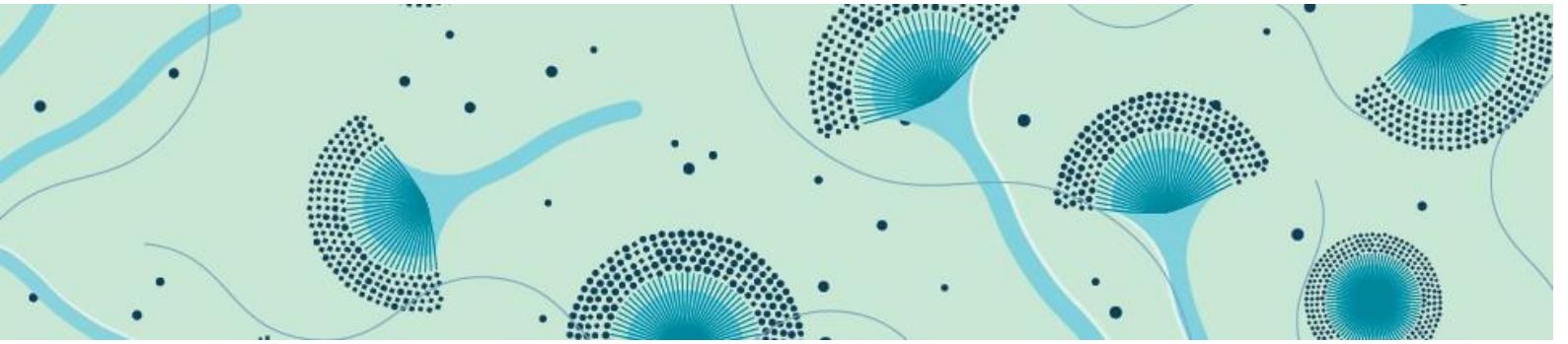


AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex real-time PCR kit

PN-101

Základní UDI: 87193267509PN-101E9

Σ **50**

PN-201

Základní UDI: 87193267509PN-201EE

Σ 50

Návod k použití Verze 2.2 EN

CE IVD

Prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Výsledky získané z těchto nebo jiných diagnostických testů by měly být použity a interpretovány pouze v kontextu celkového klinického obrazu. Společnost PathoNostics BV nemůže přijmout odpovědnost za žádná klinická rozhodnutí, která jsou učiněna. Společnost PathoNostics BV nepředstavuje tuto příručku jako komplexní souhrn všech možných výsledků používání souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex PCR v reálném čase. Tato příručka je určena výhradně k použití jako pomůcka pro paměť. Není určen k použití v žádné klinické interpretaci výsledků testu. Laboratoře musí interpretovat a hlásit výsledky testu v souladu se svými vlastními místně vyvinutými postupy.

PathoNostics BV SE ZŘÍKÁ VŠECH ZÁRUK TÝKAJÍCÍCH SE TOHOTO DOKUMENTU, VYJÁDŘENÝCH NEBO PŘEDPOKLÁDANÝCH, VČETNĚ, ALE BEZ OMEZENÍ NA ZÁRUKY PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO KONKRÉTNÍ ÚČEL. V MAXIMÁLNÍM ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM V ŽÁDNÉM PŘÍPADĚ NEBUDE SPOLEČNOST PathoNostics BV ODPOVĚDNÁ, AŤ UŽ NA ZÁKLADĚ SMLOUVY, DELIKTU, ZÁRUKY NEBO JAKÉHOKOLI ZÁKONA NEBO NA JAKÉMKOLI JINÉM ZÁKLADĚ, ZA ZVLÁŠTNÍ, NÁHODNÉ, NEPŘÍMÉ, REPRESIVNÍ, VÍCENÁSOBNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY V SOUVISLOSTI S TÍMTO DOKUMENTEM NEBO Z NĚJ VYPLÝVAJÍCÍ, MIMO JINÉ VČETNĚ JEHO POUŽITÍ, AŤ UŽ PŘEDVÍDATELNÉ NEBO NEPŘEDVÍDATELNÉ A BEZ OHLEDU NA TO, ZDA BYLA SPOLEČNOST PathoNostics BV UPOZORNĚNA NA MOŽNOST TAKOVÝCH ŠKOD.

SOUPRAVY ASPERGENIUS® 2.0 SPECIES AND RESISTANCE TR MULTIPLEX REAL-TIME PCR KITY JSOU DODÁVÁNY PRO PROFESIONÁLNÍ DIAGNOSTICKÉ TESTOVÁNÍ IN VITRO. TYTO PRODUKTY NEPOSKYTUJÍ LICENCI K PROVÁDĚNÍ PCR NA ZÁKLADĚ PATENTŮ VLASTNĚNÝCH JAKOUKOLI TŘETÍ STRANOU, VČETNĚ HOFFMAN-LA ROCHE (HOFFMANN-LA ROCHE LTD, DIAGNOSTICS, CH-4070 BASEL, ŠVÝCARSKO) A ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC., 1145 ATLANTIC AVENUE, ALAMEDA, KALIFORNIE 94501)

Zákazník je odpovědný za validaci testů a dodržování regulačních požadavků, které se týkají jeho postupů a použití souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex pro PCR v reálném čase.

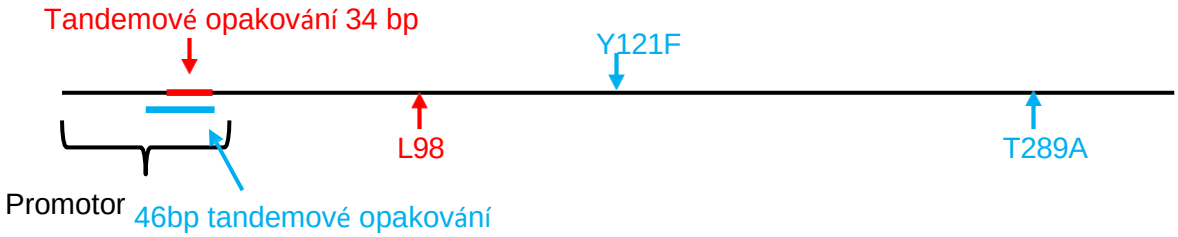
Obsah

1. Shrnutí a souvislosti 4
2. Použití 5
3. Princip testu 6
4. Produkty a cíle 6
5. Dodané materiály 7
6. Požadované, ale neposkytnuté materiály 7
7. Obecná bezpečnostní opatření 9
8. Skladování a manipulace s reagenciemi 9
9. Skladování a manipulace se vzorky 10
10. Extrakce a příprava nukleových kyselin 10
10.1 Ukázky BAL 10
10.2 Další typy vzorků 13
10.3 Další platformy pro extrakci DNA 14
10.4 Kontroly 15
11. Nastavení přístroje PCR v reálném čase 16
11.1 Nastavení filtru 16
11.2 Další informace pro každý přístroj PCR 16
11.3 Program real-time PCR 18
12 Procedura 19
12.1 Místnost 1: příprava real-time PCR mixů 19
12.2 Místnost 2: Přidání DNA do směsí PCR 20
12.3 Místnost 3: Spuštění přístroje pro měření PCR v reálném čase 20
13 Interpretace výsledků; Problémy související s přístrojem PCR 20
14 Interpretace výsledků 23
14.1 Druh multiplex 23
14.2 Resistance TR multiplex 23
14.3 Kontrola 24
15 Omezení 25
16 Výkonové charakteristiky 26
16.1 Analytický výkon 26
16.1.1 Mez detekce (LoD) 26
16.1.2 Specifičnost a inkluzivita 26
16.1.3 Robustnost 28
16.1.4 Přesnost a preciznost 28
16.2 Klinický výkon 29
17 Řešení problémů 31
18 Upozornění pro kupujícího 34
18.1 Zavedené změny od poslední revize 35

1. Shrnutí a souvislosti

Invazivní plicní aspergilóza (IPA) je nejčastější invazivní plísňovou infekcí u imunokompromitovaných pacientů a je způsobena především *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Spory druhu *Aspergillus* mohou být vdechnuty a mohou způsobit infekci v dolních plicích během potlačení imunity.
Souprava AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR (PN-101) dokáže detekovat všechny klinicky relevantní *druhy Aspergillus* – konkrétně: *A. fumigatus, A. flavus* a *A. terreus* (pouze CFX96™ a Rotor-gene® Q) přímo v klinickém materiálu, jako jsou: BAL, sérum a plazma.

Stále častěji je hlášena rezistence *A. fumigatus* proti první linii léčby vorikonazolem. Aby se zjistilo, zda je přítomen rezistentní kmen, lze k identifikaci nejrozšířenějších mechanismů rezistence vůči prostředí použít sadu AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit (PN-201): TR34 (L98H) a TR46 (Y121F/T289A).
Míra přežití imunokompromitovaných pacientů s invazivní aspergilózou se dramaticky zlepšila díky mnoha faktorům, z nichž jedním je dostupnost azolových antimykotik. Řada těchto azolů má aktivitu proti infekcím aspergillus, včetně itrakonazolu, vorikonazolu, posakonazolu a isavukonazolu. Vorikonazol je obvykle doporučenou léčbou první linie IPA; nicméně azolová rezistence u *A. fumigatus* byla v posledním desetiletí stále více zjišťována s prevalencí kolísající mezi 1 % a 20 %. Hlavní mechanismus rezistence těchto izolátů spočívá v substituci leucinu za histidin na kodonu 98 *genu cyp51A v kombinaci s tandemovou repeticí páru 34 bází v promotorové oblasti tohoto genu (TR34/L98H), což může vést k vorikonazolu* MIC50 o dávce 8 mg/l. Kromě toho je stále častěji hlášen výskyt druhé kombinace mutací (TR46/Y121F/T289A) u *A. fumigatus* , což má za následek MIC50 >16 mg/l pro vorikonazol. Gen *cyp51A* s těmito mutacemi je znázorněn na obrázku
1. Existují přesvědčivé důkazy o tom, že expozice životního prostředí azolovým fungicidům je hnací silou vzniku mechanismů rezistence TR34/L98H a TR46/Y121F/T289A. Izoláty obsahující tyto mechanismy rezistence jsou v životním prostředí rozšířené a byly získány z životního prostředí a v nemocnicích v několika evropských zemích, ale i v jiných částech světa. Rozhodující je, že 64 % až 71 % pacientů s IA způsobeným *Aspergillus* rezistentním na azol nikdy nedostalo azolovou léčbu a lze je považovat za dosud neléčené azolem. Sledovací studie dále ukázaly, že mechanismy rezistence TR34/L98H a TR46/Y121F/T289A byly zodpovědné za více než 80 % aspergilózy způsobené Aspergillus rezistentním na azol. Diagnóza u pacientů s rizikem invazivní plicní aspergilózy (IPA) je často založena pouze na detekci antigenu *Aspergillus* galactomannan v klinických vzorcích a identifikaci charakteristických abnormalit v plicích pomocí počítačového tomografického (CT) vyšetření. Konvenční kultivace zůstává necitlivá, ale je vyžadována pro testování citlivosti in vitro k detekci rezistence na azoly. Přímá detekce mutací rezistence pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) z klinických vzorků může identifikovat rezistenci. Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase poskytují řešení v této záležitosti, protože je lze použít přímo na klinických vzorcích (BAL nebo sérum) k identifikaci původce *druhu Aspergillus* a identifikaci nejrozšířenějších mechanismů rezistence.



Obrázek 1. Schematický přehled genu *cyp51A* A . *fumigatus*

2. Použití

AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR kit (PN-101) je neautomatizovaný, kvalitativní multiplexní PCR test v reálném čase pro detekci a diferenciaci *Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus flavus* a DNA dalších druhů *Aspergillus*, který se získává po extrakci nukleových kyselin pomocí přístroje NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) nebo spin kitu viru QIAamp MinElute (QIAGEN) z bronchoalveolární laváže (BAL). Test pomáhá při diagnostice invazivní plicní aspergilózy (IPA) u "rizikových" pacientů (lidí), jako jsou pacienti s hematologickými malignitami, příjemci transplantovaných solidních orgánů (SOT) a alogenních transplantátů, pacienti s chronickými plicními onemocněními (např. CF, CHOPN) a jako koinfekce s jinými infekcemi, pokud se používá v kombinaci s jinými klinickými a laboratorními nálezy. Sada AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR je určena pro použití s LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific), přístrojem Mic qPCR (BMS: Biomolecular Systems) a CFX96™ (Bio-Rad).

AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit (PN-201) je neautomatizovaný, kvalitativní multiplexní PCR test v reálném čase pro detekci a diferenciaci *Aspergillus fumigatus cyp51A* wildtype, tandem repeat 34 mutant a tandem repeat 46 mutantní DNA, která se získává po extrakci nukleové kyseliny pomocí přístroje NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) nebo QIAamp MinElute virus spin kit (QIAGEN) ze vzorků bronchoalveolární laváže (BAL). Test pomáhá při diagnostice invazivní plicní aspergilózy (IPA) rezistentní na panazol u "rizikových" pacientů (lidí), jako jsou pacienti s hematologickými malignitami, příjemci transplantovaných solidních orgánů (SOT) a alogenních transplantátů, pacienti s chronickými plicními onemocněními (např. CF, CHOPN) a jako koinfekce s jinými infekcemi, pokud se používá v kombinaci s jinými klinickými a laboratorními nálezy. Sada AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex pro měření v reálném čase je určena pro použití s přístroji LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific), přístrojem Mic qPCR (BMS) a CFX96™ (Bio-Rad).

Produkty jsou určeny pouze pro laboratorní pracovníky.

3. Princip testu

Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR jsou založeny na technologii polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase s využitím optimalizovaných směsí cílově specifických primerů a různých fluorescenčních sond pro detekci a diferenciaci *druhů Aspergillus* a mechanismů rezistence souvisejících s tandemovou repeticí (TR) propůjčující rezistenci vůči azolovým léčivům.
Součástí souprav je vnitřní kontrola (IC), která rozlišuje mezi skutečně negativními vzorky a falešně negativními vzorky, které mohou být důsledkem degradace nukleových kyselin, inhibice PCR nebo selhání testu. K dispozici jsou také pozitivní kontroly (PC), které lze integrovat do každého běhu.

4. Produkty a cíle

K dispozici jsou dvě soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex pro real-time PCR: AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR kit (PN-101) a AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit (PN-201). Sada pro univerzální kompenzaci barev (PN-501) je k dispozici pro koncové uživatele LightCycler® 480 II. Pro uživatele QuantStudia™ 5 je k dispozici sada pro kalibraci barev PathoNostics (PN-507).

Přehled souprav AsperGenius® 2.0 Multiplex pro real-time PCR a jejich odpovídající cíle naleznete v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1: Cíle soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR.

	AsperGenius® 2.0 Species Multiplex	**Cíl**	**Detekční kanál**
PN-101	*A. fumigatus*	Gen 28S rRNA	Zelený
	A. flavus	Gen 28S rRNA	Žlutý
	A. druh	Gen 28S rRNA	Oranžový
	Vnitřní kontrola	Fág M13	Červený
	*A. terreus**	Gen 28S rRNA	Rudý

***Detekce *A. terreus* je možná pouze na real-time PCR cyklerech s 5 detekčními filtry (QS5, CFX96 a RGQ 5-plex)

Tabulka 2: Cíle soupravy AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex PCR v reálném čase.

	AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex	**Cíl**	**Detekční kanál**
PN-201	TR46	*Gen cyp51A*	Zelený
	TR34 řekl:	*Gen cyp51A*	Žlutý
	Gen cyp51A *	*Gen cyp51A*	Oranžový
	Vnitřní kontrola	Fág M13	Červený

*Cíl genu *cyp51A* je specifický jak pro divoký typ *A. fumigatus*, tak pro mutantní kmeny včetně kmenů TR34/L98H a TR46/Y121F/T289A

5. Dodané materiály

Následující materiály jsou zahrnuty v soupravě AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR (PN-101; tabulka 3) a soupravě AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex PCR (PN-201; tabulka 4). Obě soupravy jsou vhodné pro 50 reakcí a měly by být skladovány ve tmě při teplotě -30 °C až -15 °C (doba použitelnosti je uvedena na vnějším štítku krabice).

Tabulka 3. Materiály obsažené v soupravě AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR (PN-101)

Součásti	Komponenta číslo	Objem (µl)	Barva šroubovacího uzávěru
2.0 Směs druhů PCR	CNP2115A	> 500	Jantar
Taq polymeráza	CNP0148A	> 50	Nachový
Vnitřní kontrola	CNP2100A	> 500	Černý
2.0 Pozitivní kontrola druhů	CNP2097A	> 125	Bílý
Ředicí pufr	CNP0012B	> 950	Transparentní
*AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex real-time PCR kit - Inlay eIFU (Návod pro Použití)**			

* Návod k použití lze stáhnout z webového portálu PathoNostics pomocí přihlašovacích údajů uvedených na vložce

Tabulka 4. Materiály obsažené v soupravě AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR (PN-201)

Součásti	Komponenta číslo	Objem (µl)	Barva šroubovacího uzávěru
2.0 Odpor TR Primer/Probe mix	CNP2096A	> 375	Červený
Hlavní mix	CNP2099A	> 625	Nachový
Vnitřní kontrola	CNP2100A	> 500	Černý
Odpor TR pozitivní kontrola	CNP2098A	> 125	Modrý
Negativní kontrola	CNP0243B	> 950	Transparentní
*AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex real-time PCR kit - Inlay eIFU (Návod k použití)**			

* Návod k použití lze stáhnout z webového portálu PathoNostics pomocí přihlašovacích údajů uvedených na vložce

6. Požadované, ale neposkytnuté materiály

Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR jsou vhodné pro přístroje pro real-time PCR, které mají minimálně 4 různé fluorescenční detekční kanály. Sady lze použít na LightCycler® 480 II (LC480 II; Roche), rotorový gen® Q (RGQ; QIAGEN), CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (QS5; Thermo Fisher Scientific) a magnetický indukční cykler (Mic qPCR cykler; Biomolekulární systémy). Pro detekci *Aspergillus terreus* je vyžadován pátý detekční kanál (karmínový) (dostupný pouze na RGQ, CFX96 a QS5). Ujistěte se, že přístroje byly zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce/pokynů pro kvalitu. Níže uvedené materiály jsou vyžadovány pro optimální výkon protokolu AsperGenius® 2.0, ale nejsou poskytovány.

Činidla

- Komponenty pro extrakci DNA: Extrakční činidla NucliSENS® EasyMag®
- Voda bez zázy/sterilní voda PCR (negativní kontrola)
- dithiothreitol (DTT); (Kód produktu Thermo Fisher Scientific #R0861)
- Proteináza K (Roche, kód produktu 03 264 793 001)

Spotřební zboží

- Vhodné keramické korálky (doporučení: MagNA Lyser Green Beads od Roche, kód produktu 03 358 941 001)
- Jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry
- Sterilní 1,5 ml lahvičky bez DNáz (zkumavky Eppendorf)
- Zkumavky PCR o objemu 0,1 nebo 0,2 ml bez obsahu DNázy (QIAGEN®, kód produktu 981103 nebo ThermoFisher Scientific, kód produktu AB-0620) pro použití s Rotor-Gene Q
- Destičky Multiwell 96 (Roche, kód produktu 04 729 692 001) pro použití s přístroji LightCycler® 480 II
- Mikrofonní trubice a víčka bez DNA (BMS, ref 60653) pro použití na cykleru Mic qPCR
- Hard-Shell® PCR destičky 96-jamkové, tenko-jamkové, bílé skořápky/čiré jamky (Bio-Rad, Hsp9601) pro použití na CFX96™
- MicroAmp Fast Optická 96jamková reakční destička 0,1 ml (Applied Biosystems, ref. 4346906) pro použití na QS5

Vybavení

- Perličkový šlehač (doporučení: MagNA Lyser, Roche)
- Nastavitelné pipety: 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
- Stojánek na zkumavky pro 1,5 ml lahvičky (zkumavky Eppendorf)
- Vírový mixér
- Stolní centrifuga s rotorem pro zkumavky o objemu 2,0 ml
- Centrifuga schopná centrifugovat PCR proužky nebo destičky
- Chladicí blok nebo led (pro Taq polymerázu)
- Skříň s laminárním prouděním vzduchu (LAF)
- Kalibrované přístroje LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) nebo Mic qPCR (Bio Molecular Systems)
    - Přístroje LightCycler® 480 II (Roche) a QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) vyžadují před prvním použitím souprav AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase použití dodatečné barevné kompenzace (LC480 II) nebo vlastní kalibrace barviva (QS5). Sada pro univerzální kompenzaci barev (PN-501) je k dispozici koncovým uživatelům přístroje LightCycler® 480 II pro vytvoření požadovaného souboru kompenzace barev. Pro koncové uživatele QuantStudia™ 5 je k dispozici sada PathoNostics Color Calibration kit (PN-507) pro vygenerování požadovaného souboru pro kalibraci barviva.
- Extrakční systém NucliSENS® EasyMag®

7. Obecná bezpečnostní opatření

Provádění laboratorních činností by mělo být vždy prováděno v souladu s obecnými bezpečnostními předpisy. Další informace o chemikáliích naleznete v příslušných bezpečnostních listech materiálů.

Aby se zabránilo křížové kontaminaci a umožnila se optimální výkonnost a reprodukovatelnost zkoušek, měla by být přijata následující opatření:

- Testy by měl provádět pouze kvalifikovaný laboratorní personál.
- Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Fyzicky oddělte sklad a pracoviště tak, jak je uvedeno v tabulce 5.
- Používejte **jednorázové špičky** obsahující hydrofobní **filtry** , abyste zabránili křížové kontaminaci.
- Používejte lahvičky/destičky PCR bez DNázy, které také neobsahují *DNA Aspergillus* .
- Po vyjmutí z mrazničky uchovávejte **Taq polymerázu a Master směs** vždy na **ledu** nebo na **chladicím bloku**. S Taq polymerázou a Master zacházejte opatrně a velmi jemně promíchejte.
- Po rozmrazení **činidla krátce odstřeďte** v odstředivce a promíchejte jemným pipetáním nahoru a dolů.
- Cyklický program by měl být naprogramován v přístroji PCR v reálném čase před provedením testu.
- Při použití PCR destičky vždy krátce před přenosem do real-time cykleru roztočte PCR reakce (není nutné pro RGQ a Mic).
- Po amplifikaci PCR neotevírejte lahvičky/destičky PCR.

8. Skladování a manipulace s reagenciemi

Součásti souprav AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR by měly být skladovány v temnu při -15 °C až -30 °C a jsou stabilní až do data exspirace, které je uvedeno na vnějším štítku krabice. Je třeba se vyvarovat opakovaného rozmrazování a zmrazování (max. 15x).

Aby se zabránilo kontaminaci, doporučujeme provádět experimentální činnosti ve třech samostatných oblastech a ovládací prvky skladovat v oddělené místnosti/místě (tabulka 5).

Tabulka 5. Manipulace s postupy v různých oblastech

Umístění	Manipulace
Pokoj 1	Skladování Taq polymerázy, Master mix, Primer/Probe mix, negativní kontrola Příprava real-time PCR mixu
Pokoj 2*	Skladování: Interní kontrola a pozitivní kontrola(y) Extrakce DNA ze vzorků Přidání extraktů DNA do mixu PCR v reálném čase Přidání pozitivní kontroly do mixu PCR v reálném čase
Pokoj 3	PCR reakce v reálném čase

**Doporučuje se provádět všechny činnosti v laminárním proudění vzduchu, aby se minimalizovala možnost křížové kontaminace Aspergillus vzduchem.*

9. Skladování a manipulace se vzorky

Detekce Aspergillus je závislá na odběru vysoce kvalitních vzorků, jejich rychlém transportu do laboratoře a vhodném skladování před laboratorním testováním. Pro detekci DNA Aspergillus jsou vhodné houbové kultury, bronchoalveolární laváž (BAL), vzorky séra a plazmy a bioptický materiál .

Všechny vzorky by měly být co nejdříve přepraveny do laboratoře a měly by být přednostně zpracovány přímo nebo při dalším zpracování skladovány při -20 °C. Je třeba se vyhnout několika cyklům zmrazení a rozmrazení.

10. Extrakce a příprava nukleových kyselin

Doporučuje se provádět předúpravu a přípravu nukleové kyseliny včetně lýzy v laminární skříni. Extrakční postup může pokračovat na pracovním stole, jakmile je vzorek lyzován. Po použití se doporučuje dekontaminovat laminární box vhodným dekontaminačním roztokem a spuštěním UV světla po dobu 30 minut.

10.1 Ukázky BAL

Vhodným materiálem pro detekci *Aspergillus* je bronchoalveolární laváž (BAL). Pro extrakci DNA se doporučuje použít **1 ml BAL** (elueční objem 50 µl), ale postačí i menší objem, například 0,5 ml. Pro vzorky BAL byl vyvinut specifický protokol extrakce DNA. Pro všechny kroky procesu používejte sterilní nebo dekontaminované materiály a roztoky.

Postup zahrnuje aplikaci materiálů a reagencií od společnosti bioMérieux pro extrakci DNA pomocí přístroje NucliSENS® EasyMag®.

Poznámka: *Aspergillus* DNA může být detekována pouze zpracováním supernatantu vzorku BAL (viz obrázek 2). Proto se doporučuje nejprve zpracovat supernatant, nebo celý BAL, a opakovat extrakci DNA peletou pouze v případě:

- Nesoulad s jinými laboratorními nálezy
- Pozitivní (zesilovací) signály pro A. species a *A. fumigatus*, ale v nepřítomnosti signálů pro rezistenční multiplex

Supernatant BAL pro extrakci DNA pomocí přístroje NucliSENS® EasyMAG® (obrázek 2)

I. Vzorek BAL se promíchá a přidá se 100 µl 1 M DTT např. k 1 ml BAL (konečná koncentrace: ~0,1 M DTT), když je vzorek BAL viskózní, upravte podle množství materiálu
   - ❖ Inkubujte vzorky BAL po dobu 15 minut při 37 °C
   - ❖ Poznámka: pokud jsou vzorky BAL stále viskózní, použijte mechanickou sílu (šlehání housenek)

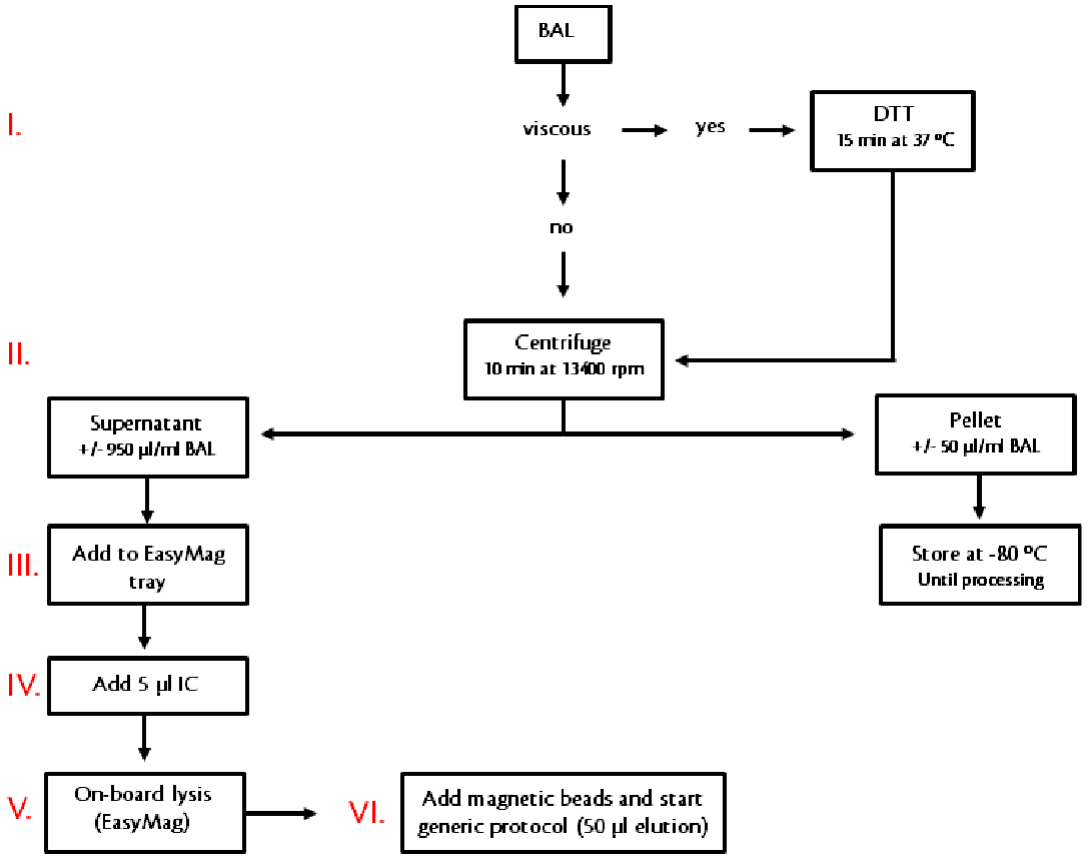
II. Odstřeďujte vzorky BAL po dobu 10 minut při 13400 ot./min (maximální rychlost)
   - ❖ Připravte si EasyMag® podle pokynů výrobce
   - ❖ Zvolte 1 ml jako vstupní objem a 50 µl jako eluční objem
   - ❖ Vyberte obecný protokol
   - ❖ Vyberte palubní lyzační protokol

III. Přeneste supernatant (+/- 950 µl) do zásobníku EasyMag®
   - ❖ Peletu článku skladujte v malém zbývajícím objemu (50 µl) při teplotě -80 °C

IV. Rozmrazte IC, jemně rozvorujte a přidejte 5 µl do BAL supernatantu v zásobníku EasyMag®

V. Spusťte lýzu na palubě (EasyMag® bude dávkovat lyzační pufr a inkubuje se po dobu 10 minut
   - ❖ Připravte si roztok magnetických křemičitých kuliček

VI. Po lýze přidejte připravené magnetické kuličky oxidu křemičitého do lyzačního pufru se supernatantem a resuspendujte
   - ❖ Spusťte extrakci DNA na přístroji EasyMag®
   - ❖ Po 34-40 minutách přeneste eluovanou DNA do zkumavek bez DNáz



Obrázek 2. Vývojový diagram extrakce DNA z BAL supernatantu. Toto schéma ukazuje postup extrakce DNA pro supernatant 1 ml BAL.

Pelety BAL pro extrakci DNA pomocí přístroje NucliSENS® EasyMAG® (obrázek 3)

Pokud supernatant ze vzorku BAL není průkazný z důvodů popsaných výše v této části, lze extrahovat DNA z pelety. Peleta obsahuje především houbový buněčný materiál. Aby byl zajištěn efektivní výtěžek DNA *Aspergillus*, musí být umožněno narušení buněčného materiálu houby. Za tímto účelem se používá šlehání kuliček, které narušuje buněčné struktury hub a získává DNA. Ujistěte se, že jsou přijata obecná opatření, aby nedošlo ke kontaminaci.

I. Přidejte 500 µl lyzační pufr do zkumavky se zelenými perličkami
   - ❖ Přeneste peletu (s pipetou) do zkumavky se zelenými korálky a inkubujte po dobu 10 minut při pokojové teplotě

II. Přidejte 5 µl IC do pufrovací směsi pelet-lýza přítomné v zelené zkumavce a dobře promíchejte

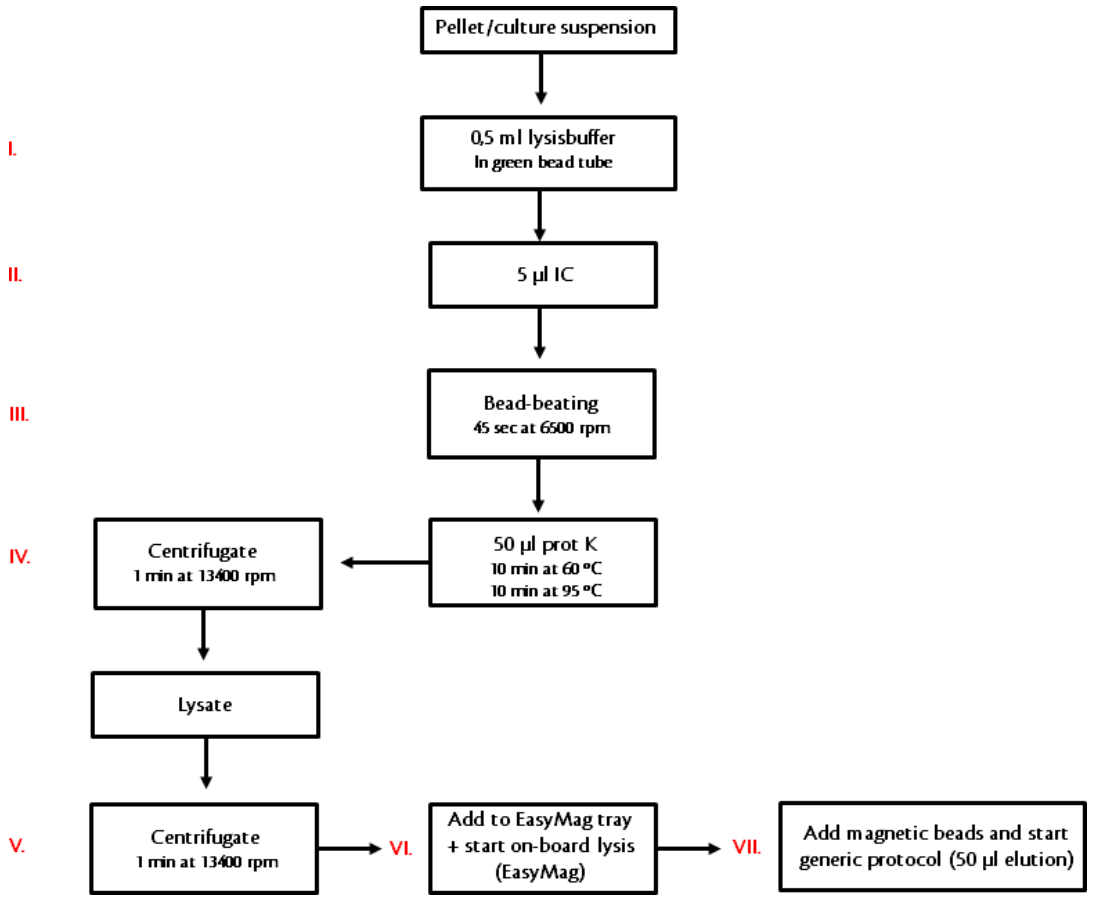
III. Šlehejte trubky v lyseru MagNA (Roche) po dobu 45 sekund při 6500 otáčkách za minutu
   - ❖ Roztočením dolů odstraníte pěnu, která vzniká při šlehání perliček v lyzéru MagNA

IV. Otevřete zkumavky a přidejte 50 µl proteinázy K (30 jednotek/mg z 20 mg/ml)
   - ❖ Vír na pět sekund
   - ❖ Inkubace 10 min při 60 °C
   - ❖ Inkubace 10 min při 95 °C
   - ❖ Odstřeďujte vzorky 1 minutu při 13400 otáčkách za minutu a převeďte kompletní lyzát do nové zkumavky o objemu 1,5 ml

V. Zkumavka s lyzátem se znovu odstředí 1 minutu při 13400 otáčkách za minutu, abyste získali čirou fázi pelet-supernatant

VI. Přeneste supernatantovou fázi obsahující DNA do zásobníku EasyMag®
   - ❖ Všimněte si, že jako vstupní objem vzorku je vybráno 0,5 ml
   - ❖ Spusťte lýzu na palubě (EasyMag® bude dávkovat lyzační pufr a inkubuje se po dobu 10 minut
   - ❖ Připravte si roztok magnetických křemičitých kuliček

VII. Po lýze přidejte připravené magnetické kuličky oxidu křemičitého do lyzačního pufru se supernatantem a resuspendujte
   - ❖ Spusťte extrakci DNA na přístroji EasyMag®
   - ❖ Po 34-40 minutách přeneste eluovanou DNA do zkumavek bez DNáz



Obrázek 3. Vývojový diagram Extrakce DNA z pelet BAL nebo suspenze kultury. Tato tabulka ukazuje postup extrakce DNA pro peletu 1 ml BAL nebo kultivační suspenze získané z kultury.

Poznámka: Zabraňte cyklům zmrazení a rozmrazení extrahované DNA v maximální možné míře a při zpracování ve stejný den skladujte extrakty DNA při teplotě 4 °C. Extrahovanou DNA skladujte po delší dobu při teplotě -20 °C.

10.2 Další typy vzorků

Kultury rodu Aspergillus

Plísňové kultury (zkumavky nebo destičky) lze použít také pro extrakci DNA a následnou analýzu pomocí souprav AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR. Odeberte konidie/mycelium z pozitivní kultury přidáním 5 ml 1x tris-EDTA (pH 8) obsahující 0,5 % Tween® 80 (polysorbát) na povrch kultury obsahující houbu a inkubujte 15 minut. Opatrně odstraňte kulturní suspenzi ze zkumavky nebo destičky. Je třeba se vyvarovat přenosu médií (jako je agar) do procesu extrakce DNA, protože by to mohlo inhibovat extrakci.

- Viz extrakce DNA BAL peleta (obrázek 3)
    - Kultivační suspenze (10 µl) se převede do zkumavky se zelenými perličkami obsahující lyzační pufr
    - Pro extrakci nukleových kyselin z kultur *Aspergillus* není vyžadován žádný DTT

Vzorky séra a plazmy

Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR lze také použít k detekci vzorků séra a plazmy Aspergillus DNA. DNA ze vzorků séra a plazmy lze extrahovat pomocí systému NucliSENS® EasyMag®, jak je popsáno Whitem *et al*. (J klinické mikrobiologie 2015; 53: 2115-2121 a J klinické mikrobiologie 2017; 55: 2356-2366). Vezměte prosím na vědomí, že vzhledem k omezenému *zatížení Aspergillus* v krvi / krevních derivátech může být obtížné jej detekovat
Rezistence A. fumigatus v důsledku detekce genu *pro jednu kopii cyp51A* .

Vzorky tkání

DNA ze vzorků tkáně lze zpracovat podle postupu pelet (obrázek 3). Tkáň musí být přidána přímo do zelené perličkové trubičky obsahující lyzační pufr. Pro extrakci DNA použijte vzorek o maximální velikosti hrášku. Bioptický materiál obsahuje lidskou DNA, která by mohla inhibovat PCR v případě použití vyšších objemů.

10.3 Další platformy pro extrakci DNA

Je důležité si uvědomit, že účinnost extrakce se u různých platforem pro extrakci DNA liší a výtěžek DNA se může lišit. U některých platforem pro extrakci DNA se doporučuje připravit předsměs IC s lyzačním pufrem před přidáním vzorku, aby byla zaručena optimální regenerace IC. V systémech pro extrakci DNA od společnosti Roche (např. přístroje MagNA Pure 96) byla pozorována nižší účinnost extrakce u vzorků s nízkou zátěží *Aspergillus* a u negativních vzorků s IC. To bylo pozorováno zejména u vzorků s "čistou matricí" (např. IC ve vodě používané jako řízení extrakce).

Extrakce DNA pomocí MagNA Pure 96

Různé soupravy pro izolaci nukleových kyselin od společnosti Roche jsou k dispozici pro použití v kombinaci s přístroji MagNA Pure 96. K extrakci DNA z 1 ml vzorků BAL nebo séra doporučujeme použít velkoobjemové sady. Před zahájením extrakce DNA na přístroji MagNA Pure 96 doporučujeme připravit směs 5 µl IC + 15 µl lyzačního pufru (z příslušné soupravy) na vzorek a dávkovat do každé jamky v zásobníku MagNA Pure odpovídající počtu vzorků. Poté přidejte vzorek do zásobníku MagNA Pure a ujistěte se, že je vybrána eluce 50 µl. Lze použít sadu pro malý objem (200 µl), ale nedoporučuje se kvůli snížené citlivosti.

QIAamp MinElute Virus Spin kit

Kromě automatizovaných postupů extrakce DNA lze pro vzorky BAL použít také metody extrakce DNA založené na filtrové koloně. QIAamp MinElute Virus Spin Kit (kat. č. 57704) vykazuje srovnatelnou účinnost extrakce DNA ve srovnání s postupem extrakce DNA na NucliSENS® EasyMAG®. Všimněte si, že tyto filtrační kolony jsou vhodné pouze pro maximální 200 µl BAL.

10.4 Kontroly

Vnitřní kontrola (IC)

Vnitřní kontrola v soupravách AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase je dodávána jako roztok bakteriofágu M13 a přidává se k rozlišení mezi pravdivě negativními vzorky a falešně negativními vzorky, které mohou být důsledkem degradace nukleových kyselin, inhibice PCR nebo selhání testu. Před přidáním IC se ujistěte, že jste smíchali vzorek a lyzační pufr. lyzační pufr obsahuje stabilizační činidlo, které inhibuje DNázy a zabraňuje degradaci IC. Požadovaný objem IC pro přidání do lyzovaného BAL/kultury je **5 µl** a eluční objem by měl být **50 µl**. Při změně elučního objemu je třeba změnit množství intelitu s hroty. Množství IC s hroty je nezávislé na počátečním objemu vzorku.

V případě vzorku s vysokou zátěží *nukleovou kyselinou Aspergillus* a/nebo vícenásobnými infekcemi může být IC během PCR reakce překonán. To je vysvětleno skutečností, že velké množství nukleových kyselin *Aspergillus* spotřebovává většinu činidel v testu. V důsledku toho, pokud IC signál chybí v přítomnosti jedné nebo více amplifikačních křivek indikujících přítomnost *Aspergillus*, je PCR stále platná.

Negativní kontrola (NC)

Negativní kontrola (NC) nebo negativní kontrola extrakce se doporučuje ke stanovení *kontaminace Aspergillus* v činidlech pro extrakci DNA. NC obsahuje pouze IC a nejlépe stejnou matrici vzorku jako vzorky *Aspergillus*. Pokud NC není zahrnuta do běhu, pak se doporučuje zahrnout alespoň negativní reakci kontroly templátu (NTC). NTC existuje pro vodu bez DNázy a je kontrolou kontaminace v běhu AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase a slouží také jako reference pro signál pozadí.

Pozitivní kontrola (PC)

Pozitivní kontroly (PC) v soupravách AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR se skládají ze syntetických fragmentů DNA a pokrývají cílové oblasti, které jsou detekovány v testech. Počítače by neměly být extrahovány a zachází se s nimi jako s normálními extrakty nukleových kyselin v testech AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR. Počítače kontrolují správný postup real-time PCR.

11. Nastavení přístroje PCR v reálném čase

Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase jsou testovány na přístrojích v reálném čase LC480 II, RGQ, CFX96, QS5 a cykleru Mic qPCR s využitím čtyř nebo pěti různých detekčních kanálů (viz tabulka 6). Pro všechny zmíněné přístroje pracující v reálném čase je k dispozici soubor se šablonou protokolu PCR. O to lze požádat u PathoNostics nebo u vašeho místního distributora.

11.1 Nastavení filtru

Nastavení filtrů RGQ, LC480 II a QS5 pro fluorescenční detekci ve čtyřech kanálech je uvedeno v tabulce 6. Tyto formáty zdrojů/detektorů – známé také jako emisní/excitační vlnové délky – by měly být naprogramovány v přístrojích RGQ, LC480 II a QS5 a upraveny podle nastavení v tabulce 6. Indikace čtyř různých detekčních kanálů CFX96™ a Mic qPCR cykleru jsou také uvedeny v tabulce 6. Detekce *A. terreus* není možná na přístroji LC480 II a Mic qPCR, ale je možná na přístrojích Rotor Gene Q, CFX96™ a QuantStudio™ 5 pomocí přístroje 662 (zdroj) / 711 (Detektor) detekčních kanálů. Přístroj QuantStudio™ 5 však vyžaduje další soubor Custom Dye pro nástroj, který lze získat provedením kalibrace barviva pomocí specifického činidla. Toto činidlo je součástí sady pro kalibraci barev PathoNostics (PN-507) a lze jej vyžádat od místního distributora nebo společnosti PathoNostics. Programování přístrojů by mělo být prováděno podle pokynů výrobce. Podrobný popis toho, jak provést tuto kalibraci barviva, naleznete v návodu k použití sady PN-507. Musí být aktivována detekce signálu ve čtyřech/pěti kanálech.

Tabulka 6. Nastavení filtrů pro optimální detekci sond AsperGenius® 2.0 . Není k dispozici = není k dispozici

Druh multiplex	Odporový multiplex	Rotor-Gene (nm)		LC480 II (nm)		QuantStudio 5 (nm)		CFX96	Mic qPCR
		Zdroj	Detektor	Zdroj	Detektor	Zdroj	Detektor		
A. fumigatus	TR46	470	510	465	510	470	520	FAM	Zelený
A. flavus	TR34	530	555	533	580	520 550	558 586	ŠESTNÁCTKOVÝ	Žlutý
A. species	cyp51A	585	610	533	610	580	623	ROX	Pomeranč
IC	IC	625	660	618	660	640	682	CY5	Červený
A. terreus		680	710	Není k dispozici	Není k dispozici	662	711	Kvazar 705	Není k dispozici

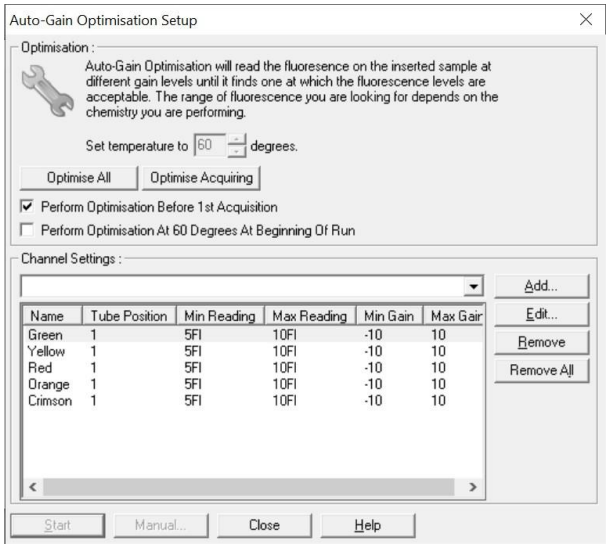
11.2 Další informace pro každý přístroj PCR

Nastavení zesílení Rotor-Gene® Q

Správné nastavení zesílení musí být určeno před zahájením práce s AsperGenius® 2.0 Multiplexním protokolem PCR v reálném čase na Rotor-Gene® Q. Správné nastavení zesílení pro přístroj Rotor-Gene® Q jsou zvolena, aby se zabránilo nasycení v detekčních kanálech. Je nutné použít funkci optimalizace zesílení:

- Vyberte optimalizaci zesílení v průvodci profilem softwaru Rotor-Gene.
- Vyberte možnost "provést optimalizaci před 1. akvizicí" (viz obrázek 4).

- Klikněte na 'optimalizovat získávání', to by mělo umožnit optimalizaci zisku pro zelenou, žlutou, oranžovou, červenou a karmínovou po vygenerování správného AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR protokolu v reálném čase.
- Vyberte jednu pozici elektronky obsahující druh multiplexu pro všech pět kanálů a vyberte 5 až 10 FI (minimální a maximální intenzita fluorescence) a -10 až 10 pro přijatelný rozsah zesílení (minimální a maximální).
- Pokud je do běhu PCR zahrnut také multiplex Resistance, vždy vyberte zkumavku, která obsahuje Species mix pro optimalizaci zisku



Obrázek 4. Optimalizace zisku v softwaru Rotor-Gene.
Příklad obrazovky optimalizace zesílení během zesílení.

LightCycler® 480 II: Kompenzace barev

V důsledku překrývání emisních spekter různých barviv může dojít k přeslechům mezi detekčními kanály. V přístroji LC480 II lze přeslechy kompenzovat pomocí souboru barevné kompenzace. Tento požadovaný soubor pro kompenzaci barev lze vygenerovat použitím směsí pro kompenzaci barev ze sady Universal Color Compensation kit, kterou samostatně poskytuje váš místní distributor nebo společnost PathoNostics na vyžádání (sada Universal Color Compensation; PN-501). Podrobný popis toho, jak vygenerovat soubor kompenzace barev, je uveden v návodu k použití sady pro univerzální kompenzaci barev. Další podrobnosti naleznete v části 11.1.

CFX96™: Vyberte správný typ tiskové desky

Při vytváření nového plátu se ujistěte, že **je Režim skenování** nastavený na **Všechny kanály**, a následně povolte detekční kanály připravené výrobcem: FAM, HEX, ROX, Cy5 a Quasar. Před zahájením běhu AsperGenius® 2.0 PCR se ujistěte, že byl vybrán správný typ destičky.

QuantStudio™ 5: Vyberte správné vlastnosti

Na obrazovce vlastností softwaru QuantStudio™ Design & Analysis použijte následující nastavení:

- Typ experimentu: Relativní standardní křivka
- Chemie: Taqmanova® činidla
- Režim spuštění: Standardní

Kalibrace barev:

Další podrobnosti naleznete v části 11.1.

Podrobné pokyny, jak provést kalibraci karmínového barviva, naleznete v návodu k použití sady pro kalibraci barev PathoNostics (PN-507).

11.3 Program real-time PCR

Cyklický program by měl být naprogramován v přístroji PCR v reálném čase před provedením reakcí AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase. Cyklický program pro LC480 II, CFX96 a QS5 je uveden v tabulce 7. Cyklický program pro RGQ a Mic qPCR je uveden v tabulce 8.

Tabulka 7. Program PCR v reálném čase na LC480 II, CFX96 a QS5

Krok	Čas	Teplota	Funkce
Aktivace Taq	30 sekund	95°C	Aktivace Taq/ Počáteční denaturace
Cyklistika (45x)	10 sekund 30 sekund	95°C 60°C*	Denaturační žíhání a prodlužování

*Aktivujte fluorescenční detekci (detekční kanály viz tabulka 6)

Tabulka 8. Real-time PCR program na RGQ a Mic qPCR

Krok	Čas	Teplota	Funkce
Aktivace Taq	30 sekund	95°C	Aktivace Taq/ Počáteční denaturace
Cyklistika (45x)	10 sekund 30 sekund	95°C **62°C***	Denaturační žíhání a prodlužování

*Aktivujte fluorescenční detekci (detekční kanály viz tabulka 6)

Přehled doby trvání protokolu je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9. Přibližná doba trvání programu PCR v reálném čase.

Přístroj pro PCR v reálném čase	Doba trvání PCR programu (v min)
LC480 II	65
RGQ	95
CFX96	70
Mikrofonní qPCR	65
QS5	65

12 Procedura

Doporučení

- Rozmrazte DNA templátu (pokud je zmrazená) a všechny činidla, a udržujte na ledu.
- Připravte si o něco větší množství, než je potřeba pro různé směsi, abyste kompenzovali ztráty při pipetování.

12.1 Místnost 1: příprava real-time PCR mixů

Real-time PCR reakce se provádí ve finálním objemu 25 µl.

- Připravte si směsi PCR v reálném čase podle tabulky 10 pro testování druhů AsperGenius® 2.0 a podle tabulky 11 pro testování rezistence AsperGenius® 2.0.
  Poznámka: vždy si připravte mírné množství směsi PCR v důsledku ztráty objemu při pipetování; např. připravte se na 11 reakcí, když je potřeba 10 reakcí. Tím je zajištěno, že lze provést alespoň 10 reakcí s 20 µl na reakci.
- Jemně, ale důkladně promíchejte směs PCR v reálném čase a nadávkujte 20 µl směs pro každý vzorek/kontrolu do lahvičky PCR nebo jamky z destičky. Uchovávejte lahvičky nebo destičky PCR na ledu nebo na chladicím bloku.

Tabulka 10. Real-time PCR mix pro AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR kit (PN-101)

Komponenta	Objem/reakce (µl)	Objem pro 10 vzorků (µl)
2.0 Směs druhů PCR	10	100
Taq polymeráza	1	10
Ředicí pufr	9	90
Celkový objem	20	200

Tabulka 11. Real-time PCR mix pro AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit (PN201)

Komponenta	Objem/reakce (µl)	Objem pro 10 vzorků (µl)
Odpor TR 2.0 Primer/Probe mix	7.5	75
Hlavní mix	12.5	125
Celkový objem	20	200

12.2 Místnost 2: Přidání DNA do směsí PCR

- Do dávkované směsi Species se přidá 5 µl extrahované DNA ze vzorku (obsahujícího IC) a 5 µl do dávkované směsi Resistance TR.
- Přidejte 5 µl negativní kontroly do směsi druhů a přidejte 5 µl negativní kontroly do směsi rezistence TR.
- Přidejte 5 µl 2.0 Species Positive Control do směsi Species a přidejte 5 µl 2.0 Resistance TR Positive Control do směsi Resistance TR.
- Uzavřete lahvičky PCR nebo uzavřete destičku PCR v reálném čase a krátce ji otočte dolů (nutné pouze pro destičku PCR v reálném čase). Snažte se vyhnout vzduchovým bublinám v desce.

12.3 Místnost 3: Spuštění přístroje pro měření PCR v reálném čase

- Přeneste lahvičky PCR nebo destičku PCR v reálném čase do přístroje pro PCR v reálném čase.
- Naprogramujte (nebo nainstalujte) program real-time cycler a vyberte start (program real-time PCR cyklování je uveden v tabulce 7 a 8)

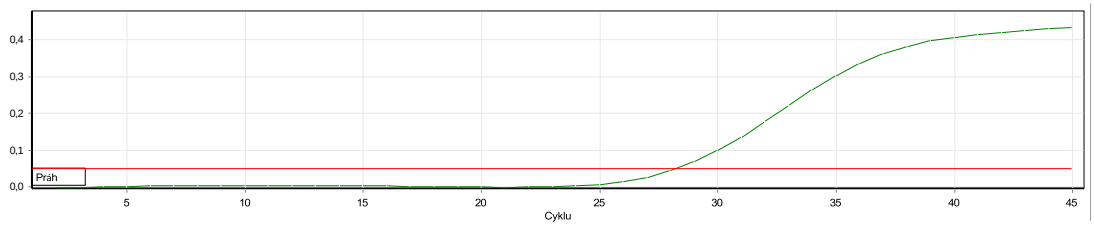
13 Interpretace výsledků; Problémy související s přístrojem PCR

Podrobnější protokol pro provádění analýzy dat je k dispozici pro všechny testované přístroje pracující v reálném čase. O to lze požádat u PathoNostics nebo u vašeho místního distributora. Podrobnější informace o nastavení různých real-time cyklerů jsou vysvětleny níže.

Prahové hodnoty: Rotor-Gene® Q

Před určením hodnoty Ct pomocí softwaru Rotor-Gene® Q zkontrolujte, zda je základní linie správně umístěna, a v případě potřeby ji upravte pomocí funkce správného sklonu. Hodnota ct se určuje pomocí funkce threshold. Doporučené prahové hodnoty pro amplifikační křivky jsou uvedeny v tabulce 12. Prahová umístění jsou založena na maximální intenzitě fluorescence, ale mohou se u jednotlivých vzorků lišit. Příklad amplifikační křivky získané pomocí rotorového genu® Q je znázorněn na obrázku 5.

Příklad amplifikační křivky



Obrázek 5. Amplifikační křivka. Příklad amplifikační křivky na RGQ, získaný pomocí *Sonda A. fumigatus* v zeleném detekčním kanálu.

Tabulka 12. Prahové hodnoty Rotor-Gene amplifikační křivky

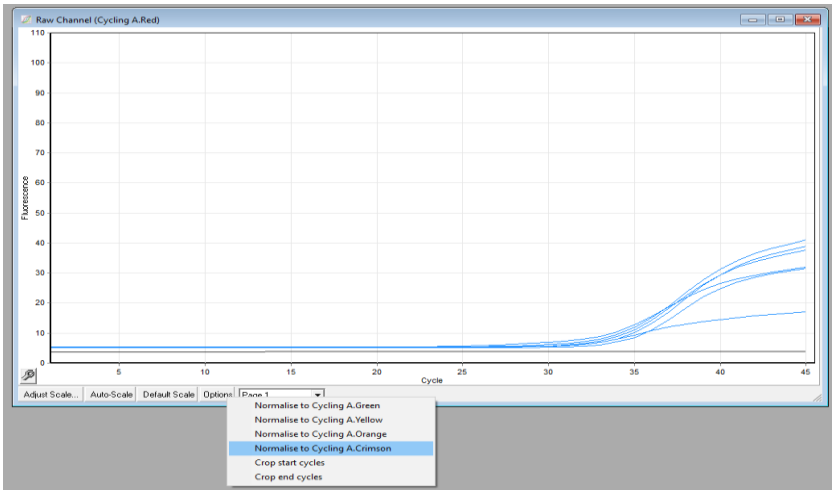
Max FI (norm. fluorescence)	Umístění prahové hodnoty
< 0.2	0.025
0.2-0.6	0.05
0.6-1.0	0.1
>1.0	0.15

Korekce přeslechů pro detekční kanál "Crimson"

Přeslechy z interních řídicích signálů (červený kanál) lze částečně pozorovat v karmínovém kanálu (*A. terreus).*

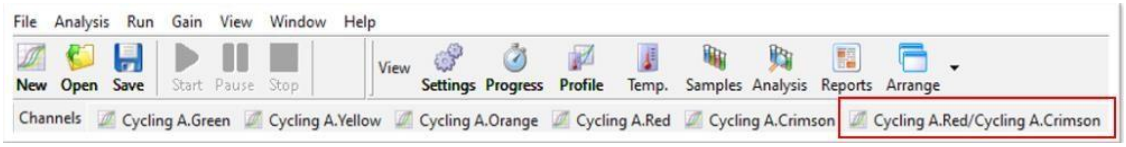
Aby bylo možné tento přeslech napravit, je třeba vytvořit vlastní surový kanál, ve kterém je červená normalizována na karmínovou, následovanou normalizací karmínové na nově vytvořený surový kanál z červené na karmínovou.

Klikněte na tlačítko de možnosti ve spodní části okna surového kanálu "Cycling A.Red" a vyberte možnost "Normalizovat na Cycling A.Crimson" (obrázek 6).



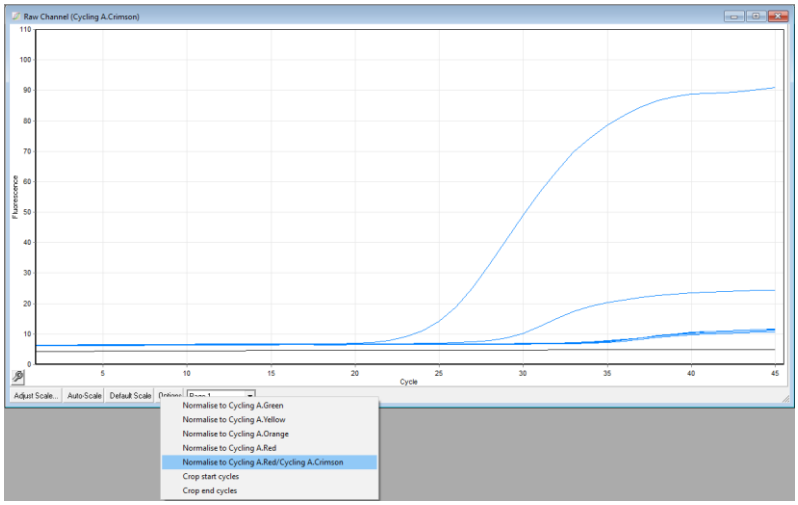
Obrázek 6. Vytvoření surového kanálu "Normalizovat na Cycling A.Crimson"

Do seznamu kanálů byl přidán nový nezpracovaný kanál (viz obrázek 7). Tento kanál neotevírejte; Tento kanál je vyžadován pouze pro konečnou korekci.



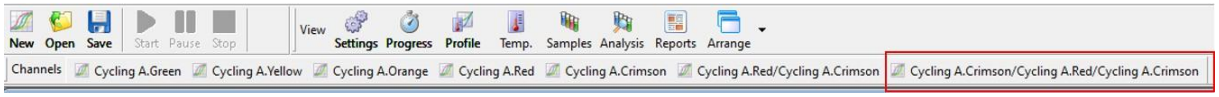
Obrázek 7. Seznam nezpracovaných kanálů v softwaru Rotor-gene Q

Otevřete nezpracovaný kanál "Cycling A.Crimson" a vyberte "Normalizovat na Cycling A.Red/Cycling A.Crimson" pro závěrečnou korekci (obrázek 8).



Obrázek 8. Vytvoření surového kanálu "Normalizovat na Cycling A.Red/Cycling A.Crimson"

Do seznamu kanálů bude přidán nový nezpracovaný kanál: "Cycling A.Crimson/Cycling A.Red/Cycling A.Crimson" (viz obrázek 9). Tento kanál lze použít pro analýzu dat *A. terreus* (Crimson).



Obrázek 9. Seznam nezpracovaných kanálů v softwaru Rotor-gene Q

Prahové hodnoty: LightCycler® 480 II

Pro stanovení hodnot Ct pomocí softwaru LC480 II doporučujeme použít funkci 2. derivace. Tato funkce automaticky určuje hodnotu Ct. Všimněte si však, že s touto funkcí 2. derivace by vzorky mohly být softwarem LC480 falešně označeny jako pozitivní. Proto vždy ručně zkontrolujte, zda je pozitivní reakce doprovázena zesilovací křivkou, a v případě potřeby výběr zrušte. Kromě toho všechny amplifikační křivky s hodnotami ct
> 40 se nazývají jako 40 s funkcí 2. derivace.

Prahové hodnoty: CFX96™

Pro určení hodnot Ct pomocí softwaru CFX doporučujeme použít režim stanovení Cq a zvolit **regresi**. Tato funkce automaticky určí hodnotu Ct- . Režim **jedné prahové hodnoty** však lze také použít k potvrzení, zda regresní režim volal správné hodnoty Ct.

Prahové hodnoty: QS5

Hodnoty ct jsou určeny automatickým prahovým bodem. To lze upravit na ruční v nabídce nastavení, ale to se nedoporučuje, protože to není standardizováno.

Prahové hodnoty: Mic qPCR

Pro automatické určení hodnot Ct na cykleru Mic qPCR lze zvolit funkci automatického nastavení prahové hodnoty. Ne vždy je to však možné v závislosti na dalších zvolených parametrech. Pro nejspolehlivější nastavení analýzy na cykleru Mic qPCR se doporučuje kontaktovat společnost PathoNostics nebo místního distributora, abyste získali optimální analytickou šablonu.

14 Interpretace výsledků

14.1 Druh multiplex

Interpretace dat soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR je uvedena v tabulce 13. Všechny *cíle Aspergillus* jsou detekovány sondami specifickými pro gen 28S multicopy. Pokud není v žádném detekčním kanálu pozorován žádný fluorescenční signál, při použití AsperGenius®
2.0 Species Multiplex real-time PCR kit, DNA může být degradována, reakce může být inhibována nebo došlo k manuální chybě. Viz část 17 "Odstraňování problémů", jak postupovat.

Tabulka 13. Interpretace signálů v soupravě AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR.
A. fum = Aspergillus fumigatus, *A. fla = Aspergillus flavus*, *A.* spp = *druh Aspergillus*, *A. ter = Aspergillus terreus*

AsperGenius® 2.0 Signály zesílení druhů						
Cíl	***A. fum***	***A. fla***	***A. Spp***	**IC**	***A. ter***	**Výsledek**
	+	-	+	+		*A. fumigatus*
	-	+	+	+		*A. flavus*
	-	-	+	+		*Aspergillus* species
			+	+	+	*A. terreus*
	-	-	-	+		Žádný *druh Aspergillus*, IC pozitivní
	+/-	+/-	+/-	-	+/-	IC překonal vysokou zátěží DNA, výsledek je stále platný
	-	-	-	-		Neplatný

Poznámka: *Sonda A. species* detekuje všechny druhy rodu Aspergillus a je o něco citlivější než specifické sondy pro *A. fumigatus, A. flavus a A. terreus*. Když vzorky vedou k vysokým hodnotám Ct pro sondu *A.* species (Ct ≥ 35), signály pro *A. fumigatus, A. flavus* nebo *A. terreus* by nemusel být pozorován. Nicméně vzorek extraktu by stále mohl obsahovat jeden z těchto druhů *rodu Aspergillus*.

14.2 Resistance TR multiplex

V případě, že je real-time PCR AsperGenius® 2.0 Species Multiplex pozitivní na
A. fumigatus, pozitivní signály lze očekávat také s real-time PCR kitem AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex. Hodnoty Ct získané pomocí soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR jsou vždy nižší než hodnoty Ct získané pomocí soupravy AsperGenius®
2.0 Rezistence TR multiplex díky efektu genu s více a jednou kopií. **Proto by AsperGenius® 2.0 Resistance TR PCR mohla být negativní, když byly pomocí testu 2.0 Species vyvolány hodnoty C t ≥ 35.**

Interpretace dat soupravy AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR je uvedena v tabulce 14. Sondy detekují tandemové repetice (TR) v promotorové oblasti genu *cyp51A (jedna kopie), které jsou spojeny s rezistencí na azoly. Sonda TR34 je specifická pro odporový mechanismus TR34/L98H a sonda TR46 pro odporový mechanismus TR46/Y121F/T289A* . Genová *sonda cyp51A* reaguje se všemi
Kmeny divokého typu A. fumigatus, ale také s kmeny *A. fumigatus*, které obsahují jeden z výše uvedených mechanismů rezistence.
Pokud při použití AsperGenius® není v žádném detekčním kanálu pozorován žádný fluorescenční signál 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit, pak může dojít k degradaci DNA, reakce může být inhibována nebo dojde k manuální chybě. Viz část 17 "Řešení problémů", jak postupovat.

Tabulka 14. Interpretace signálů v soupravě AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR.

AsperGenius® 2.0 Resistance TR zesilovací signály					
Cíl	**TR46**	**TR34 řekl:**	**CYP51A**	**MEZIPODNIKOVÉ**	**Výsledek**
	+	-	+	+	*A. fumigatus* TR46/Y121F/T289A
	-	+	+	+	TR34/L98H
	-	-	+	+	*A. fumigatus* wildtype
	-	-	-	+	Nebyl *zjištěn A. fumigatus*, IC pozitivní
	+/-	+/-	+/-	-	IC překonal vysokou zátěž DNA, výsledek je stále platný
	-	-	-	-	Neplatný

14.3 Kontrola

Aby bylo možné ověřit účinnost procedury extrakce DNA (IC) a PCR (IC a PC), musí být hodnoty CT pro všechny kontroly zahrnuté v soupravě AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase v přijatelném rozmezí (tabulka 15). Hodnoty C_t pro IC silně závisí na matrici vzorku a postupu extrakce DNA.

Tabulka 15. Rozsahy hodnot Ct pro ovládací prvky. Hodnoty ct jsou určeny pomocí doporučeného nastavení prahové hodnoty popsaného v tomto manuálu.

Kontrola	Cíl	Kanál	Hodnoty Ct
Species 2.0 PC	*A. fumigatus*	Zelená/465-510/FAM	27.0-33.0
	A. flavus	Žlutá/533-580/HEX/VIC	26.0-32.0
	A. druh	Oranžová/533-610/ROX	26.0-32.0
	Vnitřní kontrola	Červená/618-660/Cy5	26.0-31.0
	A. terreus	Kvasar/Karmínová/ATTO700	27.0-33.0
Resistance TR PC	TR46	Zelená/465-510/FAM	26.0-33.0
	TR34 řekl:	Žlutá/533-580/Hex/VIC	26.0-32.0
	cyp51A	Oranžová/533-610/ROX	27.0-32.0
	Vnitřní kontrola	Červená/618-660/Cy5	26.0-31.0
MEZIPODNIKOVÉ *	Třída M13	Červená/618-660/Cy5	30.0-37.0

* Silně pozitivní vzorek *Aspergillus* může konkurovat IC a vést k vyšším hodnotám Ct, než je uvedeno.

Vezměte prosím na vědomí, že hodnoty Ct byly získány interně kalibrovanými přístroji PCR. Ostatní přístroje PCR se mohou mírně lišit od uvedených hodnot Ct. Pozitivní i interní kontroly však musí být vždy detekovány, pokud jsou zahrnuty do AsperGenius®
2.0.

Hodnoty Ct pro IC jsou vyšší pro AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR než pro AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR, což je způsobeno Taq polymerázou/Master mixem obsaženým v každé z těchto souprav. Proto je celkový rozsah hodnot Ct pro IC nastaven od 30 do 37.

15 Omezení

Soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR pomáhají při diagnostice invazivní plicní aspergilózy. Negativní výsledky nemusí nutně znamenat nepřítomnost (plísňové) infekce. Negativní výsledky by neměly být používány jako jediný základ pro diagnózu, terapii nebo jiná rozhodnutí o léčbě. Pozitivní výsledky nevylučují koinfekci s jinými patogeny. Detekovaný patogen (patogeny) nemusí být jednoznačnou příčinou onemocnění. Do konečné diagnózy musí být zahrnuto další laboratorní vyšetření a hodnocení klinického obrazu.

16 Výkonové charakteristiky

16.1 Analytický výkon

16.1.1 Mez detekce (LoD)

Mez detekce nebo analytické citlivosti byla stanovena pro soupravy AsperGenius® 2.0 Species a AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR pomocí ředicí řady genomové DNA. Konečný limit detekce byl potvrzen testováním 20 replikátů s mírou pozitivity ≥ 95 %. Všechny replikáty byly obohaceny o vnitřní kontrolu, aby napodobily skutečný klinický vzorek. Kvantifikace cílů byla provedena pomocí vlastní kapkové digitální PCR. Přehled hodnot LoD pro všechny cíle je uveden v tabulce 16.

Tabulka 16: Minimální počet kopií na reakci, který lze úspěšně určit pomocí souprav AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase na pěti různých přístrojích v reálném čase.

Analýza	Cíl	CFX	RGQ	LC480	MIC	QS5
		kopie/ reakce	kopie/ reakce	kopie/ reakce	kopie/ reakce	kopie/ reakce
Species (PN-101)	*A. fumigatus*	6	6	6	6	6
	A. flavus	5	5	5	5	5
	A. terreus	16	16	16	16	3
	A. niger	5	5	5	5	5
Resistance TR (PN-201)	*A. fumigatus* WT	3	3	3	3	3
	A. fumigatus TR34	9	9	9	9	9
	A. fumigatus TR46	3	3	3	3	3

16.1.2 Specifičnost a inkluzivita

Analytická specificita a inkluzivita souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex pro real-time PCR byla stanovena testováním DNA různých klinicky relevantních patogenů včetně různých plísňových kmenů, kvasinek a bakterií. Všechny testované vzorky DNA jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17. Druhy testovány pomocí souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex pro real-time PCR.

Patogen	Výsledek testu AsperGenius 2.0
Aspergillus fumigatus	*Aspergillus fumigatus*
Aspergillus fumigatus TR34	*Aspergillus fumigatus* TR34
Aspergillus fumigatus TR46	*Aspergillus fumigatus* TR46
Aspergillus fumigatus TR53	*Aspergillus fumigatus* wild-type
Aspergillus fumigatus TR92	*Aspergillus fumigatus* TR46
Aspergillus flavus	*Aspergillus flavus*
Aspergillus terreus	*Aspergillus terreus*
Aspergillus niger	*Druh Aspergillus*
Aspergillus lentulus	*Druh Aspergillus*
Aspergillus versicolor	*Druh Aspergillus*
Penicillium chrysogenum	*Druh Aspergillus* *
Penicillium marneffei	Negativní
Pneumocystis jirovecii	Negativní
Fusarium solani	Negativní
Mucor hiemalis	Negativní
Cunninghamella bertholletiae	Negativní
Lichtheimia corymbifera	Negativní
Rhizomucor miehei	Negativní
Rhizomucor pusillus	Negativní
Rhizopus microsporus	Negativní
Rhizopus oryzae	Negativní
Scopulariopsis brevicaulis	Negativní
Malassezia caprae	Negativní
Saccharomyces cerevisiae	Negativní
Cryptococcus neoformans	Negativní
Candida albicans	Negativní
Candida parapsilosis	Negativní
Candida glabrata	Negativní
Candida guilliermondii	Negativní
Candida tropicalis	Negativní
Candida krusei	Negativní
Bordetella pertussis	Negativní
Escherichia coli	Negativní
Haemophilus influenzae	Negativní
Moraxella catarrhalis	Negativní
Pseudomonas aeruginosa	Negativní
Staphylococcus aureus	Negativní
Streptococcus pneumoniae	Negativní
Klebsiella pneumoniae	Negativní
Legionella pneumoniae	Negativní
Mycoplasma pneumoniae	Negativní
Mycobacterium tuberculosis	Negativní

* *Penicillium chrysogenum* je také detekováno pomocí 28S *A.* druhu zkoumat kvůli genetické podobnosti obou druhů v genu 28S.

16.1.3 Robustnost

Ověření robustnosti umožňuje stanovení celkové poruchovosti souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex real-time PCR sledováním přítomnosti IC v extraktu vzorku. Robustnost byla hodnocena testováním více vzorků BAL podle postupu popsaného v kapitole 10.1. IC byl správně získán ze všech testovaných vzorků BAL (100 %) pomocí souprav AsperGenius® 2.0 Species a Resistance TR Multiplex PCR v reálném čase.

16.1.4 Přesnost a preciznost

Pro ověření přesnosti a preciznosti souprav AsperGenius® 2.0 Species and Resistance TR Multiplex real-time PCR byly testovány tři různé výrobní šarže na signálech PC a IC na dvou různých přístrojích PCR v reálném čase (CFX96 a RGQ). Byl vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka (stdev) a variační koeficient. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18 – tabulce 21.

Tabulka 18. Reprodukovatelnost soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR na CFX96.

Cíl	CFX								
	Položka 1		Položka 2		Položka 3		Totální		
	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	CV (%)
PC *A. fumigatus*	30.45	0.21	30.42	0.09	29.89	0.10	30.25	0.30	0.98
PC *A. flavus*	29.38	0.38	29.07	0.07	28.79	0.08	29.08	0.32	1.11
PC A. spp	28.73	0.13	28.69	0.06	28.43	0.08	28.62	0.16	0.56
PC IC	28.30	0.27	28.47	0.03	28.18	0.06	28.32	0.19	0.68
PC *A. terreus*	29.63	0.13	29.64	0.05	29.27	0.07	29.51	0.19	0.66
Vnitřní kontrola	33.71	0.15	34.25	0.31	34.30	0.27	34.09	0.36	1.06

Tabulka 19. Reprodukovatelnost soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR na RGQ.

Cíl	RGQ								
	Položka 1		Položka 2		Položka 3		Totální		
	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	CV (%)
PC *A. fumigatus*	30.10	0.10	30.35	0.20	29.98	0.09	30.14	0.20	0.68
PC *A. flavus*	30.20	0.21	30.15	0.20	29.98	0.15	30.11	0.19	0.64
PC A. spp	27.23	0.05	27.50	0.18	27.19	0.10	27.31	0.18	0.67
PC IC	27.42	0.13	27.60	0.17	27.29	0.06	27.44	0.18	0.64
PC *A. terreus*	29.12	0.07	28.79	0.22	28.44	0.07	28.78	0.32	1.10
Vnitřní kontrola	32.21	0.36	32.69	0.38	32.34	0.37	32.42	0.41	1.26

Tabulka 20. Reprodukovatelnost soupravy AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR na CFX96.

Cíl	CFX96								
	Položka 1		Položka 2		Položka 3		Totální		
	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	CV (%)
PC *A. fumigatus* TR46	29.61	0.11	29.39	0.08	29.55	0.08	29.52	0.13	0.43
PC *A. fumigatus* TR34	28.99	0.10	29.03	0.06	29.11	0.04	29.04	0.08	0.28
PC *A. fumigatus* Cyp51A	28.18	0.10	27.94	0.09	28.14	0.08	28.09	0.14	0.49
PC IC	27.46	0.05	27.42	0.05	27.49	0.02	27.46	0.05	0.18
Vnitřní kontrola	33.17	0.15	31.49	0.52	33.12	0.19	32.59	0.87	2.67

Tabulka 21. Reprodukovatelnost soupravy AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR na RGQ.

Cíl	RGQ								
	Položka 1		Položka 2		Položka 3		Totální		
	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	Průměr	Std. oddch.	CV (%)
PC *A. fumigatus* TR46	29.22	0.46	28.78	0.22	29.07	0.18	29.02	0.34	1.17
PC *A. fumigatus* TR34	28.46	0.12	28.12	0.29	28.38	0.14	28.32	0.23	0.83
PC *A. fumigatus* Cyp51A	27.95	0.14	26.99	0.28	28.22	0.19	27.72	0.58	2.11
PC IC	26.70	0.10	26.08	0.30	26.74	0.13	26.51	0.36	1.36
Vnitřní kontrola	32.19	0.40	31.49	0.52	32.52	0.45	32.07	0.61	1.90

16.2 Klinický výkon

Panely pro odbornou způsobilost QCMD ASPDNA18S, ASPDNA 19S, ASPDNA20S, ASPDNA21S, ASPDNA22S, a ASPDNA23S byly všechny testovány pomocí sady AsperGenius® 2.0 Species Multiplex pro PCR v reálném čase. Objem 0,5 ml každého vzorku QCMD byl extrahován pomocí NucliSENS® EasyMAG® s elučním objemem 50 µl. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 22 spolu s obsahem vzorku podle QCMD.

Tabulka 22: Výsledky QCMD panelů pomocí soupravy AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR kit

Ukázka	AsperGenius 2.0 Druh (PN-101)					Ukázkový obsah
	A. fum	*A. flav*	*A.* Spp	IC	*A. terr*	
ASPDNA 18S-01	36.6		33.5	33.5		*A. fumigatus*
ASPDNA 18S-02	31.8		29.3	31		*A. fumigatus*
ASPDNA 18S-03			25.6	31.8		*A. niger*
ASPDNA 18S-04				34.9		Negativní
ASPDNA 18S-05			29.2	33.2		*A. niger*
ASPDNA 18S-06				30		Negativní
ASPDNA 18S-07	31		28.8	32.5		*A. fumigatus*
ASPDNA 18S-08	34.8		32.2	33.8		*A. fumigatus*
ASPDNA 19S-01	31.2		28.2	30.1		*A. fumigatus*
ASPDNA 19S-02				Neg		Negativní
ASPDNA 19S-03	35.3		32.8	34.7		*A. fumigatus*
ASPDNA 19S-04	35.1		31.7	30.8		*A. fumigatus*
ASPDNA 19S-05				37.3		Negativní
ASPDNA 19S-06	38.9		35.8	36.4		*A. fumigatus*
ASPDNA 19S-07			31.4	36.2		*A. niger*
ASPDNA 19S-08			26.7	31.6		*A. niger*
ASPDNA20S-01	31.9		29	29.2		*A. fumigatus*
ASPDNA20S-02				29.2		Negativní
ASPDNA20S-03	32.7		30.3	33.1		*A. fumigatus*
ASPDNA20S-04	37.3		32.2	29		*A. fumigatus*
ASPDNA20S-05	37.3		33.5	32		*A. fumigatus*
ASPDNA20S-06				32.6		Negativní
ASPDNA20S-07			26.1	29.9		*A. niger*
ASPDNA20S-08			29.7	31.6		*A. niger*
ASPDNA21S-01			29.9	33.1		*A. niger*
ASPDNA21S-02	38.9		37.1	30.8		*A. fumigatus*
ASPDNA21S-03				35.8		Negativní
ASPDNA21S-04	36.1		34.9	30.0		*A. fumigatus*
ASPDNA21S-05			32.9	34.1		*A. niger*
ASPDNA21S-06				30.1		Negativní
ASPDNA21S-07	35.5		35.2	35.2		*A. fumigatus*
ASPDNA21S-08	31.3		30.7	30.0		
ASPDNA22S-01	30.1		30.6	30.7		*A. fumigatus*
ASPDNA22S-02	30.5		30.5	31.4		*A. fumigatus*
ASPDNA22S-03			21.3	30.7		*A. niger*
ASPDNA22S-04				30.9		
ASPDNA22S-05				31.0		
ASPDNA22S-06	32.3		32.2	30.7		*A. fumigatus*
ASPDNA22S-07	32.5		31.2	30.9		*A. fumigatus*
ASPDNA22S-08			25.1	31.9		*A. niger*
ASPDNA23S-01	32.5		32.3	35.0		*A. fumigatus*

ASPDNA23S-02				35.9		
ASPDNA23S-03	37.0		35.7	36.1		*A. fumigatus*
ASPDNA23S-04	34.0		33.6	Není k dispozici		*A. fumigatus*
ASPDNA23S-05			29.5	40.4*		*A. niger*
ASPDNA23S-06				37.2		
ASPDNA23S-07			33,2	38.2		*A. niger*
ASPDNA23S-08	33.2		32.6	30.3		*A. fumigatus*

** Hodnota Ct ovlivněna silným signálem Aspergillus v sousedním kanálu*

Kromě testování způsobilosti QCMD byla v zařízeních PathoNostics provedena validační studie s 55 vzorky BAL. Tyto vzorky byly testovány společně s první generací soupravy CE-IVD AsperGenius® Species Multiplex real-time PCR kit (PN-001) jako referenční. Výsledky získané s PN-001 a PN-101 ze všech 55 vzorků BAL byly stejné: 28 vzorků BAL odhalilo negativní výsledky testů v obou testech, zatímco 27 bylo identifikováno jako *A. fumigatus* s oběma testy.

17 Řešení problémů

Tato část může být užitečná při řešení jakýchkoli problémů, které mohou nastat (tabulka 23).

Tabulka 23. Řešení problémů.

Problém	Možná příčina	Doporučení
Pozitivní kontroly zůstávají negativní	Jedna ze složek nebyla přidána	Ujistěte se, že byly přidány všechny komponenty
	Ovládací prvek nebyl správně uložen	Zkontrolujte podmínky skladování a datum spotřeby sady (uvedeno na štítku krabice)
	Pozitivní kontrola byla přidána do nesprávné reakční zkumavky	Ujistěte se, že pozitivní kontrola byla přidána do správné reakční zkumavky.
	Nesprávný profil / programování PCR	Zkontrolujte programování real-time cycleru Zkontrolujte své pracovní kroky / schéma pipetování a zkontrolujte kalibraci real-time PCR stroje a pipety.

IC zůstává negativní v *Aspergillus*-negativní vzorky	Degradace / inhibice nukleových kyselin	Opakujte extrakci podle protokolu a ujistěte se, že jsou všechny nástroje řádně dekontaminovány
	Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda je přidáno dostatečné množství směsi primeru/sondy, Taq polymerázy, Master mixu a vzorku
	Podmínky PCR nejsou v souladu s protokolem	Zkontrolujte podmínky PCR a v případě potřeby opakujte PCR se správným nastavením

	Nesprávný eluční objem / nedostatečný integrovaný obvod Postup extrakce DNA se používá s neznámou účinností	V případě, že se eluce provádí v 50 µl, zkontroluje se, zda je do výchozího materiálu přidáno 5 µl IC. Kontaktujte PathoNostics pro zkušenosti s konkrétní platformou pro extrakci DNA. Lze doporučit opakovat extrakci s 10 µl IC, v závislosti na postupu extrakce.
Negativní kontrola generuje fluorescenční signál	Přenos / kontaminace	Celý experiment opakujte s čerstvými činidly, se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem zacházejte podle předpisu a před pipetováním reagencie odstřeďte. Pokud problém přetrvává, opakujte také extrakci DNA Ujistěte se, že jste provedli všechny kroky v bezpečnostní skříni s laminárním prouděním vzduchu II, abyste zabránili kontaminaci. Pozitivní kontroly přidejte striktně v posledním kroku. Zajistěte, aby pracovní prostory a nástroje byly pravidelně dekontaminovány.
Velmi slabé fluorescenční signály i pro ovládací prvky	Nesprávné nastavení přístroje Nesprávná směs PCR v reálném čase	Zkontrolujte teplotu žíhání/denaturace a nastavení kanálu/zesílení Kontrola, zda jsou směsi PCR připraveny podle protokolu Zkontrolujte datum spotřeby a podmínky skladování
Neočekávané zesilovací křivky pro PC	Nesprávné nastavení přístroje	Použijte kompenzaci barev (LC480)
Rezistenční TR multiplex je záporný, zatímco Species multiplex je záporný Pozitivní	Omezené množství *DNA Aspergillus* přítomné v supernatantu	Otestujte peletu a/nebo použijte vyšší objem BAL pro extrakci DNA pro zvýšení citlivosti

18 Upozornění pro kupujícího

Produkty sady AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase vyrábí společnost PathoNostics BV, Maastricht, Nizozemsko v rámci systémů kvality akreditovaných podle ISO 13485:2016. Tento produkt je prodáván pouze pro použití koncovým uživatelem a může být dále prodáván, distribuován nebo znovu zabalen pouze s písemným souhlasem společnosti PathoNostics a pouze licencovanými distributory.

Reagencie různých šarží soupravy AsperGenius® 2.0 Multiplex real-time PCR by neměly být kombinovány. Pokud je souprava AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase přijata v poškozeném obalu nebo při absenci suchého ledu, kontaktujte společnost PathoNostics nebo místního distributora PathoNostics.

Materiály použité v soupravě, včetně činidel, vzorků a použitých lahviček, by měly být zlikvidovány v souladu s místními předpisy.

Další jazykové verze tohoto návodu k použití si můžete vyžádat od společnosti PathoNostics nebo místního distributora PathoNostics. Jakýkoli závažný incident, ke kterému došlo v souvislosti se soupravou AsperGenius® 2.0 Multiplex PCR v reálném čase, musí být nahlášen společnosti PathoNostics a příslušnému orgánu země, ve které je uživatel a/nebo pacient usazen.

18.1 Zavedené změny od poslední revize

Od verze IFU IFU AsperGenius 2.0 PN-101 a PN-201 v2.1 byly zavedeny následující modifikace:

- Použití sady pro kalibraci barev PathoNostics je přidáno v oddílech 4 a 11.1
- Do oddílu 10.1 byl přidán vzorový vstup objemů <1,0 ml.
- Menší aktualizace v části 11 týkající se detekce karmínových kanálů na QS5.
- Rozsah Ct na PC v sekci 14.3 byl rozšířen.
- Do oddílu 16.1.1 byla doplněna analytická specificita A. terreus na QS5.
- Doplňuje se nový oddíl 18.1.
- Důležitá poznámka týkající se absence signálu v sekci 14.2 byla odstraněna, protože se toto tvrzení ukázalo jako nesprávné, stejně jako v tabulce 14.
- V sekci 12 byly přidány informace o nastavení CFX (režim skenování).
- ASPDNA22S a ASPDNA23S údaje o EHK byly přidány do tabulky 22.
- Do části 6 byly přidány specifické informace týkající se barevné kompenzace a kalibrace barviva.
- Byly přidány další informace týkající se volání Ct na CFX96 (použití jednoho prahu).
- Prohlášení o poskytování instalačních příruček společností PathoNostics bylo v části 11 odstraněno, protože nejsou k dispozici.
- Korekce přeslechů pro detekční kanál "Crimson" byla přidána do sekce 14 pro analýzu genu Rotor Q.

Ochranné známky:

AsperGenius® je registrovaná ochranná známka společnosti PathoNostics,

Rotor-Gene® je registrovaná ochranná známka společnosti QIAGEN,

LightCycler® 480 je registrovaná ochranná známka společnosti Roche,

QuantStudio™ je ochranná známka společnosti Thermo Fisher

CFX™ je ochranná známka společnosti Bio-Rad

NucliSENS® a EasyMAG® jsou registrované ochranné známky společnosti bioMérieux

AsperGenius® 2.0 Species Multiplex real-time PCR kit

Číslo produktu: PN-

101 50 reakcí

Základní UDI 87193267509PN-101E9

Skladujte při teplotě –30 °C až –15 °C

Chraňte před slunečním zářením

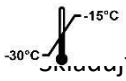
PathoNostics B.V.
SRN: NL-MF-000002705 řekl:
Randwycksingel 45, 6229 EG Maastricht, Nizozemí Telefon: +31 (0)43 3030400, Fax: +31 (0)84 7469245
E-mail: info@pathonostics.com, Web: www.pathonostics.com

AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR kit

Katalogové číslo: PN-201

50 reakcí

Základní UDI 87193267509PN-201EE



Skladujte při teplotě -30 °C až -15 °C

Chraňte před slunečním zářením

PathoNostics B.V.
SRN: NL-MF-000002705 řekl:
Randwycksingel 45, 6229 EG Maastricht, Nizozemí Telefon: +31 (0)43 3030400, Fax: +31 (0)84 7469245
E-mail: info@pathonostics.com, Web: www.pathonostics.com