

RCP-Q Comprehensive

Real Time PCR Kit for Respiratory

REF

G610005

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
RCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit for Respiratory	G610005-5	50T

Předchozí REF č.: G2M803521

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

RCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit for Respiratory je diagnostický test *in vitro*, založený na technologii real-time PCR, pro detekci patogenů způsobujících respirační infekce v různých typech klinických vzorků.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

RCP-Q Comprehensive Real Time PCR Kit for Pneumonia je multiplexní test využívající technologii real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) pro kvalitativní detekci nukleových kyselin *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* a *Legionella pneumophila* ve vzorcích nazofaryngeálních (NP) a orofaryngeálních (OP) výtěrů od lidí, přičemž obsahuje interní kontrolu (IC) pro sledování účinnosti extrakce a inhibice PCR. Nukleové kyseliny extrahované z klinických vzorků jsou amplifikovány pomocí patogen-specifických primerů a fluorescenčně značených hydrolyzačních sond v jedné multiplexní reakci; během amplifikace štěpení sondy exonukleázovou aktivitou 5'-3' Taq DNA polymerázy generuje cíl-specifické fluorescenční signály. Každý cíl je detekován ve vyhrazeném fluorescenčním kanálu, konkrétně *B. pertussis* (FAM), *M. pneumoniae* (HEX/VIC), *C. pneumoniae* (Texas Red/ROX), *L. pneumophila* (Cy5) a IC (Cy5.5), což umožňuje simultánní detekci a rozlišení. Nárůst fluorescence je měřen v real time a přítomnost cíle je určena vznikem charakteristické amplifikační křivky překračující předem definovaný práh, zatímco úspěšná amplifikace interní kontroly potvrzuje funkčnost testu.

Souhrn

Respirační infekce, včetně pneumonie, jsou často způsobeny atypickými bakteriálními patogeny, jako jsou *B. pertussis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* a *L. pneumophila*. Tyto patogeny se přenášejí především kapénkami, aerosoly nebo kontaminovanými zdroji z prostředí (např. vodní systémy v případě *Legionella pneumophila*). Infikované osoby, včetně dětských i dospělých populací, mohou vykazovat příznaky jako přetrvávající kašel, horečka, bolest v krku, bolest hlavy a atypická pneumonie, které jsou často nespecifické a překrývající se, což ztěžuje klinickou diagnostiku. Konvenční diagnostické metody, včetně kultivace a sérologie, mohou být časově náročné nebo mít nedostatečnou citlivost, zejména v raných stádiích infekce. Molekulární diagnostické metody, jako je real-time PCR, nabízejí rychlou, citlivou a specifickou detekci patogen-specifických nukleových kyselin. Tento test podporuje včasnou a přesnou diagnostiku, což umožňuje včasné klinické rozhodování, cílenou antimikrobiální léčbu a lepší management pacienta. Interní kontrola (IC) je zahrnuta pro sledování celkové funkčnosti testu, včetně procesů extrakce a amplifikace.

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 (G610005-5)
Primer & Probe Mix	G2MA3-8142-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-8143-1	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 nazofaryngeálních a orofaryngeálních výtěrů) by měly být odebrány do sterilní nádoby a víčko utaženo podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku dodaném v soupravě pro odběr vzorků.
- Jakmile je vzorek odebrán, měl by být okamžitě vložen do sterilní nádoby a co nejrychleji odeslán do laboratoře.
- Transportní médium může udržet organismy po dlouhou dobu, doporučuje se však, aby byly vzorky chlazeny při teplotě 2 °C až 8 °C nebo uchovávány na mokřím ledu během přepravy.
- Vzorky mohou být uchovávány až čtyři dny při teplotě 2 °C až 8 °C.

Příprava vzorku

- Extrakce nukleové kyseliny patogenu specifického pro respirační infekci by měla být provedena podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku extrakční soupravy/IFU.

Příprava činidel

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

Příprava reakční směsi

- Připravte reakční směs podle následující tabulky v oblasti pro přípravu činidel (Tabulka 2).

Tabulka 2.

Komponenty	Objem
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 termocyklieru 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 DNase Free Water.
- Pro Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše uvedeného, přičemž vzorek nukleové kyseliny (DNA) nahradíte cíl-specifickou 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.

Cílový název	Reportér	Zhášeč
<i>Bordetella pertussis</i>	FAM	Žádný
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	HEX/VIC	Žádný
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Texas Red/ROX	Žádný
<i>Legionella pneumophila</i>	Cy5	Žádný
Interní kontrola	Cy5.5	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 – FAM, HEX/VIC, Texas Red/ROX, Cy5 a Cy5.5.

- 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 Cy5.5 a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by neměla být amplifikována v No Template Control (NTC) a Positive Control. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5.5 v NTC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte jamky No Template Control a Positive Control, vyberte kanály FAM, HEX/VIC, Texas Red/ROX, Cy5 a Cy5.5 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 každý cíl.

- Chybějící 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/VIC, Texas Red/ROX, Cy5 a Cy5.5 postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte níže uvedenou tabulkou (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cílové organismy			Signál qPCR			
<i>Bordetella pertussis</i> (FAM)	+	-	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (HEX/VIX)	-	+	-	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (Texas Red/ROX)	-	-	+	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> (Cy5)	-	-	-	+	-	-
Interní kontrola (Cy5.5)	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-
Výsledek	Pozitivní výsledek na <i>B. pertussis</i>	Pozitivní výsledek na <i>M. pneumoniae</i>	Pozitivní výsledek na <i>C. pneumoniae</i>	Pozitivní výsledek na <i>L. pneumophila</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/reakci
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 medikace]	Dobře kontrolováno
13.	Křížové reakce (<i>Chlamydia pneumoniae</i> , VZV, <i>Neisseria meningitidis</i> a HSV 1 & 2)	Žádná křížová reaktivita
14.	Klinická citlivost	99 %
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 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 rozlítí těchto činidel postupujte podle vhodných postupů pro zvládání rozlítí.
- 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, 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.

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