

ZikaQ

Real Time PCR Kit
for Zika Virus

REF

G610044

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
ZikaQ Real Time PCR Kit for Zika Virus	G610044-1	50T

Předchozí REF č.: G2M262621

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.	Charakteristiky výkonu	7
13.	Varování a bezpečnostní opatření	8
14.	Omezení	8

Účel použití

ZikaQ Real Time PCR Kit for Zika Virus je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci RNA specifické pro virus Zika v klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

ZikaQ Real Time PCR Kit for Zika Virus je diagnostická souprava navržená jako real-time reverzně-transkripční PCR (RT-PCR) test pro detekci infekce virem Zika ve vzorcích lidského původu. Využívá technologii RT-PCR k cílení na oblast genu Poly RNA viru Zika. Test používá specifické páry primerů a fluorescenční sondy s detekčními kanály pro RNA viru Zika na HEX a pro interní kontrolu na Cy5. Interní kontrola, lidský housekeeping gen, slouží jako kontrola extrakce a reakce k validaci procesu a zajištění přesných výsledků. Extrahovaná RNA je validována, aby byly zajištěny přesné a spolehlivé diagnostické výsledky.

Souhrn

Virus Zika, člen rodu Flavivirus, je převážně přenášen komáry rodu Aedes, zejména Aedes aegypti. Objeven byl v Ugandě v roce 1947 a od té doby se stal celosvětovým zdravotním problémem. Virus se šíří primárně komářím štípnutím, ale může být přenášen také sexuálně, z matky na plod během těhotenství a potenciálně krevní transfuzí. Většina infekcí je asymptomatická nebo se projevuje mírnými příznaky, jako je horečka, vyrážka, bolest kloubů a konjunktivitida, avšak závažné případy mohou vést k neurologickým komplikacím, jako je syndrom Guillain-Barré, a k vrozeným vadám, jako je mikrocefalie. Diagnostika obvykle zahrnuje sérologické testy, které mohou být méně specifické vzhledem ke zkřížené reaktivitě s jinými flaviviry. Reverzní transkripce – polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) nabízí přesnější diagnostický přístup detekcí virové RNA v krvi, moči nebo slinách. RT-PCR je zvláště účinná během akutní fáze infekce, kdy jsou hladiny virové RNA vysoké, a poskytuje citlivou a specifickou metodu k potvrzení aktivní infekce virem Zika a k jejímu odlišení od jiných příbuzných virů.

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 (G610044-1)
Zika Primer and Probe Mix	G2MA3-2950-1	1 X 50 µl
Positive Control Template	G2MA3-2125-1	1 X 50 µl
Internal Control Primer & Probe Mix	G2MA3-2951-1	1 X 50 µl
qRT-PCR Master Mix	G2MA3-0660-1	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)
- 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

- Extrakce RNA ze vzorků krve, moči nebo slin pro detekci viru Zika by měla být provedena pomocí vhodné soupravy pro extrakci virové RNA podle pokynů výrobce.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické RNA by měla být provedena podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku soupravy.

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 (Tabulka 2).

Tabulka 2.

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

⚠ Připravte zkumavku s qPCR 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 8 µl Positive Control Template dodaného se soupravou. Neprodleně uzavřete víčko nebo zapečete destičku, abyste zabránili kontaminaci. Krátce zcentrifugujte a přejděte k provedení PCR reakce.

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.

Cíl	Reportér	Zhášeč
Zika Target	HEX	Žádný
Interní kontrola	Cy5	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 budou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – HEX a Cy5. Po nastavení uložte soubor a spusťte reakční program.

Interpretace výsledků testu

- Hodnota Ct ≤ 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 „testované vzorky“ pro analýzu interní kontroly. Vyberte barvivo Cy5 a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by se neměla amplifikovat v No Template Control. Pozdní šumový amplifikační graf Cy5 v NTC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Vyberte jamky No Template Control a Positive Control, zvolte kanál HEX a Cy5 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 pro kanál HEX a Cy5.
- Absence amplifikace v NTC značí, že nedošlo ke kontaminaci reagentů ani experimentálního prostředí a že pipetování bylo provedeno správně.
- Amplifikace v PC potvrzuje, že byly dodrženy předepsané podmínky uchovávání reagentů a parametry reakce.

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu Cy5 a HEX postupně vyberte jamky testovaných vzorků a analyzujte amplifikační grafy. Pro kvalitativní interpretaci výsledků se řiďte tabulkou uvedenou níže.
- Pro diagnostické účely by měly být výsledky 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 (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíle		qPCR signál		
Zika Target Pathogen (HEX)		+	-	-
Positive Control (HEX and Cy5)		+	+	-
Internal Control (Cy5)		+/-	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	+/-
Výsledek		Pozitivní výsledek pro Zika	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.

Charakteristiky výkonu

Tabulka 6.

S. No.	Parametry	Pozorování
1.	Analytická senzitivita	100 %
2.	Analytická specifita	100 %
3.	Pravdivost (bias)	99 %
4.	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 3,5 %
5.	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 4,0 %
6.	Správnost (vyplývající z pravdivosti a přesnosti)	99 %
7.	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 200 kopií/ml
8.	Měřicí rozsah	10 – 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	Vhodné pokyny pro manipulaci
12.	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek [lidská genomová DNA, cholesterol a hemoglobin]	Dobře kontrolováno
13.	Zkřížené reakce (virus dengue, virus západonilské horečky, virus žluté horečky a chikungunya)	Žádná zkřížená reaktivita
14.	Klinická senzitivita	98 %
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 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.
- Veškerý biologicky nebezpečný odpad likvidujte v souladu s místními předpisy.

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