

Liferiver

Aktualizacja Nr.: ZJ0004
Data wydania: 5 Marca 2017

High-Risk Human Papillomavirus (HPV) and Genotyping 16 & 18 Real-Time PCR Kit (Alias: HPV Harmonia) Instrukcja użytkownika

Tylko do badań



TD-0413-02



w U.S.A i Chinach

UE:

Do stosowania z Instrumentami ABI Prism®7500;Bio-Rad CFX96;SLAN-96P;LineGene9600; LightCycler®480



Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd.
www.liferiverbiotech.com Tel: +86-21-34680596
info@liferiverbiotech.com Fax: +86-21-34680595

Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: +(32) 2.732.59.54
Fax: +(32) 2.732.60.03
E-Mail : mail@obelis.net

No. 20 Building, 528 Ruiqing Road, Zhangjiang High-Tech Industrial East District, Shanghai, China
Facility 1: Building #26, 588 Xinjunhuan Road, Pujiang High-Tech Park, Shanghai 201114, China.
Facility 2: 2nd Floor, Building #15, 188 Xinjunhuan Road, Pujiang High-Tech Park, Shanghai 201114, China

1. Przeznaczenie

Zestaw Real-Time PCR High-Risk Human Papillomavirus (HPV) and Genotyping 16 & 18 służy do wykrywania 14 wirusów HPV w celu wspomagania diagnostyki raka szyjki macicy wywołanego przez HPV. Wykorzystując fluorescencyjną metodę detekcji PCR, zestaw ten może wykrywać specyficzne fragmenty DNA wirusów HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68 w wydzielinie dróg moczowo-płciowych oraz w komórkach szyjki macicy. Wśród nich oddzielnie wykrywane są podtypy 16 i 18 wirusa HPV.

2. Zasada działania Real-Time PCR

Zasada wykrywania metodą PCR w czasie rzeczywistym opiera się na fluorogenicznym teście 5' nukleazy. Podczas reakcji PCR polimeraza DNA rozszcza sondę na 5' końcu i oddziela barwnik reporterowy od barwnika ksenonowego tylko wtedy, gdy sonda i docelowy DNA są ze sobą zhybrydowane. W wyniku tego rozszczenia powstaje sygnał fluorescencyjny generowany przez rozszczenie barwnik reporterowy, który jest monitorowany w czasie rzeczywistym przez system detekcji PCR. Cykl PCR, w którym początkowo wykrywany jest wzrost sygnału fluorescencji, jest proporcjonalny do ilości określonego produktu PCR. Monitorowanie intensywności fluorescencji w czasie rzeczywistym umożliwia wykrywanie gromadzącego się produktu, przy czym próbówka reakcyjna nie jest ponownie otwierana po amplifikacji.

3. Opis Produktu

Wiadomo, że różne podtypy wirusa HPV zakażają różne części ciała. Zestaw High-Risk Human Papillomavirus (HPV) and Genotyping 16 & 18 Real-Time PCR Kit zawiera specjalny, gotowy do użycia system do wykrywania podtypów wirusa HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68 za pomocą systemu RT PCR i techniki Taqman. Umożliwia on wykrywanie specyficznych fragmentów DNA wirusa HPV. Master Mix zawiera odczynniki i enzymy do specyficznej amplifikacji DNA HPV. Podczas reakcji PCR fluorescencja jest emitowana i mierzona przez jednostkę optyczną systemu RT PCR. Wykrywanie amplifikowanego fragmentu DNA HPV odbywa się w kanałach fluorometrycznych FAM, HEX/VIC/JOE, TEXAS RED/Cal Red 610 i CY5 z fluorescencyjnym wygaszaczem BHQ1. Spośród tych 4 kanałów, CY5 wykrywa kontrolę wewnętrzną, MNBH. Bufor do ekstrakcji DNA jest dołączony do zestawu, a do ekstrakcji DNA wykorzystuje się próbki wymazów z genitaliów. Zewnętrzna kontrola pozytywna zawiera częściową sekwencję wszystkich 14 wirusów HPV wysokiego ryzyka.

4. Składniki Zestawu

Nr.	Typ odczynnika	Prezentacja, 25 reakcji
1	Bufor Ekstrakcyjny DNA	2 fiolki, 1,4ml
2	HPV Mix Reakcyjny	1 fiolka, 950µl
3	Mix Enzymów PCR	1 fiolka, 22µl
4	Woda o czystości molekularnej	1 fiolka, 400µl
5	Kontrola Pozytywna HPV	1 fiolka, 400µl

Czułość analityczna: 1x10⁴ kopii/ml

Uwaga: Czułość analityczna zależy od objętości próbki, objętości elucji, metody ekstrakcji kwasów nukleinowych i innych czynników. Jeżeli w zestawie używany jest bufor do ekstrakcji DNA, czułość jest taka sama jak deklarowana. Jednakże, gdy objętość próbki jest kilkadziesiąt, a nawet kilkadziesiąt razy większa niż objętość elucji przy zastosowaniu metody zateżania, może być ona znacznie wyższa.

5. Przechowywanie

- Odczynniki powinny być przechowywane w -20°C. Przechowywanie w +4°C nie jest zalecane.
- Wszystkie odczynniki mogą być używane do upływu daty ważności podanej na etykiecie zestawu.
- Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>3x), ponieważ może to zmniejszyć czułość.
- Podczas pracy wszystkie odczynniki należy przechowywać w chłodnym miejscu.
- Mix reakcyjny należy przechowywać w ciemnym miejscu.

6. Dodatkowo wymagane materiały i urządzenia

- Komora Biologiczna
- System do real time PCR
- Mikrowirówka stacjonarna do próbek typu "ependorf" (RCF maks. 16 000 x g)
- Vortex
- Próbówki/plytki do reakcji real time PCR
- Pojemnik kriogeniczny
- Pipety (0.5 µl – 1000 µl)
- Steryjne końcówki filtrujące do mikropipet
- Steryjne mikróbowki
- Jednorazowe bezprudowe rękawiczki
- Pojemnik na odpady stanowiące zagrożenie biologiczne
- Chłodziarka i zamrażarka
- Stojaki na próbówki

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przed rozpoczęciem procedury należy uważnie przeczytać niniejszą instrukcję.
- Badanie to musi być przeprowadzane przez wykwalifikowany personel.
- Próbki powinny być traktowane jako zakaźne i należy je przygotowywać w komorze laminarnej.
- Badanie to należy przeprowadzać zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej.
- Nie należy używać zestawu po upływie terminu ważności.
- Unikaj wielokrotnego rozmrażania i zamrażania odczynników, ponieważ może to zmniejszyć czułość testu
- Po rozmrożeniu odczynników przed użyciem próbówki należy wytrząsnąć i krótko odwirować.
- Przygotować szybko Mix Reakcyjny na lodzie lub w bloku chłodzącym.
- Utworzyć dwa oddzielne obszary robocze: 1) Izolacja RNA/ DNA oraz 2) Amplifikacja/wykrywanie produktów amplifikacji.
- Nie należy rozpraszając pipet, fiolek i innych materiałów roboczych między jednostkami roboczymi.
- Należy zawsze używać sterylnych końcówek z filtrami do pipet
- W każdym obszarze należy nosić oddzielne fartuchy i rękawice.
- Nie pipetować ustnie. Nie jeść, nie pić i nie palić w laboratorium, unikać aerozoli.

8. Pobieranie, przechowywanie i transport próbek

- Próbki należy pobrać do sterylnych próbek.
- Próbki można ekstrahować natychmiast lub zamrozić w temperaturze od -20°C do -80°C.
- Transport próbek klinicznych musi być zgodny z lokalnymi przepisami dotyczącymi transportu czynników etiologicznych.

9. Procedura

9.1 Ekstrakcja DNA

Bufor do ekstrakcji DNA jest dołączony do zestawu. Bufor należy dokładnie rozmrozić i krótko odwirować

w wirówce przed użyciem. Można użyć własnego zestawu do ekstrakcji lub zestawu komercyjnego.

9.1.1 Wymaz z narządów płciowych i komórki szyjki macicy

- Za pomocą specjalnego przyrządu do pobierania próbek z szyjki macicy delikatnie zeszkrobuję się komórki z szyjki. Próbkę należy umieścić w zamkniętej sterylnej szklanej próbówce.
- Przepłukać próbkę w 1,0 ml normalnego roztworu soli fizjologicznej i energicznie wymieszać. Wirować przy 13 000 obr/min przez 5 minut. Ostrożnie usunąć i wyrzucić supernatant z próbówki, nie naruszając osadu.
- Dodać 1,0 ml roztworu soli fizjologicznej i zawiesić osad, energicznie go wirując. Wirować przy 13 000 obr/min 5 minut. Ostrożnie usunąć i wyrzucić supernatant z próbówki, nie naruszając osadu.
- Dodać 50µl buforu do ekstrakcji DNA, zamknąć próbówkę, a następnie wirować przez 10 sekund. Krótko odwirować w wirówce stołowej.

5) Inkubować próbówkę przez 10 minut w temperaturze 100°C.

6) Wirować próbówkę z prędkością 13 000 obr/min przez 5 minut. Supernatant zawiera wyekstrahowane DNA i może być użyty jako wzorzec do PCR.

Uwaga:

- Podczas inkubacji należy upewnić się, że próbówka nie jest otwartądyż opary przedostaną się do powietrza i mogą spowodować skażenie, jeśli próbka będzie miała wynik dodatni.
- Próbkę do ekstrakcji należy wykorzystywać w ciągu 3 godzin lub przechowywać w temperaturze -20°C przez 1 miesiąc.
- Zestawy do ekstrakcji DNA pochodzą od różnych producentów. Można użyć własnego lub komercyjnego zestawu, w zależności od oczekiwanej wydajności. W celu ekstrakcji DNA postępować zgodnie z instrukcjami producenta.

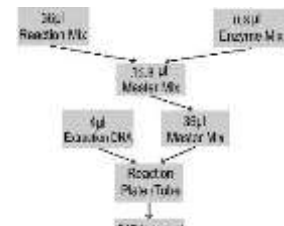
9.2 Kontrola wewnętrzna

Gen MNBH jest wykrywany jako kontrola wewnętrzna. Wszystkie próbki kliniczne powinny wykazywać wynik pozytywny MNBH, co wskazuje na obecność wystarczającej ilości kwasu nukleinowego z ludzkiego genu MNBH. Niewykrycie MNBH w którejkolwiek z próbek klinicznych może wskazywać na:

- Nieprawidłową ekstrakcję kwasu nukleinowego.
- Brak wystarczającej ilości ludzkiego materiału komórkowego w próbce.
- Nieprawidłowe przygotowanie lub wykonanie badania.
- Nieprawidłowe działanie odczynnika lub sprzętu.

9.3 Protokół PCR

Objętość Master Mixa do każdej reakcji powinna być pipetowana następująco:



- Pomnożyć objętości Mixu reakcyjnego i Mixu enzymów na reakcję przez liczbę próbek, która obejmuje liczbę przygotowanych kontroli i próbek. Jako kontrolę negatywną stosuje się wodę klasy molekularnej. Ze względu na niedokładne pipetowanie należy zawsze dodawać dodatkową wirtualną próbkę. Całkowicie wymieszać, a następnie krótko odwirować w wirówce centrifuge.
- Odpipetować 36µL Master Mix za pomocą mikropipet ze sterylnymi końcówkami filtracyjnymi do każdej studzienki reakcji real time PCR. Osobno dodać 4µL wzorca próbki DNA, kontroli pozytywnej i negatywnej do różnych studzienek reakcyjnych. Natychmiast zamknąć studzienki, aby uniknąć kontaminacji.

3) Krótko odwirować, aby zebrać Master Mix na dnie studzienek reakcyjnych.

4) Przeprowadź następujący protokół na instrumencie:

94°C przez 2min	1 cykl
93°C przez 10sek, 62°C (poniżej 0.2°C dla każdego cyklu) przez 31sek	15 cykli
93°C przez 10sek, 61°C przez 31sek ; (Fluorescencję mierzyc w 61°C)	40 cykli

Wybór Kanałów Fluorescencyjnych	
FAM	Target Kwasów Nukl.
VIC	Target Kwasów Nukl.
610	Target Kwasów Nukl.
CY5	Target Kwasów Nukl.

- Jeśli stosujesz system ABI Prism®, wybierz "none" jako pasywny punkt odn. i wygaszacz.
- Jeśli stosujesz system LightCycler®480, przed wykryciem należy przeprowadzić kompensację kolorów.

10. Ustawienie podstawowe: Nicco powyżej maksymalnego poziomu wody o czystości molekularnej.

11. Kontrola Jakości:

Kontrola	FAM	HEX	610	CY5
Woda o Czystości Molekularnej (Kontrola Negatywna)	UNDET	UNDET	UNDET	UNDET
Kontrola Pozytywna	Ct≤35			

12. Dane Analizy i Interpretacji

1) Wynik Pozytywny: Próbka zawiera pewien serotyp DNA HPV. Możliwe są następujące wyniki:

FAM	HEX	610	CY5	Wynik	
1	Ct≤38	UNDET	UNDET	Co najmniej jeden z HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	
2	UNDET	Ct≤32	UNDET	HPV 16	
3	UNDET	UNDET	Ct≤30	HPV 18	
4	UNDET	UNDET	UNDET	Ct ≤22	Mniej niż limit detekcji lub negatywny
5	UNDET	UNDET	UNDET	Ct > 22 lub UNDET	Szczegółowe informacje patrz punkt 9.2

W przypadku dalszych pytań, prosimy o kontakt: diag@tkbiotech.com.pl