ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5 | 615 00 Brno-Židenice | Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851 | E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz
Společnost je zapsána v OŘ vedeném Krajským
soudem v Brně pod spisovou značkou C 40647.

EliGene® Influenza A/B/pandemic LC

REF **90058-LC (pro 50 stanovení)**

Složení soupravy:

5 x 150 µl **InfA/H1N1 LC Mix**
5 x 150 µl **InfB LC Mix**
2 x 55 µl Enzyme Mix
1 x 260 µl **IC RNA**
2 x 50 µl **PC Influenza**
Návod k použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

EliGene® Influenza A/B/pandemic LC kit je určen pro detekci RNA chřipkových virů A a B spolu s pandemickým podtypem A/H1N1.

Princip metody

Diagnostická souprava je založena na reverzní transkripci s qPCR v jedné zkumavce. V tomto kitu jsou pro detekci chřipky A (H3N2, H1N1, H5N1), chřipky B a interní kontroly použity primery a fluorescenčně značené sondy (FAM, HEX a Cy5).

Obecný úvod

Chřipka je infekční onemocnění ptáků a savců způsobené RNA viry z čeledi *Orthomyxoviridae*, chřipkovými viry. Nejčastějšími příznaky jsou zimnice, horečka, rýma, bolest v krku, bolesti svalů, bolesti hlavy, kašel, slabost. Přibližně 33 % lidí, kteří onemocní chřipkou, jsou asymptomatičtí. Chřipka může občas vést k zápalu plic, a to buď přímo virovou pneumonií, nebo sekundárním bakteriálním zápalem plic. Chřipka se obvykle přenáší vzduchem prostřednictvím kašle nebo kýcháním, kdy vznikající aerosoly obsahují virus. Chřipka může být také přenášena přímým kontaktem s ptačím trusem, nosním sekretem nebo prostřednictvím kontaktu s kontaminovanými povrchy. Virus chřipky může být inaktivován slunečním zářením a dezinfekčními prostředky. Často se objevují nové kmeny viru chřipky vzniklé buď přenosem existujícího viru chřipky z jiného živočišného druhu na člověka, nebo pokud existující lidský kmen získá nové geny z viru infikujícího ptáky nebo prasata. Ptačí kmen nazývaný H5N1 vyvolal znepokojení z nové pandemie chřipky poté, co se objevil v Asii v devadesátých letech minulého století. Nerozvinul se však do podoby, která se snadno přenáší mezi lidmi. V dubnu 2009 se objevil nový kmen chřipky, který kombinoval geny z lidské, prasečí a ptačí chřipky. Zpočátku byl označován jako tzv. "prasečí chřipka" a je také známý jako chřipka A/H1N1. Chřipka B téměř výhradně infikuje lidi a je méně častá než chřipka A. Tento typ chřipky mutuje 2-3 krát pomaleji než typ A.

Odběr vzorku, zpracování a uchovávání

Klinický materiál:	**Doporučená izolace NK:**
Stěry (nosohltan, bukální), sliny, sputum, moč	Manuální: **EliGene® Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit (15min protokol)** Chemagic Viral DNA/RNA kit (chemagen-PerkinElmer) QIAamp DSP Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení Qiagen
Sérum, plasma	chemagenic Viral DNA/RNA kit (chemagen-PerkinElmer) QIAamp DSP Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení Qiagen
	Automatická: **ZEPHYRUS Magneto automat** (ELISABETH PHARMACON) Magneto BodyFluid DNA/RNA Izolační kit **Chemagic 360 izolační automat** (chemagen-PerkinElmer) Chemagic Viral DNA/RNA kit Chemagic Viral NA/gDNA kit **QIAcube izolační automat** kity dle doporučení Qiagen

RNA se doporučuje eluovat do vody pro molekulární biologii. V důsledku složení elučních pufrů některých výrobců může dojít k inhibici PCR reakce elučním pufrem. Eluční pufr izolační soupravy EliGene Viral RNA/DNA FAST Isolation lze použít bez obav z inhibice PCR, stejně jako s elučními pufry izolačních souprav doporučených výše. Pokud chcete použít izolační soupravy od jiných výrobců, musí být k izolaci RNA přidána interní kontrolní amplifikace (RNA) obsažená v této soupravě, aby bylo jisté, že je vyloučena inhibice elučním pufrem.

Sérum nebo plasma:

Podle standardního postupu odeberte vzorek séra nebo plazmy do sterilních zkumavek.

Doporučujeme použít objem 200 µl séra nebo plazmy a eluční objem 50 µl vody PCR. Před izolací musí být ke 200 µl vzorku přidán lyzační roztok a poté 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA).

Stěry:

Uvedené vzorky odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek.

Doporučené odběrové tampony:

FLOQSwabs (Copan) – suché stěry nebo do UTM – (Universal Transport Medium, Copan)

Darcon swap – suché stěry nebo do transportního média pro viry MicroTest™ M4RT nebo MicroTest™ M6 (Termo Scientific)

Jiné oběrové sady na bázi polymerových materiálů – suché nebo s transportním médiem for viry.

Nepoužívejte bavlněné tampony z důvodu možné inhibice PCR reakce.

Vzorky by měly být přepravovány do laboratoře při 4 ° C (modrý led). Jsou stabilní minimálně 72 hodin od odběru vzorků při 4 ° C. V případě, že nemáte možnost transportovat suché výtěry do laboratoře při 4 ° C, je třeba přepravovat suché výtěry při pokojové teplotě do šesti hodin.

Pro delší skladování vzorků než 72 hodin zmrazte vzorek na -20 ° C.

Suché tampóny by měly být ponořeny do lyzačního pufru podle návodu k použití použité izolační soupravy. **Po odstranění tampónu musí být přidáno 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA) do 200 ul vzorku použitého pro izolaci RNA.**

V případě odběru vzorků do transportního média by mělo být pro izolaci RNA použito 200 µl nebo množství doporučené v návodu k použití použité izolační soupravy. Po přidání lyzačního pufru musí být do 200 µl vzorku použitého k izolaci RNA přidáno 5 µl RNA interní kontroly (IC RNA).

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety 1-1000 µl a sterilní špičky s filtrem prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný Real-Time PCR přístroj.
- Sterilní stojánek prostý DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro Real Time PCR – souprava je optimalizována pro přístroje LightCycler® 480, QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). RT-qPCR využívá detekci pomocí TaqMan technologie (FAM a HEX značené sondy) a může být použita i na dalších termocyklérech umožňujících detekci v těchto kanálech.
- Laboratorní ochranné rukavice.

Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci chřipky A a B je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci chřipky A/H1N1 je použita sonda značená Cy5 barvou (exc. 618 nm – em. 660 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)

LightCycler® 480 (Roche):

Před použitím EliGene® Influenza A/B/pandemic LC kitu je nezbytné provést spektrální kalibraci pomocí EliGene LC Spectral Calibration Kit 2 (Cat. No. 90099-SC2)! Jakmile byla spektrální kalibrace jednou provedena, je platná až do modernizace přístroje nebo pokud dojde k výměně optiky.

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře.

V okně “Detection format“ zvolte “ 3 Color Hydrolysis probe”.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode “None”, 1 Cycle

55°C	15 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”

Step 2 - Analysis mode “None”, 1 Cycle

95°C	2 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”

Step 2 - Analysis mode “Quantification”, 45 Cycles

95°C	5 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”
55°C	15 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode “Single”
67°C	15 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”

Step 3 - Analysis mode “None”, 1 Cycle

40°C	20 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode “None”

Kompletní teplotní profil může být také nahrán z Run Template "EliGene_INFLUENZA_LC_LC480_v02.ixo".

Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

Real-Time PCR Systém QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type,"Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako detekované barvy zvolte FAM (InfA, InfB), VIC (IC RNA), Cy5 (InfA H5N1**). Nepoužívejte barvu ROX jako pasivní referenci!**

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

55°C 15 min Ramp rate (1.6°C/s)

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s Ramp rate (1.6°C/s)

55°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s)

Post-Read Stage

40°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_INFLUENZA_LC_QS3_v00.edt" nebo "EliGene_INFLUENZA_LC_QS5_v00.edt.edt". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

V okně "New Run" vyberte volbu "Three Step".

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

55°C 15 min

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s

55°C 15 s Odečet signálu v kanálech (Acquiring in channels) "Green", "Yellow" a "Red"

67°C 15 s

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Pro možnost "Gain Optimization" vyberte možnost "Automatic gain optimization before first acquisition".

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_INFLUENZA_LC_Q-GENE_v00.ret".

Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V úvodní možnosti “Startup Wizard Create” založte nový “New Experiment“ a vytvořte nový protokol “Create New Protocol“.

N**astavte následující teplotní profil:**

Step 1	55°C	15 min
Step 2	95°C	2 min
Step 3	95°C	5 s
Step 4	55°C	15 s + Plate Read
Step 5	67°C	15 s
Step 6	*GOTO Step 3*	*44x*
Step 7	40°C	20 s

Doplňte “Sample Volume“ na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 4 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX a Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky s čtením v FAM, HEX a Cy5 kanálech jako „Unknown“ vzorky, případně „Standard“.
Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_INFLUENZA_LC_CFX_v00.prcl".

Real-Time PCR system iCycler iQ5 (Bio-Rad)

V okně “Protocol” zvolte “Create New“a nastavte následující teplotní profil:

Cycle 1 - 1 Repeat

55°C	15 min	

Cycle 2 - 1 Repeat

95°C	2 min	

Cycle 4 – 45 Repeats

95°C	15 s	
55°C	15 s	Acquisition of data “Real Time“
67°C	15 s	

Cycle 4 - 1 Repeat

40° C	1 min	

V okně “Plate“ zvolte možnost “Create New“ a poté zvolte nabídku “Select/Add Fluorophores“ a zvolte barvy FAM, HEX a Cy5. Poté zadejte jednotlivé vzorky a spusťte běh.

Příprava reagencií

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagencie zcela rozmražené, krátce promíchané na vortexu a krátce stočené.
- 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA) přidávejte až po přidání lyzačního roztoku do vzorku.

  V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované RNA až těsně před PCR analýzou!

- Při použití přístroje iCycler iQ5 firmy Bio-Rad je nezbytné pro správné vyhodnocení dat přidat do InfA/H1N1 LC Mixu a InfB LC Mixu standard fluoresceinu o výsledné koncentraci 10 nM. Je možné použít 100x EliFluorescein Standard, kdy do zkumavky s InfA/H1N1 a InfB mixem přidáte 2 ul 100x EliFluorescein Standardu.

VAROVÁNÍ: Je také možná kontaminace v laboratorním prostoru. Používejte samostatnou pipetu pro Master Mixy, samostatnou pipetu pro pozitivní kontroly a samostatnou pipetu pro vzorky! Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře provádějící analýzy RNA.

Příprava reakčního mixu

1. Vezměte zkumavky označené InfA/H1N1 a InfB Mix a zkumavku Enzyme Mix a rozmrazte je při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce odstřeďte v centrifuze. Připravte InfA/H1N1 a InfB Master Mix smícháním 14 µl InfA/H1N1 Mixu a 14 µl InfB Mixu s 1 µl Enzyme Mixu na reakci a krátce odstřeďte.
2. Detekce: Přidejte 15 µl InfA/H1N1 a InfB Master Mixu do amplifikačních zkumavek nebo destiček a přidejte 5 µl izolovaného vzorku RNA. Při pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili křížové kontaminaci vzorků. Připravený Master Mix by měl být použit do 30 minut a nelze jej znovu použít. Připravený Master Mix nemrazte.
3. Pozitivní kontrola: Napipetujte 15 µl InfA/H1N1 a InfB Master Mixu samostatně do amplifikační zkumavky nebo destičky. Poté přidejte 5 µl PC Influenza. Při pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. **K pipetování pozitivních kontrol použijte mikropipetu určenou pouze pro pipetování pozitivních kontrol.**

Vložte mikrozkumavky nebo destičku do Real-Time PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

Odečet výsledků

LightCycler® 480 (Roche):

V nabídce “Sample Editor” zvolte možnost “Abs Quant”.

V nabídce “Analysis” zvolte možnost “Abs Quant/2nd Derivative Max”.

V okně “Analysis” klikněte na ikonu “Color Comp” a zvolte kalibraci pro EliGene® Influenza A/B/pandemic LC kit. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu “Calculate”.

Pozitivní výsledek na Chřipku A: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510) InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku A/H1N1: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 kanálu (618-660) InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku B: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510) InfB LC mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580) u InfA/H1N1 a InfB LC Mixu.

Hodnoty “Concentration” u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, “Negative” znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

Real-Time PCR Systém QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce “Analysis Settings” vyberte možnosti “Automatic Treshold” a “Automatic Baseline” a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek na Chřipku A: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku A/H1N1: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve Cy5 kanálu InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku B: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfB LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu u InfA/H1N1 a InfB LC Mixu.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu “Analysis” a vyberte Analýzu “Quantitation”. V okně „Quantitation Analysis” zvolte možnosti “Dynamic Tube” a “Slope Correct”. V nabídce “Outlier Removal” nastavte NTC Treshold na 10 %.

Pozitivní výsledek na Chřipku A: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green) InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku A/H1N1: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve Cy5 kanálu (Red) InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku B: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green) InfB LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (Yellow) u InfA/H1N1 a InfB LC Mixu.

Hodnoty “Calc. conc.” u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, “Negative” znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V okně “Data Analysis“ zvolte možnost “Quantification“. V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Threshold“

a vyberte v „Baseline Cycles“ možnost „Auto Calculated“ a v Single „Threshold“ možnost „Auto Calculated“

Poté v okně “Data Analysis“ vyberte jednotlivé fluorofory (FAM, HEX a Cy5) kliknutím na box s jejich označení pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek na Chřipku A: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku A/H1N1: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve Cy5 kanálu InfA/H1N1 LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek na Chřipku B: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfB LC Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu u InfA/H1N1 a InfB LC Mixu.

Real-Time PCR systém iCycler iQ5 (Bio-Rad)

V okně “Data File“ zvolte možnost “Analyze“ a v nabídce „Analysis Mode“ zvolte možnost “PCR Base Line Substracted Curve Fit“. Poté v nabídce „Base Line Treshold Parameter“ zvolte postupně pro všechny

analyzované barvy (FAM, HEX a Cy5) v parametru „Crossing Treshold“ možnost “User Defined“ a zadejte hodnotu Treshold Position 100.
Pozitivní výsledek na Chřipku A: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfA/H1N1 LC mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.
Pozitivní výsledek na Chřipku A/H1N1: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 kanálu InfA/H1N1 LC mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.
Pozitivní výsledek na Chřipku B: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu InfB LC mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.
Interní kontrola (IC RNA) je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu u InfA/H1N1 a InfB LC Mixu.
Hodnoty Ct odpovídají kvantitě pozitivního výsledku.

Interpretace výsledků

Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM a Cy5 InfA/H1N1 LC Mixu před 40. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně Chřipka A a A/H1N1 negativní nebo koncentrace RNA je pod detekčním limitem soupravy (15 genomových RNA/reakci). Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM InfB LC Mixu před 44. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně Chřipka B negativní nebo koncentrace RNA je pod detekčním limitem soupravy (15 genomových RNA/reakci). Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost Influenzy A, A/H1N1, B, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované RNA viru chřipky.

Pozitivní výsledek

Amplifikační signál ve FAM kanálu InfA/H1N1 LC Mixu se objeví před 40. cyklem. Chřipka A RNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na RNA Chřipky A.

Amplifikační signál v Cy5 kanálu InfA/H1N1 LC Mixu se objeví před 40. cyklem. Chřipka A/H1N1 RNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na RNA Chřipky A/H1N1.

Amplifikační signál ve FAM kanálu InfB LC Mixu se objeví před 40. cyklem. Chřipka B RNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na RNA Chřipky B RNA.

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící RNA analýzy.

Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu specifického pro Chřipku A, A/H1N1 v kanálu FAM a Cy5 InfA/H1N1 LC Mixu a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX (specifického pro interní kontrolu), je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA.

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu specifického pro Chřipku B v kanálu FAM InfB LC Mixu a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX (specifického pro interní kontrolu), je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA.

Kontrolní postup

Souprava EliGene® Influenza A/B/pandemic LC zahrnuje interní kontrolu (IC RNA). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace RNA a detekuje případné chyby v procesu izolace RNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě, že vzorek je Chřipka A, A/H1N1, B RNA negativní, Ct interní kontroly musí být Ct < 35. Interní kontrola musí být přidávána přímo ke vzorku před izolací.

Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující RNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít referenční virový materiál pozitivní na daný kmen chřipky. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době exspirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době exspirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Citlivost soupravy EliGene® Influenza A/B/pandemic LC je 15 genomových RNA (Influenza A, A/H1N1, B) v reakční směsi. Citlivost metodiky byla ověřena následovně. Byly použity vzorky RNA o známé koncentraci genomových RNA Influenza A, A/H1N1 a B. Zkouška proběhla celkem třikrát. Detekce chřipky byla úspěšná ze 100 % u všech vzorků, alespoň 5 genomových RNA v reakčním mixu.

Analytická citlivost je 5 kopií RNA viru chřipky v reakčním Mixu.

Analytická specifita metody je 100%. Analytická specifita metodiky byla ověřena srovnáním primerů a sond se všemi známými DNA sekvencemi v databázi GenBank. Analytická specificita bylo rovněž analyzována přidáním DNA/RNA z SARS-Cov2, EBV, CMV, HSV1, HSV2, VZV, enterovirus, RSV, MTB, *Borrelia* spp., *C. trachomatis*, *E. coli*, *A. niger*, *C. albicans* k reakčnímu Mixu. Tyto DNA nebo RNA neposkytly falešně pozitivní výsledek na přítomnost viru chřipky.

Klinická specifita se testovala na 100 vzorcích sér pacientů. Kit EliGene® Influenza A/B/pandemic LC vykazoval 100% shodu v detekci přítomnosti viru *Influenza A* (10 z 10 vzorků)*, Influenza A/H1N1* (5 z 5 vzorků) a *Influenza B* (8 z 8 vzorků) v porovnání s výsledky získanými referenční CE-IVD soupravou.

Měřící interval

Souprava umožňuje detekci 10^1–10^8 virových RNA molekul v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola (IC RNA) pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.

Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace RNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Citlivost detekce RNA influenzy závisí na odběru vzorku, způsobu skladování a způsobu zpracování (RNA izolace, den přijetí vzorku, detekce ihned po izolaci).

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Po smíchání je MasterMix stabilní po dobu 30 minut. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagenciemi a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagenciemi. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagenciemi.
- Likvidujte zbylé reagencie a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započetím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době exspirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagencie poskytované v rámci kitu a reagencie doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagencie z různých šarží!
- Nepoužívejte reagencie ze souprav jiných výrobců!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.

- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagenciemi musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Mikrozkumavky obsahující InfA/H1N1 a InfB LC Mixy jsou určeny pouze pro jedno použití a musí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkumavka obsahující IC RNA je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto Mixem pracujte podle bezpečnostních vět (S):

S36/37. Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Literatura:

Rose N, Hervé S, Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, Andraud M, Camsusou C, Madec F, Simon G. 2013. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. Vet Res. 44(1):72.

Labella AM, Merel SE. 2013. Influenza. Med Clin North Am. 97(4):621-45.

Cha RM, Smith D, Shepherd E, Davis CT, Donis R, Nguyen T, Nguyen HD, Do HT, Inui K, Suarez DL, Swayne DE, Pantin-Jackwood M. 2013. Suboptimal protection against highly pathogenic avian influenza (H5N1) viruses from Vietnam in ducks vaccinated with commercial poultry vaccines. Vaccine. S0264-410X(13)01137-7.

Vysvětlivky

	Katalogové číslo
	Horní teplotní hranice
	Číslo šarže
	Spotřebujte do (poslední den v měsíci).
	Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*
	V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*
	Obsah dostatečný pro "N" testů
	Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.
	Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz