

AMPLICOR® Internal Control Detection Kit

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

AMPLICOR® Internal Control Detection Kit

IC MWP DK

96 Tests

P/N: 20763306 122

ART: 07 6330 6

US: 83324

POUŽITÍ

Souprava pro detekci vnitřní kontroly AMPLICOR Internal Control Detection Kit se používá ve spojení s testem na mikrodestičkách AMPLICOR Microwell Plate (MWP) Tests, který možnost vnitřní kontroly obsahuje. Při těchto diagnostických testech *in vitro* se využívá amplifikace nukleové kyseliny polymerázovou řetězovou reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR) a hybridizace nukleové kyseliny k detekci terčové nukleové kyseliny ve vzorcích. Do každé amplifikační reakce se při nich přidává vnitřní kontrola, která je v klinickém vzorku amplifikována společně s terčovou nukleovou kyselinou a slouží ke sledování účinnosti testu. K detekci signálu specifického pro vnitřní kontrolu slouží souprava AMPLICOR Internal Control Detection Kit. Detekce amplifikované DNA vnitřní kontroly se provádí podle uživatelské volby.

POSTUP

PCR amplifikace

Při testech AMPLICOR MWP s možností vnitřní kontroly lze provádět současně amplifikaci terčové nukleové kyseliny a nukleové kyseliny vnitřní kontroly. Činidlo Master Mix, které je v testu použito, obsahuje dvojici biotinylovaných primerů specifických pro terč i pro vnitřní kontrolu, takže se vnitřní kontrola amplifikuje společně s terčovou nukleovou kyselinou z klinického vzorku.

Amplifikace vnitřní kontroly

Při enzymatických amplifikačních postupech, jakým PCR je, se může účinnost snižovat v důsledku přítomnosti inhibitorů v klinickém vzorku. K vybraným testům AMPLICOR je vnitřní kontrola přidávána proto, aby se daly zjistit zpracované vzorky, jež obsahují látky, které by mohly PCR amplifikaci rušit. Vnitřní kontrolou pro daný test AMPLICOR je plazmid neinfekční DNA nebo transkript RNA s oblastmi vazby primeru identickými s těmi, jež se nacházejí v terčové sekvenci pro test specifické, s randomizovanou interní sekvencí podobné délky a složení bázi jako u terčové sekvence a s jedinečnou oblastí vazby sondy, kterou se ampikon vnitřní kontroly od terčového ampikonu odlišuje. Tyto vlastnosti byly zvoleny tak, aby se zajistila stejná účinnost amplifikace vnitřní kontroly a terčové nukleové kyseliny specifické pro daný test.

Hybridizace

Pro PCR amplifikaci se testovaný ampikon a ampikon vnitřní kontroly přidávkem denaturačního roztoku chemicky denaturuje na jednořetězovou DNA. Na mikrodestičce se do jednotlivých jamek potažených oligonukleotidovou sondou specifickou buď pro terč nebo pro vnitřní kontrolu přidávají alikvotní podíly denaturovaného ampikonu. Biotinem značený testovaný ampikon a ampikon vnitřní kontroly se hybridizuje na terčově specifické oligonukleotidové sondy navázané na jamky příslušných mikrodestiček (MWPs). Touto hybridizační ampikonu na terčově specifickou sondu se zvyšuje celková specifičnost testu.

Detekce

Pro hybridizaci se destička opláchně, aby se odstranil nenavázaný materiál, a do všech jamek na destičce se přidá kojugát avidinu s křenovou peroxidázou. Ten se váže na biotinem značený ampikon hybridizovaný na terčově specifický oligonukleotid (testovací nebo vnitřní kontroly) navázaný na destičku. Destičky se znovu vypláchnou, aby se odstranil nenavázaný kojugát, a do jamek se přidá substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje navázaná křenová peroxidáza oxidaci TMB na barevný komplex. Reakce se zastaví přidávkem slabé kyseliny a na automatickém čtecím zařízení pro vyhodnocování mikrodestiček se odečte absorbance u 450 nm.

ČINIDLA

AMPLICOR Internal Control Detection Kit

Souprava pro detekci vnitřní kontroly AMPLICOR

(P/N: 20763306 122; ART: 07 6330 6; US: 83324)

IC MWP DK

96 testů

IC MWP

(Mikrodestička pro vnitřní kontrolu)

1 x 96 testů

Mikrodestička potažená DNA sondou specifickou pro vnitřní kontrolu
Dvanáct 8-jamkových stripů v jednom opakovaně těsně uzavíratelném
sáčku s vysoušedlem

[3] AV-HRP

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

1 x 12 ml

Pufr Tris-HCl

< 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou

Bovinní gamaglobulin (savčí)

Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyakui Co., Ltd.)

0,1% fenol

1% ProClin® 150

[4A] SUB A

(Substrát A)

1 x 12 ml

Citrátový roztok

0,01% peroxid vodíku

0,1% ProClin 150


[4B] SUB B

(Substrát B)

1 x 3 ml

0,1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)

40% dimethylformamid (DMF)

T  40% hm. dimethylformamid (DMF)

Toxický

R: 61-20/21-36

Může poškodit plod. Při vdechování a styku
s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45

Nevystavujte se expozici – před použitím si
vyžádejte speciální pokyny. V případě nehody
nebo necítíte-li se dobře, vyhledejte okamžitě
lékařskou pomoc (pokud možno ukažte štítek).

[5] STOP

(Stop činidlo)

1 x 12 ml

4,9% kyselina sírová

10X WB

(Promývací koncentrát 10X)

2 x 90 ml

< 2% fosfátový pufr

< 9% chlorid sodný

EDTA

< 2% detergent

0,5% ProClin 300

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Nepipetujte ústy.
- C. V pracovních laboratorních prostorách nejzte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- D. Při odebrání alikvotních podílů z lahviček s činidly dbejte, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci. Doporučuje se používat sterilní pipety a špičky na jedno použití.
- E. Nesměšujte dohromady činidlo z různých šarží, ani z různých lahviček téže šarže.
- F. Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- G. Po datu expirace již soupravu nepoužívejte.
- H. Materiálový bezpečnostní list si můžete vyžádat od místního zastoupení firmy Roche.
- I. Pracovní tok v laboratoři musí postupovat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru (Příprava činidel/Příprava vzorků a kontrol) k poamplifikačnímu prostoru (Amplifikace/Detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
- J. Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními a používat odpovídající laboratorní postupy, například ty, jež jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹ nebo v dokumentu NCCLS M29-A². Všechny plochy důkladně vyčistíte a vydezinfikujete čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v deionizované vodě.

POZNÁMKA: *Běžně prodávané tekuté bělicí prostředky pro domácnost obsahují chlornan sodný obvykle v koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tedy získáme zředěním bělicího prostředku pro domácnost v poměru 1 : 10.*

- K. Při manipulaci s [3] AV-HRP, [4A] SUB A, [4B] SUB B, pracovním substrátem (směs [4A] SUB A a [4B] SUB B) a [5] STOP noste prostředky ochrany očí, laboratorní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste tuto péči zanedbali, mohly by se vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zředte vodou.
- L. Zamezte styku pokožky a sliznic s [4B] SUB B nebo s pracovními substráty. Pokud se některá z těchto látek do styku s pokožkou dostane, okamžitě ji omyjte velkým množstvím vody.
- M. [4B] SUB B a pracovní substrát obsahuje dimethylformamid, o němž existují údaje, že je ve vysokých orálních dávkách toxický a může poškodit plod. Je třeba se vyvarovat potřísnění pokožky, vdechnutí par a požití. Pokud k potřísnění pokožky dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

- A. **Činidla nezmrazujte.**
- B. **[5] STOP** uchovávejte při teplotě 2–25°C. Činidlo je stále do vyznačeného data expirace.
- C. **IC MWP** uchovávejte v dodaném plastovém vaku při teplotě 2–8°C. V neotevřeném vaku je látka stálá. Po otevření je stálá 3 měsíce (resp. do data expirace, je-li tato doba kratší), musí být ovšem ponechána ve vaku, který je opět těsně uzavřen a obsahuje vysoušedlo.
- D. **[3] AV-HRP, [4A] SUB A** a **[4B] SUB B** uchovávejte při teplotě 2–8°C. V neotevřeném stavu jsou tato činidla stálá do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou činidla stálá 3 měsíce (resp. do data expirace, je-li tato doba kratší).
- E. Pracovní substrát se připravuje smísením **[4A] SUB A** s **[4B] SUB B** a musí se připravovat denně čerstvý. Je-li chráněn před světlem, je při pokojové teplotě stálý 3 hodiny. **[4A] SUB A, [4B] SUB B** ani pracovní substrát nesmí přijít do styku s kovy, s oxidačními činidly ani přímým světlem.
- F. **10X WB** uchovávejte při teplotách 2–25°C. Činidlo **10X WB** je stále do vyznačeného data expirace. Pracovní promývací roztok (1X) se připravuje přidáním 1 objemu **10X WB** do 9 objemů destilované nebo deionizované vody a uchovává se v čisté uzavřené plastové nádobě při teplotách 2–25°C. Je stálý 2 týdny ode dne přípravy.

MATERIÁLY, JEŽ JSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

AMPLICOR Internal Control Detection Kit

Souprava pro detekci vnitřní kontroly AMPLICOR

IC MWP DK

(P/N: 20763306 122; ART: 07 6330 6; US: 83324)

IC MWP

(Mikrodestička s jamkami pro vnitřní kontrolu)

[3] AV-HRP

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

[4A] SUB A

(Substrát A)

[4B] SUB B

(Substrát B)

[5] STOP

(Stop činidlo)

10X WB

(Promývací koncentrát 10X)

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci/detekci

- Detekční souprava AMPLICOR specifická pro daný terč.
- Multikanálový pipetor (objem 25 µl a 100 µl) nebo elektronický pipetor (Impact® nebo AMPLICOR®)
- Pipetové špičky s aerosolovou bariérou (25 µl a 100 µl) a špičky bezbariérové (100 µl)*
- Omývač mikrodestiček**
- Čtecí zařízení na mikrodestičky ***
- Zásobníky na činidla na jedno použití
- Víčko k mikrodestičkám
- 96-well strip ejector, Costar® #2578
- Inkubátor 37°C ± 2°C
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Rukavice na jedno použití, bez pudru
- Odměrné válce

* Pipetory musejí být přesné na 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, je třeba používat špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky „positive displacement“, aby se předešlo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

** K promývání destiček o formátu 12 x 8 mikrojamek s objemem 250–300 µl promývacího roztoku na jednu jamku v 30-sekundových intervalech.

*** Specifikace čtečky mikrodestiček: Šíře pásma 10 nm ± 3 nm, rozsah absorbcí u 450 nm 0 až ≥ 3,00, opakovatelnost ≤ 1 %, správnost ≤ 3 % od 0 do 2,00 A₄₅₀, drift absorbance u 450 nm ≤ 0,01 za hodinu.

NÁVOD K POUŽITÍ

A. Zkušební vzorky

Detekční souprava AMPLICOR na vnitřní kontrolu se používá společně s těmi testy AMPLICOR MWP, které možnost vnitřní kontroly obsahují. Amplifikované vzorky pro detekci vnitřní kontroly se připravují, jak je popsáno v části „*Návod k použití*“ příslušného příbalového letáku pro daný test.

B. Detekce vnitřní kontroly

Provádí se v prostoru: Poamplifikace – prostor amplifikace/detekce

POZNÁMKA: *Hybridizační pufr (I2) HYB NENÍ součástí detekční soupravy pro vnitřní kontrolu. K detekci vnitřní kontroly použijte hybridizační pufr dodaný v rámci příslušné soupravy AMPLICOR MWP Test. Množství tohoto pufru v soupravě je pro daný účel postačující.*

1. Všechna činidla zahřejte na pokojovou teplotu.
2. Připravte promývací roztok následujícím postupem. Prohlédněte **10X WB** a zpozorujete-li sraženinu, rozpusťte ji zahřátím kapaliny na teplotu 30–37°C. Přidejte jeden objem **10X WB** k 9 objemům destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchat. Pro ruční promývání připravte 40 ml pracovního promývacího roztoku na každý 8-jamkový strip MWP. Pro automatické promývání připravte potřebné množství s ohledem na používané promývací zařízení na mikrodětičky. Pracovní promývací roztok se uchovává v čisté uzavřené nádobě za teplot 2–25°C; je pak stálý 2 týdny ode dne přípravy.
3. Než **IC MWP** vyjmete z plastového vaku, nechte je vytemperovat na pokojovou teplotu. Vyjměte z balení potřebný počet 8-jamkových stripů a uložte je do rámu MWP. Nepoužité stripy vraťte do vaku a vak opět těsně uzavřete; přitom nezapomeňte, že ve vaku musí být také vysoušedlo. **POZNÁMKA: Se stripy MWP je třeba zacházet opatrně, aby se nerozbily.** K vyjmutí stripů z rámu vystředte MWP na ejektoru (Costar 96-well strip ejector) a rovnoměrně tiskněte rohy rámu. K zajištění stripů na místě položte ejektor na ně a rovnoměrně na ně tiskněte.
4. Do každé jamky na testované desce **IC MWP** odměřte 100 µl činidla [2] **HYB** specifického pro daný test.
5. Pokud byl denaturovaný amplikon uchovávaný při teplotě 2–8°C, inkubujte jej po dobu 2–4 minut při 37°C, aby se snížila jeho viskozita.
6. Do jamky (jamek) MWP odměřte pomocí špiček s aerosolovou bariérou po 25 µl denaturovaného amplikonu. Na destičku asi 10–15 krát jemně poklepejte, dokud barva nepřejde z modré na světle žlutou (barevný přechod indikuje, že je směs dostatečně promíšena).
7. Destičku MWP přikryjte víkem a po dobu uvedenou na příbalovém letáku k příslušnému testu AMPLICOR MWP Test inkubujte při teplotě 37°C ± 2°C.
8. Destičku MWP promyjte pracovním promývacím roztokem, a to buď ručně, nebo na automatickém promývacím zařízení.

Ruční promývání:

- a. Vyprázdněte destičky a na papírových ubrouscích vysušte.
- b. Do každé jamky napipetujte tolik promývacího roztoku, aby se jamka zcela zaplnila (250–300 µl). Nechte 30 sekund prosakávat. Obsah vylijte a vysušte.
- c. Krok (b) ještě čtyřikrát zopakujte.

Při automatickém vymývání nastavte promývací zařízení takto:

- a. Vysajte obsah jamek.
- b. Naplňte každou jamku až po okraj promývacím roztokem (přibližně 250–300 µl podle typu myčky destiček), nechte odmočit 30 sekund a odsajte všechnu tekutinu.
- c. Opakujte krok (b) 4 krát.
- d. Po skončení automatického mytí osušte destičky.

9. Přidejte 100 µl [3] **AV-HRP** do každé jamky (AMPLICOR Electronic Pipettor, Program 2). Destičku MWP přikryjte a inkubujte 15 minut při teplotě 37°C ± 2°C.
10. Potom ji promyjte podle kroku 8.
11. Připravte pracovní substrát smícháním 2,0 ml [4A] **SUB A** a 0,5 ml [4B] **SUB B** pro každý násobek dvou proužků mikrodestiček s 8 jamkami (16 testů). Připravený pracovní substrát je třeba do 3 hodin spotřebovat. Uchovávejte jej při pokojové teplotě a chráňte před přímým světlem.
12. Do všech testovaných jamek odměřte po 100 µl připraveného pracovního substrátu.
13. Ponechte stát ve tmě při pokojové teplotě (20–25°C), aby se během 10 minut objevilo zbarvení.
14. Do všech jamek odměřte po 100 µl činidla [5] **STOP**.
15. V době do jedné hodiny od přidání činidla [5] **STOP** změřte absorbanci u 450 nm Zjištěné hodnoty všech vzorků a kontrol zaznamenejte.

VÝSLEDKY

Mezní hodnoty pro vnitřní kontrolu jsou specifické pro jednotlivé testy. Tyto hodnoty, včetně podrobných pokynů k interpretaci výsledků testu, lze nalézt v části „*Interpretace výsledků s detekcí vnitřní kontroly*“ příbalového letáku k danému testu AMPLICOR MWP Test.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Pracovní tok v laboratoři musí postupovat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru (Příprava činidel/Příprava vzorků a kontrol) k poamplifikačnímu prostoru (Amplifikace/Detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
2. Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu věcí zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti testu je třeba věnovat mimořádnou péči tomu, aby se zachovala čistota reagensů soupravy a amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je na kontaminaci podezření, je třeba činidlo zlikvidovat.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Viz část „*Funkční charakteristiky*“ příbalového letáku příslušného testu AMPLICOR MWP Test.

LITERATURA

1. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
2. NCCLS. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue. Approved Guideline. NCCLS Document M29-A Villanova, PA:NCCLS, 1997.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
Clen Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics Corporation
Indianapolis, IN 46256 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center®
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

Roche Diagnostics
H7V 4A2 Laval, Quebec
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Piazza Durante 11
I-20131 Milano

Distribuidor em Portugal:
Roche Farmacêutica Química, Lda
P-2700 Amadora

United States:

Roche® je registrovaná obchodní známka společnosti Hoffmann-La Roche Inc.

AMPLICOR® je registrovaná obchodní známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc., licencovaná subjektu Roche Diagnostics Corporation.

Roche Response Center® je registrovaná známka služby společnosti Roche Diagnostics Corporation.

Ostatní země:

Výše uvedené obchodní známky buď ve vlastnictví nebo v licencovaném používání dceřině společnosti společnosti Roche, jež produkt distribuuje.

Costar® je registrovaná obchodní známka společnosti Corning Costar Corporation.

Impact® je registrovaná obchodní známka společnosti MATRIX Technologies, Inc.

ProClin® je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

Copyright Roche Molecular Systems, Inc., 2003. Všechna práva vyhrazena.

4/2003

(58000876-01ENGL)
04496604001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

