

W. Nile-Q

Real Time PCR Kit for West Nile Virus

REF

G610042

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
W. Nile-Q Real Time PCR Kit for West Nile Virus	G610042-1	50T

Předchozí REF č.: G2M802321

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.	Varování a bezpečnostní opatření	7
13.	Omezení	7

Účel použití

W. Nile-Q Real Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci RNA viru západonilské horečky (West Nile Virus) v klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

W. Nile-Q Real Time PCR Kit je multiplexní real-time reverzně-transkripční PCR test využívající chemii TaqMan k detekci RNA specifické pro WNV v klinických vzorcích. Tento test obsahuje specifické primery a fluorescenční sondy cílící na sekvenční viru západonilské horečky v kanálu FAM, jakož i primery a sondy pro paralelní detekci endogenní interní kontroly v kanálu HEX k identifikaci případné inhibice RT-PCR (selhání amplifikace), pokud se cílová sekvenční RNA viru západonilské horečky neamplifikuje. W. Nile-Q Real-Time PCR Kit rovněž zahrnuje Positive Control k zajištění optimálních experimentálních podmínek a k potvrzení integrity reagentů soupravy. Souprava obsahuje qRT-PCR Master Mix, W. Nile primer and probe mix, Internal Control Primer and Probe mix pro detekci viru západonilské horečky a interní kontroly v klinických vzorcích, Positive Control Template a RNase/DNase-free vodu jako No Template Control k potvrzení integrity reagentů soupravy.

Souhrn

Virus západonilské horečky (WNV) je přenášen komáry a může infikovat různé hostitelské druhy, včetně ptáků, psů, koní a lidí. Proti WNV neexistují u lidí žádné vakcíny ani specifické léky. Většina infekcí WNV je asymptomatická, ale přibližně 20 % infikovaných osob vyvine příznaky podobné chřipce. Přibližně 1 ze 150 infikovaných osob může vyvinout závažné onemocnění, včetně encefalitidy (zánětu mozku) nebo meningitidy (zánětu mozkových a míšních obalů), které může být smrtelné. Vzhledem k tomu, že příznaky WNV se velmi podobají příznakům sezónních virových infekcí a mohou vést k závažným komplikacím, je včasná diagnostika klíčová pro odlišení od jiných patogenů s podobnými příznaky. Konvenční sérologické testy mohou trvat 4 až 10 dní a zlatý standard, test neutralizace redukcí plaků, je omezen na specializovaná laboratoře. Real-Time PCR nabízí vyšší citlivost a specifitu a poskytuje rychlejší výsledky ve srovnání s konvenčními metodami, čímž zvyšuje diagnostickou efektivitu.

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 (G610042-1)
W. Nile Primer & Probe Mix	G2MA3-2235-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-2236-1	1 X 50 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	G2MA3-3061-1	1 X 50 µl
qRT-PCR Master Mix	G2MA3-0660-1	1 X 500 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-4	1 X 500 µl

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- MagRNA-II Viral RNA Extraction Kit (G2M030320) (Genes 2Me Private Limited) nebo QIAamp Viral RNA Mini Kit
- 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

- Pro testování viru západonilské horečky metodou RT-PCR se vzorky krve odebírají do zkumavek s EDTA sterilní jehlou z vény.
- Vzorky mozkomíšního moku (CSF) se získávají lumbální punkcí. Oba typy vzorků se uchovávají v sterilních, označených nádobách.
- Vzorky krve by měly být uchovávány při teplotě 2 až 8 °C, zatímco vzorky CSF by měly být uchovávány při teplotě -20 °C nebo nižší.
- Používejte sterilní techniky a řádné označení, abyste zabránili kontaminaci.
- Neprodleně přepravte vzorky do laboratoře při dodržení těchto teplotních podmínek, abyste zajistili jejich integritu a spolehlivost výsledků. Nastříkejte na uzavřený obal obsahující vzorek 75 % etanol v biologicky bezpečném boxu.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické RNA by měla být provedena podle pokynů uvedených v příbalovém letáku soupravy. Extrahovanou RNA použijte okamžitě nebo ji uchovávejte při teplotě -20 °C po dobu 2 až 3 dní, při -80 °C po delší dobu.

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu (2 °C až 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.

Komponenty	Objem
qRT-PCR Master Mix	10 µl
W. Nile Primer & Probe Mix	01 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	01 µl
Vzorek RNA	08 µl
Konečný objem	20 µl

△ Připravte zkumavku s qRT-PCR reakcí 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, přičemž vzorek RNA nahradíte RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek RNA nahradíte cílově specifickým 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.
- Níže je uveden příklad nastavení přístroje BioRad CFX96.

PCR přístroj

- 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	Zhášec
W. Nile	FAM	Žádný
Interní kontrola	HEX	Žádný

Nastavení teploty a cyklů PCR

- Definujte následující nastavení teplotního profilu a PCR cyklů. Uložte soubor a spusťte reakci (Tabulka 4).

Tabulka 4.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Reverzní transkripce a denaturace	1	55	10:00
		95	03:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	95	00:15
		60*	01:00

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro příslušné cílové kanály – FAM a HEX.

- Po nastavení výše uvedených podmínek uložte soubor a spusťte reakční program.

Interpretace výsledků testu

- Hodnota Ct nižší nebo rovna ≤35 by měla být považována za mezní hodnotu (cut-off) pro odlišení pozitivních a negativních výsledků. Hodnota nižší nebo rovna ≤35 se považuje za pozitivní.

Validace interní kontroly

- Vyberte pouze „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo HEX a zobrazte graf amplifikace interní kontroly.
- Interní kontrola by se neměla amplifikovat v No Template Control a Positive Control Template. Pozdní šumový amplifikační graf HEX v jamkách NTC a Positive Control ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte NTC a Positive Control Template, zvolte kanál FAM a HEX a zobrazte graf amplifikace.
- Křivka NTC musí být plochá bez hodnoty Ct. V případě potřeby upravte hodnotu prahu (threshold) těsně nad NTC. PC musí amplifikovat s hodnotou Ct ≤ 28 v kanálu FAM.
- NTC potvrzuje absenci kontaminace v reagentech i správné pipetování a prostředí. PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání reagentů a parametry reakce.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu FAM a HEX postupně vyberte jamky testovaných vzorků a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte následující tabulkou (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíl		qPCR signál		
W. Nile Target Pathogen (FAM)		+	-	-
Positive Control (FAM)		+	+	-
Internal Control (HEX)		+/-	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-
Výsledek	Pozitivní výsledek pro W. Nile	Negativní výsledek	Neplatný výsledek	

⚠ Pro diagnostické účely by měly být výsledky vždy používány v kombinaci s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných testů, klinické dojmy apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s klinickými nálezy, doporučuje se provést doplňující testování k potvrzení výsledku.

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 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 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.

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