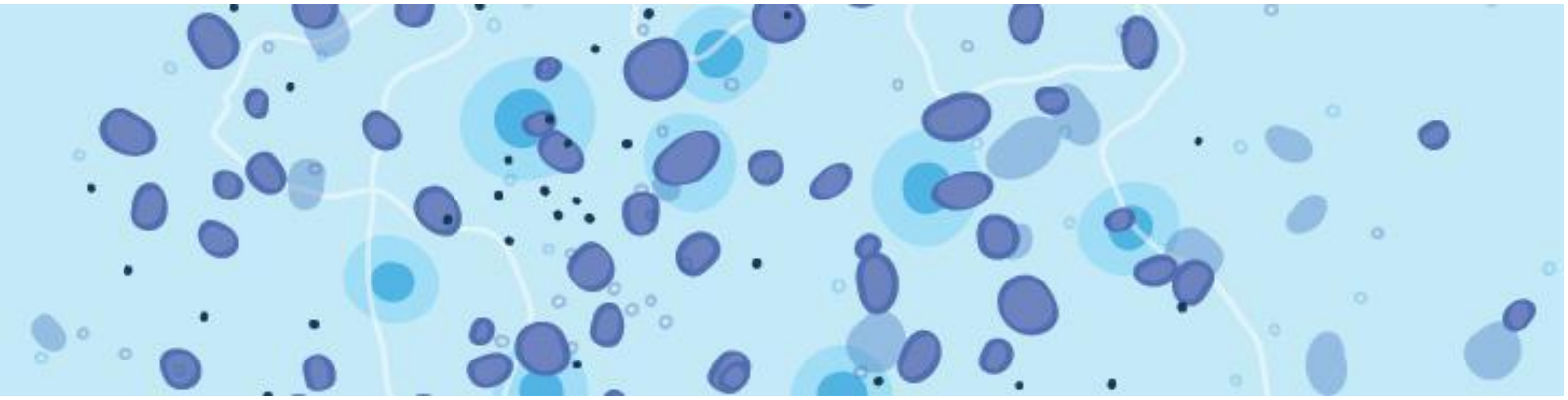


PneumoGenius®

Multiplex real-time PCR kit

Návod k použití Verze 1.2 CZ

PN-600

Basic UDI-DI: 87193267509PN-600EY

Σ 25

Pro použití s LightCycler 480® II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), CFX96TM (Bio-Rad), QuantStudioTM 5 (Thermo Fisher Scientific) a přístroji Magnetic Induction Cycler® (Mic qPCR cycler; Bio molecular systems).

CE IVD

Vyloučení odpovědnosti

Výsledky získané z těchto nebo jiných diagnostických panelů by měly být používány a interpretovány pouze v kontextu celkového klinického obrazu. Společnost PathoNostics BV nemůže převzít odpovědnost za jakákoli učiněná klinická rozhodnutí. Společnost PathoNostics BV nepředstavuje tuto příručku jako komplexní shrnutí všech možných výsledků použití soupravy PneumoGenius® Multiplex real-time PCR. Tato příručka je určena výhradně jako pomůcka pro zapamatování. Není určena pro použití při jakékoli klinické interpretaci výsledků testu. Laboratoře musí interpretovat a hlásit výsledky testu v souladu s vlastními místně vypracovanými postupy.

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího upozornění.

Společnost PathoNostics BV VYHLAŠUJE VEŠKERÉ ZÁRUKY VE VZTAHU K TOMUTO DOKUMENTU, VYJÁDŘENÉ I VYJÁŘENÉ NEBO PŘEDPOKLÁDANÉ, VČETNĚ, ALE BEZ OMEZENÍ, ZÁRUKY PRODEJNOSTI NEBO VHODNOSTI PRO URČITÝ ÚČEL. V NEJVYŠŠÍM ROZSAHU POVOLENÉM ZÁKONEM NEBUDE SPOLEČNOST PathoNostics BV V ŽÁDNÉM PŘÍPADĚ NESE ODPOVĚDNOST, AŤ UŽ ZE SMLOUVY, DELIKTU, ZÁRUKY NEBO NA ZÁKLADĚ JAKÉHOKOLI ZÁKONA NEBO NA JAKÉMKOLI JINÉM ZÁKLADĚ ZA ZVLÁŠTNÍ, NÁHODNÉ, NEPŘÍMÉ, PUNITIVNÍ, MNOHONÁSOBNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY V SOUVISLOSTI S TÍMTO DOKUMENTEM NEBO VYPLÝVAJÍCÍ Z NĚJ, VČETNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ, AŤ UŽ JE TO PŘEDVÍDATELNÉ NEBO NE A AŤ UŽ JE SPOLEČNOST PathoNostics BV NA MOŽNOST TAKOVÝCH ŠKOD UPOZORNĚNA, NEBO NE.

PRODUKT PNEUMOGENIUS® MULTIPLEX REAL-TIME PCR KIT JE DODÁVÁN PRO PROFESIONÁLNÍ DIAGNOSTICKÉ TESTOVÁNÍ IN VITRO. TENTO VÝROBEK NEPOSKYTUJE LICENCI K PROVÁDĚNÍ PCR PODLE PATENTŮ VLASTNĚNÝCH JAKOUKOLI TŘETÍ STRANOU VČETNĚ SPOLEČNOSTÍ HOFFMAN-LAROCHE (HOFFMANN-LA ROCHE LTD, DIAGNOSTICS, CH-4070 BASEL, SWITZERLAND) A ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC., 1145 ATLANTIC AVENUE, ALAMEDA, CALIFORNIA 94501).

Zákazník je odpovědný za validaci testu a soulad s právními předpisy.
požadavků, které se týkají jeho postupů a použití soupravy PneumoGenius® Multiplex realtime PCR.

Obsah

1. Shrnutí a obecné informace 4
2. Použití testu 4
3. Princip testu 5
4. Produkty a cíle 5
5. Poskytovaný materiál 5
6. Potřebný materiál, který však není k soupravě poskytován 6
7. Obecná bezpečnostní opatření 7
8. Skladování a manipulace s reagenciemi 7
9. Skladování a manipulace se vzorky 7
10. Extrakce a příprava nukleové kyseliny 8
11. Nastavení přístrojů real-time PCR 10
12. Postup 13
13. Interpretace výsledků, otázky související s PCR přístroji 13
14. Analýza dat 17
15. Problémy, které mohou nastat při analýze dat 28
16. Výkonnostní charakteristiky 29
17. Řešení problémů 33
18. Zbytková rizika 34
19. Oznámení pro odběratele 34
20. Kontakty 35
21. Informace pro objednání 35
22. Symboly 36

1. Shrnutí a obecné informace

Pneumocystis pneumonia je důležité oportunní onemocnění u imunokompromitovaných pacientů, které způsobuje houba *Pneumocystis jirovecii (P. jirovecii)*. Výskyt infekce *Pneumocystis* pneumonia se dramaticky navýšil s příchodem pandemie HIV/AIDS, avšak v dnešním industrializovaném světě se již snižuje, díky rozšíření používání léků se sulfáty jako profylaxe a zavedení vysoce aktivní antiretrovirové terapie (HAART). Nicméně, *P. jirovecii* stálé zůstává jako důležitá příčina mortality a morbidity u pacientů s HIV/AIDS, stejně tak jako u imunokompromitovaných pacientů, u nichž je diagnostika velmi obtížná.

Současná diagnostika *P. jirovecii* se většinou provádí metodou přímého mikroskopického vyšetření vzorků bronchoalveolární laváže (BAL). Houba je vizualizována pomocí standardních technik barvení nebo pomocí imunofluorescenčního barvení. Nevýhodou těchto metod je složitá diagnostika, která vyžaduje specifické dovednosti, obzvláště pokud je výskyt houby nízký, což je pozorováno hlavně u pacientů s HIV. Nyní se čím dál častěji přistupuje k používání real-time PCR diagnostiky pro detekci *P. jirovecii*, protože tato technika je ve srovnání s přímým mikroskopickým vyšetřením citlivější.

Souprava PneumoGenius® real-time PCR od výrobce PathoNostics dokáže detekovat a kvantifikovat *P. jirovecii* přímo ze vzorků BAL. Po extrakci DNA z BAL vzorku je souprava PneumoGenius® PCR použita k detekci multicopy mtLSU genu a singlecopy DHPS *fas* genu pro stanovení přítomnosti *P. jirovecii*. Přítomnost mtLSU genu může být navíc kvantifikována pomocí použití LSU standardů, které jsou součást balení.

Kromě toho, lze pomocí analýzy křivky tání rozlišit dvě bodové mutace způsobující substituce aminokyslein Thr55Ala a Pro57Ser v proteinu DHPS. Substituce aminokyselin jsou pravděpodobně spojeny s rezistencí vůči standardní léčbě sulfátovými léčivy. Také lze mutace DHPS použít jako epidemiologický marker.

2. Použití testu

Souprava PneumoGenius® Multiplex PCR je neautomatizovaný semikvantitativní test multiplex PCR v reálném čase pro detekci a kvantifikaci Pneumocystis jirovecii a identifikaci mutací Thr55Ala a Pro57Ser DNA v genu DHPS fas, který se získává po extrakci nukleové kyseliny pomocí přístroje NucliSENS easyMAG® (BioMérieux) nebo soupravy QIAamp® Blood mini kit (Qiagen) ze vzorků bronchoalveolární laváže (BAL). Test pomáhá při diagnostice pneumocystové pneumonie u imunokompromitovaných pacientů, včetně pacientů s HIV a jedinců trpících podvýživou, pokud je použit v kombinaci s dalšími klinickými a laboratorními nálezy. Souprava PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase je určena pro použití s přístroji LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific), Mic qPCR instrument (BMS) a CFX96™ (Bio-Rad).

Uživatel
Výrobek je určen pouze pro laboratorní profesionály

3. Princip testu

Souprava PneumoGenius® real-time PCR je navržena pro detekci a kvantifikaci DNA *P. jirovecii* v BAL vzorcích. Souprava se skládá z již připravených (ready to use) optimalizovaných směsí cílových specifických primerů a sond pro detekci DNA *P. jirovecii*. Test PneumoGenius® PCR je založena na technologii PCR v reálném čase (real-time PCR), která umožňuje detekci díky přítomnosti fluorescenčních sond v mixu. Detekce se provádí během amplifikace na real-time PCR přístroji, schopném detekovat fluorescenci ve žlutém, oranžovém a červeném kanálu. Navíc, k rozlišení a identifikaci mutací v genu DHPS fas se používá analýza křivky tání.
Vstupním materiálem pro testy je extrahovaná DNA ze vzorků BAL. Extrakce nukleové kyseliny je oddělený proces a tato souprava ho nezahrnuje, nicméně doporučené extrakční procesy jsou vypsané v tomto příbalovém letáku (sekce 10 „Izolace nukleové kyseliny a příprava vzorků“, strana 7-8).

4. Produkty a cíle

Soupravu PneumoGenius® Multiplex PCR real-time vyvinula společnost PathoNostics B.V.
Pro koncové uživatele přístroje Roche LightCycler® 480 II je k dispozici sada Universal Color Compensation (PN-501).
Přehled PCR testu PneumoGenius® Multiplex real-time a jeho odpovídající cíle jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Souprava PneumoGenius® real-time PCR (PN-600)

	PneumoGenius® cíle
PN-600	DHPS *fas* (single copy)
	mtLSU (multi copy)
	Interní kontrola (M13 phage)

5. Poskytovaný materiál

Všechen materiál, který obsahuje souprava PneumoGenius® real-time PCR je sepsán v tabulce 2. Souprava je vhodná pro přípravu 25 reakcí.

Tabulka *2*. Poskytovaný materiál v soupravě *PneumoGenius®* real-time PCR (PN-600). c/µl = kopie/ µl.

Komponenty	**Označení komponentů**	**Objem (µl)**	**Barva víčka**
PneumoGenius mastermix	CNP2009A	>250	Žlutá
Taq polymeráza	CNP2010A	>25	Fialová
Ředící Roztok	CNP0012B	>950	Průhledná
Interní Kontrola	CNP0144B	>500	Černá
PneumoGenius Pozitivní Kontrola	CNP2011A	>125	Bílá
LSU Standard 1 (10000 c/µl)	CNP2038A	>20	Zelená
LSU Standard 2 (1000 c/µl)	CNP2039A	>20	Zelená
LSU Standard 3 (100 c/µl)	CNP2040A	>20	Zelená
LSU Standard 4 (10 c/µl)	CNP2041A	>20	Zelená
*PneumoGenius® - Návod k použití (čeština)**			

*pro překlad v jiném jazyce, prosím, kontaktuje firmu PathoNostics nebo svého místního distributora

6. Potřebný materiál, který však není k soupravě poskytovaný

Souprava PneumoGenius® real-time kit je kompatibilní pro real-time PCR přístroje, které mají minimálně 4 různé fluorescenční detekční kanály (specifikace v kapitole 11). Tato souprava je validována pro přístroje LightCycler® 480 II (LC480; Roche), Rotor-Gene® Q (RGQ; QIAGEN), CFX96TM (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (QS5; Thermo Fisher Scientific) a Magnetic Induction Cycler (Mic qPCR cycler; Bio molecular systems) v kombinaci s NucliSENS® EasyMAG® (bioMérieux) DNA-extrakčním systémem a QIAamp® Blood minikit (QIAGEN, kat. číslo 51104). Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a zkalibrovány podle doporučení výrobce.

Reagencie

- Komponenty extrakce DNA: NucliSENS® EasyMag® extrakce nebo QIAamp® Blood mini kit
- DNase free/sterile PCR grade water (negativní kontrola)
- Dithiothreitol (DTT); (Thermoscientific katalogové číslo #R0861)

Spotřební materiál

- Jednorázové špičky s hydrofobními filtry
- Sterilní DNase-free 1.5 ml zkumavky
- Vhodné DNase-free 0.1 nebo 0.2 ml PCR zkumavky (QIAGEN®, kat. číslo 981103 nebo Thermoscientific, kat. číslo AB-0620) pro použití s Rotor-Gene® Q
- Vhodné 96 jamkové destičky (Roche, kat. číslo 04 729 692 001) pro použití s přístrojem LC480 II
- Zkumavky Mic bez DNAse a uzávěry (BMS, ref. 60653) pro použití na cykleru Mic qPCR
- PCR destičky Hard-shell® 96jamkové, tenkostěnné (Bio-Rad, Hsp9655) pro použití na CFX96TM
- MicroAmp Fast Optical 96jamková reakční destička 0,1 ml (Applied Biosystems, ref. 4346906) pro použití na QS5

Vybavení

- Nastavitelné pipety: 0.1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
- Stojan na zkumavky pro 1,5 ml zkumavky a chladicí blok (1,5 ml) / led (pro Taq polymerázu)
- Chladicí blok PCR nebo led pro zkumavky s PCR reakcemi a 96jamkové destičky
- Vortex
- Zahřívací blok (pro použití s extrakcí QIAamp®)
- Stolní odstředivka s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5/2,0 ml
- Odstředivka vhodná pro PCR desky (nutná pro LC480, CFX96 a QS5)
- UV kabinet/PCR pracoviště nebo kabinet s laminárním prouděním vzduchu (LAF)
- Kalibrované přístroje LightCycler® 480 II (Roche), Rotor-Gene® Q (QIAGEN) se 72jamkovým rotorem, CFX96™ (Bio-Rad), QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific) nebo Mic qPCR (BMS)
    - Přístroj LightCycler® 480 II (Roche) vyžaduje před prvním použitím soupravy PneumoGenius® Multiplex PCR real-time použití dodatečné kompenzace barvy. Pro koncové uživatele je k dispozici sada Universal Color Compensation (PN-501), která slouží k vytvoření požadovaného souboru pro kompenzaci barev.
- NucliSENS® EasyMAG extrakční systém

7. Obecná bezpečnostní opatření

Práce v laboratoři by měla být vždy prováděna v souladu s obecnými bezpečnostními předpisy. Další informace o chemických látkách naleznete v příslušném bezpečnostním listě (MSDS), který je součástí této soupravy.

Následující opatření vám pomůžou vyhnout se kontaminacím a zároveň provést test správně:

- Tento molekulární test by měl provádět pouze kvalifikovaný laboratorní personál.
- Pokud pracujete s chemikáliemi, pokaždé si oblečte laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Před začátkem testování si nejprve pečlivě prostudujte návod k použití.
- Mějte fyzicky oddělené místnosti na práci, jak je popsáno v tabulce 3.
- Používejte **jednorázové sterilní špičky** s hydrofobním **filtrem**, abyste se vyhnuli cros-kontaminaci.
- Používejte DNase-free PCR zkumavky.
- **Taq polymerázu** uchovávejte po vyjmutí z mrazničky vždy **na ledu** nebo na **chladicím bloku**. Zacházejte s ní opatrně a míchejte velmi jemně.
- Po rozmrazení **odstřeďte činidla** na 5 sekund v centrifuze a promíchejte je jemným pipetováním nahoru a dolů.
- Program cyklování by měl být naprogramován v přístroji pro PCR v reálném čase před provedením testu nebo požádejte místního distributora o soubor se šablonou běhu.
- Po amplifikaci PCR lahvičky/plotny neotvírejte.

8. Skladování a manipulace s reagenciemi

Všechny komponenty soupravy PneumoGenius® by měly být skladovány v temnotě a při teplotě od -15 °C do -30 °C. Datum expirace je uveden na obalu soupravy. Vyhněte se opakovanému rozmrazování a zamrazování (max 10x).

Abyste se vyhnuli kontaminacím, doporučujeme provádět testování ve 3 oddělených místnostech a také uchovávat pozitivní kontroly na jiném místě/jiné místnosti (tabulka 3).

Tabulka 3. Rozložení provedení testu v oddělených místnostech

Místo	Proces
Místnost 1	Uchovávání mastermixu, Taq polymerázy a ředícího roztoku (Dilution buffer) Příprava real-time PCR mixu
Místnost 2	Skladování IC, PC a LSU Standardů Extrakce DNA ze vzorků Přidání extrahované DNA do připraveného real-time PCR mixu Přidání pozitivní kontroly do připraveného real-time PCR mixu
Místnost 3	Provedení Real-time PCR reakce

9. Skladování a manipulace se vzorky

Výsledky soupravy PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase silně závisí na kvalitě a množství vzorku odebraného jako vstupní materiál pro extrakci DNA.
Doporučení pro optimální zacházení se vzorky a jejich odběr:

Detekce *P. jirovecii* závisí na odběru vysoce kvalitních vzorků, jejich rychlém transportu do laboratoře, vhodném skladování před provedením testu. Vzorky bronchoalveolární laváže (BAL) jsou vhodné pro detekci *P. jirovecii* DNA.

Vzorky BAL by měly být do laboratoře dopraveny ihned po odběru a přednostně zpracovány nebo uchovány při teplotě -20 °C nebo -80 °C před dalším zpracováním. Vyhněte se několikanásobnému rozmrazování a zmrazování.

10. Extrakce a příprava nukleové kyseliny

Přestože lze použít jiné metody extrakce DNA pro vzorky BAL, doporučujeme použít jednu z následujících validovaných metod pro úspěšnou extrakci DNA a vysoký výtěžek DNA.

Obecná doporučení

Doporučujeme provádět předúpravu vzorků (pre-treatment – pomocí DTT pro viskózní vzorky), stejně tak jako manuální extrakci DNA pomocí kolonek v laminárním vzduchovém boxu. Po každém použití laminárního boxu je vhodné jej dekontaminovat pomocí dekontaminačního roztoku a UV záření po dobu 30 minut.

Pokud je to možné, vyhněte se cyklickému rozmrazovaní a zmrazování extrahované DNA. Pokud budete vzorky DNA zpracovávat ve stejný den, kdy byly izolovány, můžete je uchovávat při 4 °C. Po delší dobu uchovávejte extrahovanou DNA při -20 °C nebo -80 °C.

Předúprava vzorků (pro viskózní vzorky)

- Pokud je vzorek BAL viskózní, zvortexujte ho a přidejte 20 µl 1 M DTT ke 200 µl vzorku BAL (finální koncentrace bude 0,09 M DTT)
- Inkubujte BAL vzorek po dobu 15 minut při teplotě 37 °C

Extrakce pomocí kolonek (QIAamp® Blood minikit)

- Postupujte dle návodu od výrobce (Qiagen; stránky manuálu 27-29)
- Přidejte 5 µl interní kontroly ke vzorku (200 µl BAL)
- Eluční objem je 50 µl

NucliSENS® EasyMag®

- Připravte soupravu NucliSENS® EasyMag® podle návodu od výrobce (bioMérieux)
- Vyberte v nastavení – „Generic protocol“ (obecný protokol)
- Vyberte 200 µl jako vstupní objem a 50 µl jako objem eluční
- Vyberte „onboard lysis“
- Přeneste 200 µl (DTT-treated) vzorku BAL do zásobníku EasyMag®
- Rozmrazte interní kontrolu a přidejte 5 µl ke vzorku BAL do zásobníku EasyMag®
- Začněte program „onboard lysis“ (přístroj EasyMag® EasyMag® rozplní lyzační pufr a inkubuje po 10 minut)
    - Připravte si čerstvý roztok magnetic silica bead
- Po lýzi, přidejte připravenou směs magnetic silica beads do lyzačního pufru se vzorkem a resuspendujte
    - Začněte DNA-extrakci na přístroji EasyMag®
    - Po 34-40 min, přeneste eluovanou DNA do nových sterilních DNA-free zkumavek

Ostatní platformy extrakce DNA

Je důležité si uvědomit, že účinnost extrakce se mezi platformami extrakce DNA liší a tím se může lišit i konečný výtěžek DNA. U některých extrakčních platforem, které byly testovány v kombinaci s testem AsperGenius® od firmy PathoNostics, je doporučeno ještě před přidáním vzorky, vytvořit premix IC a lyzačního pufru – zajistí se tím znovuzískání IC. U přístroje MagNAPure, doporučujeme připravit mix 5 µl IC + 15 µl lyzačního pufru (z příslušné soupravy) pro jeden vzorek a rozdělit do každé jamky v MagNAPure destičce, korespondující s počtem izolovaných vzorků. Poté přidejte vzorek do MagNAPure destičky a ujistěte se, že jste nastavili objem eluce na 50 µl.

Kontroly

Interní kontrola (IC)

Interní kontrola v soupravě je dodávána jako roztok bakteriofága M13 a používá se k odlišení pozitivních vzorků od falešně pozitivních vzorků. Interní kontrola slouží pro kontrolu degradace nukleové kyseliny, PCR inhibice a selhání testu. Jakmile přidáte IC ke vzorku, ihned přidejte i lyzační roztok (lysis buffer). Lyzační pufr obsahuje stabilizační reagencie, které inhibují DNázy a zabraňují degradaci IC.

Objem IC, který má být přidán ke vzorku lyzovaného BALu je 5 µl. Když se změní eluční objem, musí se odpovídajícím způsobem změnit množství IC. Množství IC je bez ohledu na počáteční objem vzorku.

V případě infekce s vysokým obsahem nukleové kyseliny *P. jirovecii* může být IC během PCR reakce překonána. To je vysvětleno skutečností, že velké množství nukleových kyselin *P. jirovecii* spotřebovává většinu reagencií v testu. Pokud tedy signál IC chybí v přítomnosti jedné nebo více amplifikačních křivek a/nebo specifickém vrcholu tání (specific melting peaks) dokazující přítomnost *P. jirovecii*, test je stále platný.

Kontrola bez templátu (NTC)

Každé testování by mělo obsahovat kontrolu bez templátu (NTC). A NTC existuje v podobě DNase-free vody a je to kontrolou kontaminace celého PneumoGenius® PCR běhu a slouží také jako referenční signál pro pozadí.

Negativní kontrola (NC)

Negativní kontrola nebo negativní kontrola extrakce se doporučuje ke stanovení kontaminace *P. jirovecii* během extrakce DNA nebo v průběhu PCR. Vzorek negativní kontroly obsahuje pouze interní kontrolu (IC) a nejlépe stejný vzorek matrice jako vzorky *P. jirovecii*.

Pozitivní kontrola (PC)

Pozitivní kontrola v soupravě PneumoGenius® obsahuje syntetické DNA fragmenty pokrývající cílové oblasti, které jsou soupravou detekovány. Pozitivní kontrola se zpracovává jako běžný extrakt nukleové kyseliny a kontroluje správnost procesu RT-PCR. Zahrnutí PC do PCR reakce je v závislosti na preferenci každého koncového uživatele a nemusí být zahrnuta v každém běhu.

11. Nastavení přístrojů Real-time PCR

Souprava PneumoGenius® Multiplex real-time PCR je validována na přístrojích LC480 II, RGQ, CFX96, QS5 a Mic qPCR cycler s využitím čtyř různých detekčních kanálů.
Pro všechny uvedené přístroje reálného času je k dispozici soubor se šablonou protokolu PCR a specifická instalační příručka. Tu si můžete vyžádat u společnosti PathoNostics nebo u svého místního distributora.

Nastavení filtru
Nastavení filtrů RGQ, LC480 II a QS5 pro detekci fluorescence ve třech kanálech jsou uvedena v tabulce 4. Tyto emisní/excitační) formáty zdroje/detektoru je třeba zvolit v příslušné softwarové aplikaci a nastavit je podle tabulky 4.
Indikace tří různých detekčních kanálů CFX96 a Mic jsou rovněž uvedeny v tabulce 4. Programování přístrojů by se mělo provádět podle pokynů výrobce. Detekce signálu ve čtyřech kanálech musí být aktivována.
Poznámka: Předprogramované soubory šablon PCR, ve kterých jsou aktivována správná nastavení filtrů a detekčních kanálů, lze získat na vyžádání.

Table 4. Nastavení filtrů pro optimální detekci sond PneumoGenius®

PneumoGenius cílová oblast	RotoGene (nm)		LC480 II (nm)		QuantStudio 5 (nm)		CFX96	Mic qPCR
	Source	Detector	Source	Detector	Source	Detector		
DHPS fas	530	555	533	580	520 550	558 586	HEX	Žlutá
mtLSU	585	610	533	610	580	623	ROX	Oranžová
IC	625	660	618	660	640	682	CY5	Červená

Roche LightCycler® 480 II: kompenzace barevnosti

Vzhledem k překrývajícím se emisním spektrům různých barviv může docházet k přeslechům mezi detekčními kanály. V přístroji LC480 II lze přeslechy kompenzovat pomocí souboru Color Compensation. Tento požadovaný soubor Color Compensation lze vygenerovat provedením příkazu
Color Compensation experimentu pomocí sady Color Compensation kit, kterou společnost PathoNostics poskytuje samostatně na vyžádání (Universal Color Compensation kit; PN-501). Podrobný popis generování souboru Color Compensation je uveden v návodu k použití sady Universal Color Compensation kit.

Bio-Rad CFX96™: Detekční kanály a typ destičky

Použijte detekční kanály připravené výrobcem: HEX, ROX a Cy5. Tyto detekční kanály jsou kalibrovány pro průhledné i bílé destičky. Před provedením reakce PCR v reálném čase vyberte správný typ destičky (bílá nebo průhledná).

Thermo Fisher QuantStudio™ 5: vlastnosti
Na obrazovce vlastností softwaru QuantStudioTM Design & Analysis Software použijte následující nastavení:
- Relative Standard Curve jako Experiment type
- SYBR® Green Reagents jako Chemistry
- Standard jako Run mode

Real-time PCR program: obecné informace

Protokol PCR pro sadu PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase zahrnuje amplifikaci po dobu 45 cyklů a následnou analýzu křivky tání. Program PCR v reálném čase je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Real-time PCR program

Krok	Čas	Teplota	Funkce
Denaturace	2 min	95 °C	Aktivace Taq polymerázy / Prvotní denaturace
Cyklování (45x)	15 sec 60 sec	94 °C 60 °C*	Denaturace Žíhání a roztahování
Tání	2 min	95 °C	Denaturace
	90 sec **	45 °C 45-85 °C*	Tuhost Tání

* aktivace fluorescenční detekce podle tabulky 4

** ramp rate závisí na typu real-time PCR cykleru, viz tabulka 6

Přehled doby trvání protokolu pro jednotlivé přístroje je uveden v tabulce 6. V této tabulce jsou rovněž uvedeny specifikace tavení.

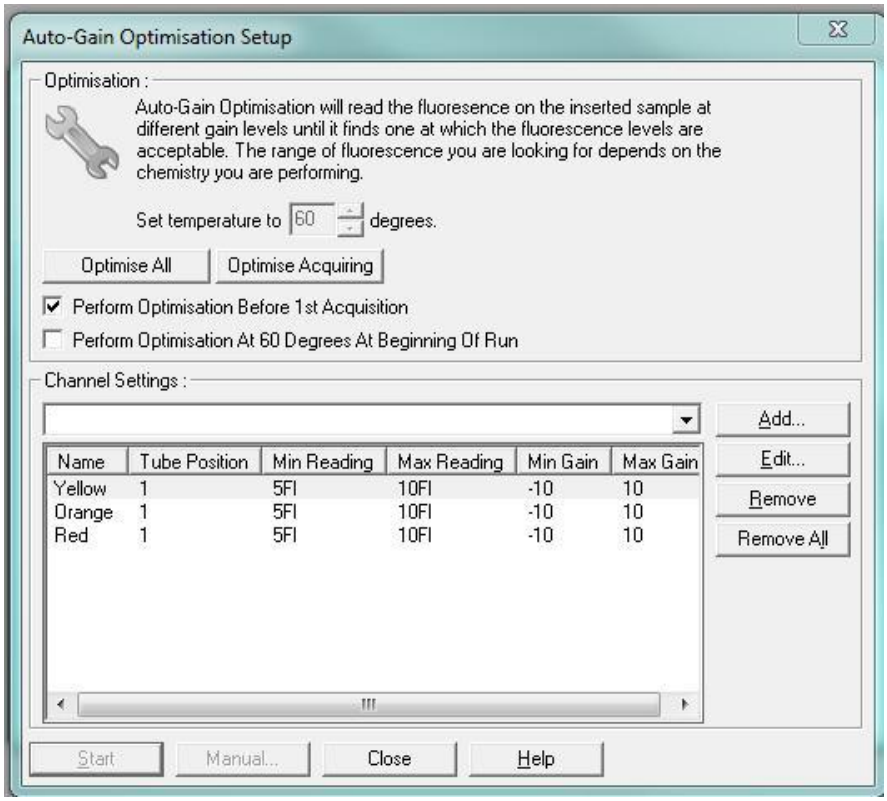
Tabulka 6. Doba trvání programu real-time PCR a poznámky k postupu tání

Přístroj real-time PCR	Doba běhu PCR programu (min)	Poznámky k tání
LC 480 II	110	1 akvizice na °C
RGQ	125	1 °C/každý krok + 5 sekund pro každý další krok
CFX96	130	přírůstek o 0,5oC na 0:01
Mic	123	0,3 °C/s
QS5	108	0,04 °C/s

11.1. Doplňující informace Rotor-Gene® Q

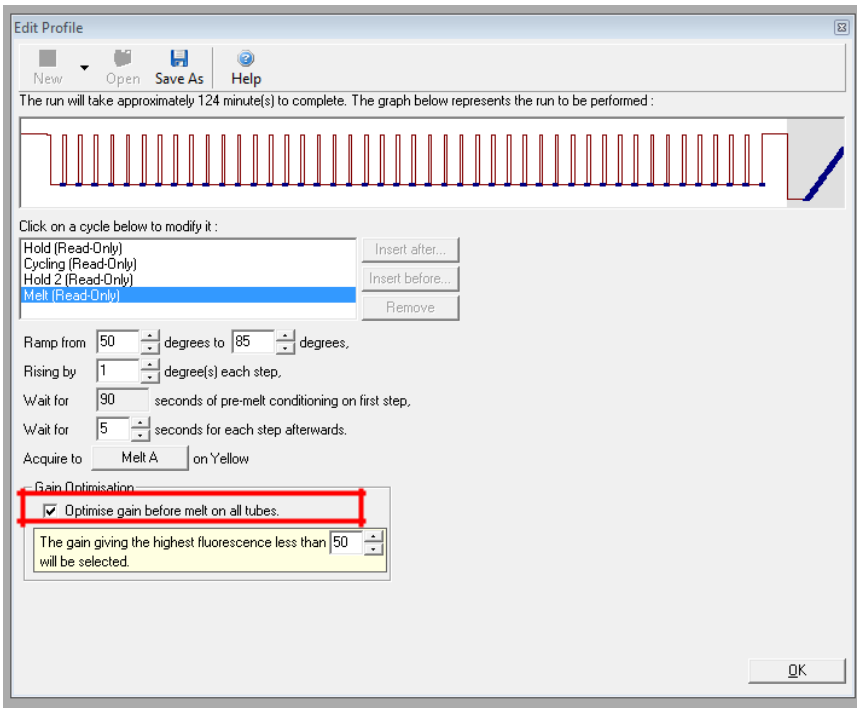
Správné „gain“ nastavení musí být naprogramováno v přístroji, než začnete testovat vzorky pomocí soupravy PneumoGenius® na RGQ přístroji. Správné gain nastavení pro přístroj RGQ je vymodelováno tak, aby zabránilo saturaci v detekčních kanálech. Optimalizace gain nastavení je doporučena jak pro amplifikaci, tak pro melting.

- Zvolte „gain optimization“ (gain optimalization) v softwarovém rozhraní přístroje Rotor-Gene
- Vyberte ‘perform optimization before 1st acquisition’
- Klikněte na ‘optimize acquiring’, to by vám mělo umožnit provést gain optimalizaci pro žlutý, oranžový a červený kanál po vytvoření správného RT-PCR protokolu PneumoGenius®
- Vyberte pozice, kde jsou zkumavky obsahující mix pro všechny tři kanály a vyberte 5 až 10 FI pro minimální a maximální čtení (min and max reading) a -10 až 10 pro mininální a maximální gain. Správné nastavení optimalizace gain settings je na obrázku 1.



Obrázek 1. Zobrazení „gain optimisation“ pro Rotor-Gene software pro amplifikaci.

Také zvolte gain-optimization během kroku melting a vyberte 50 pro „gain giving the highest fluorescence“ (obrázek 2).



Obrázek 2. Ukázka pro krok „melt“ u Rotor-Gene softwaru. Vyberte „optimise gain before melt on all tubes“ a také vyberte „**50** for the gain giving the highest fluorescence“

12. Postup

Doporučení

- Rozmrazte templátovou DNA (pokud byla zmrazené) a také všechny reagencie a udržujte je na ledu nebo na chladicím bloku.
- Taq polymerázu také udržujte na ledu nebo chladicím bloku.
- Pro případ pipetovacích chyb, si připravujte o trochu větší množství u různých směsí, než je vyžadováno v návodu.

12.1. Místnost 1: Příprava real-time PCR mastermixu

Příprava real-time PCR mastermixu

Real-time PCR mix se připravuje v konečném objemu 25 µl.

- Připravte real-time PCR mix podle tabulky 7.
- Promíchejte real-time PCR mix jemně, ale důkladně a rozdělte 20 µl směsi mastermixu na vzorek/kontrolu do PCR zkumavky nebo jamky v destičce. Udržujte PC zkumavky nebo destičku na chladicím bloku.
- Připravte směs pro další 4 vzorky, pokud zahrnete standardy LSU pro kvantifikaci vzorků.

Table 7. Real-time PCR mix pro PneumoGenius® real-time PCR test

Komponenty	Objem/reakci (µl)	Objem pro 10 vzorků (µl)
PneumoGenius mastermix	10	100
Taq polymeráza*	1	10
Dilution buffer	9	90
Konečný objem	20	200

*Udržujte na ledu nebo chladicím bloku

12.2. Místnost 2: Přidání DNA do směsi PCR

Přidejte 5 µl extrahované DNA ze vzorku (obsahující IC) ke každému mastermixu.

- NTC reakce: přidejte 5 µl ředícího roztoku (dilution buffer) do připravené zkumavky/destičky k mastermixu.
- PC reakce: přidejte 5 µl PneumoGenius PC do připravené zkumavky/destičky k mastermixu.
-
- LSU Standards: přidejte 5 µl LSU standardu do připravené zkumavky/destičky k mastermixu.

Při použití destičky uzavřete zkumavky nebo destičku PCR a krátce ji roztočte. Snažte se zabránit vzniku vzduchových bublin v destičce.

12.3. Místnost 3: Spuštění přístroje real-time PCR

- Vložte PCR zkumavky nebo destičky do real-time PCR přístroje.
- Přístroj nastavte podle programu, který je uveden v tabulce 4 a 5 a spusťte real-time program.

13. Interpretace výsledků, otázky související s PCR přístroji

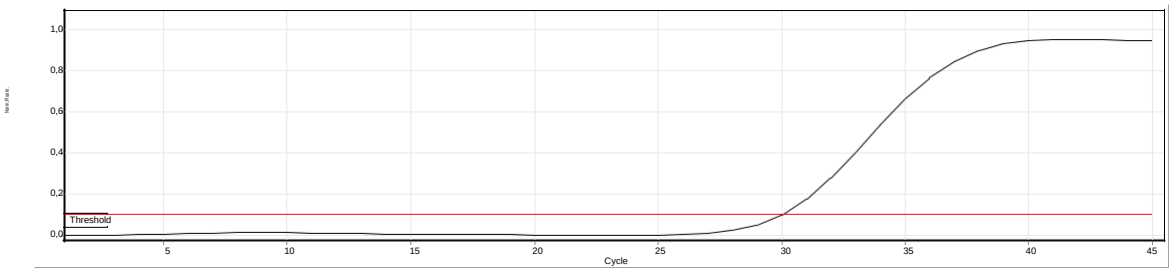
Thresholds: Rotor-Gene® Q

Před určením hodnoty C_t-value pomocí softwaru RGQ zkontrolujte, jestli je baseline (základní linie) správně umístěná a případně ji upravte pomocí slope correct function. Funkci „outlier removal“ lze využít k zabránění falešně pozitivních výsledků v důsledku funkce „slope correct“. Za tímto účelem, vyberte ‘10%’ v „outlier removal wizard“. Tím se zabrání zobrazení jakéhokoli vzorku s celkovou změnou fluorescence menší než 10 %. Toto nastavení bude také vysvětleno v podkapitole kvantifikace (sekce 14: Interpretace výsledků).
Hodnota Ct-value se určuje pomocí funkce threshold. Doporučené treshold hodnoty pro amplification curves (amplifikační křivku) jsou zaznamenány v tabulce 7. Upozorňujeme, že tyto hodnoty jsou pouze doporučené a jsou založeny na maximální intenzitě fluorescence. Hodnoty se mohou lišit jak mezi jednotlivými vzorky, kroky, tak i druhy cyclerů. Příklad amplifikační křivky (pro mtLSU) získané pomocí RGQ je zobrazen na obrázku 4.

Tabulka 7. Thresholds RGQ amplification curves

Max FI (norm. fluorescence)	Threshold levels
< 0.2	0.025
0.2-0.6	0.05
0.6-1.0	0.1
>1.0	0.15

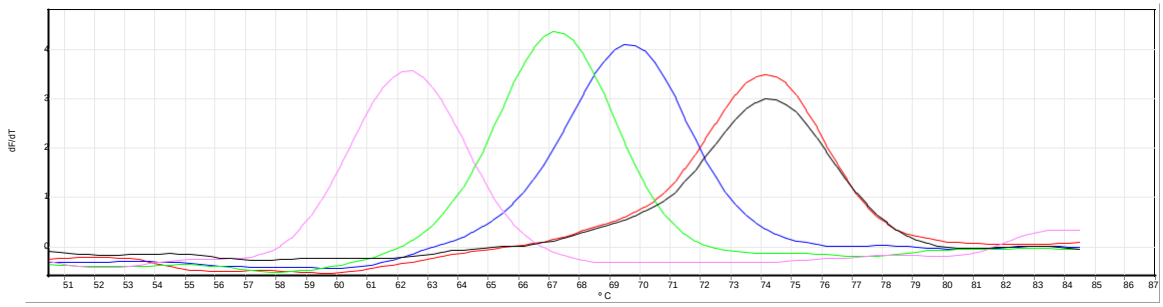
Příklad amplifikační křivky



Obrázek 4. Amplifikační křivka. Příklad amplifikační křivky *P. jirovecii* mtLSU v oranžovém detekčním kanálu u přístroje RGQ.

Intenzita fluorescence se může lišit mezi jednotlivými RGQ přístroji. Z toho důvodu nejsou doporučeny threshold hodnoty pro melting peak analysis. Obecně platí, že pokud je pozorován signál melting peak výše než background signál při specifických teplotách tání (T_m), tak to ukazuje specifický signál a ten může být určen jako pozitivní. NTC může být použita jako background signál. Specifické hodnoty T_m korespondují s DHPS typy a jsou zapsány v tabulce 10. Všechny melting peaks pro všechny DHPS typy detekované pomocí soupravy PneumoGenius® real-time PCR jsou ukázány na obrázku 5.

Příklad melting peaks

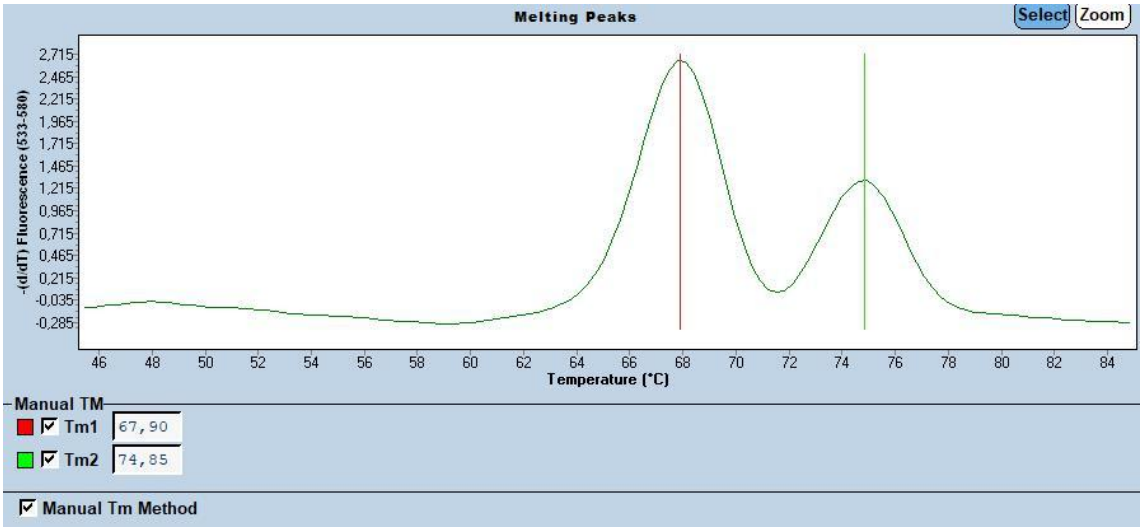


Obrázek 5. Melting peaks se soupravou PneumoGenius®. Melting peaks ve žlutém detekčním kanálu pro DHPS wildtype (červená), T55A (modrá), P57S (zelená), T55A + P57S (růžová) a PC (červená). Zaznamenejte, že melting peak pro pozitivní kontrolu (PC) v oranžovém detekčním kanálu je specifický pro wildtype a bude vysvětlen v kapitole 14. Data byla získána pomocí přístroje RGQ.

Thresholds: LC480 II

K určení hodnot C_t u přístroje LC480 II pomocí softwaru doporučujeme použít 2nd-derivative function (druhou derivační funkci). Tato funkce automaticky určí hodnotu C_t. Nicméně, je nutné podotknout, že s funkcí 2nd derivative můžou být vzorky označeny jako falešně pozitivní. Proto je potřeba vždy zkontrolovat, že je přítomná běžná amplifikační křivka (normal amplification curve) a v případě potřeby ji upravit. Navíc, všechny amplifikační křivky, které mají hodnoty $C_t > 40$ jsou označeny jako křivky 40 s funkcí druhé derivace.

Pro funkci melting peaks není možné nastavit hodnotu horizontal threshold. Hodnoty T_m pro melting peaks jsou automaticky určeny podle T_m-calling function pomocí sostwaru LC480. Nicméně, vždycky zkontrolujte, jestli je přítomný specific melting peak porovnáním s PC a NTC, které je vzorem pro background signál. V případě potřeby zvolte “munual T_m-method”, protože tato funkce umožňuje přesnější T_m-identification (obrázek 6).



Obrázek 6. Manuální nastavení T_m-selekce u softwaru přístroje LC480. Vyberte T_m1 a/nebo T_m2 pro manuální výběr vertikálního threshold pro přesnější identifikaci T_m hodnot.

Thresholds: CFX96™

Pro stanovení hodnot C_t pomocí softwaru CFX se doporučuje použít C_q a zvolit regresi. Tato funkce automaticky určí hodnotu C_t. Pro manuální výběr prahové hodnoty lze zvolit možnost single threshold (jeden práh), ale je nedoporučuje, protože není standardizována. Všimněte si, že hodnoty C_t získané pomocí funkce regresním režimem jsou nižší než při použití manuálního prahu.
Hodnoty T_m jsou při použití prahu pro vrcholy tání poskytovány automaticky. Na adrese obecně platí, že pík tání pozorovaný nad signálem pozadí při specifickém T_m znamená, že se jedná o specifický signál a může být označen jako pozitivní. NTC lze použít jako signál pozadí.

Specifické hodnoty T_m cílů jsou uvedeny v tabulce 11.

Thresholds: QuantStudio™ 5

Hodnoty C_t v QS5 se určují pomocí automatického prahu. Ten lze nastavit v nabídce nastavení na manuální v části „C_t settings“, což může být potřebné. Hodnoty T_m jsou poskytovány automaticky a mohou obsahovat falešně pozitivní výsledky pro negativní jamky.
Manuální nastavení „peak calling threshold“ je k dispozici v nabídce nastavení v části Melt Curve Settings (Nastavení křivky tání). NTC lze použít jako signál pozadí. Specifické hodnoty T_m cílů jsou uvedeny v části tabulce 11.

Thresholds: Mic qPCR cyklér

Pro automatické stanovení hodnot C_t na Mic qPCR cykleru lze zvolit funkci automaticky nastavený práh. V každém detekčním kanálu musí být vybrána pevná prahová hodnota pro analýzu křivky tání. Pro co nejspolehlivější nastavení analýzy na Mic qPCR cycleru doporučujeme kontaktovat společnost PathoNostics nebo místního distributora, abyste získali šablonu optimální analýzy.

14. Analýza dat

14.1. Interpretace výsledků

Interpretace dat

Interpretace dat získaných pomocí PneumoGenius® PCR amplifikačních křivek jsou ukázána v tabulce 8. Pokud při použití soupravy PneumoGenius® nepozorujete žádný fluorescenční signál v žádném detekčním kanálu, je vzorek inhibován, jeden z testovacích kroků v postupu selhal nebo došlo k manuální chybě. Více informací najdete v kapitole 15 „Řešení problémů“.

Tabulka 8. Interpretace signálu PneumoGenius® PCR

	PneumoGenius® amplifikační signály			
LC480	**533-580**	**533-610**	**618-660**	**výsledky**
RGQ	**žlutá**	**oranžová**	**červená**	
CFX	**HEX**	**ROX**	**Cy5**	
MIC	**žlutá**	**oranžová**	**červená**	
QS5	**VIC**	**ROX**	**Cy5**	
	+	+	+	*P. jirovecii*
	-	+	+	Omezené množství *P. jirovecii DNA*
	-	-	+	Žádný *P. jirovecii*, IC Pozitivní
	+	+	-	IC v kompetici s vysokou koncentrací DNA, výsledky jsou stále platné
	-	-	-	Neplatný

14.2. Kvantifikace

V soupravě PneumoGenius® real-time PCR jsou zahrnuty 4 LSU standardy pro kvantifikaci množství *P. jirovecii* mtLSU DNA (10000-10 kopie/µl). Tyto 4 LSU standardy jsou kvantifikovány pomocí droplet digital PCR (ddPCR) a musí být zahrnuty do PCR minimálně jednou za PN-600 šarži (jak na RGQ, tak na LC480 II).

Kvantifikace na RGQ

Příklad správné amplifikační křivky při práci s RGQ pro všechny 4 standardy je ukázána na obrázku 7A. Standardní křivka může být následně vygenerována po úpravě vzorků v softwaru RGQ přístroje:

- Vyberte ‘standard’ pro typ vzorků a aplikujte to na všechny 4 standardy obsažené v soupravě PneumoGenius®
- Vyberte ‘unknown’ pro všechny vzorky co mají být kvantifikovány
- Vyberte ‘NTC/positive control’ pro vzorky kontrol
- Zadejte celkové množství kopií/reakci (jak je popsáno v tabulce 9)

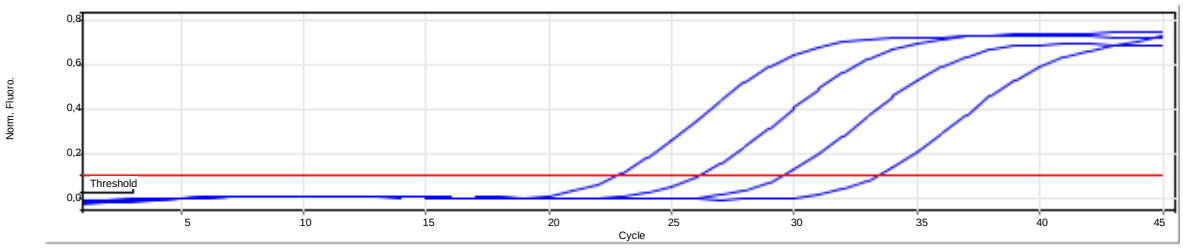
Po zadání koncentrací standardů do softwaru přístroje Rotor-Gene Q si software automaticky vypočítá počet kopií na základě vygenerované standardní křivky. Příklad standardní křivky, kde jsou čísla kopií vynesena proti hodnotám Ct, je znázorněn na obrázku 7B.

Tyto 4 standardy nemusí být zahrnuty v každém běhu. Standardní křivka může být importována do dalších sérií testování pomocí soupravy. Doporučuje se však do každého běhu PCR zahrnout jeden standard, aby bylo umožněno standardní nastavení křivky, čímž se zlepší přesnost koncentrace.

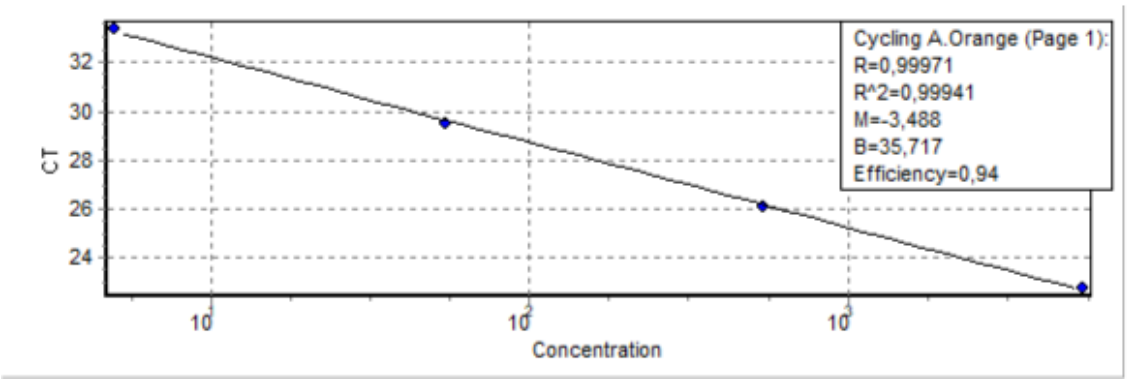
Chcete-li exportovat standardní křivku:

- uložte běh v RGQ, ve kterém byla vygenerována standardní křivka, jako soubor běhu.
- Tento soubor lze nyní importovat pomocí výběru ‘Analysis’ a ‘Quantitation’.
- Poté může být standardní křivka importována výběrem ‘Import Curve’ (zobrazeno na obrázku 7C).
- Po importu standardní křivky, software ji automaticky použije pro nové testování se soupravou PneumoGenius®.

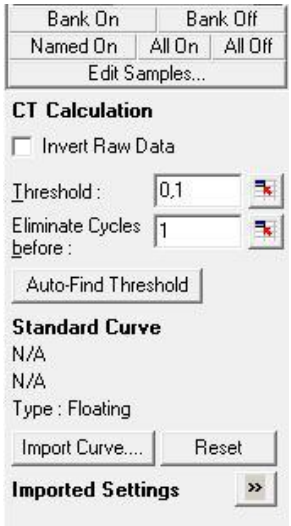
A



B



C



Obrázek 7. Kvantifikace *P. jirovecii* mtLSU DNA v RGQ. (A) Amplifikační křivka 4 koncentrací *P. jirovecii* mtLSU. (B) Standardní křivka založená na 4 koncentracích *P. jirovecii* mtLSU. (C) Obrázek softwaru přístroje Rotor-gene Q pro import standardní křivky do jiného běhu testování.

Tabulka 9. Koncentrace LSU standardů

Název	Číslo komponentu	Typ	Daná koncentrace / 5 µl
Standard 1	CN2038A	Standard	50000
Standard 2	CN2039A	Standard	5000
Standard 3	CN2040A	Standard	500
Standard 4	CN2041A	Standard	50

Kvantifikace u přístroje LC480 II

Příklad správné amplifikační křivky u přístroje LC480 pro 4 LSU standardy je ukázán na obrázku 8A. Standardní křivka může být následně vygenerována po úpravě vzorků v softwaru přístroje LC 480:

- Vyberte 'Abs quant' jako pracovní postup v ‚Sample Editor screen,
- Vyberte 'standard' jako typ vzorku a označte tak všechny 4 PneumoGenius® standardy
- Vyberte 'unknown' pro všechny vzorky co mají být kvantifikovány
- Vyberte 'negative/positive control' pro vzorky kontrol
- Zadejte celkové množství kopií na reakci (je vypsáno v tabulce 9)

Po zadání koncentrací standardů v Sample Editor screen, vyberte ‚Abs Quant/2nd derivative Max' jako model analýzy a vyberte ‚calculate'. The LC480 software automaticky vypočítá počet kopií na základě vygenerované standardní křivky. Příklad standardní křivky, kde jsou čísla kopií vynesena proti hodnotám C_t, je znázorněn na obrázku 8B.

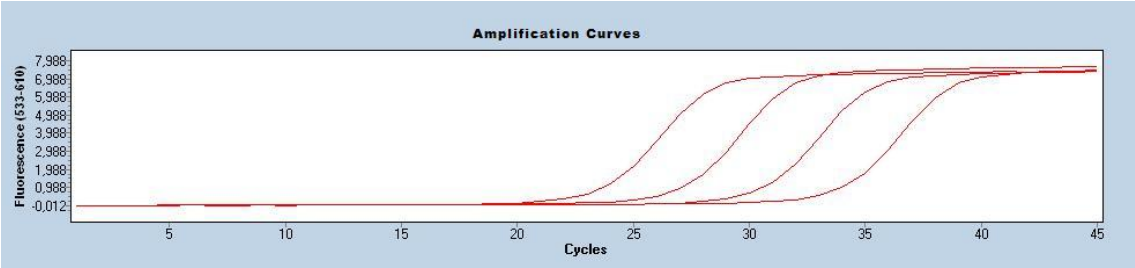
Tyto 4 standardy nemusí být zahrnuty v každém běhu. Standardní křivka může být importována do dalších sérií testování pomocí soupravy, avšak to vyžaduje zahrnutí vždy jednoho standardu v každém PCR běhu pro účely kalibrace.

Chcete-li exportovat standardní křivku:

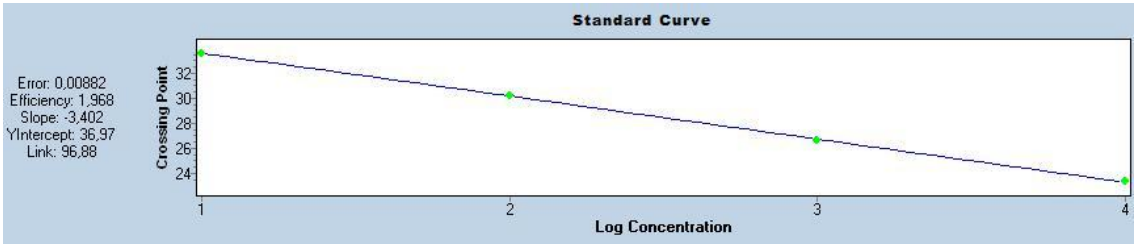
- Uložte PCR běh v LC480 II zahrnující standardní křivku, která byla vygenerována za použití 4 LSU standardů
- Standardní křivka musí být uložena výběrem 'Std Curve (in run)' a následně 'save as external' (ukázáno na obrázku 8C)
- Standardní křivku lze uložit do před-programového souboru pro standardní křivky (Std Curve).
- Nyní lze standardní křivku použít i v jiném PCR běhu (který zahrnuje alespoň jeden LSU standard), pokud vyberete 'Std Curve (v běhu)' a následně 'St curve (External)'.
- Objeví se standardní křivka a koncentrace každého vzorku se stanoví po výběru tlačítka 'calculate'.

Poznámka: jakmile se provede standardní křivka na přístroji LC480II nebo RGQ, je nezbytné zahrnout alespoň jeden standard i v každém následujícím běhu, který přístroji umožní provést kvantifikaci klinických vzorků podle uložené standardní křivky.

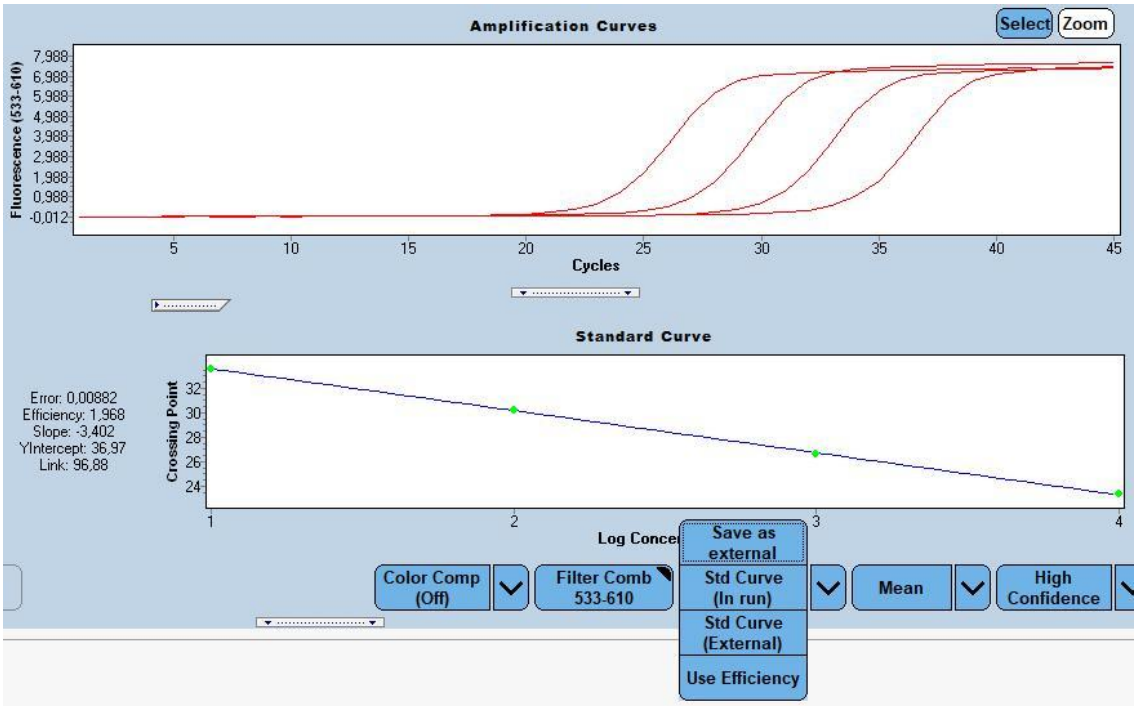
A



B



C

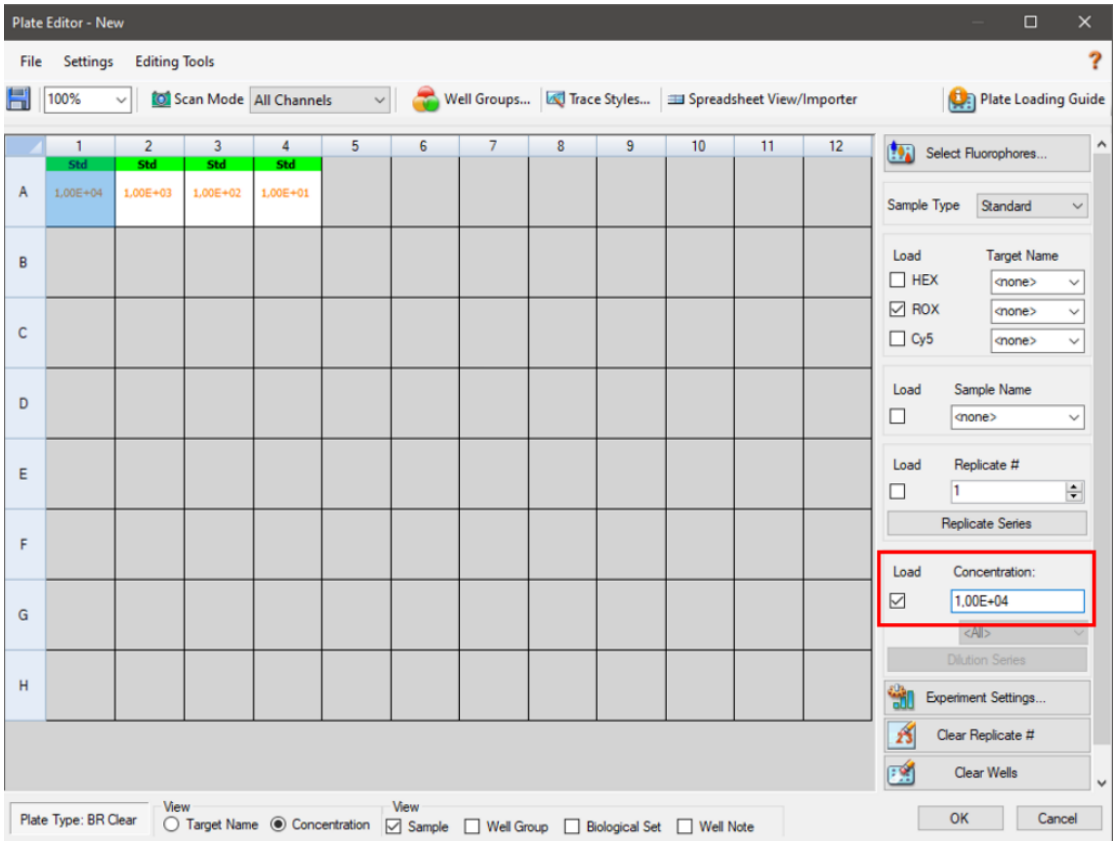


Obrázek 8. Kvantifikace *P. jirovecii* mtLSU DNA v přístroji LC480 II. (A) Amplifikační křivka 4 *P. jirovecii* mtLSU koncentrací. (B) Standardní křivka založená na 4 *P. jirovecii* mtLSU koncentracích. (C) Obrázek softwaru přístroje LC480II pro uložení standardní křivky.

Kvantifikace na přístroji CFX96™

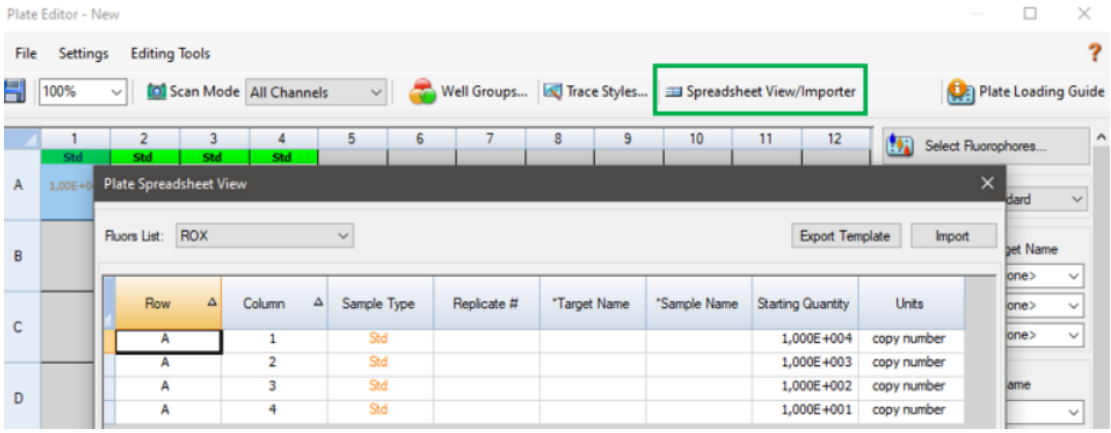
Pro nastavení standardní křivky LSU je třeba provést několik kroků:

- Vyberte „Plate Setup“ a následně na obrazovce analýzy dat vyberte „View/Edit“
- Vyberte jamky, do kterých se pipetují standardy LSU, a ujistěte se, že je položka „Sample Type“ nastavena na „Standard“. Po vytvoření jamek pro standardy vyberte každou jamku zvlášť a v části „Concentration“ (Koncentrace) editoru destiček (označeno červeně, obrázek 8) vyplňte správnou koncentraci pro každý standard. Tento postup opakujte pro každý standard, dokud nebudou k rozložení destičky přiřazeny všechny čtyři standardy LSU.



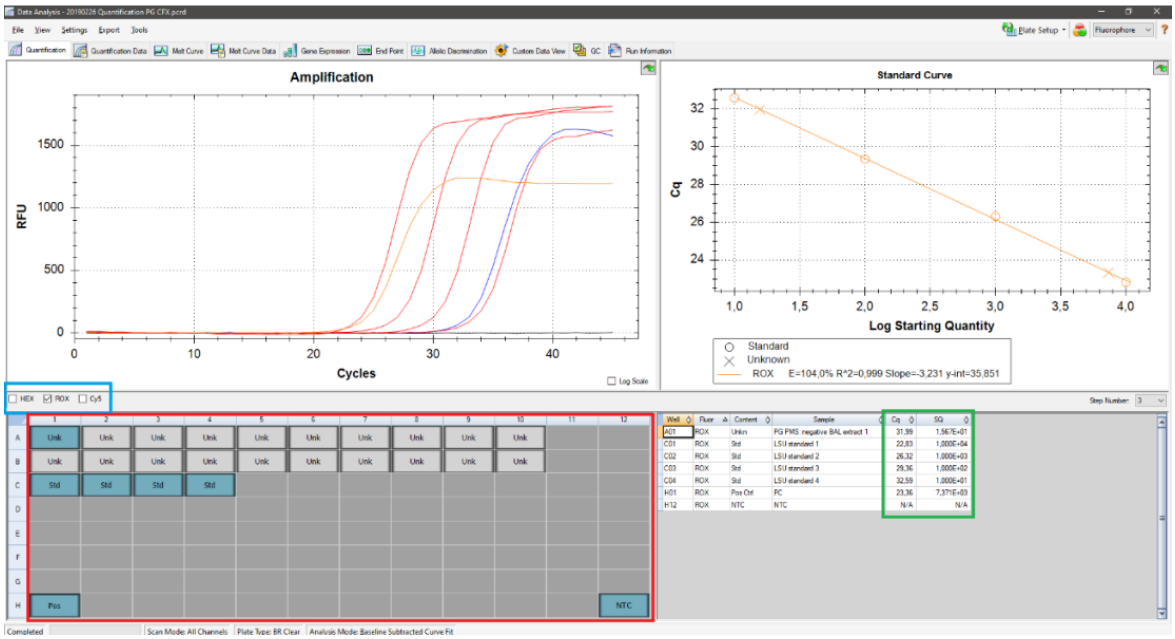
Obrázek 8. Nastavení standardů LSU na obrazovce editoru desek CFX. Každý standard je třeba vyplnit samostatně.

- ❖ Poté vyberte v levém horním rohu Editoru desek položku „Editační nástroje“ a klikněte na položku „Zobrazení tabulky/Importér“, která je na obrázku 9 vyznačena zeleně. Do sloupce „Sample Name“ (Název vzorku) zadejte názvy vzorků a kontrol a jim odpovídající typ vzorku.



Obrázek 9. Zobrazení/import tabulky. Názvy jednotlivých vzorků lze vyplnit ve sloupci „Sample Name“.

Po použití koncentrací standardu software CFX96 při provádění kvantifikační analýzy automaticky vypočítá počet kopií na základě vygenerované standardní křivky. Příklad standardní křivky, na které jsou vyneseny počty kopií proti hodnotám Ct, je znázorněn na obrázku 10. Pro každý běh CFX96 jsou k vytvoření standardní křivky zapotřebí standardy LSU.

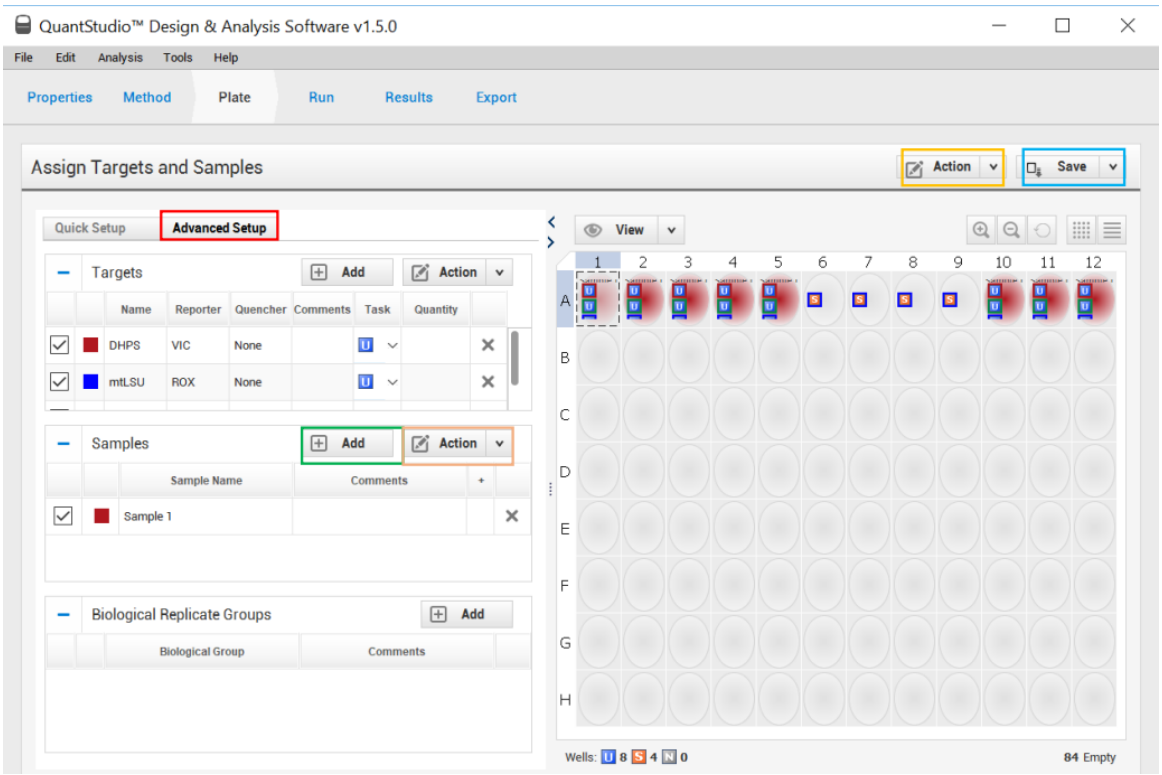


Obrázek 10: Kvantifikace analýzy dat. Modře jsou vyznačeny dostupné detekční kanály; červeně jamky, které lze (de)vybírat; zeleně jsou vyznačeny koncentrace Ct (Cq) a LSU (SQ).

Kvantifikace na přístroji QS5

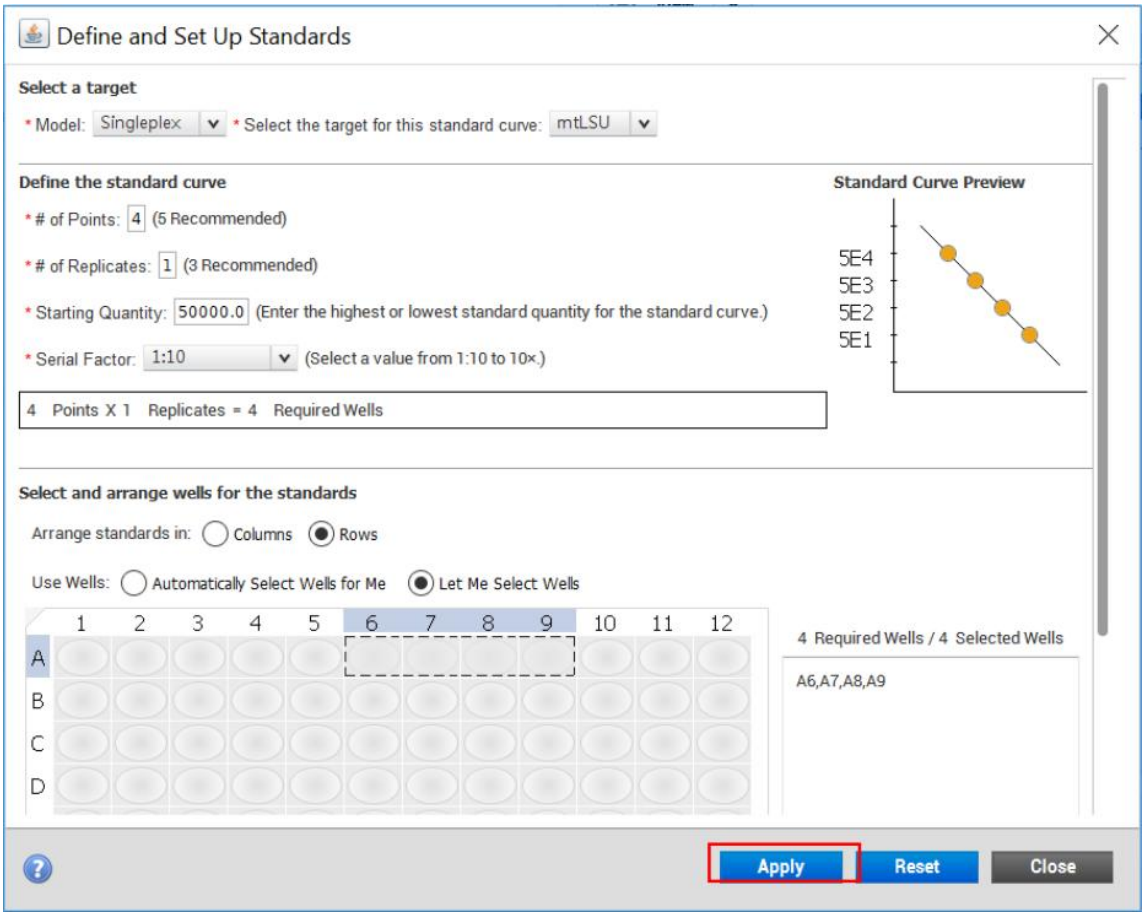
Pro nastavení standardní křivky LSU je třeba provést několik kroků:

- V softwaru vyberte možnost „Plate“ a následně „Advanced Setup“.
- Zvolte „Action“ (Akce) a poté „Define and setup standards“ (Definovat a nastavit standardy), abyste zadali informace pro umožnění kvantifikace pomocí standardů PneumoGenius® (obrázek 11).



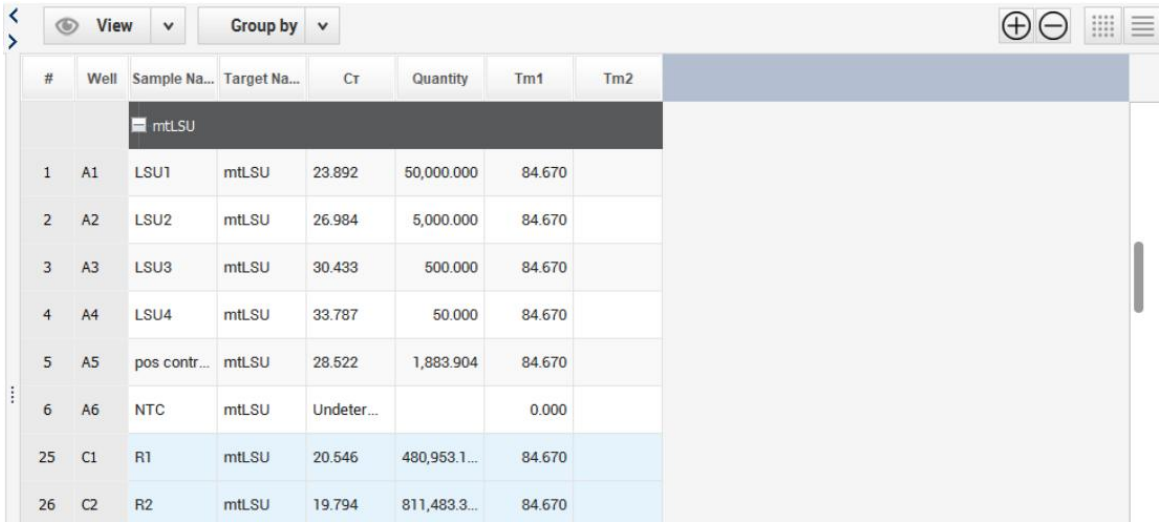
Obrázek 11. Obrazovka Plate. Vyberte oranžově označenou možnost „Action“ (Akce) a zvolte „Define and setup standards“ (Definovat a nastavit normy).

- Pro kvantifikaci pomocí standardů PneumoGenius® je třeba uvést následující informace (obrázek 12)
    - Jako model zadejte „Singleplex“ a jako cíl vyberte „mtLSU“
    - # of points = 4
    - # of replicates = 1
    - Starting quantity = 50000
    - Serial factor = 1:10
    - Arrange standards in rows
    - Vyberte možnost „Let me select wells“ a následně vyberte jamky obsahující standardy
    - Vyberte možnost „Použít“



Obrázek 12. Včetně informací o standardní křivce. Zahrňte požadované informace umožňující kvantifikaci pomocí standardů PneumoGenius®. Po vyplnění informací vyberte možnost „Apply“ (Použít) označenou červeně a pokračujte.

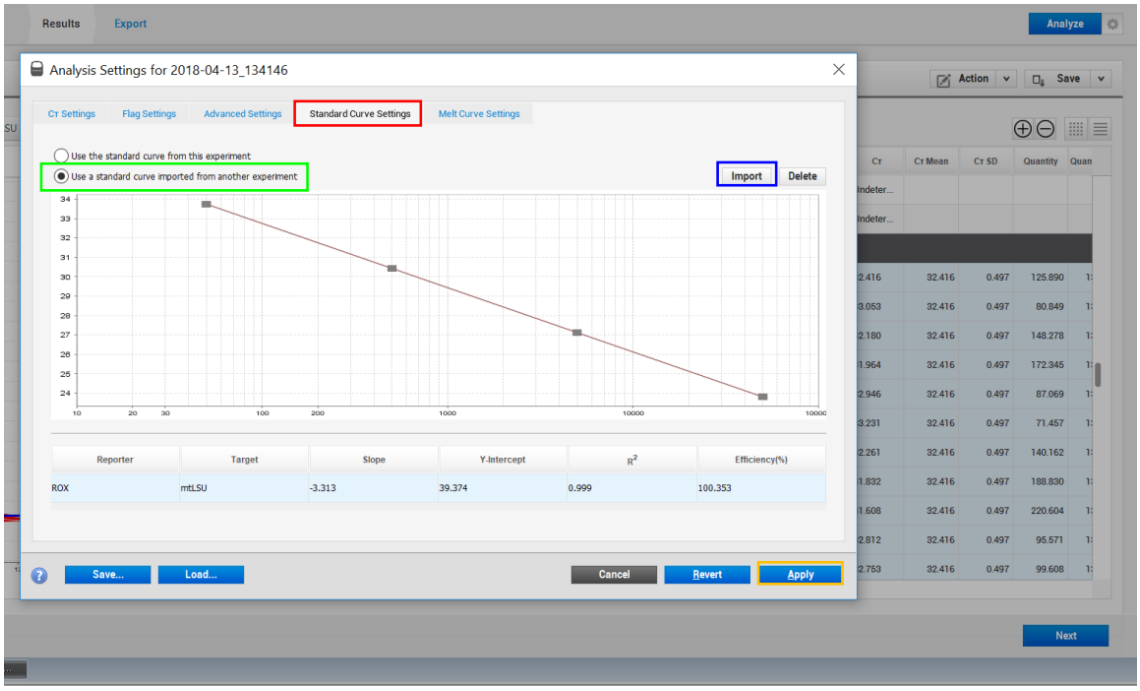
Po použití koncentrací standardu software QS5 při provádění kvantifikační analýzy automaticky vypočítá počet kopií na základě vygenerované standardní křivky. Příklad standardní křivky, kde jsou počty kopií vypočítány podle hodnot Ct, je uveden na obrázku 13.



#	Well	Sample Na...	Target Na...	Cr	Quantity	Tm1	Tm2
		mtLSU					
1	A1	LSU1	mtLSU	23.892	50,000.000	84.670	
2	A2	LSU2	mtLSU	26.984	5,000.000	84.670	
3	A3	LSU3	mtLSU	30.433	500.000	84.670	
4	A4	LSU4	mtLSU	33.787	50.000	84.670	
5	A5	pos contr...	mtLSU	28.522	1,883.904	84.670	
6	A6	NTC	mtLSU	Undeter...		0.000	
25	C1	R1	mtLSU	20.546	480,953.1...	84.670	
26	C2	R2	mtLSU	19.794	811,483.3...	84.670	

Obrázek 13. Vzorová data. Automatické výpočty pro kvantifikaci jsou uvedeny v tabulce.

- Standardní křivku lze také importovat z jiného cyklu výběrem ikony nastavení v pravém horním rohu obrazovky (obrázek 14).
    - Vyberte nastavení standardní křivky a následně vyberte možnost "Use a standard curve imported from another experiment".
    - Zvolte možnost „importovat", která umožňuje vybrat jiný běh QuantStudio™ 5 se stejným protokolem.
    - Klikněte na „Apply" a na data se použije standardní křivka z druhého běhu.

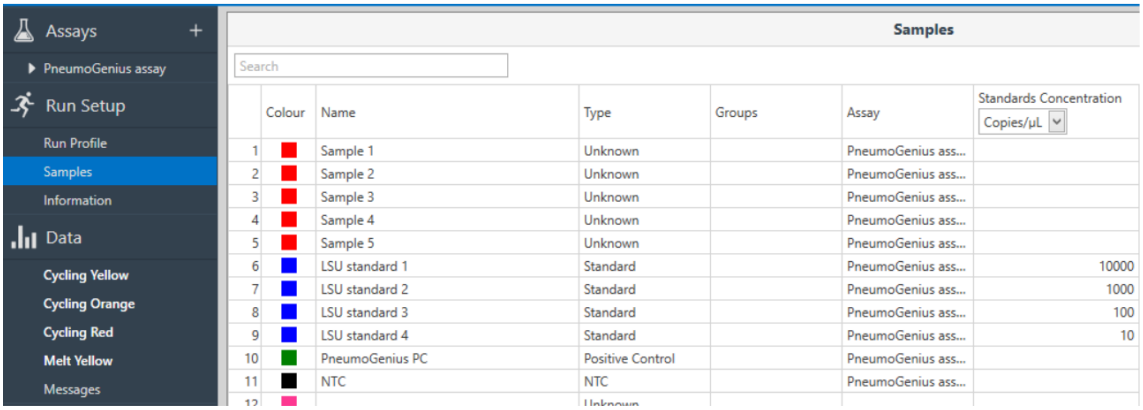


Obrázek 14. Import standardní křivky. V nabídce nastavení vyberte možnost „Standard Curve settings "označenou červeně. Zvolte „Use a standard curve imported from another experiment" (Použít standardní křivku importovanou z jiného experimentu) (označeno zeleně), následuje import (označeno modře) a výběr správných běhů Quantstudia 5 (soubor eds). Nakonec vyberte možnost apply (použít) označenou oranžově.

Kvantifikace na přístroji MIC

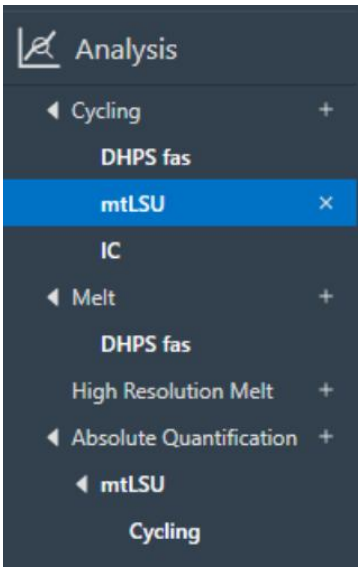
Pro nastavení standardní křivky LSU je třeba provést několik kroků:

- ❖ Zvolte „Samples“ (Vzorky) a následně vyplňte údaje pro jamky obsahující standard LSU výběrem Type „Standard“ (Typ standardu) a zadáním koncentrace (obrázek 15).



Obrázek 15. Přehled vzorků

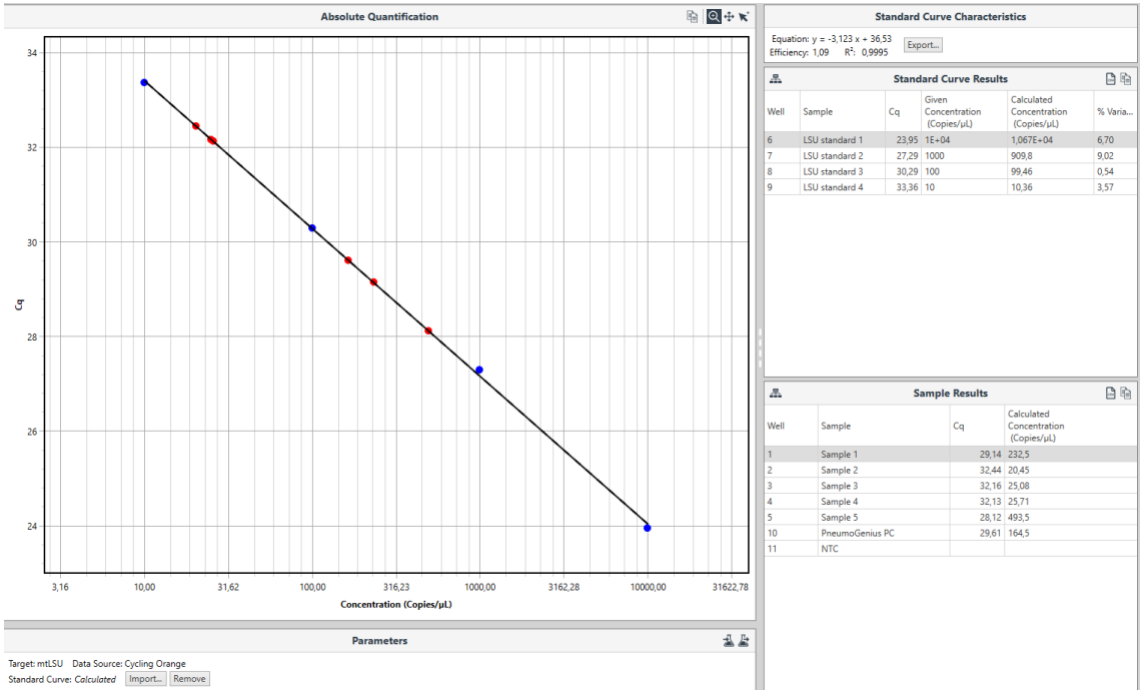
- Po dokončení běhu a přiřazení testu PneumoGenius® Multiplex real-time PCR kit ke vzorkům se automaticky vygenerují všechny analýzy (viz obrázek 16).



Obrázek 16. Každá dostupná analýza generovaná testem PneumoGenius

Absolutní kvantifikace / cyklování

- V režimu analýzy absolutní kvantifikace klikněte na „mtLSU“.
- Automaticky se vygeneruje standardní křivka (v běhu jsou vyžadovány standardy PneumoGenius) a vypočítají se koncentrace všech neznámých vzorků (obrázek 17).



Obrázek 17. Absolutní kvantifikace mtLSU pomocí testu PneumoGenius®

- Amplifikační křivky + hodnoty Ct všech tří detekčních sond si můžete prohlédnout kliknutím na příslušný název cíle v části „Cycling“ (obrázek 16).
- Všechna nastavení prahových hodnot jsou přednastavena v souboru testu a není nutné je dodatečně upravovat.

Standardní křivku lze také importovat (a exportovat) výběrem importu v části „Parametry“ na obrazovce absolutní kvantifikace mtLSU (obrázek 17). Aby však bylo možné úspěšně importovat externí standardní křivku, musí být v experimentu zahrnut alespoň jeden ze standardů LSU (nejlépe standard LSU 2).

14.3. Kvantifikace klinických vzorků

Standardní křivka PneumoGenius® LSU umožňuje kvantifikaci extraktů DNA. Pro stanovení množství kopií ve vzorku je však třeba použít „correction factor“. Pro výpočet „correction factor“ je třeba vzít v úvahu několik faktorů:

1. Vstup PCR extraktu DNA: doporučený eluční objem při extrakci nukleových kyselin pro soupravu PneumoGenius® Multiplex real-time PCR je 50 µl a pro PCR se použije 5 µl: korekční faktor = **10**.
2. Extrakce DNA: korekční faktor není nutný, protože celkové množství kopií DNA v eluátu se teoreticky rovná celkovému množství kopií ve vzorku, který byl použit pro extrakci DNA.
3. Pokud byl pro extrakci DNA použit doporučený objem vzorku 200 µl, vynásobte jej **5** a vypočítejte koncentraci na 1 ml **vzorku**.

Shrnutí:

[kopie na ml] = [vypočtené kopie na reakci] x 10 x 5

14.4. Křivky tání a T_m – hodnoty

Rozlišování typů DHPS je umožněno pomocí analýzy křivky tání. Rozsahy specifické teploty tání (T_m-values) odpovídající typům DHPS jsou uvedeny v tabulce 11. Nicméně, pamatujte, že tyto údaje škálové hodnoty Tm jsou orientační, jelikož i přístroje od stejného výrobce se mohou lišit. Proto pokaždé porovnávejte získané Tm hodnoty s PC, která je specifická pro wildtype.

Tabulka 11. T_m-hodnota rozmezí (°C) pro DHPS typy na přístrojích RGQ, LC480, CFX, MIC and QS5.

Hodnoty Tm PneumoGenius® (°C)						
Kanál	Typ	RGQ	LC480	CFX	MIC	QS5
Žlutá 533-580 HEX/VIC	T55A a P57S	62.5-65.5	61.5-64.5	59.0 - 62.0	62.0 - 65.0	59.0 - 62.0
	T55A	69.5-72.5	69.0-72.0	66.5 - 69.5	69.2 - 72.2	66.7 - 69.7
	P57S	67.0-70.0	66.5-69.5	64.0 - 67.0	66.7 - 69.7	64.1 - 67.1
	Wildtype/PC	74.0-77.0	73.0-76.0	70.5 - 73.5	73.1 - 76.1	71.2 - 74.2

14.5. Kontroly

Pro kontrolu správné extrakce DNA (IC) a procesu PCR (IC a PC) musí být hodnoty pro kontroly použité ze soupravy PneumoGenius® v rozmezích, které jsou uvedeny v tabulce 12. Hodnoty Ct pro IC jsou silně závislé na kvalitě vzorku a procesu DNA extrakce. Ale pozitivní signál musí být detekován v negativních vzorcích mezi hodnotami Ct 28 a 35.

Tabulka 12: C_t hodnoty pro kontroly. *C_t hodnoty jsou určeny pomocí doporučených prahových hodnot popsaných v této příručce.*

Kontrola	Cíl	Kanál	Ct-hodnota
Pozitivní kontrola	DHPS wildtype	Žlutá / 533-580 / HEX / VIC	25.0 - 29.0
	mtLSU	Oranžová / 533-610 / ROX	25.0 - 29.0
Interní kontrola	M13 phage	Červená / 618-660 / Cy5	28.0 - 35.0

Poznámka: Hodnoty Ct byly získány pomocí kalibrovaných přístrojů RGQ a LC480 II. Ostatní přístroje RGQ a LC480 II můžou vykazovat rozdílné Ct hodnoty. Interní kontrola musí být vždy detekována i u *P. jirovecii* negativních vzorků.

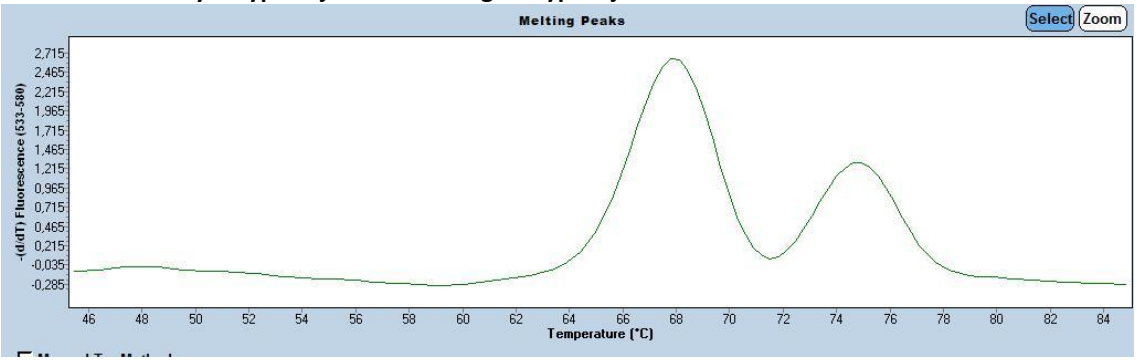
15. Problémy, které mohou nastat při analýze dat

Při analýze dat se lze setkat s některými problémy. Nejčastější problémy jsou popsány níže.

Infekce jak wildtype *P. jirovecii* DHPS, tak mutantním typem

Kmen *P. jirovecii* s DHPS wildtype a mutantním typem může být přítomen v jednom (BAL) vzorku. Výsledkem bude dvojitý melting peak, v závislosti na genotypu. Příklad takového typu vzorku *P. jirovecii* DHPS-wildtype kmen a a P57S DHPS mutant kmen v jednom, je ukázán na obrázku 9.

Příklad dvou různých typů *P. jirovecii* DHPS genotypů v jednom vzorku

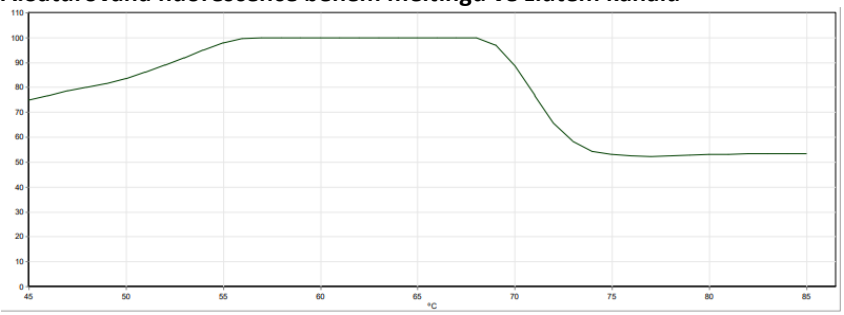


Obrázek 9. Dvojitý DHPS melting peak pro wildtype (74 °C) a P57S (68 °C) mutaci.

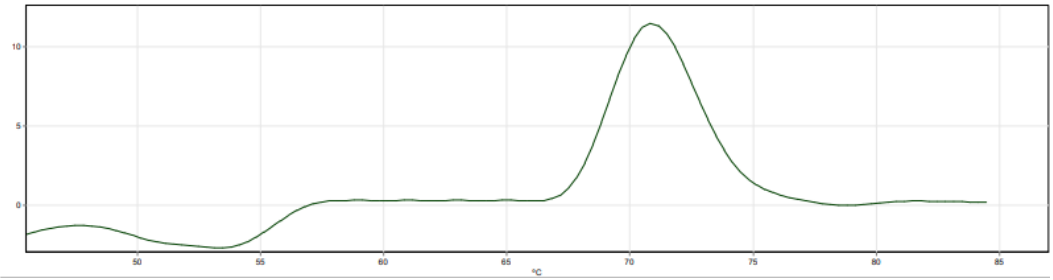
Saturace fluorescenčního signálu na RGQ

Saturaci fluorescenčních kanálů lze zabránit pomocí funkce optimalizace gain během amplifikace a meltingu na přístroji RGQ. Normálně nejsou fluorescenční signály saturovány během meltingu po výběru funkce gain-optimization, ale pokud se to stane, doporučujeme vybrat 50 pro max FI místo 100 (vše je popsání v kapitole 11, obrázek 3). Ačkoli to limituje fluorescenční intenzitu u melting peak, je zabráněno posunu Tm. Příklad saturace během kroku melting je ukázán na obrázku 10A-B. Obrázek 10C-D ukazuje výsledky s omezením max. intenzity fluorescence na 50.

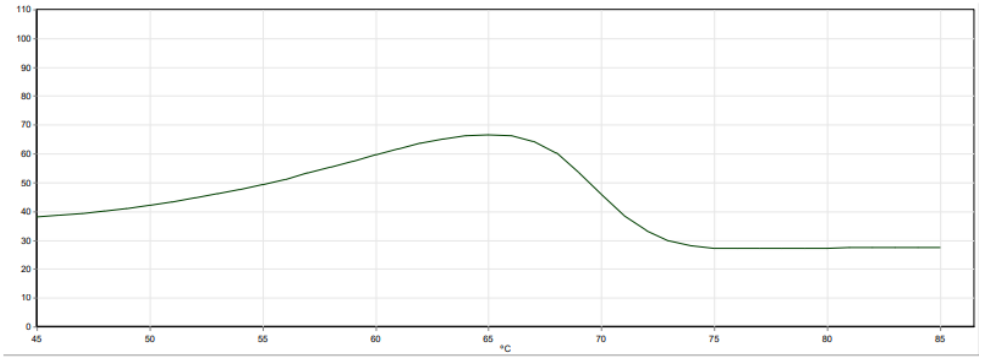
A. Saturovaná fluorescence během meltingu ve žlutém kanálu



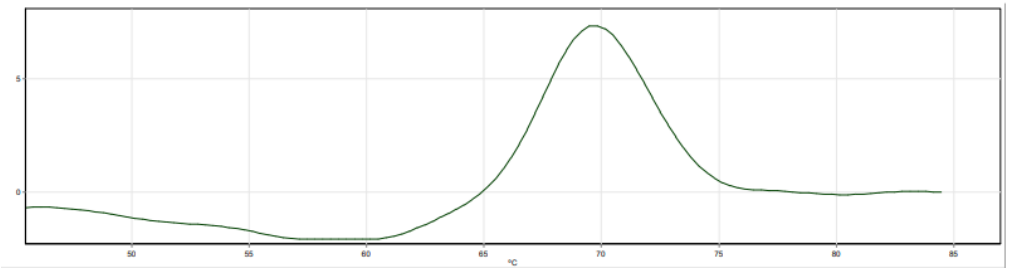
B. Saturovaná fluorescence během analýzy dat pro melting (žlutá)



C. Nesaturovaná fluorescence během meltingu ve žlutém kanálu



D. Nesaturovaná fluorescence během analýzy dat pro melting (žlutá)



Obrázek 10. Saturace během „melting" fáze v raw žlutém detekčním kanálu. (A) Saturovaná fluorescence během kroku melting v otevřeném kanálu. (B) Saturovaná fluorescence během analýzy dat pro melting. (C) Nesaturovaná fluorescence během kroku melting v otevřeném kanálu. (D) Nesaturovaná fluorescence během analýzy dat pro melting v otevřeném kanálu, zabráněno výběrem max FI 50.

16. Výkonnostní charakteristiky

16.1. Analytický výkon

16.1.1. Limit detekce (LoD)

LoD (analytická citlivost) byla stanovena pomocí za použití ředicí řady genomové DNA *P. jirovecii*. Konečný LoD byl potvrzen testováním 20 replikátů s mírou pozitivity ≥ 95%. Kvantifikace cílů byla provedena pomocí in-house droplet digital PCR. Přehled hodnot LoD pro všechny cíle je uveden v tabulce 13

Tabulka 13. Hodnoty detekčního limitu soupravy PneumoGenius®

Cíl	Testovaná koncentrace (c/µl)	LC480	MIC	CFX96	RGQ	QS5
		Hodnota Ct				
mtLSU	1	34-37	35-37	35-38	34-37	34-36
DHPS *fas*	1	36-40	36-38	34-36	34-37	35-38

16.1.2. Analytická specificita

Analytická specificita kitu PneumoGenius® byla stanovena testováním DNA různých klinicky relevantních fungálních kmenů a bakterií, které jsou přítomny v respiračním traktu. Všechny testované vzorky DNA jsou uvedeny v tabulce 14. Kromě toho byly primery a sondy zkontrolovány na možné homologie ke všem sekvencím publikovaným v GenBank (NCBI) analýzou porovnání sekvencí, aby byla zajištěna specificita testu PneumoGenius®. Nebyly prokázané žádné cross-reakce u žádného kmene.

Tabulka 14. Testování specificity příslušných kmenů. + = pozitivní, - = negativní

Pathogen	Strain	*mtLSU*	*DHPS*
Pneumocystis jirovecii	In-house*	+	+
Cryptococcus neoformans	IHEM 04165	-	-
Saccharomyces cerevisae	IHEM 21157	-	-
Candida albicans	In-house*	-	-
Candida parapsilosis	In-house*	-	-
Aspergillus fumigatus	ATCC MYA4609	-	-
Fusarium solani	IHEM 25864	-	-
Scedosporium prolificans	IHEM 21157	-	-
Penicillium chrysogenum	IHEM 18723	-	-
Penicillium marneffei	ATCC 18224D	-	-
Rhizopus oryzae	IHEM 06016	-	-
Staphylococcus aureus	ATCC BAA-1556D-5	-	-
Pseudomonas auruginosa	In-house*	-	-
Escherichia coli	ATCC 700973	-	-
Bordetella pertussis	ATCC BAA-589	-	-
Haemophilus influenzae	ATCC 51907D	-	-
Moraxella catharrhalis	In-house*	-	-
Streptoccocus pneumoniae	ATCC 700669D-5	-	-
Klebsiella pneumoniae	In-house*	-	-
Legionella pneumoniae	ATCC 33152	-	-
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 29085	-	-
Mycobacterium tuberculosis	In-house*	-	-

*(=interní) potvrzeno sekvencováním

16.1.3. Robustnost

Ověření robustnosti umožňuje stanovení celkové míry selhání PneumoGenius® PCR sledováním přítomnosti interní kontroly. Robustnost byla ověřena testováním 38 *P.jirovecci*-negativních BAL vzorků. Bylo použito 200 µl BAL pro extrakci DNA a 50 µl elučního objemu a všechny vzorky byly analyzovány pomocí PenumoGenius® PCR. IC byla detekována ve všech vzorcích při očekávaných hodnotách Ct (Ct 28-34). Výsledkem je robustnost testu PneumoGenius® PCR pro BAL vzorky 100%.

16.1.4. Interferující látky

PneumoGenius® PCR byla testována na interferenci s velkým množstvím lidské DNA (200 ng). Detekce *P.jirovecii* (zahrnuty obě sondy) byla srovnatelná se vzorky *P.jirovecii* bez přítomnosti lidské DNA, a proto detekce PneumoGenius® PCR testu není ohrožena vysokým nálož lidské DNA.

16.1.5. Testování způsobilosti

Souprava PneumoGenius® multiplex PCR v reálném čase je podrobena panelům EQA od společností Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) a Instand (INSTAND E.V.) a dosud vykázala 100 % správných výsledků u všech vzorků v těchto panelech.

- QCMD 2015 až 2022 včetně (ročně)
- Instant E.V. 2019 až 2022 včetně (pololetně)

Individuální zprávu si můžete vyžádat u společnosti PathoNostics nebo u místního distributora.

16.2. Klinické výsledky

Studie klinické výkonnosti prokázaly následující vlastnosti soupravy PneumoGenius® Multiplex real-time PCR:

- Podle interních validačních studií má vysokou shodu (90 %) pro použití s bronchoalveolárními laváženi (BAL) a vzorky DNA ve srovnání s referenční metodou.
- Podle externí validační studie má senzitivitu 70 % a specificitu 82 % při rozlišování pravděpodobné a nepravděpodobné pneumocystové pneumonie (PCP):
    - Montesinos, I., Delforge, M. L., Ajjaham, F., Brancart, F., Hites, M., Jacobs, F., & Denis, O. (2017). Evaluation of a new commercial for diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia and identification ofdihydropteroate synthase (DHPS) mutations. Diagnostic microbiology and infectious disease, 87(1), 32-36.
- Údaje publikované v roce 2022 v časopise Medical Mycology ukázaly, že souprava PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase detekuje Pneumocystis jirovecii s vynikající citlivostí (100 %) a specifičností (100 %). Podle autorů této studie by měl být PneumoGenius® na základě vynikajícího výkonu považován za náhradu vlastního laboratorně vyvinutého testu.
    - Nijhuis RHT, Godschalk PCR, Smink JHI, van der Zee C, van Hannen EJ. Comparison of the PneumoGenius® and RealStar® Pneumocystis jirovecii PCR CE-IVD assays with a lab developed test for the detection of Pneumocystis jirovecii. Med Mycol. 2022 Jan 10;60(1):myab080. doi: 10.1093/mmy/myab080. PMID: 34894244.
- Duniaski a kol. zkoumali mezidruhovou nerovnováhu počtu kopií mitochondriálních genů jako prediktivní hodnotu pro shlukování izolátů Pneumocystis jirovecii do odlišných podskupin. Jelikož ke zkoumání svého výzkumného cíle použili soupravu PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase a nezkoumali samostatně klinickou výkonnost soupravy, testovali pouze známé pozitivní vzorky, a proto lze určit pouze citlivost (97 %) a poměr falešně negativních výsledků (0,04). Vysoká citlivost je v souladu s jinými studiemi zkoumajícími plnou klinickou výkonnost soupravy PneumoGenius.
    - Dunaiski CM, Janssen L, Erzinger H, Pieper M, Damaschek S, Schildgen O, Schildgen V. Inter-Specimen Imbalance of Mitochondrial Gene Copy Numbers Predicts Clustering of Pneumocystis jirovecii Isolates in Distinct Subgroups. J Fungi (Basel). 2018 Jul 10;4(3):84. doi: 10.3390/jof4030084. PMID: 29996561; PMCID: PMC6162491.

Většina studií zkoumajících soupravu PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase je koncipována jako retrospektivní studie zahrnující známé pacienty s PCP. Tyto studie mají relativně malý vzorek, a protože jsou často zahrnuti pouze pacienti s PCP, není možné vypočítat specificitu nebo jakékoli hodnoty týkající se negativních výsledků. Studie publikovaná Montesinosem a kol. je studií, která se zaměřuje na rozlišení mezi pravděpodobnou a nepravděpodobnou PCP a také podrobně popisuje všechny charakteristiky klinického výkonu tohoto rozlišení (tabulka 15). Nijhuis et al. zkoumali citlivost a specifičnost soupravy PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase při detekci Pneumocystis jirovecii. Tato studie zkoumala pozitivní i negativní vzorky a zjistila téměř dokonalou výkonnost soupravy PneumoGenius® Multiplex real-time PCR při rozlišování.
(tabulka 16).

Tabulka 15: ***Charakteristiky klinického výkonu vypočtené ze studie Montesinos et al. Tato studie se zaměřuje na rozlišení pravděpodobných a nepravděpodobných PCP. Klinické výkonnostní charakteristiky jsou vypočítány nad tímto rozlišením***

Výkonnostní charakteristika	**Specifikace**
Diagnostická specificita	70%
Diagnostická citlivost	82%
Pozitivní prediktivní hodnota	60%
Negativní prediktivní hodnota	87%
Poměr pravděpodobnosti	Pozitivní poměr pravděpodobnosti: 3.95 Negativní poměr pravděpodobnosti: 0.37

Tabulka 16: ***Klinické charakteristiky výkonu podle studie Nijhuis et al.***

Výkonnostní charakteristika	**Specifikace**
Diagnostická specificita	100%
Diagnostická citlivost	100%
Pozitivní prediktivní hodnota	100%
Negativní prediktivní hodnota	100%
Poměr pravděpodobnosti	Pozitivní poměr pravděpodobnosti: N/A Negativní poměr pravděpodobnosti: 0

17. Řešení problémů

Tabulka 17. Řešení problémů pro soupravu PneumoGenius®.

Problém	Možná příčina	Doporučené řešení
PC nebo LSU standardy zůstávají negativní	Jeden z komponentů nebyl přidán	Ujistěte se, že byly přidány všechny komponenty.
	Kontrola nebyla vhodně skladována	Zkontrolujte v jakých podmínkách byla kontrola skladováná, také zkontroluje datum expirace soupravy (vyznačeno na krabici).
	PC byla přidána do jiné reakční zkumavky	Zkontrolujte nastavení programu na PCR přístroji.
	Špatně nastavený PCR program	Zkontrolujte všechny kroky provedené v postupu, správné rozmístění a označení kontrol a zkontrolujte kalibraci pipet a PCR přístroje.
IC zůstává negativní i u Pneumocystis-negativních vzorků	Degradace nukleové kysel. / inhibice	Opakujte extrakci podle návodu a zajistěte, aby všechny přístroje byly řádně dekontaminovány.
	Nesprávně namíchaný PCR mix	Zkontrolujte zda byla přidána Taq polymeráza, PCR směs a vzorek.
	PCR podmínky nebyly v souladu s protokolem	Zkontrolujte nastavení podmínek pro PCR a pokud je to nutné tak poté zopakujte PCR se správným nastavením.
	Špatný elační objem / nepřidána IC kontrola	V případě, že se provádí v 50 µl (EasyMag), zkontroluje zda bylo přidáno k výchozímu materiálu 5 µl IC.
	Byl použit nevalidovaný postup DNA extrakce a výsledkem je nižší výtěžek IC	Opakujte extrakci s 10 µl IC
Negativní kontrola generuje fluorescenční signál	Přenesení / kontaminace	Celý experiment opakujte s čerstvými činidly, zacházejte se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem podle předepsaného postupu a před pipetováním stočte činidla. Ujistěte se, že jste všechny kroky provedli v laminárním boxu, ochranné třídy II, abyste se vyhnuli kontaminacím.

		Přidávejte pozitivní kontroly výhradně v posledním kroku Ujistěte se, že pracovní prostory a nástroje jsou pravidelně dekontaminovány
Velmi slabé fluorescenční signály také pro kontroly	Nesprávné nastavení přístroje Kalibrace Nesprávná příprava real-time PCR mixu	Zkontrolujte nastavení detekčních kanálů Zkontrolujte, jestli je přístroj kalibrován a jestli lampy byly vyměněny podle doporučení výrobce Zkontrolujte, jestli byl PCR mix připraven podle návodu od výrobce Zkontrolujte datum exspirace a podmínky skladování
DHPS sonda je negativní v porovnání s mtLSU sondou	Limitovaná přítomnost počtu kopií DNA *P. jiroveci* ve vzorku	Při extrakci ze vzorků BAL, použijte větší množství vzorku nebo navyšte množství vstupní DNA do PCR reakce

18. Zbytková rizika

Neexistují žádná významná zbytková rizika, o kterých by měli být uživatelé informováni a která již nejsou obsažena v jiných částech tohoto dokumentu.

19. Oznámení pro odběratele

Soupravu PneumoGenius® Multiplex real-time PCR vyrábí společnost PathoNostics B.V.,Maastricht, Nizozemsko v rámci systémů kvality akreditovaných podle normy ISO 13485:2016. Tento produkt je prodáván pouze pro použití koncovým uživatelem a smí být dále prodáván, distribuován nebo přebalován pouze s písemným souhlasem společnosti PathoNostics a pouze licencovanými distributory.

Reagencie různých šarží soupravy PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase by neměly být kombinovat. Pokud obdržíte soupravu PneumoGenius® Multiplex PCR v reálném čase v poškozeném obalu nebo bez suchého ledu, kontaktujte prosím společnost PathoNostics nebo místního distributora PathoNostics.

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

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

19.1. Změny provedené od poslední revize

Od verze IFU PneumoGenius_PG-PN60.11E byly provedeny následující změny:

- „Záměr použití“ byl v oddíle 3 nahrazen „Použití testu“ a zahrnuje další přístroje pro PCR v reálném čase validované pro použití ve spojení s jinými přístroji se sadou PneumoGenius® Multiplex real-time PCR.
- Oddíly 11, 12, 13 a 14 byly upraveny tak, aby obsahovaly podrobnosti a postupy týkající se používání nově validovaných přístrojů pro real-time PCR ve spojení se sadou PneumoGenius® Multiplex real-time PCR kit.
- Byl přidán oddíl 16 „Výkonnostní charakteristiky“.
- Byl přidán oddíl 18 „Zbytková rizika“.
- Oddíl 19 „Oznámení pro odběratele“ nyní obsahuje „Změny provedené od poslední revize“.
- Poslední strana „Symboly“ byla upravena podle nových štítků použitých na obalu soupravy.
- Obecná aktualizace struktury, obsahu a uspořádání IFU.

20. Kontakty

Pro technickou pomoc a další informace nás prosím kontaktujte zasláním e-mailu na info@pathonostics.com nebo voláním na + 31-43-3030423. Pro technickou pomoc uveďte katalogové číslo PN-700.

Výrobce:

PathoNostics B.V.
Randwycksingel 45
6229 EG Maastricht
The Netherlands

Telefon: +31 (0)43 3030423
Fax: +31(0)84 7469245
Email: info@pathonostics.com
Web: www.pathonostics.eu

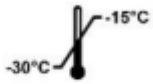
21. Informace pro objednání

Pro objednání kontaktujte místního distributora.

Trademarks:

PneumoGenius® is a registered trademark of PathoNostics
Rotor-Gene® is registered trademark of QIAGEN
LightCycler® is a registered trademark of Roche
QuantStudio™ is a trademark of Thermo Fisher
CFX96™ is a trademark Bio-Rad
NucliSENS® and easyMAG® are registered trademarks of bioMérieux

PneumoGenius® Multiplex real-time PCR kit

	Katalogové číslo (PN-600)
	Obsahuje reagencie dostatečné pro 25 reakcí
GTIN	8719326750941
Basic UDI-DI	87193267509PN-600EY
	Číslo šarže: LPNxxxxxxx
	Teplotní omezení (-30 °C až -15 °C)
	Konzultujte s návodem k použití
	Chraňte před světlem

PathoNostics B.V.
SRN: NL-MF-000002705
Randwycksingel 45, 6229 EG Maastricht, The Netherlands
Phone: +31 (0)43 3030400, Fax: +31 (0)84 7469245
Email: info@pathonostics.com, Web: www.pathonostics.com