pokynů uvedených v soupravě.
- Přpravujte vzorky při teplotě 2–8 °C a uchovávejte při teplotě 4 °C.
- Vzorky zpracujte do 72 hodin, ideálně do 36 hodin.
- Krev pro extrakci RNA nezmrazujte.
- Se vzorky zacházejte a uchovávejte je opatrně, aby byla zachována jejich stabilita.
- Zajistěte stálou teplotu během přepravy, aby nedošlo ke změnám.

One PCR: Ultra-Fast RT PCR System

Princip testu

PML RARA-Q Real-Time PCR Kit využívá pokročilou technologii real-time PCR k detekci fúzního transkriptu PML-RARA včetně izoform bcr1, bcr2 a bcr3 v lidských klinických vzorcích. Je speciálně navržena pro bezproblémovou integraci se systémem One PCR Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited), který automatizuje celý proces extrakce nukleových kyselin a real-time PCR analýzy.

Jedná se o třízkumavkový multiplexní test využívající specifické primery a fluorescenční sondy k detekci izoform fúzního transkriptu PML-RARA. Zkumavka Ready Mix obsahuje primery, sondy a všechny nezbytné komponenty PCR k detekci izoformy bcr1 (FAM) v Ready Mix 1, bcr2 (HEX) v Ready Mix 2 a bcr3 (FAM) v Ready Mix 3, přičemž souprava obsahuje interní kontrolu (IC) označovanou ABL1, značenou barvivem Texas Red v každé zkumavce, detekovanou v příslušných kanálech.

Během procesu amplifikace je fluorescence emitována a měřena systémem One PCR, což poskytuje výsledky v real time pro přesné a včasné výsledky.

Dodávaný materiál

Tabulka 1. (Pro 24 testů)

Obsah soupravy	Popis	Kód obsahu soupravy	Množství (G610024-3)
PML-RARA Cartridge	PML-RARA Cartridge-1	G2MA3-2575-1	24 X 1T
	PML-RARA Cartridge-2 (RM 1, 2, 3)	G2MA3-2970-1	24 X 1T
	Adaptor Cartridge-2	G2MA3-2577-1	24 X 1T
Pufry	Reconstitution Buffer	G2MA3-2817-1	2 X 1 ml
PML-RARA PC	Pozitivní kontrola	G2MA3-1873-1	2 X 1T

Poznámka: Pokyny pro pipetování

Můžete opakovaně použít pipety s pevným objemem nebo použít pipety s nastavitelným objemem podle potřeby k dosažení požadovaného objemu.

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Souprava / nádoba pro odběr vzorků
- Mikropipeta s pevným objemem (Genes 2Me Private Limited)
- Jednorázové špičky s bariérovým filtrem (10 µl, 25 µl a 200 µl)
- Voda bez nukleáz (NFW)
- Jednorázové bezpudrové rukavice
- Mikrozukmavky
- One PCR Ultra-Fast RT PCR System (Genes 2Me Private Limited) (IG2M5001UF)

Postup testu

Kontrola kvality pro 24reakční soupravu

- Systém One PCR zjednodušuje celý proces tím, že kombinuje extrakci jednoho vzorku a real-time PCR amplifikaci v jednom běhu.
- Pro každý test se soupravou PML-RARA Real-Time PCR Kit vyjměte z krabice soupravy Cartridge-1 a Cartridge-2.
- Před zahájením testování zajistěte provedení následujících kontrol kvality pro každou 24reakční soupravu:
- **Kontrola bez templátu (NTC):** Jako vzorek pro validaci NTC použijte 200 µl vody bez nukleáz (NFW). Tím se ověří, že v nepřítomnosti cílové RNA nedochází ke kontaminaci ani amplifikaci.
- **Pozitivní kontrola (PC):** Přidejte 200 µl NFW do zkumavky s lyofilizovanou PC a použijte ji jako pozitivní vzorek k validaci funkčnosti testu.

Pracovní postup One PCR a podrobné instrukce:

Krok 1: Zapnutí přístroje

1. Zapněte přístroj:

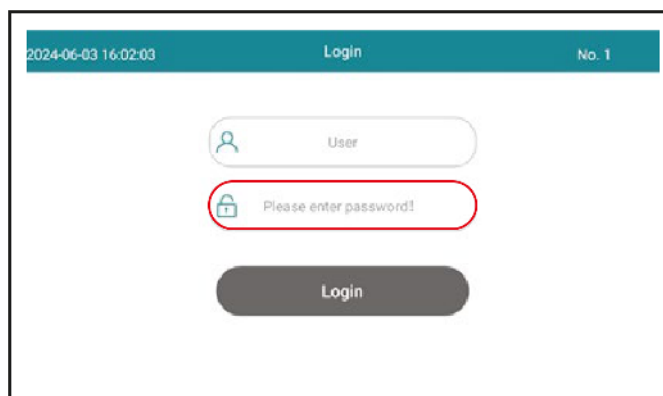
Vyhledejte vypínač na zadní straně přístroje One PCR a zapněte jej. Přístroj se spustí, inicializuje a provede vlastní test (Obrázek 1).



Obrázek 1: Přepněte vypínač do polohy „ON“ na zadní straně přístroje

2. Přihlášení do přístroje:

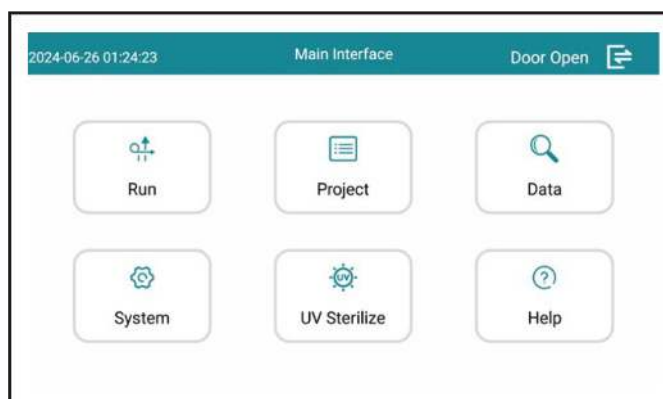
Po vyzvání zadejte přihlašovací údaje svého účtu (výchozí heslo: 1234) (Obrázek 2).



Obrázek 2: Přihlašovací rozhraní uživatele

3. Přístup do hlavního rozhraní:

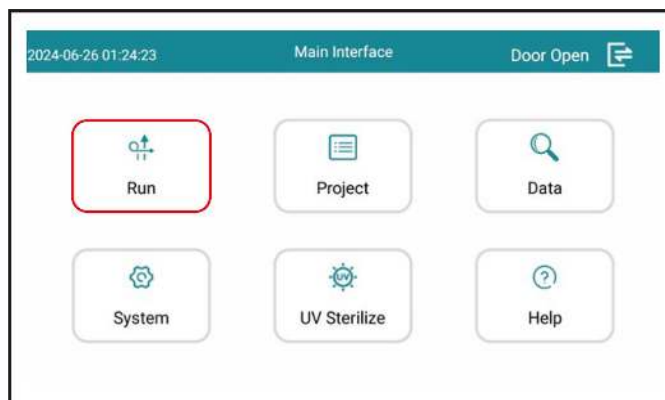
Na hlavní obrazovce se zobrazí 6 možností: Run (Spustit), Project (Projekt), Data, System (Systém), UV Sterilize (UV sterilizace) a Help (Nápověda), společně s tlačítkem Door Open (Otevřít dveře) (Obrázek 3).



Obrázek 3: Hlavní rozhraní přístroje

4. Vyberte možnost „Run“:

Pro pokračování stiskněte možnost „Run“ (Obrázek 4).

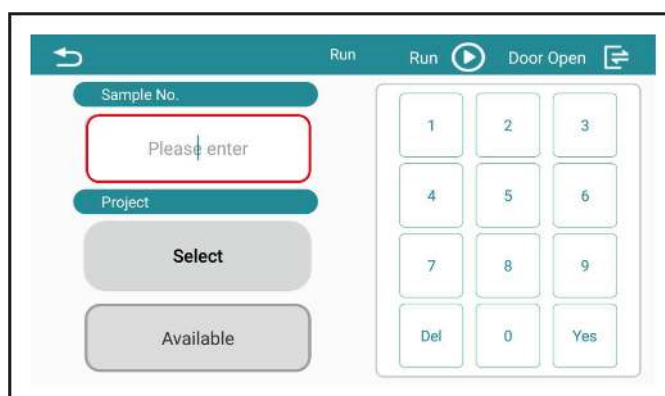


Obrázek 4: Výběr možnosti „Run“ v hlavním rozhraní přístroje

Krok 2: Zadání údajů o pacientovi

1. Manuální zadání ID pacienta:

Přejděte na záložku „Sample“ (Vzorek) a zadejte ID pacienta (Obrázek 5).



Obrázek 5: Manuální zadání čísla vzorku / ID pacienta

2. Skenování ID pacientů:

Alternativně můžete pomocí čtečky čárových kódů zadat ID pacientů do sloupce „Sample No.“ (Číslo vzorku) (Obrázek 6).



Obrázek 6: Funkce čtečky čárových kódů pro automatizované zadání čísla vzorku / ID pacienta

3. Naskenujte QR kód Cartridge-1:

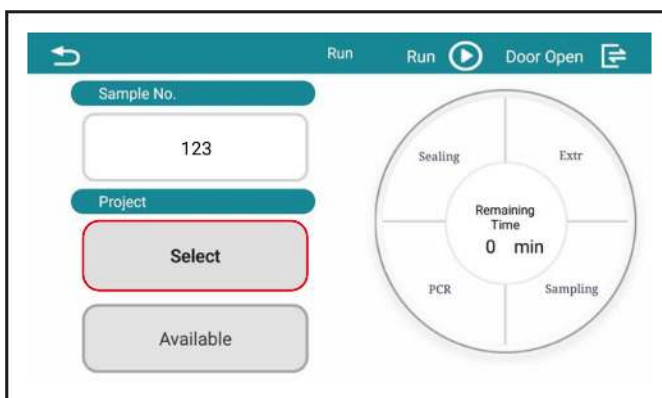
Zajistěte, aby byl QR kód na Cartridge-1 viditelný pro skenování. Naskenováním QR kódu se program automaticky vybere (Obrázek 7).



Obrázek 7: Skener QR kódu pro automatizovaný výběr programu

4. Manuální výběr programu:

Pokud skenování není možné, klikněte na „Select“ (Vybrat) a zvolte přednastavený program „PML-RARA“ (Obrázek 8).



Obrázek 8: Manuální výběr programu z přednastaveného seznamu

Krok 3: Příprava cartridge

1. Připravte Cartridge-1:

Pevně poklepejte na Cartridge-1, aby se kapalina usadila, a zkontrolujte přítomnost vzduchových bublin (Obrázek 9).



Obrázek 9: Poklepání Cartridge-1 na desce stolu

2. Odloupněte fólii Cartridge-1:

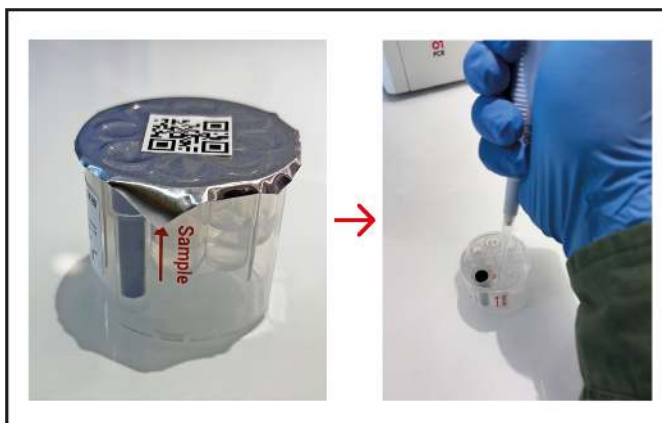
Opatrně odloupněte ochrannou fólii z Cartridge-1 (Obrázek 10).



Obrázek 10: Odloupnutí fólie Cartridge-1

3. Přidejte vzorek pacienta do Cartridge-1:

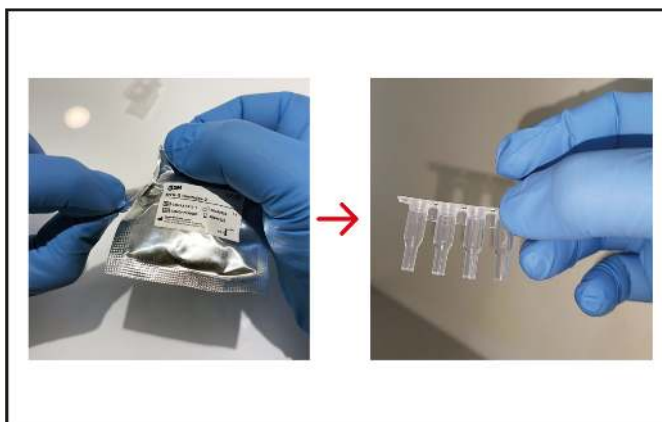
Do jamky „A“ Cartridge-1, označené červeně nápisem „Sample“ (Vzorek), přidejte 200 µl vzorku pacienta (Obrázek 11).



Obrázek 11: Přidání vzorku do jamky „Sample“ Cartridge-1

4. Připravte Cartridge-2:

Otevřete balení Cartridge-2. Poklepáním na Cartridge-2 usadíte lyofilizovaný materiál (Obrázek 12).



Obrázek 12: Otevření Cartridge-2

5. Přidejte rekonstituční pufr:

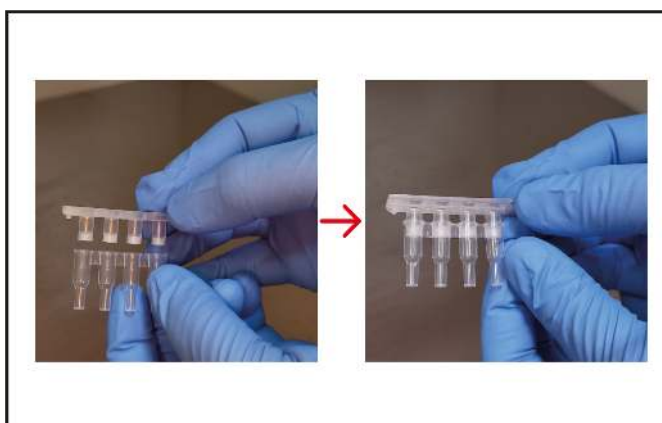
Odstraňte víčka zkumavek z Cartridge-2 a podle potřeby přidejte a důkladně promíchejte 10 μ l rekonstitučního pufru do pozic A, B a C (Obrázek 13).



Obrázek 13: Rekonstituce lyofilizovaných činidel v Cartridge-2

6. Připevněte Cartridge-2 k adaptéru:

Pro zpracování připevněte k Cartridge-2 dodaný adaptér pro zkumavky (Obrázek 14).



Obrázek 14: Připevnění adaptéru k Cartridge-2

7. Umístěte adaptér:

Zajistěte, aby prodloužená přechínající část adaptéru byla umístěna v pozici A (Obrázek 15).

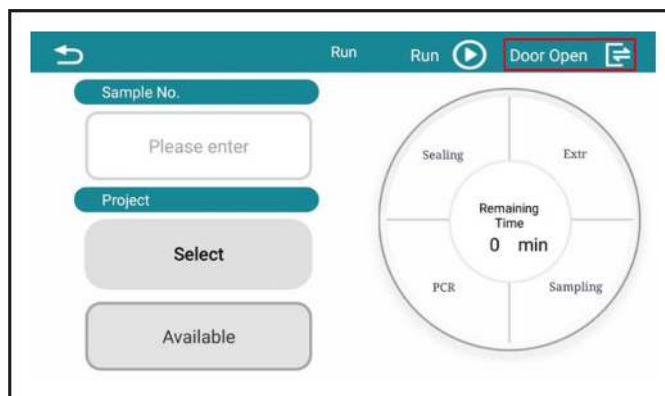


Obrázek 15: Správná orientace připevnění adaptéru na Cartridge-2

Krok 4: Vložení cartridge

1. Otevřete dvířka přístroje:

Stisknutím tlačítka „Door Open“ (Otevřít dveře) v pravém horním rohu obrazovky otevřete dvířka přístroje (Obrázek 16).



Obrázek 16: Otevření dvířek přístroje

2. Vložte Cartridge-1:

Pro správné umístění zarovnejte plochý výřez Cartridge-1 s plochou stranou přístroje (Obrázek 17).



Obrázek 17: Správná orientace pro vložení Cartridge-1 do přístroje

3. Vložte Cartridge-2:

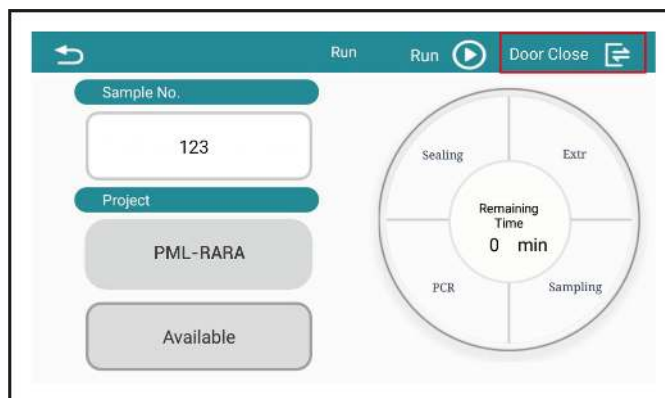
Umístěte Cartridge-2 do příslušné pozice (A, B, C a D) podle instalační příručky (Obrázek 18).



Obrázek 18: Správná orientace pro vložení Cartridge-2 do přístroje

3. Zavřete dvířka přístroje:

Stisknutím tlačítka „Door Close“ (Zavřít dveře) zavřete dvířka (Obrázek 19).



Obrázek 19: Zavření dvířek přístroje

Krok 5: Spuštění přístroje

1. Zahajte běh:

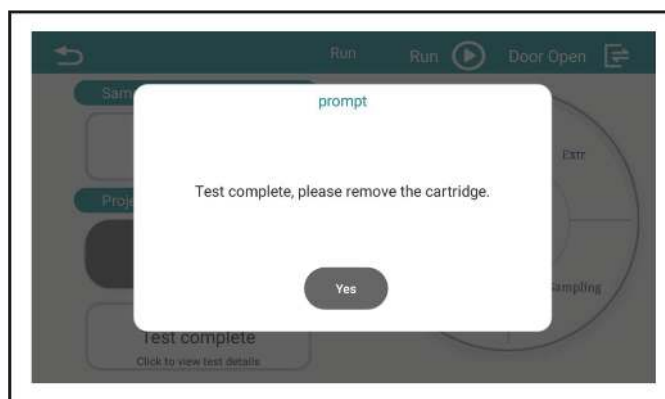
Stisknutím tlačítka „Run“ zahájíte extrakci vzorku a Real-Time PCR amplifikaci. Systém vzorky zpracuje automaticky (Obrázek 20).



Obrázek 20: Kliknutím na „Run“ zahájíte běh One PCR

2. Dokončení běhu:

Po dokončení běhu vyzve přístroj k vyjmutí cartridge (Obrázek 21).



Obrázek 21: Výzva přístroje k vyjmutí cartridge po dokončení běhu

Krok 6: Vyjmutí cartridge

Otevřete dvířka a opatrně vyjměte cartridge:

Po dokončení běhu otevřete dvířka a opatrně vyjměte Cartridge-1 i Cartridge-2 (Obrázek 22).

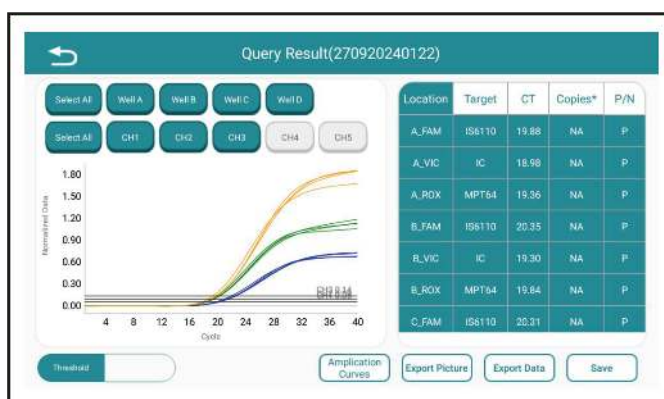


Obrázek 22: Otevření dvířek přístroje a vyjmutí cartridge

Krok 7: Zobrazení výsledků

1. Zobrazení výsledků:

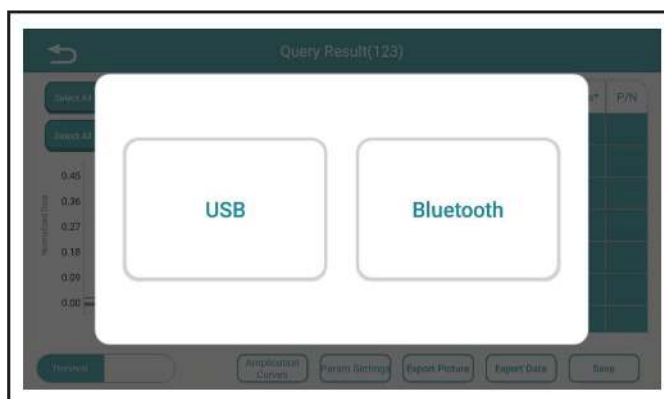
Po dokončení běhu software zobrazí výsledky pro každý vzorek jako pozitivní nebo negativní (P/N), včetně hodnot Ct a amplifikačních křivek (Obrázek 23).



Obrázek 23: Výsledky vygenerované softwarem One PCR po dokončení běhu

2. Export reportů:

Pomocí funkce „Export“ exportujte data prostřednictvím možností „USB“ nebo „Bluetooth“ (Obrázek 24).

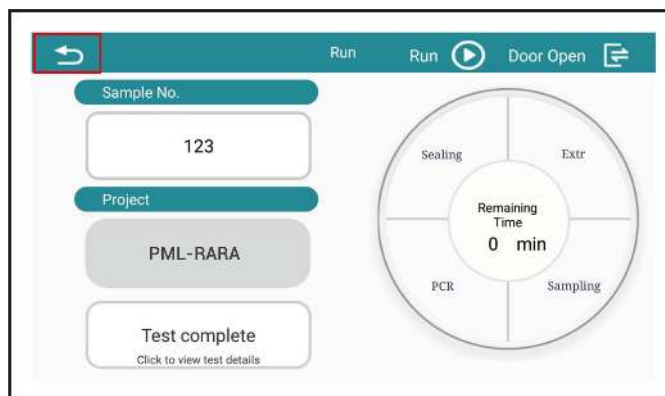


Obrázek 24: Možnosti exportu dat vygenerovaných po běhu

Krok 8: Zobrazení uložených výsledků

1. Přístup k předchozím běhům:

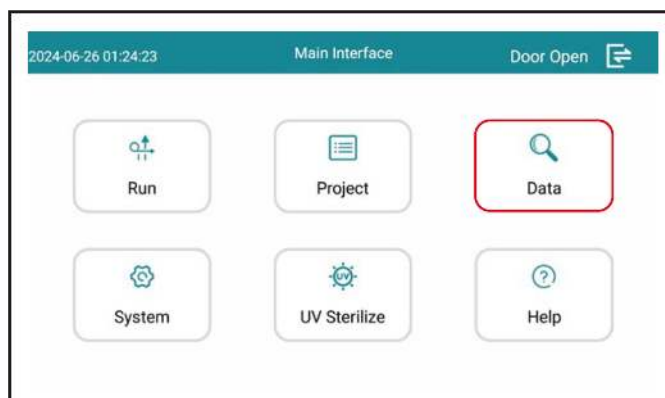
Kliknutím na ikonu „↶“ přejdete do hlavního rozhraní (Obrázek 25).



Obrázek 25: Přejchod do hlavního rozhraní pro přístup k předchozím běhům

2. Zobrazení dat:

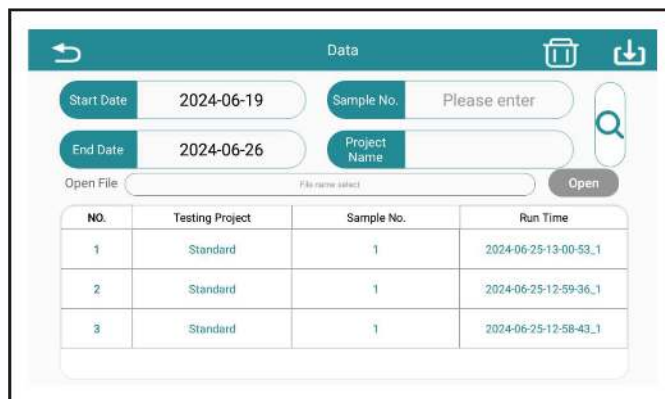
Vyberte možnost „Data“ pro zobrazení seznamu předchozích běhů (Obrázek 26).



Obrázek 26: Kliknutím na „Data“ v hlavním rozhraní zobrazíte uložené výsledky

3. Vyberte uložený běh k zobrazení:

Ze seznamu uložených běhů vyberte požadovaný soubor pro zobrazení dat a amplifikačních křivek daného běhu (Obrázek 27).



Obrázek 27: Výběr požadovaného běhu pro zobrazení dat a amplifikačních křivek

Krok 9: Vypnutí přístroje

1. Vypnutí:

Vypněte přístroj pomocí vypínače umístěného na zadní straně (Obrázek 28).



Obrázek 28: Přepnutí vypínače do polohy „off“ na zadní straně přístroje

Interpretace výsledků

Tabulka 2.

Cíle		Signál real time PCR				
Cíl BCR-1 (FAM)		+	-	-	-	-
Cíl BCR-2 (HEX)		-	+	-	-	-
Cíl BCR-3 (FAM)		-	-	+	-	-
Interní kontrola ABL1 (Texas Red)		+/-	+/-	+/-	+/-	-
Výsledek	Pozitivní výsledek pro cíl BCR-1			Pozitivní výsledek pro cíl BCR-3	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Charakteristiky výkonu

Tabulka 3.

Č.	Parametry	Pozorování
1	Přesnost	Opakovatelnost v rámci běhu: CV <3,4 %
2		Opakovatelnost mezi dny: CV<3,5 %
3		Reprodukovatelnost mezi pracovišti: CV<3,5 %
4		Reprodukovatelnost mezi obsluhou: CV<3,4 %
5	Meze detekce	LOD: 9 kopií/reakce
6	Analytická specifická	Studie interference: hemoglobin – 2 g/l, celá krev – 5–10 % (v/v), lidská genomová DNA – $\geq 10^6$ kopií/ml → nebyla zjištěna žádná interference
7		Studie zkřížené reaktivity: gen HLA – 1×10^6 kopií/ml, gen BRAF – 1×10^6 kopií/ml, gen EGFR – 1×10^6 kopií/ml → nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita
8	Klinická senzitivita	98 %
9	Klinická specifická	99 %

Výpočet klinického hodnocení			
Diagnostická přesnost			
Výsledek testu	Onemocnění přítomno	Onemocnění nepřítomno	Celkem
Pozitivní	TP=49	FP=1	TP+FP=50
Negativní	FN=1	TN=99	FN+TN=100
Celkem	TP+FN=50	FP+TN=100	150

TP: pravdivě pozitivní výsledek; FP: falešně pozitivní výsledek; TN: pravdivě negativní výsledek; FN: falešně negativní výsledek.

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 a různé pomůcky používané při testování musí být pravidelně dezinfikovány 1 % roztokem chlornanu sodného nebo 75 % alkoholem.
 - Tento test je určen pouze pro diagnostiku *in vitro*.
 - Se všemi klinickými vzorky zacházejte, jako by obsahovaly infekční agens; vždy používejte vhodné ochranné prostředky, včetně rukavic a laboratorních plášťů.
 - Postupy provádějte v dobře větraném prostoru a dodržujte pokyny pro odpovídající úroveň biologické bezpečnosti podle typu vzorku.
 - Zabraňte křížové kontaminaci používáním nových rukavic a pipetovacích špiček pro každý vzorek a kontrolu.
 - Veškerý biologicky nebezpečný odpad, jako jsou špičky, použité cartridge, rukavice apod., likvidujte v souladu s místními předpisy.
 - Zajistěte řádnou kalibraci a údržbu přístrojů, aby nedocházelo k chybným výsledkům.
 - Nepoužívejte komponenty soupravy po datu expirace.
 - Uchovávejte činidla řádně při teplotě 2 °C až 8 °C a zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování.
 - Před použitím zajistěte, aby rekonstituční pufr a ostatní komponenty byly vyrovnány na pokojovou teplotu.
 - Používejte vodu bez nukleáz a certifikovaný spotřební materiál, abyste zabránili kontaminaci.
 - Nemíchejte činidla z různých šarží soupravy.
 - V případě rozlití dezinfikujte postižené místo vhodným dezinfekčním prostředkem a bezpečně zlikvidujte kontaminovaný materiál.
 - Nevystavujte soupravu přímému slunečnímu záření ani extrémním teplotám, protože by to mohlo ovlivnit její funkčnost.
 - Při odtrhávání krytu Cartridge-1 na ni jemně poklepejte, abyste zabránili vylití činidel; případné rozlití okamžitě očistěte.
 - Při manipulaci s Cartridge-1 se vyvarujte třesení nebo jejího obracení, aby nedošlo k úniku činidel.
 - Zajistěte správné plnění rekonstitučním pufrem do Cartridge-2: u jednozkumavkových testů přidejte do zkumavky A; u dvouzkumavkových testů do zkumavek A a B; u třízkumavkových testů do zkumavek A, B a C; u čtyřzkumavkových testů do zkumavek A, B, C a D.
 - Zajistěte, aby byla Cartridge-2 vložena do přístroje ve správné orientaci (A, B, C, D), aby nedošlo k záměně výsledků.
 - Při pipetování do jamek cartridge zajistěte přesné dávkování objemu, aby nedošlo k falešným výsledkům.
 - Zajistěte, aby byly cartridge v přístroji řádně usazeny; volné uložení může způsobit poruchu.
 - Pravidelně kalibrujte a udržujte přístroj One PCR, aby byl zajištěn přesný teplotní cyklus a detekce fluorescence.
 - Nedotýkejte se vnitřku jamek cartridge; používejte sterilní pipetovací špičky a rukavice.
 - Zabraňte kontaminaci činidel a vzorků heparinem, protože může interferovat s 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.

Symbole použité na označení

Symbole	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