

PML-RARA

Real-Time PCR Kit

REF

G610024

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
PML-RARA Real-Time PCR Kit	G610024-1	50T

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.	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	6
12.	Varování a bezpečnostní opatření	7
13.	Omezení	8

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.

Princip testu

PML-RARA Real Time PCR Kit je účinný nástroj používaný k rozlišení mezi různými typy fúzních transkriptů (RNA) genu PML-RARA ve vzorcích kostní dřeně nebo periferní krve od pacientů s akutní promyelocytární leukémií (APL). Je speciálně navržen k detekci a kvantifikaci dlouhého transkriptu (BCR1) a k rozlišení mezi variantním (BCR2) a krátkým (BCR3) transkriptem. Princip testu soupravy je založen na systému real-time PCR, kde je extrahovaná RNA ze vzorku převedena na cDNA a amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) v jednokrokovém reakčním protokolu. Tato souprava obsahuje speciální primery a fluorescenční sondy, každou značenou odlišným fluorescenčním barvivem (bcr1: FAM, bcr2: HEX, bcr3: FAM), zaměřené na specifické zlomové oblasti (breakpointy) uvnitř genové fúze. Použitím sond s odlišnými fluorescenčními značkami lze všechny tři varianty genové fúze PML-RARA detekovat současně ve třech odlišných zkumavkách. Souprava dále obsahuje interní kontrolu (IC) nazvanou ABL1, značenou barvivem Texas Red, která zajišťuje spolehlivost testu potvrzením správné funkce PCR reakce. Souprava také poskytuje čtyři ředění kvantifikačních standardů (QS1-QS4) pro přesnou kvantitativní PCR amplifikaci a měření dlouhého (bcr1) fúzního transkriptu PML-RARA a ABL1. Díky své schopnosti jak kvalitativně rozlišovat mezi variantami genové fúze, tak kvantitativně měřit jejich úroveň, poskytuje tato souprava komplexní přehled klíčový pro diagnostiku onemocnění a plánování léčby.

Souhrn

Akutní promyelocytární leukémie (APL), podtyp akutní myeloidní leukémie (AML-M3), se vyznačuje jedinečnou genetickou anomálií, při které dochází k translokaci mezi chromosomy 15 a 17. Tato fúze spojuje gen receptoru alfa pro kyselinu retinovou (RARA) na chromosomu 17 s genem PML na chromosomu 15. Fúze nastává v různých zlomových oblastech (breakpointech), což vede ke třem odlišným fúzním transkriptům známým jako BCR1, BCR2 a BCR3. BCR1, vyskytující se v 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. Tyto zlomové oblasti produkují fúzní transkripty různé délky, označované jako dlouhá, variantní a krátká forma.

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 (G610024-1)
BCR-1 Primer and Probe Mix	G2MA3-2808-1	1 X 50 µl
BCR-2 Primer and Probe Mix	G2MA3-2809-1	1 X 50 µl
BCR-3 Primer and Probe Mix	G2MA3-2810-1	1 X 50 µl
ABL1 Primer and Probe Mix	G2MA3-2811-1	3 X 50 µl
Quantification Standard (QS1)	G2MA3-2812-1	1 X 25 µl
Quantification Standard (QS2)	G2MA3-2813-1	1 X 25 µl
Quantification Standard (QS3)	G2MA3-2814-1	1 X 25 µl
Quantification Standard (QS4)	G2MA3-2815-1	1 X 25 µl
Positive Control	G2MA3-3191-1	1 X 75 µl
qRT-PCR Master Mix	G2MA3-0661-5	1 X 1,5 ml
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-2	2 X 1,5 ml

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Souprava pro odběr vzorků EDTA
- MagNXT Tissue & body fluids Nucleic Acid Extraction Kit (G2M212121) (Genes 2Me Private Limited) NEBO QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- 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

- Odeberte periferní krev a/nebo vzorky kostní dřeně do zkumavek s EDTA podle pokynů dodaných se soupravou.
- Přpravujte vzorky při teplotě 2-8 °C a uchovávejte při 4 °C. Zpracujte vzorky do 72 hodin, ideálně do 36 hodin pro přesné měření minimální reziduální nemoci (MRD). Nezmrazujte krev určenou pro extrakci RNA. Manipulujte se vzorky a uchovávejte je pečlivě, aby byla zachována jejich stabilita. Zajistěte konstantní teplotu během přepravy, aby se zabránilo změnám.

Příprava vzorku a extrakce RNA

- Proveďte extrakci RNA z krve s EDTA nebo z kostní dřeně pomocí doporučených souprav podle pokynů výrobce. RNA použijte pro RT-PCR okamžitě, aby bylo zajištěno citlivé měření minimální reziduální nemoci, neboť RNA se rychle degraduje. Extrahovaná RNA může být uchovávána při -80 °C pro pozdější použití.

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

- Pro kvalitativní detekci a rozlišení fúzních genových transkriptů BCR1, BCR2 a BCR3 genu PML-RARA připravte reakční směs podle Tabulky 2 v oblasti pro přípravu činidel.

Tabulka 2.

Obsah soupravy	Zkumavka 1 (BCR-1)	Zkumavka 2 (BCR-2)	Zkumavka 3 (BCR-3)
qRT-PCR Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl
BCR-1 Primer and Probe Mix	01 µl	-	-
BCR-2 Primer and Probe Mix	-	01 µl	-
BCR-3 Primer and Probe Mix	-	-	01 µl
ABL1 Primer and Probe Mix	01 µl	01 µl	01 µl
RNase/DNase Free Water	03 µl	03 µl	03 µl
Sample RNA	05 µl	05 µl	05 µl
Konečný objem	20 µl	20 µl	20 µl

Poznámka: Koncentrace RNA by se měla pohybovat v rozsahu 100-150 ng/µl.

Připravte reakční směs v oblasti pro přípravu činidel pro kvantitativní detekci fúzního genového transkriptu *BCR1* genu PML-RARA a pro vytvoření standardní křivky podle Tabulky 3. Použijte dodané kvantifikační standardy ABL1 (QS1-QS4) s definovaným počtem kopií, jak je uvedeno v Tabulce 4 soupravy. Před použitím v přípravě reakční směsi zajistěte rovnoměrné rozložení kopií v každém roztoku kvantifikačního standardu důkladným vortexováním každého standardu po dobu 50 sekund a krátkým zcentrifugováním po dobu 10 sekund. Nerovnoměrné rozložení kopií může vést k nesrovnalostem, jako je nedokonalé zarovnání standardů nebo odchylky hodnot R^2 a sklonu (např. -3,1 až -3,6 nebo -0,3 až -0,27), a v konečném důsledku i účinnosti (E).

Tabulka 3.

Obsah soupravy	Objem
qRT-PCR Master Mix	10 µl
BCR-1 Primer and Probe Mix	01 µl
ABL1 Primer and Probe Mix	01 µl
Quantification Standards (QS1-Q4)	05 µl
RNase/DNase Free Water	03 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 termocyklu 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 (Tabulka 2), přičemž vzorek RNA nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše (Tabulka 2), přičemž vzorek nukleové kyseliny (RNA) nahradíte specifickou Positive Control v reakční směsi BCR-1, BCR-2 a BCR-3.
- Pro kvantitativní experiment připravte reakční směs se všemi čtyřmi kvantifikačními standardy (QS1-QS4) společně se vzorkem RNA, u kterého byla zjištěna pozitivita na BCR1. Pro kvantifikační standardy (QS1-QS4) postupujte podle stejného nastavení reakce, jak je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 4.

Kvantifikační standardy	Počet kopií na µl
Quantification Standard (QS1)	1000000
Quantification Standard (QS2)	100000
Quantification Standard (QS3)	10000
Quantification Standard (QS4)	1000

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 5).

Tabulka 5.

Cíl	Reportér	Zhášeč
BCR-1	FAM	Žádný
BCR-2	HEX	Žádný
BCR-3	FAM	Žádný
Interní kontrola (ABL1)	Texas Red	Žádný

Nastavení teploty a cyklů PCR

- Definujte následující nastavení pro teplotní profil a PCR cykly. Uložte soubor a spusťte reakci.

Tabulka 6.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Reverzní transkripce	1	55	10:00
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 – FAM, HEX a Texas Red.
- 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 pouze „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo Texas Red a zobrazte graf amplifikace interní kontroly (ABL1). Interní kontrola by neměla být amplifikována v No Template Control (NTC). Pozdní šumový amplifikační graf Texas Red v NTC ignorujte.

Validace Positive Control, kvantifikačních standardů a NTC

- Vyberte jamky NTC, PC a kvantifikačního standardu (QS1-QS4), vyberte kanál FAM, HEX a Texas Red a zobrazte graf amplifikace. NTC musí být plochá křivka bez hodnoty Ct. V případě potřeby upravte prahovou hodnotu těsně nad NTC.
- PC musí být amplifikována s hodnotou Ct ≤28 pro kanál FAM, HEX a Texas Red. Kvantifikační standardy (QS1 až QS4) musí být amplifikovány s hodnotou Ct 18±3 až 28±3 na kanálu FAM a Texas Red. 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 FAM, HEX, Texas Red postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou (Tabulka 7).

Tabulka 7.

Cílové organismy	Signál qPCR				
BCR-1 Target (FAM)	+	-	-	-	-
BCR-2 Target (HEX)	-	+	-	-	-
BCR-3 Target (FAM)	-	-	+	-	-
Internal Control ABL1 (Texas Red)	+	+	+	+	-
Positive Control (FAM, HEX & Texas Red)	+	+	+	+	-
No Template Control	-	-	-	-	-
Výsledek	Kvalitativní pozitivní výsledek na BCR-1	Kvalitativní pozitivní výsledek na BCR-2	Kvalitativní pozitivní výsledek na BCR-3	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

⚠ 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.

Kvantitativní interpretace výsledků

- V kanálu FAM a Texas Red postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvantitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou (Tabulka 8).

Tabulka 8.

Cílové organismy		Signál qPCR			
BCR-1 (FAM)	+	-	-	-	-
ABL1 (Texas Red)	-	+	+/-	-	-
QS1-QS4 (FAM & Texas Red)	+	+	+	-	-
No Template Control	-	-	-	-	-
Výsledek		Kvantitativní pozitivní výsledek na BCR-1	Kvantitativní pozitivní výsledek na ABL1	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Analýza standardní křivky

- Hodnoty pro neznámé vzorky interpretujte pouze tehdy, je-li $R^2 \geq 0,98$
- Sklon kalibrátorů je v rozsahu -3,0 až -3,7
- Účinnost PCR je 90 % - 110 %
- A žádná amplifikace v kanálu FAM a Texas Red v NTC.

Normalizované číslo kopie (NCN)

- Zadejte přístrojem indikované číslo kopie (CN) do následujícího vzorce

$$NCN = \frac{PML-RARA (BCR1)_{CN}}{ABL1_{CN}}$$

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.
- 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. Jiné neověřené situace mohou před použitím vyžadovat laboratorní ověření.
- 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