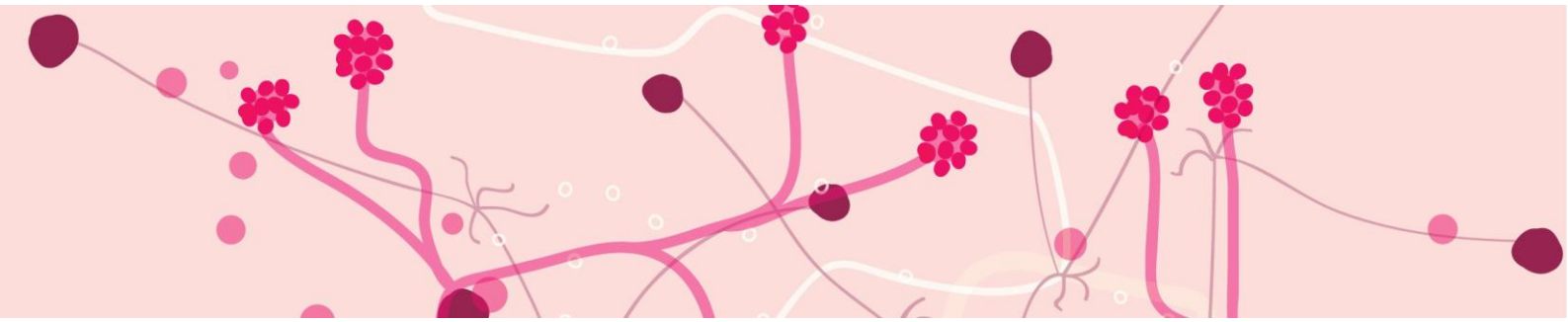


Návod k použití

MucorGenius® Verze 1.2E

Σ 25

IVD

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Pro použití s LightCycler 480® II (Roche), Rotor-Gene® Q (Qiagen), CFX96™ (Bio-Rad), Quantstudio 5 (Thermofisher Scientific) a Magnetickým indukčním cyklerem® (Mic qPCR cycler; Bio molecular systems)

CE

REF Číslo produktu PN-700

PathoNostics B.V., Randwycksingel 45, 6229 EG Maastricht, Nizozemsko

-15 °C
-30 °C

Obsah

1 Shrnutí a souvislosti 4
2 Použití 4
3 Princip testu 5
4 Produkty a cíle 5
5 Dodané materiály 5
6 Požadované, ale neposkytnuté materiály 6
7 Obecná bezpečnostní opatření 7
8 Skladování a manipulace s reagenciemi 7
9 Skladování a manipulace se vzorky 8
10 Extrakce a příprava nukleových kyselin 8
10.1 BAL/respirační vzorky 8
10.2 Sérum 9
10.3 Další typy vzorků 9
10.4 Další platformy pro extrakci DNA 9
10.5 Kontroly 9
11 Nastavení přístroje real-time PCR 9
12 Procedura 11
12.1 Místnost 1: příprava real-time PCR mixu 11
12.2 Místnost 2: Přidání DNA do směsi PCR 12
12.3 Místnost 3: Spuštění přístroje pro měření PCR v reálném čase 12
13 Analýza dat 12
13.1 Metody prahových hodnot cyklu (C_t) 12
14 Interpretace výsledků 14
15 Řešení problémů 16
16 Upozornění pro kupujícího 18
17 Výkonové charakteristiky 19
17.1 Mez detekce (LoD) 19
17.2 Analytická specifičnost 19
17.3 Robustnost a rušivé látky 20
17.4 Reprodukovatelnost a přesnost 20

17.5 Rozhraní FPCRI 21

18 Symboly 22

19 Kontakt 23

20 Informace o objednávce 23

1 Shrnutí a souvislosti

Mukormykóza je spojena s vysokou úmrtností u "rizikových" pacientů, jako jsou příjemci transplantovaných hematopoetických kmenových buněk, transplantace solidních orgánů, hematologická malignita a nekontrolovaný diabetes mellitus. Klinicky a rentgenologicky je mukormykóza často k nerozeznání od jiných invazivních plísňových infekcí, jako je aspergilóza, a zůstává obtížně diagnostikovatelná. Koinfekce druhy Aspergillus může být častá. Druhy Mucorales však nejsou citlivé na vorikonazol, který se často používá jako léčba první linie při aspergilóze. Včasná specifická diagnóza a okamžitá terapeutická intervence s aktivní antimykotickou léčbou, jako je amfotericin B, jsou tedy nezbytné pro zlepšení výsledku mukormykózy. Zvyšující se výskyt mukormykózy pravděpodobně souvisí s nárůstem počtu vysoce rizikových pacientů, zejména u pacientů se základní hematologickou malignitou. Nejběžnějšími rody u invazivní mukormykózy jsou *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia* a *Mucor*, které představují 90 % všech případů. Jiné druhy rodů (*Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Saksenaea*, *Cokeromyces*, *Actinomucor* a *Syncephalastrum*) jsou individuálně zodpovědné za <1 % až 5 % hlášených případů mukormykózy.

V současné době se diagnóza provádí histopatologickým vyšetřením a pozitivní kultivací druhu Mucorales. Real-time PCR se častěji používá k potvrzení diagnózy mukormykózy ve vzorcích dýchacích cest, biooptických vzorcích, vzorcích tkáně fixované formalínem a zalitých v parafínu (FFPE) v případech kultivačně negativních invazivních plísňových infekcí. Molekulární diagnostický přístup využívající soupravu MucorGenius® real-time PCR, která detekuje cirkulující DNA v séru z Mucorales u rizikových pacientů, může pomoci rychleji diagnostikovat invazivní mukormykózu a dříve zahájit cílenou terapii a případně sledovat MucorGenius® PCR lze použít paralelně s multiplexní PCR AsperGenius® Species díky stejnému protokolu PCR.

2 Použití

Multiplexní souprava MucorGenius® real-time PCR kit (PN-700) je souprava pro PCR v reálném čase určená k detekci DNA *druhů Mucorales* včetně *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Lichtheimia* spp, *Cunninghamella* spp a *Rhizomucor* spp.
Vstupním vzorkem je celková nukleová kyselina extrahovaná a purifikovaná z bronchoalveolární laváže (BAL), tracheální aspirace, sputa, pleurální tekutiny, vzorků tkáně zalité v parafínu (FFPE), biopsie a vzorků séra.
Souprava MucorGenius® pro měření v reálném čase (PN-700) je validována pro použití s soupravami NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux) a QIAamp® MinElute® Virus Spin kit (Qiagen) pro extrakci nukleových kyselin z BAL, tracheální aspirace, sputa, pleurální tekutiny a vzorků séra.

Test MucorGenius® real-time PCR pomáhá při diagnostice mukormykózy u imunokompromitovaných pacientů, pokud se používá v kombinaci s jinými klinickými a laboratorními nálezy. Negativní výsledky nemusí nutně znamenat nepřítomnost (plísňové) infekce. Negativní výsledky by neměly být používány jako jediný základ pro diagnózu, terapii

nebo jinou léčbu. 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. Výrobek je určen pouze pro laboratorní odborníky.

3 Princip testu

Real-time PCR test MucorGenius® je určen pro detekci Mucorales DNA v klinických vzorcích. Test PCR se skládá z optimalizovaných směsí cílově specifických primerů a sond připravených k použití pro detekci DNA Mucorales. Test MucorGenius® real-time PCR je založen na technologii real-time PCR, která je umožněna fluorescenčními sondami přítomnými ve směsích. Detekce se provádí během amplifikace na real-time PCR přístroji, který je schopen detekovat fluorescenci v různých detekčních kanálech.

4 Produkty a cíle

Přehled testu MucorGenius® real-time PCR a jeho odpovídajících cílů naleznete v tabulce 1. Sada Universal Colorcomp (PN-501) je k dispozici pro koncové uživatele LC480 II.

Tabulka 1: Test PCR v reálném čase MucorGenius® (PN-700)

Číslo produktu PN-700	**Cíle MucorGenius®**
	Gen 28S rRNA
	M13 fág (interní kontrola)

5 Dodané materiály

Následující materiály jsou součástí sady MucorGenius® PCR (PN-700; tabulka 2). Souprava je vhodná pro 25 reakcí.

Tabulka 2. Materiály obsažené v soupravě MucorGenius® PCR (PN-700)

Součásti	**Číslo součásti**	**Objem (µl)**	**Barva šroubovacího uzávěru**
MucorGenius® PCR mix	CNP2016A	>250	Jantarová
Taq polymeráza	CNP2010B	>25	Nachová
Ředicí pufr	CNP0012B	>950	Průhledná
Vnitřní kontrola	CNP2043A	>500	Černá
Pozitivní kontrola MucorGenius®	CNP2017A	>125	Bílá
*MucorGenius® - Návod k použití (Čeština)**			
Bezpečnostní listy (MSDS)#			
Certifikát o analýze (CoA)			

6 Požadované, ale neposkytnuté materiály

Test MucorGenius® PCR je vhodný pro přístroje real-time PCR, které mají minimálně 4 různé fluorescenční detekční kanály. Test MucorGenius® PCR je validován na LightCycleru® 480 II (LC480 II; Roche), rotorový gen® Q (RGQ; QIAGEN), CFX96™ (Bio-Rad), Quantstudio® 5 (QS5; Thermofisher scientific) a magnetický indukční cykler (mikrofon; Biomolekulární systémy) v kombinaci se systémem pro extrakci DNA NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux) a soupravou QIAamp® MinElute® Virus Spin kit (Qiagen). Ujistěte se, že přístroje byly zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce / pokynů pro kvalitu. Níže uvedené materiály jsou vyžadovány pro výkon protokolu MucorGenius®, ale nejsou poskytovány.

Činidla

- Komponenty pro extrakci DNA: extrakční činidla NucliSENS® EasyMag® nebo souprava QIAamp® MinElute® Virus Spin kit (kat. č. 57704; Qiagen)
- Voda bez zázy/sterilní voda PCR (negativní kontrola)
- dithiothreitol (DTT); (Kód termovědeckého produktu #R0861)

Spotřební zboží

- Jednorázové špičky obsahující hydrofobní filtry
- Sterilní 1,5 ml lahvičky bez DNáz (zkumavky Eppendorf)
- Vhodné 0,1 nebo 0,2 ml PCR zkumavky bez obsahu DNázy (QIAGEN®, kód produktu 981103 nebo Thermoscientific, kód produktu AB-0620) pro použití přístrojů RGQ
- Vhodné destičky s více jamkami 96 (Roche, kód produktu 04 729 692 001) pro použití přístrojů LC480 II
- Mikrofonní trubice a víčka bez DNA (BMS, ref 60653) pro použití na cykleru Mic qPCR
- Tvrdé PCR® destičky 96-jamkové, tenkostěnné (Bio-Rad, Hsp9655) pro použití na CFX96™
- MicroAmp Fast Optická 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
- Stojánek na zkumavky pro 1,5 ml lahvičky (zkumavky Eppendorf)
- Chladicí blok (1,5 ml) nebo led (pro taq polymerázu)
- Chladicí blok nebo led pro PCR reakční zkumavky a 96jamkové destičky
- Vírový mixér
- Stolní centrifuga s rotorem pro zkumavky o objemu 1,5 ml
- Odstředivka vhodná pro PCR destičky
- Kalibrované přístroje LightCycler® 480 II, Rotor-Gene® Q, CFX96™, Quantstudio® 5 nebo Mic qPCR
- 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 (MSDS), které jsou součástí příbalového letáku soupravy.

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

- Test PCR by měl provádět pouze kvalifikovaný laboratorní personál.
- Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Fyzicky oddělte pracoviště podle tabulky 3.
- Používejte **jednorázové špičky** obsahující hydrofobní **filtry** , abyste zabránili křížové kontaminaci.
- Používejte lahvičky PCR bez DNázy.
- Rozmrazujte **vzorky DNA** vždy na ledu a uchovávejte je na **ledu** nebo na **chladicím bloku**.
- Po vyjmutí z mrazničky mějte **enzymy** vždy na **ledu** nebo na **chladicím bloku**. S enzymy zacházejte opatrně a velmi jemně je promíchejte.
- Po rozmrazení **se činidla odstřeďují po** dobu 5 sekund v odstředivce a míchají se jemným pipetáním nahoru a dolů.
- Cyklický program by měl být naprogramován v přístroji PCR v reálném čase před provedením testu.
- Před přenosem do real-time cykleru krátce roztočte směsi PCR na PCR destičce (není nutné pro RGQ).
- Po amplifikaci PCR neotevírejte lahvičky/destičky PCR.

8 Skladování a manipulace s reagenciemi

Součásti souprav MucorGenius® by měly být skladovány v temnu při teplotě -15 °C až -30 °C a jsou stabilní až do doby použitelnosti uvedené na štítku. Je třeba se vyvarovat opakovaného rozmrazování a zmrazování (10x). Aby se zabránilo křížové kontaminaci, doporučujeme provádět experimentální činnosti ve třech samostatných oblastech a ovládací prvky skladovat v oddělené místnosti/místě (tabulka 3).

Tabulka 3. Manipulace s postupy v různých oblastech

Umístění	**Manipulace**
Pokoj 1	Skladní PCR mix, Taq polymeráza, ředicí pufr Příprava real-time PCR mixu
Pokoj 2*	Integrovaný obvod úložiště a PC Extrakce DNA ze vzorků Přidání extraktů DNA do mixu real-time PCR Přidání PC do mixu real-time PCR
Pokoj 3	PCR reakce v reálném čase

*Doporučuje se provádět všechny činnosti v bezpečnostní skříni s laminárním prouděním vzduchu II, aby se minimalizovala možnost křížové kontaminace.

9 Skladování a manipulace se vzorky

Detekce Mucorales spp je závislá na odběru vysoce kvalitních exemplářů, jejich rychlém transportu do laboratoře a vhodném skladování před laboratorním testováním. K detekci Mucorales DNA lze použít bronchoalveolární laváž (BAL), tracheální aspirace, sputum, pleurální tekutinu, vzorky tkáně zalité v parafínu (FFPE), biopsii a vzorky séra.
Vzorky by měly být do laboratoře přepraveny co nejdříve a měly by být přednostně zpracovány přímo nebo skladovány při -20 °C nebo -70 °C při dalším zpracování. Je třeba se vyhnout několika cyklům zmrazení a rozmrazení.

10 Extrakce a příprava nukleových kyselin

Doporučuje se provádět extrakci a přípravu nukleových kyselin včetně lýzy v bezpečnostní skříni s laminárním prouděním II. Extrakční postup může pokračovat na pracovním stole, jakmile je vzorek lyzován. Po použití se doporučuje dekontaminovat laminární skříň proudění vzduchu vhodným dekontaminačním roztokem a spuštěním UV světla po dobu 30 minut.

10.1 BAL/respirační vzorky

Důrazně se doporučuje použít 1 ml BAL (nebo jiný respirační vzorek) pro extrakci DNA a eluční objem 50 µl. Pro respirační vzorky 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®.

I. Vzorek dýchacích cest se promíchá a přidá se 100 µl 1 M DTT k 1 ml (konečná koncentrace 0,09 M DTT), je-li vzorek viskózní, upraví se podle množství materiálu
   - ❖ Inkubace vzorků po dobu 15 minut při 37 °C

II. Připravte si EasyMag® podle pokynů výrobce
   - ❖ Zvolte 1 ml jako vstupní objem a 50 µl jako elučního objem
   - ❖ Vyberte obecný protokol
   - ❖ Vyberte palubní lyzační protokol
   - ❖ Rozmrazte vnitřní kontrolu

III. Přeneste 1 ml vzorku do zásobníku EasyMag®

IV. Jemně protřepejte vnitřní kontrolu a přidejte 5 µl do vzorku v zásobníku EasyMag®

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

VI. Po lýze se připravené magnetické křemičité kuličky přidají do lyzačního pufru se vzorkem a resuspendují
   - ❖ Spusťte extrakci DNA na přístroji EasyMag®
   - ❖ Po 34-40 minutách přeneste eluovanou DNA do zkumavek bez DNAse-free

10.2 Sérum

Vzhledem k nízké plísňové zátěži se doporučuje použít 1 ml séra pro extrakci DNA a eluční objem 50 µl. 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®. Postupujte podle kroků II až VI popsaných v oddíle 10.1.

10.3 Další typy vzorků

Pro extrakci DNA z FFPE materiálu nebo biopsie kontaktujte společnost PathoNostics nebo místního distributora pro speciální protokoly.

10.4 Další platformy pro extrakci DNA

Ačkoli jiné platformy pro extrakci DNA **nejsou validovány**, byly provedeny studie hodnocení výkonu. Je důležité si uvědomit, že účinnost extrakce se u různých platforem pro extrakci DNA liší a výtěžek DNA se může lišit. Kontaktujte PathoNostics pro zkušenosti s konkrétní platformou pro extrakci DNA.

10.5 Kontroly

Vnitřní kontrola (IC)
IC v soupravě je dodáván jako roztok bakteriofága M13 a přidává se k rozlišení mezi skutečně negativními vzorky a falešně negativními vzorky, které mohou být výsledkem degradace nukleových kyselin, inhibice PCR nebo selhání testu.
Objem IC, který má být napnut do lyzovaného vzorku BAL, je 5 µl. Když se změní eluční objem (50 µl), musí se odpovídajícím způsobem změnit množství IC s hroty. Množství IC s hroty je nezávislé na počátečním objemu vzorku.

Pozitivní kontrola (PC)
PC v soupravě MucorGenius® PCR se skládá ze syntetického fragmentu DNA a pokrývá cílovou oblast, která je detekována v testu. S počítačem se zachází jako s normálním extraktem nukleové kyseliny a kontroluje správný postup PCR. Na postup extrakce nukleových kyselin není nutné aplikovat PC.

11 Nastavení přístroje real-time PCR

Real-time PCR kit MucorGenius® je validován na přístrojích real-time LC480 II, RGQ, CFX96, QS5 a Mic qPCR cycleru s využitím čtyř různých detekčních kanálů.
Pro všechny zmíněné přístroje pracující v reálném čase je k dispozici soubor se šablonou protokolu PCR a specifická instalační příručka. O to lze požádat u PathoNostics nebo u vašeho místního distributora.

Nastavení filtru

Nastavení filtrů všech real-time PCR přístrojů je uvedeno v tabulce 4. Tato nastavení musí být použita k úspěšnému spuštění testu MucorGenius® PCR v reálném čase. Programování přístrojů by mělo být prováděno podle uživatelské příručky.

Poznámka: V rámci stejného experimentu lze použít multiplexní PCR testy MucorGenius® i AsperGenius® Species v reálném čase pomocí detekce ve čtyřech různých kanálech. Poraďte se s návodem k použití AsperGenius® Species a aktivujte všechny čtyři detekční kanály.

Tabulka 4. Nastavení filtrů pro optimální detekci sond MucorGenius®. *Tyto kanály jsou vyžadovány při spuštění MucorGenius® bez AsperGenius®*

MucorGenius®	Rotor-Gene (nm)		LC480 II (nm)		CFX96	QS5	Mic qPCR
	Zdroj	Detektor	Zdroj	Detektor			
Mucorales spp.	530	555	533	580	ŠESTNÁCTKOVÝ	520-558 550-586	Žlutý
MEZIPODNIKOVÉ	625	660	618	660	CY5	640-682	Červený

Program cyklování PCR v reálném čase: obecné informace

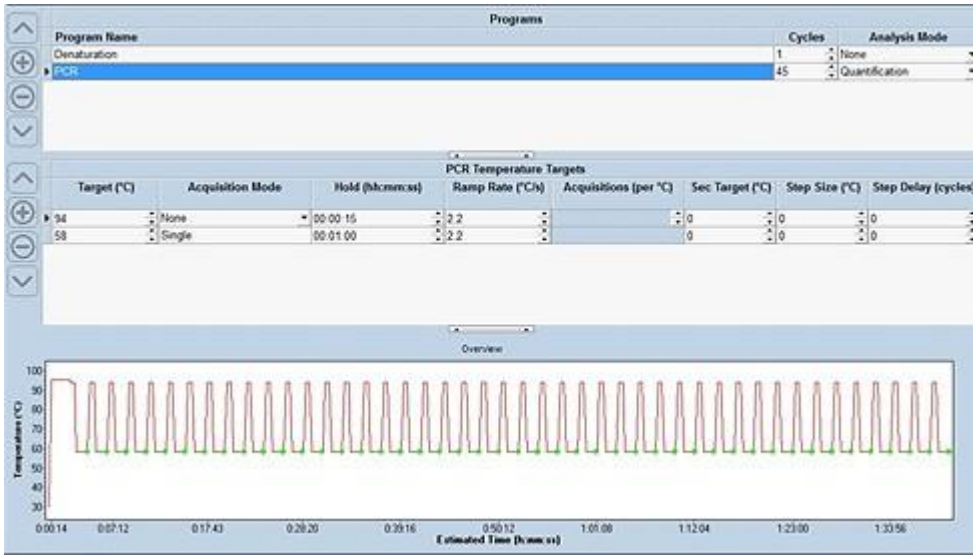
Cyklistický program je uveden v tabulce 5. Příklad programování LC480 II je znázorněn na obrázku 1.

Zesilovací program trvá přibližně 100 minut a je totožný se zesilovacím programem multiplexu AsperGenius® Species (PN-001), s výjimkou detekčního formátu.

Tabulka 5. Program cyklování PCR v reálném čase

Čas	Teplota	Funkce	
2 minuty	95 °C	Aktivace Taq / počáteční denaturace	
15 sekund	94 °C	Denaturace	Jednotka PCR
60 sekund	58 °C#	Žíhání a roztahování	45 cyklů

#activate fluorescenční detekci podle tabulky 4.



Obrázek 1. Obrazovka pro zesílení v LC480II software. Vyberte kvantifikaci v režimu analýzy a jednu v režimu snímání pro detekci během cyklování.

12 Procedura

Doporučení

- Rozmrazte DNA templátu (pokud je zmrazená) a všechny činidla, a udržujte na ledu.
- Polymerázu MucorGenius® Taq uchovávejte vždy na chladicím bloku nebo na ledu
- Připravte směs na o něco větší množství, než jsou požadované reakce, abyste kompenzovali ztráty pipetováním (např. 1 dodatečná reakce na 9 vzorků).

12.1 Místnost 1: příprava real-time PCR mixu

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

- Připravte si směs PCR v reálném čase podle tabulky 6.
- Jemně, ale důkladně promíchejte směs real-time PCR a nadávkujte 20 µl směsi do lahvičky PCR nebo jamky z destičky. Během přípravy uchovávejte lahvičky nebo destičky PCR na ledu nebo na chladicím bloku.

Tabulka 6. Real-time PCR mix pro MucorGenius®

Komponenta	Objem/reakce (µl)	Objem pro 9 vzorků + 1 (µl)
MucorGenius® PCR mix	10	100
Taq polymeráza	1	10
Ředicí pufr	9	90
Celkový 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 (obsahujícího IC) do dávkované směsi PCR v reálném čase
- Pro reakce NTC: přidejte 5 µl ředicí pufr do směsi real-time PCR
- PC reakce: přidejte 5 µl pozitivní kontroly MucorGenius® do směsi PCR v reálném čase
- 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

- Umístěte lahvičky PCR nebo destičku PCR v reálném čase do přístroje PCR v reálném čase
- Vyberte program pro cyklování v reálném čase a spusťte běh (program cyklování PCR v reálném čase je uveden v tabulce 5).

13 Analýza dat

13.1 Metody prahových hodnot cyklu (C_t)

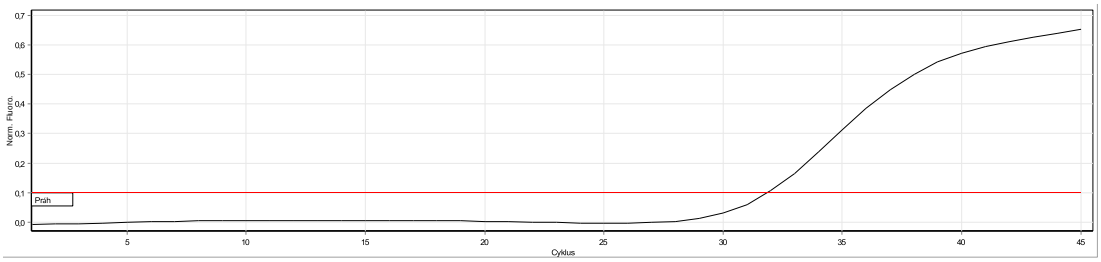
Výsledky testu MucorGenius® real-time PCR jsou hlášeny jako hodnoty C_t (prahová hodnota cyklu) v závislosti na konkrétním použitém nástroji PCR v reálném čase a metodě výpočtu CT. Před stanovením hodnoty C_t by měla být použita prahová hodnota, aby se vyloučil šum na pozadí a zabránilo se falešně pozitivním signálům.

Prahové hodnoty: RGQ

Před stanovením$_{\text{hodnoty C t}}$ pomocí softwaru Rotor-Gene zkontrolujte, zda je základní linie správně umístěna, a v případě potřeby ji upravte pomocí funkce správného sklonu. Hodnota C_t je určena pomocí funkce threshold. Doporučené prahové hodnoty pro amplifikační křivky jsou uvedeny v tabulce 7. Prahová umístění jsou založena na maximální intenzitě fluorescence, ale mohou se lišit mezi vzorky a různými nástroji Rotor-Gene Q. Příklad amplifikační křivky získané pomocí Rotor-Gene Q je znázorněn na obrázku 2.

Tabulka 7. Prahové hodnoty Rotor-Gene Q amplifikační křivky

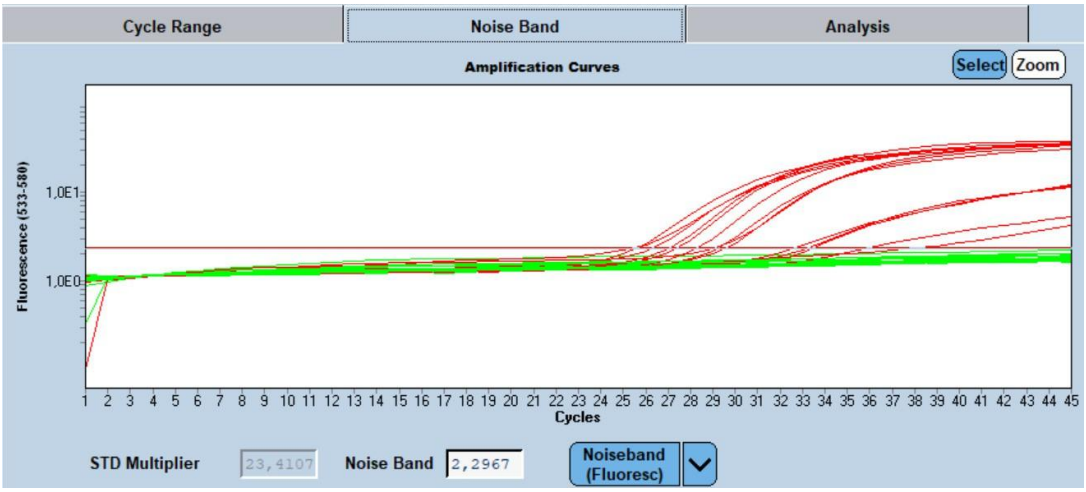
Max FI (norm. fluorescence)	Umístění prahové hodnoty
< 0.2	0.025
0.2-0.6	0.05
0.6-1.0	0.1
>1.0	0.15



Obrázek 2. Amplifikační křivka. Příklad amplifikační křivky na RGQ, získané pomocí sondy Mucorales pro *Rhizopus oryzae* ve žlutém detekčním kanálu.

Prahové hodnoty: LC480 II

Pro stanovení t-hodnot C pomocí softwaru LC480 II doporučujeme použít metodu Fit points. Tato metoda je spolehlivější ve srovnání s metodou 2nd derivace pro stanovení hodnoty CT pro vzorky s nízkým množstvím Mucorales DNA. To vyžaduje ruční umístění prahu v části šumového pásma. Ujistěte se, že práh je umístěn o něco výše než signály na pozadí. Příklad je znázorněn na obrázku 3. Kromě toho vždy zkontrolujte, zda je přítomna sigmoidální amplifikační křivka, a porovnejte ji s pozitivní kontrolou, abyste potvrdili její skutečnou pozitivitu.



Obrázek 3. Umístění prahu v části šumového pásma analýzy bodů vyhlazení. V důsledku umístění prahu jsou červené křivky softwarem označeny jako kladné a zobrazí hodnotu Ct, zelené křivky jsou softwarem označeny jako záporné.

Prahové hodnoty: CFX96

Pro stanovení t-hodnot C pomocí softwaru CFX96 doporučujeme použít režim stanovení Cq a zvolit regresi. Tato funkce automaticky určuje hodnotu C_t-. Možnost jeden práh může být vybrána pro výběr ručního prahu, ale nedoporučuje se, protože není standardizována.

Prahové hodnoty: QS5

C-hodnoty$_t$ jsou automaticky určeny pomocí softwaru Quantstudio pro návrh a analýzu pomocí automatické prahové funkce. Doporučuje se použít šablonu pro běh PCR připravenou společností PathoNostics.

Prahové hodnoty: Mikrofon

Pro automatické určení hodnot Ct na Mic qPCR lze zvolit funkci automatického nastavení prahu. Doporučujeme použít šablonu PCR run připravenou společností PathoNostics.

14 Interpretace výsledků

Interpretace dat MucorGenius® PCR je uvedena v tabulce 8. Pokud při použití PCR MucorGenius® v reálném čase není pozorován žádný fluorescenční signál v žádném detekčním kanálu, dojde k degradaci DNA, vzorek je inhibován nebo dojde k ruční chybě.

Tabulka 8. Interpretace signálů pomocí MucorGenius®

Zesilovací signály MucorGenius®			
LC480	**533-580**	**618-660**	**Výsledek**
RGQ	**žlutý**	**Červený**	
CFX	**HEX**	**Cy5**	
MIC	**žlutý**	**Červený**	
QS5	**VIC**	**Cy5**	
-	+	+	*Mucorales* spp
-	-	+	Žádné *Mucorales* spp
-	+	-	IC poražen vysokými *Mucorales* spp. zatížení; výsledek je stále platný
-	-	-	Neplatný

Mezní hodnota Ct

Nelze doporučit žádnou pevnou mezní hodnotu Ct z důvodu omezeného počtu pozitivních vzorků zahrnutých do klinických studií v důsledku vzácnosti onemocnění (žádné statistické zdůvodnění). Obecně platí, že <C_t 40 by měly být vždy považovány za pozitivní výsledek, zatímco >C_t 40 jsou považovány za negativní výsledek.

Řízení

Aby bylo možné zkontrolovat správný postup extrakce DNA (IC) a PCR (IC a PC), musí být hodnoty C_t pro všechny kontroly zahrnuté do MucorGenius® PCR v přijatelném rozmezí (tabulka 9). Hodnota C_t pro IC je silně závislá na matrici vzorku a postupu extrakce DNA. Pozitivní signál pro IC však musí být detekován v *negativních vzorcích Mucorales* spp.

Tabulka 9 Rozsahy hodnot C_t pro kontroly. *Ct-hodnoty byly určeny pomocí popsaného nastavení prahových hodnot pro všechny real-time cyklery.*

Řízení	Cíl	Kanál	Ct-hodnoty
MucorGenius® PC	*Mucorales* spp.	Žlutá/533-580/HEX/VIC	25.0-29.0
IC*	Třída M13	Červená/618-660/Cy5	30.0-36.0

* Silně pozitivní vzorek *Mucorales* spp. by mohl konkurovat IC a vést k vyšším hodnotám C_t než je uvedeno.

15 Řešení problémů

Tato část týkající se odstraňování problémů může být užitečná při řešení jakýchkoli problémů, které mohou nastat (tabulka 10).

Tabulka 10. Řešení problémů

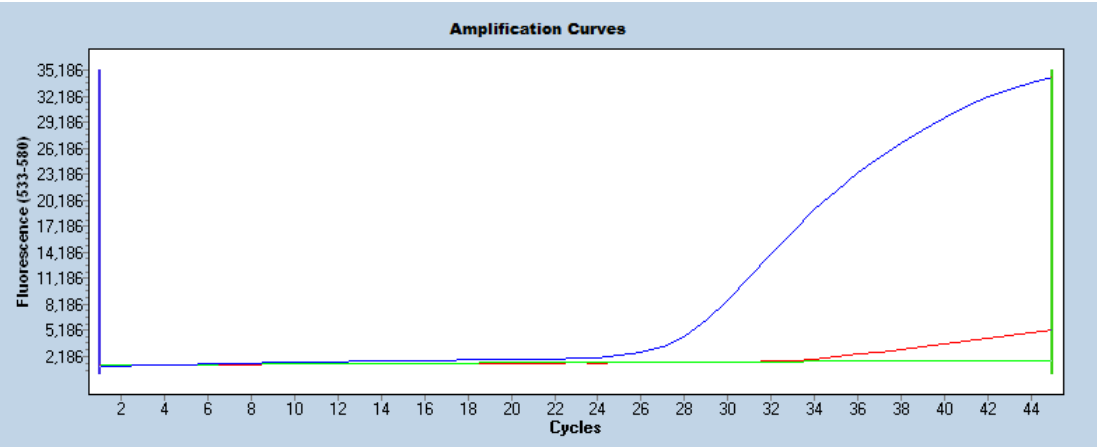
Problém	Možná příčina	Doporučení
Pozitivní kontroly zůstávají negativní	Jedna ze složek nebyla přidána	Ujistěte se, že byly přidány všechny komponenty
	Ovládací prvek nebyl správně uložen	Zkontrolujte podmínky skladování a datum spotřeby sady (uvedeno na štítku krabice)
	Pozitivní kontrola byla přidána 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 u *Mucorales* spp - negativních vzorků	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 PCR, Taq polymerázy 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	V případě, že se eluce provádí v 50 µl, zkontroluje se, zda je do výchozího materiálu přidáno 5 µl IC.
	Používá se postup extrakce DNA, který se nedoporučuje a vede k méně efektivní výtěžnosti extrakce IC	Kontaktujte PathoNostics pro zkušenosti s konkrétní platformou pro extrakci DNA. Lze doporučit opakovat extrakci s 10 µl IC materiálem, v závislosti na postupu extrakce.
Negativní kontrola generuje fluorescenční signál	Přenos / kontaminace	Opakujte celý experiment s čerstvými činidly, zacházejte se vzorky, součástmi soupravy a spotřebním materiálem podle předpisu a odstřeďujte

		Reagencie před pipetováním
		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 také pro ovládací prvky	Nesprávné nastavení přístroje Nesprávná směs PCR v reálném čase	Zkontrolujte nastavení kanálu Zkontrolujte, zda je PCR směs připravena podle protokolu Zkontrolujte datum spotřeby a podmínky skladování

Problémy s analýzou dat, které mohou nastat

Omezené sigmoidální křivky

Vzorky s nízkým množstvím Mucorales DNA (např. blízko detekčního limitu) mohou mít za následek méně sigmoidální amplifikační křivky (obrázek 4). To je výsledkem snížené účinnosti zesílení. Vždy porovnejte tyto signály s pozitivními a negativními řídicími signály. Pokud křivka vykazuje nárůst ve srovnání s pozadím, musí být vzorek považován za pozitivní. K přesné identifikaci signálu použijte popsané prahové hodnoty pro konkrétní cyklery PCR v reálném čase. Obvykle jsou tyto signály pozorovány při Ct 33 nebo vyšší.



Obrázek 4. Omezené sigmoidální signály pro vzorky s nízkým množstvím DNA Mucorales. Použijte správné nastavení prahu a vždy porovnejte signál Mucorales vzorku (červený) s pozitivní kontrolou (modrý) a negativní kontrolou (zelený).

16 Upozornění pro kupujícího

Produkt MucorGenius® vyrábí společnost PathoNostics BV v Maastrichtu v Nizozemsku 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 se souhlasem společnosti PathoNostics a pouze licencovanými distributory.
Reagencie z různých šarží MucorGenius® by neměly být kombinovány.
Pokud je sada MucorGenius® přijata v poškozeném obalu, kontaktujte prosím PathoNostics nebo místního distributora PathoNostics.
Další jazykové verze tohoto návodu k použití si můžete vyžádat od společnosti PathoNostics nebo místního distributora PathoNostics.

Prohlášení o 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 přijmout odpovědnost za žádná klinická rozhodnutí, která jsou učiněna. Společnost PathoNostics BV nepředstavuje tuto příručku jako komplexní souhrn všech možných výsledků používání souprav MucorGenius® pro 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.

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího upozornění.

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.

PRODUKT MUCORGENIUS® JE DODÁVÁN PRO PROFESIONÁLNÍ DIAGNOSTICKÉ TESTOVÁNÍ IN VITRO. TENTO PRODUKT NEPOSKYTUJE LICENCI K PROVÁDĚNÍ PCR NA ZÁKLADĚ PATENTŮ VLASTNĚNÝCH JAKOUKOLI TŘETÍ STRANOU, VČETNĚ SPOLEČNOSTÍ 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 testu a dodržování regulačních požadavků, které se vztahují k jeho postupům a použití soupravy MucorGenius® pro PCR v reálném čase.

17 Výkonové charakteristiky

17.1 Mez detekce (LoD)

LoD neboli analytická citlivost byla stanovena pro několik druhů Mucorales pomocí ředicí série genomové DNA. Finální LoD byla potvrzena testováním 20 replikátů s mírou pozitivity ≥ 95 %. Replikáty byly zvýšeny pomocí interní kontroly. Kvantifikace cílů byla provedena pomocí vlastní kapkové digitální PCR. Přehled hodnot LoD pro všechny cíle je uveden v tabulce 11.

Tabulka 11. LoD hodnoty MucorGenius®

Cíl	Kmen	Testováno conc	LC480	RGQ	CFX96	Mic	QS5
		(c/µl)	Hodnota ct				
R. oryzae	IHEM06016	2	32-35	33-35	31-32	32-33	34-40
R. microsporus	IHEM22234	2	33-34	34-43	32-33	34-36	31-38
R. miehei	IHEM26897	1	33-34	34-39	33-35	33-37	34-40
R. pusillus	IHEM21236	2	33-34	34-37	32-33	33-34	31-36
C. berthollatiae	Domácí*	1	32-33	32-38	34-40	32-35	31-38
L. corymbifera	Domácí*	1	32-33	33-37	33-41	32-35	28-38
M. hiemalis	IHEM27256	2	32-33	32-37	31-32	32-33	33-40

*Potvrzeno sekvenováním 18S

17.2 Analytická specifičnost

Analytická specificita Real-time PCR MucorGenius® byla stanovena testováním DNA různých relevantních respiračních patogenů včetně různých kmenů plísní a bakterií. Všechny testované vzorky DNA jsou uvedeny v tabulce 12. Kromě toho byly primery a sondy zkontrolovány z hlediska možných homologií ke všem sekvencím publikovaným v GenBank (NCBI) pomocí analýzy porovnání sekvencí, aby byla zajištěna specifičnost testu MucorGenius®.

Tabulka 12. Testování specifičnosti relevantních kmenů. + = pozitivní, - = negativní

Patogen	*Reference*	*Mucorales spp*
R. oryzae	IHEM 06016	+
C. bertholletiae	Vlastní*	+
L. corymbifera	Vlastní*	+
M. hiemalis	IHEM 27256	+
R. pusillus	IHEM 21236	+
R. miehei	IHEM 26897	+
R. microsporus	IHEM 22234	+
S. prolificans	IHEM 21157	-
P. marneffei	ATCC 18224D	-
P. chrysogenum	IHEM 18723	-

F. solani	IHEM 25864	-
P. jirovecii	Vlastní*	-
S. cerevisae	IHEM 25104	-
C. neoformans	IHEM 04165 řekl:	-
A. fumigatus	ATCC MYA4609	-
A. flavus	Vlastní*	-
A. terreus	Vlastní*	-
A. niger	Vlastní*	-
C. albicans	Vlastní*	-
C. parapsilosis	Vlastní*	-
C. krusei	Vlastní*	-
C. glabrata	Vlastní*	-
M. tuberculosis	BCCM000092	-
M. pneumoniae	ATCC 29085	-
L. pneumophila	ATCC 33152	-
K. pneumoniae	Vlastní*	-
S. pneumoniae	ATCC 700669D-5	-
M. catarrhalis	Vlastní*	-
H. influenzae	ATCC 51907D	-
B. pertussis	ATCC BAA-589	-
E. coli	ATCC 700973	-
P. auruginosa	Vlastní*	-
S. aureus	ATCC BAA-1556D-5	-
Lidská genomová DNA	Promega	-

*Potvrzeno sekvenováním

17.3 Robustnost a rušivé látky

Ověření robustnosti umožňuje určit celkovou poruchovost MucorGenius® PCR monitorováním přítomnosti interní kontroly. Robustnost byla ověřena testováním 20 vzorků BAL negativních na druhy Mucorales. Za tímto účelem byly použity dvě různé metody extrakce DNA: NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux) a QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen; nr 57704). U obou metod byl použit eluční objem 200 µl BAL a 50 µl a všechny vzorky byly analyzovány pomocí PCR MucorGenius®. IC byl detekován ve všech vzorcích při očekávaných hodnotách Ct (Ct 30-32). Výsledkem je, že robustnost testu MucorGenius® PCR je 100 %.
MucorGenius® PCR byla testována na interferenci vysokou zátěží lidské DNA (100 ng/µl). Detekce Mucorales byla srovnatelná se vzorky Mucorales bez přítomnosti lidské DNA, a proto detekce testu MucorGenius® PCR nebyla ohrožena vysokým zatížením lidskou DNA

17.4 Reprodukovatelnost a přesnost

Aby bylo možné určit reprodukovatelnost nebo přesnost, byly testovány tři různé šarže MucorGenius® na několika cílech a na dvou různých přístrojích PCR v reálném čase (LC480 II a RGQ). Ten

Byl vypočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka (STDEV) a variační koeficient (CV). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13 (LC480 II) a 14 (RGQ).

Tabulka 13. Reprodukovatelnost MucorGenius® na LC480.

Číslo vzorku	LC480 II					
	Položka 1	Položka 2	Položka 3	Znamenat	Příkaz STDEV	CV (%)
R. oryzae	32.1	32.2	32.1	32.1	0.07	0.22
C. bertholletiae	30.5	30.7	30.5	30.6	0.13	0.42
R. pusillus	32.0	32.0	32.3	32.1	0.17	0.53
Pozitivní kontrola	27.2	27.2	27.3	27.2	0.06	0.22
Vnitřní kontrola	32.3	32.7	32.7	32.6	0.23	0.71

Tabulka 14. Reprodukovatelnost MucorGenius® na RGQ.

Číslo vzorku	RGQ					
	Položka 1	Položka 2	Položka 3	Znamenat	Příkaz STDEV	CV (%)
R. oryzae	34.1	34	35.3	34.5	0.73	2.12
C. bertholletiae	30.3	29	29.4	29.6	0.67	2.26
R. pusillus	33.2	32.6	32.1	32.6	0.52	1.60
Pozitivní kontrola	25.7	25.3	25.8	25.6	0.23	0.90
Vnitřní kontrola	29.7	29.8	29.7	29.7	0.17	0.57

17.5 Rozhraní FPCRI

Výkon soupravy MucorGenius® pro PCR v reálném čase byl stanoven pomocí programu externího hodnocení kvality (EQA) z Evropské iniciativy pro houbovou PCR (FPCRI). Panel séra obsahoval 7 vzorků a DNA byla extrahována pomocí NucliSENS® EasyMag® (bioMérieux) a následně eluce v 50 µl. Výsledky se soupravou MucorGenius® PCR jsou uvedeny v tabulce 15 (100% skóre) a byly získány detekcí na LC480 II. Individuální protokol o testu si můžete vyžádat u společnosti PathoNostics nebo u místního distributora.

Tabulka 15. Výsledky MucorGenius® na panelu séra FPCR.

Číslo vzorku	Naočkovaná DNA (ekvivalentní genomy/ml)	Výsledky		
		Mucorales detekce	Rod/druh identifikace	Ct
S1	Ne	Negativní	Negativní	
S2	*R. pusillus* (10)	Pozitivní	Mucorales	35.7
S3	*L. corymbifera* (100)	Pozitivní	Mucorales	30.6
S4	*L. corymbifera* (1)	Pozitivní	Mucorales	35
S5	*R. pusillus* (100)	Pozitivní	Mucorales	32.5
S6	*L. corymbifera* (10)	Pozitivní	Mucorales	33.5
S7	*R. pusillus* (1)	Pozitivní	Mucorales	36.2

18 Symboly

	Obsahuje činidla dostatečná pro <N> reakcí
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Teplotní omezení
	Výrobce
	Prostudujte si návod k použití Pozor
	Upozornění
	Chraňte před světlem

19 Kontakt

Pokud potřebujete technickou pomoc a další informace, kontaktujte nás zasláním e-mailu na info@pathonostics.com nebo telefonicky na čísle +31-43-3030423. Technickou pomoc naleznete na katalogovém čísle PN-700.

Výrobce:
PathoNostics B.V.
Randwycksingel 45
6229 EG Maastricht
Nizozemsko

Telefon: +31 (0)43 3030423
Telefax: +31(0)84 7469245
E-mail: info@pathonostics.com
Web: www.pathonostics.eu

20 Informace o objednávce

Pro zadání objednávky kontaktujte oddělení zákaznických služeb na adrese info@pathonostics.com nebo vyplňte on-line objednávkový formulář na adrese www.pathonostics.eu/contact.

Ochranné známky: QIAGEN®, LightCycler® 480, Roche®, bioMérieux®, NucliSENS® EasyMAG®, MagNAPure®, Bio-rad®, Bio Molecular Sytems®, Thermo Fisher Scientific®, PathoNostics®, MucorGenius®.