

Anyplex™ II

MTB/MDR Detection

(kat. č. TB7301Y)

Systém Anyplex™ II PCR pro současnou detekci *Mycobacterium tuberculosis* a její rezistence k protituberkulózním lékům první linie (isoniazid a rifampicin) na základě analýzy teploty tání

Pro použití s

1. CFX96™ Detekční systém Real-Time PCR (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)
2. Systém CFX96™ Dx (software CFX Manager™ Dx v3.1)



Pouze pro diagnostiku in vitro



Seegene Inc,

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Germany

Není k dispozici v USA

OBSAH

UPOZORNĚNÍ	3
ÚČEL POUŽITÍ	5
PŘEHLED PRINCIPU A POSTUPU	5
ZÁKLADNÍ INFORMACE	8
REAGENCIE	11
SKLADOVÁNÍ A MANIPULACE	12
POŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ BALENÍ	12
PROTOKOL	13
NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO REAL-TIME PCR A ANALÝZA VÝSLEDKŮ ----	18
VÝSLEDKY	38
ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	44
ÚČINNOST	46
LITERATURA	53
VÝZNAM SYMBOLŮ	54
INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ	55

UPOZORNĚNÍ

- Pouze pro diagnostické použití in vitro.
- Spolehlivost výsledků závisí na vhodném postupu odběru, skladování, přepravy a zpracování vzorků.
- **Tento test byl validován pro následující typy vzorků: sputum, kultivace, čerstvá tkáň a bronchiální výplach.** Tento test nebyl validován pro žádné jiné typy vzorků.
- **Vzorky DNA skladujte při teplotě -70 °C až do použití a během použití je uchovávejte na ledu.**
- Citlivost testu se může snížit, pokud jsou vzorky opakovaně zmrazovány/rozmrazovány nebo skladovány po delší dobu.
- **Pro PCR reakce tohoto produktu je nutné použít výhradně tyto zkumavky: [EU 0,1 ml, Thin-wall 8-tube strip (kat. č. B77009) a EU 8-Single attachable optical wide indented cap-strip (kat. č. B79501); BIOplastics].**
- **Kontrolní reakce typu Wild musí být provedena v každém testovacím cyklu.**
- Pracovní postup v laboratoři by měl probíhat jednosměrně.
- Používejte jednorázové rukavice a před vstupem do různých prostor si je vyměňte. V případě kontaminace rukavice okamžitě vyměňte nebo je ošetřete dekontaminační reagentií DNA.
- Zásoby a vybavení musí být vyhrazeny pro pracovní oblasti a neměly by se přemisťovat z jedné oblasti do druhé.
- V laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagentiemi používejte jednorázové nepudrované rukavice, laboratorní pláště a ochranné brýle. Po manipulaci se vzorky a testovacími reagentiemi si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte ústy.
- Při odebrání alikvotů ze zkumavek s reagentiemi zabraňte jejich kontaminaci. Doporučuje se používat sterilní jednorázové pipetovací špičky odolné proti aerosolu.
- Nekombinujte reagentie z různých šarží nebo z různých zkumavek stejné šarže.
- Nepoužívejte výrobek po uplynutí doby použitelnosti.
- Všechny jednorázové předměty jsou určeny k jednorázovému použití. Nepoužívejte je opakovaně.
- Používejte zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zabraňte případnému rozstříku nebo křížové kontaminaci vzorků během přípravy.
- Dávejte pozor, abyste se nedotkli vnitřku uzávěru zkumavky nebo stripu.
- Dávejte pozor, abyste nekontaminovali reagentie s extrahovanými nukleovými kyselinami, produkty PCR a pozitivní kontrolou. Aby se zabránilo kontaminaci reagentií, doporučuje se používat filtrační špičky.

- Pro každý experiment používejte oddělené pracovní prostory.
- Připravte si a použijte jinou sadu pipet pro každou z následujících oblastí: extrakce nukleových kyselin, míchání reagentů, přidávání vzorku nukleové kyseliny a manipulace s produkty PCR.
- Zkumavky nebo stripy s PCR reakcí otevírejte po amplifikaci pouze na určených místech, aby nedošlo ke kontaminaci prostoru s amplikony.
- Pozitivní materiály skladujte odděleně od reagentů soupravy.
- Při manipulaci se vzorky je třeba dodržovat laboratorní bezpečnostní postupy (viz Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories & CLSI Documents). Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní plochy 0,5% chlornanem sodným (v deionizované nebo destilované vodě). Součástí produktu (zbytky produktu, obaly) lze považovat za laboratorní odpad. Nepoužité reagenty a odpad likvidujte v souladu s platnými předpisy o nakládání s odpady.
- Doba použitelnosti je 12 měsíců při teplotě $\leq -20\text{ °C}$ od data výroby. Informace naleznete na štítku konečné datum ukončení platnosti.
- Obchodní název "CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD" se mění na "CFX96™ Dx System". Vzhledem k tomu, že u systémů nedošlo k žádným hardwarovým změnám, očekává se, že výsledky z obou systémů budou stejné.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" je aktualizovaná verze "CFX Manager™ Software- IVD v1.6". Aktualizovaný software obsahuje vylepšení nabídky "Run" (Spustit). Tato vylepšení nemají vliv na výsledky analýzy dat; výsledky tedy budou stejné.
- Tato souprava je určena k diferenciální diagnostice infekcí vyvolaných cílovým patogenem; *Mycobacterium tuberculosis* a jeho rezistence na antituberkulotika první linie (isoniazid a rifampicin).

ÚČEL POUŽITÍ

Anyplex™ II MTB/MDR Detection je kvalitativní *in vitro* diagnostický test pro současnou detekci *Mycobacterium tuberculosis* a jeho rezistence k protituberkulózním lékům první linie (isoniazid a rifampicin) ze sputa, kultivace, čerstvé tkáně nebo bronchiálního výplachu symptomatických pacientů. Zahrnuje 7 mutací způsobujících rezistenci k isoniazidu v genu *katG* a promotorové oblasti *inhA* a 18 mutací způsobujících rezistenci k rifampicinu v genu *rpoB*.

PŘEHLED

PRINCIPU A POSTUPU

1. Princip

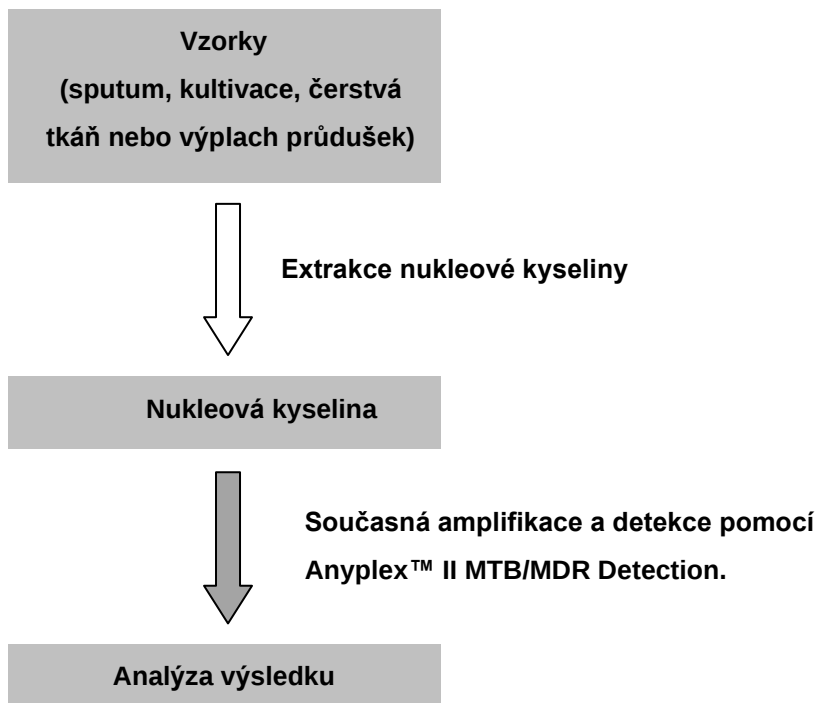
Společnost Seegene vlastní dvě vynikající technologie týkající se PCR: **technologii duálních primingových oligonukleotidů (DPO™)** a **technologii TOCE™**. DPO™ je základním nástrojem pro blokování prodloužení nespecificky primedovaných templátů, což umožňuje navrhovat a vyvíjet testy s mimořádně vysokou specifičností. Síla a užitečnost technologie DPO™ může být úspěšně začleněna do různých molekulárně diagnostických systémů, jako jsou multiplexované molekulární testy a testy pro detekci bodových mutací. TOCE™ je nová technologie pro Real-Time odečítání založená na analýze teploty tání. Až dosud byla analýza teploty tání omezena několika přirozenými omezeními – konkrétně omezeným designem sondy, nemožností rozsáhlého a účinného multiplexování a vysokou citlivostí teploty tání v důsledku sekvenční variability v místě sondy. Technologie TOCE™ tato omezení překonává tím, že poskytuje rozšířené možnosti multiplexování, zlepšuje flexibilitu designu sondy, poskytuje odečet nezávislý na variabilitě cílové sekvence a kompatibilitu napříč platformami. Kombinace technologií DPO™ a TOCE™ umožňuje současnou Real-Time detekci vícečetných bodových mutací s vysokou specifičností.

Anyplex™ II MTB/MDR Detection je multiplexní real-time PCR test, který umožňuje současnou amplifikaci a detekci cílových sekvencí *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), 7 mutací způsobujících rezistenci k isoniazidu (INH) [*katG* S315I(ATC), S315N(AAC), S315T(ACC), S315T(ACA), promotor *inhA* -15(T), -8(A), -8(C)], 18 rifampicinu (RIF), mutací způsobujících rezistenci [*rpoB* L511P(CCG), Q513K(AAA), Q513L(CTA), Q513P(CCA), delece 3 aminokyselin v 513–516, D516V(GTC), D516Y(TAC), S522L(TTG), S522Q(CAG), H526C(TGC), H526D(GAC), H526L(CTC), H526N(AAC), H526R(CGC), H526Y(TAC), S531L(TTG), S531W(TGG), L533P(CCG)] a interní kontroly (IC).

Anyplex™ II MTB/MDR Detection zahrnuje interní kontrolu. Interní kontrola se přidává ke sledování zpracovaných vzorků obsahujících látky, které mohou interferovat s amplifikací PCR. **Specifičnost olig zaměřených na mutace v Anyplex™ II MTB/MDR Detection lze potvrdit pomocí kontroly typu Wild (WTC).** Wild-type Control je navržena tak, aby vykazovala stejný vzorec výsledku jako vzorek *M. tuberculosis* citlivý na léčiva. **Reakce Wild-type Control by musí být provedena pro každý testovací běh a v závislosti na jejím výsledku je analyzován výsledek lékově rezistentních neznámých vzorků.**

Anyplex™ II MTB/MDR Detection využívá systém Uracil-DNA glykosylázy (UDG)-dUTP. Systém UDG-dUTP se běžně používá při provádění PCR k eliminaci přenosu amplikonů, protože UDG vylučuje uracilová rezidua z DNA štěpením N-glykosylové vazby.

2. Přehled postupů



ZÁKLADNÍ INFORMACE

1. Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekční bakteriální onemocnění způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, které se šíří vzduchem. Když infikované osoby kašlou, plivou nebo mluví, organismy *M. tuberculosis* se rozptylují do vzduchu. Pro vznik infekce stačí pouze vdechnutí malého množství *M. tuberculosis*. Ne všichni lidé nakažení *M. tuberculosis* však onemocní; imunitní systém zárodky zlikviduje nebo utlumí do latentního stavu, ve kterém mohou setrvat roky. Oslabení imunitního systému pak vede k propuknutí aktivní ho onemocnění způsobeného *M. tuberculosis*. Tuberkulóza a syndrom získané imunodeficeience (AIDS) tvoří smrtelnou kombinaci. AIDS oslabuje imunitní systém a osoba, která je HIV pozitivní a infikovaná *M. tuberculosis*, má mnohem větší pravděpodobnost, že onemocní tuberkulózou než osoba, která je HIV negativní a infikovaná *M. tuberculosis*.

2. Tuberkulóza rezistentní vůči lékům

Při diagnostice infekční tuberkulózy je třeba zahájit léčbu protituberkulózními léky. Nejběžnějšími léky proti tuberkulóze (léky první volby) jsou isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol. V každé sledované zemi byly zaznamenány kmeny rezistentní vůči jednomu léku. Navíc se objevily kmeny *M. tuberculosis* rezistentní vůči všem hlavním antituberkulotikům. Zvláště nebezpečnou formou tuberkulózy rezistentní vůči lékům je multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB), která je definována jako onemocnění způsobené *M. tuberculosis* rezistentní vůči nejméně dvěma nejúčinnějším a nejčastěji používaným lékům proti tuberkulóze, isoniazidu a rifampicinu. MDR-TB se vyskytuje prakticky ve všech zemích sledovaných Světovou zdravotnickou organizací (WHO).

3. Diagnóza tuberkulózy a tuberkulózy rezistentní vůči lékům

Rychlá a přesná diagnóza symptomatických pacientů je základem globálních strategií pro kontrolu tuberkulózy. Aktivní tuberkulóza se v současné době diagnostikuje na základě celkového posouzení příznaků, klinických projevů a výsledků testů. Diagnostické vyšetřovací metody tuberkulózy zahrnují rentgenový snímek hrudníku (RTG), mikroskopii (barvení na acidofastické bacily (AFB)), kultivaci a molekulární diagnostiku. Nyní se pro včasnou diagnostiku tuberkulózy společně s kultivací často používají molekulární diagnostické metody založené na PCR.

Odhalení lékové rezistence před zahájením nevhodné chemoterapie snižuje nemocnost, úmrtnost, ekonomické náklady a zbytečnou léčbu neúčinnými léky. Rutinní metody testování citlivosti na léčiva (DST), které jsou standardem pro diagnostiku tuberkulózy rezistentní na léčiva, jsou pomalé a v podmínkách s omezenými zdroji zřídka dostupné. Skutečnost, že výsledek často trvá několik týdnů, oddaluje zahájení účinné léčby, čímž se zvyšuje riziko přenosu *M. tuberculosis* rezistentní vůči lékům na kontaktní osoby. Kromě toho mohou pacienti dostávat nevhodnou léčbu, která rezistenci zesiluje a dále ohrožuje šanci na úspěšný výsledek léčby. Proto je přesná, jednoduchá a rychlá diagnostika nezbytná pro účinný screening a poskytuje užitečné podklady pro vhodnou léčbu v celosvětovém boji proti tuberkulóze.

Mezi nejnovější pokroky ve fenotypovém DST patří použití mykobakteriálních růstových indikátorů a fágových testů. Ačkoli tyto metody jsou schopny podat zprávu o fenotypové rezistenci během 2 až 10 dnů, představuje kultivace životaschopných *M. tuberculosis* zdravotní riziko pro laboratorní personal. Proto vyžaduje vysokou úroveň biologické bezpečnosti. K překonání těchto omezení a ke zvýšení rychlosti detekce rezistence k léčivům byla vyvinuta řada metod založených na PCR. Velkou výzvou pro úspěšný vývoj metod genotypového testování však zůstává obrovský počet různých nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (nsSNP), které způsobují rezistenci. Kromě toho je mnoho z těchto metod založených na PCR omezeno nutností následného zpracování, které umožní detekci nsSNP v rámci PCR amplifikované domény (např. hybridizace na imobilizované oligonukleotidy, microarray, dot-blot hybridizace, denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie a sekvenování DNA).

V systému Anyplex™ II MTB/MDR Detection je každá cílová mutace, která je rezistentní vůči lékům, amplifikována a specificky detekována odpovídajícími oligami během 3 hodin použitím technologií DPO™ a TOCE™ společnosti Seegene bez nutnosti dalšího zpracování. Cílové mutace Anyplex™ II MTB/MDR Detection jsou shrnuty v následující tabulce.

Cílové mutace detekce Anyplex™ II MTB/MDR

Odolnost vůči lékům	Souvis ející gen	Cílové mutace			
Rezistenc e na isoniazid (INH-R)	<i>katG</i>	S315I (AGC→ATC)	S315N (AGC→AAC)	S315T (AGC→ACC)	S315T (AGC→ACA)
	<i>inhA</i> promotor	-15 (C→T)	-8 (T→A)	-8 (T→C)	
Rezistence na rifampicin 1 (RIF-R)	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG)	Q513K (CAA→AAA)	Q513L (CAA→CTA)	Q513P (CAA→CCA)
		3 a.a. vypuštění v 513~516	D516V (GAC→GTC)	D516Y (GAC→TAC)	S522L (TCG→TTG)
		S522Q (TCG→CAG)	H526C (CAC→TGC)	H526D (CAC→GAC)	H526L (CAC→CTC)
		H526N (CAC→AAC)	H526R (CAC→CGC)	H526Y (CAC→TAC)	S531L (TCG→TTG)
		S531W (TCG→TGG)	L533P (CTG→CCG)		

¹ Zjištěno je také dalších devět mutací se stejnou mutací na stejné bázi (podtrženo): (CAA→AAT), D516F (GAC→TTC), D516V (GAC→GTG), H526F (CAC→TTC), H526G (CAC→GGC), H526L (CAC→CTG), H526L (CAC→CTT), H526S (CAC→AGC) a H526T (CAC→ACC).

REAGENCIE

Reagencie obsažené v jedné sadě vystačí na 50 reakcí.

Informace k objednávce (**REF** TB7301Y)

Detekce MTB/MDR pomocí Anyplex™ II			
Symbol	Obsah	Objem	Popis
PRIMER	4X MTB/MDR TOM	250 µl	TOCE oligo mix (TOM): - Amplifikační a detekční reagencie
PREMIX	EM1	250 µl	- DNA polymeráza - Uracil-DNA glykosyláza (UDG) - Pufr obsahující dNTP
CONTROL +	MTB/DR PC	100 µl	Pozitivní kontrola (PC): - Směs klonů patogenu a IC
CONTROL W	MTB/DR WTC	100 µl	Kontrola typu Wild (WTC): - Směs klonů MTB typu Wild
WATER	RNase-free Water	1 000 µl	Ultračistá kvalita, stupeň PCR
DNA ES	Roztok pro extrakci DNA	10 ml	Reagencie pro extrakci bakteriální DNA
	Uživatelská příručka		

SKLADOVÁNÍ A MANIPULACE

Všechny komponenty Anyplex™ II MTB/MDR Detection musí být skladovány při teplotě ≤ -20 °C. Při dodržení těchto podmínek skladování jsou všechny složky stabilní až do data expirace uvedeného na štítku soupravy. Výkon soupravy není ovlivněn až 5 cykly zmrazování a rozmrazování. Pokud budou reagenty používány pouze občasně, je vhodné je uskladnit po aliquótních částech

POŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ BALENÍ

- NALC-NaOH (0,5 % NALC, 2 % NaOH a 1,47 % citrátu trisodného) nebo 4 % NaOH (1 N NaOH).
- 1X roztok PBS
- Jednorázová plastová smyčka nebo jehla
- Jednorázové bezprašné rukavice (latexové nebo nitrilové)
- Pipety (nastavitelné) a sterilní špičky na pipety
- 1,5 ml mikrokumavky
- Výrobník ledu
- Stolní centrifuga
- Vortex
- Tepelné těleso
- Čistá lavice
- Detekční systém ^{CFX96™} real-time PCR (Bio-Rad)
- Systém ^{CFX96™} Dx (Bio-Rad)
- Stripy EU 0.1 mL, Thin-wall 8-tube Strip bílé (kat. č. B77009; BIOplastics)
- Stripy EU 8-single attachable optical wide indented cap-strip (kat. č. B79501; BIOplastics)

PROTOKOL**1. Odběr, skladování a přeprava vzorků**

Poznámka: Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Povoleny jsou pouze ty vzorky, které jsou odebírány, skladovány a přepravovány za přísného dodržování následujících pravidel a pokynů.

Poznámka: Aby byla zajištěna vysoká kvalita vzorků, měly by být vzorky přepravovány co nejrychleji. Vzorky musí být přepravovány při uvedených teplotách.

A. Odběr vzorků**Sputum**

- Při odběru vzorků sputa dávejte pacientům jasné pokyny. Pacienti musí odebírat vzorky buď venku na čerstvém vzduchu, nebo mimo dosah dalších osob. Pacienti by neměli odebírat vzorky v uzavřených prostorech, jako jsou toalety.
- Před odběrem sputa vypláchněte ústa vodou. Pacienti hluboce zakašlou, aby vykašlali sputum přímo do nádoby.
- Vzorek sputa musí mít objem 3~5 ml.

Pevná kultura (Ogawa)

- Vzorky lze testovat, jakmile se objeví růst, a během následujících 60 dnů inkubace.
- Kolonie lze odebírat pomocí jednorázové plastové smyčky nebo jehly. Spolu s buňkou neodebírejte žádné médium Ogawa.

Tekutá kultura (MGIT)

- Zkumavky s indikátorem růstu mykobakterií (MGIT) se denně zkoumají pomocí UV lampy. Sledujeme, zda se na dně zkumavky odráží jasně oranžová fluorescence na menisku. Při pozitivním signálu fluorescence naberte pipetou se ze dna zkumavky 0,5 ml vzorku.

Čerstvá tkáň

- Tkáň, která má být testována, musí být odebrána asepticky do sterilní nádoby bez fixačních nebo konzervačních látek. Vzorek tkáně ke kultivaci nekládejte do formalínu.
- Pokud vzorek vyschne, přidejte sterilní fyziologický roztok, aby byl vlhký. Až do přepravy uchovávejte v chladu.

Bronchiální výplach

- Bronchiální výplach by měl lékař asepticky odebrat do sterilní nádoby pomocí aspirační techniky nebo chirurgických postupů.

B. Skladování a přeprava vzorků

Vzorek	Skladování a přeprava		Poznámka
	Teplota.	Doba trvání*	
Sputum	2~8°C	3 dny	- Výkonnost může být ovlivněna delším skladováním vzorků. - Vzorky by také měly dodržovat místní a národní pokyny pro transport patogenního materiálu.
Pevná kultura (Ogawa)			
Tekutá kultura (MGIT)			
Čerstvá tkáň			
Bronchiální výplach			

* Doba trvání: Doba od odběru vzorku do konečného testu (včetně přepravy a skladování vzorků před testem).

2. Příprava vzorků

Sputum

- Přidejte stejný objem NALC-NaOH (0,5 % NALC, 2 % NaOH a 1,47 % citrátu trisodného) ke vzorku v nádobce na sputum a 1 minutu míchejte ve vortexu.

Poznámka: Místo NALC-NaOH lze použít 4% NaOH (1 N NaOH).

- Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
- Přeneste 1,5 ml do nové sterilní zkumavky a odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Supernatant zlikvidujte, přidejte 1 ml roztoku 1X PBS a dobře promíchejte.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a supernatant zlikvidujte pipetou.
- Přidejte 1 ml roztoku 1X PBS a dobře promíchejte.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a supernatant zlikvidujte pipetou.

Čerstvá tkáň

- Vzorek tkáně rozkrájejte nebo rozmělněte ve sterilní nádobě.
- Suspendujte v 1 ml roztoku 1X PBS.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a supernatant zlikvidujte pipetou.

Bronchiální výplach

- Bez přidání NALC-NaOH odstředte 1,5 ml vzorku při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Supernatant zlikvidujte, přidejte 1 ml roztoku 1X PBS a dobře promíchejte.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a supernatant zlikvidujte pipetou.

3. Extrakce nukleových kyselin

Roztok pro extrakci DNA je součástí soupravy Anyplex™ II pro detekci MTB/MDR.

Všechny vzorky kromě vzorků kultur

- (volitelně) K připravenému sedimentu přidejte 1 ml sterilní vody, odstředte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a supernatant zlikvidujte pipetou.
- Přidejte 100 µl roztoku pro extrakci DNA do sedimentu a 30 sekund míchejte ve vortexu.
- Uzavřete zkumavku pomocí uzávěru a vařte 20 minut při teplotě 100 °C na tepelném tělese.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako vzorek PCR použijte 5 µl supernatantu.

Pevná kultura (Ogawa)

- Suspendujte kolonii ve 200 µl roztoku pro extrakci DNA v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce.
- Míchejte ve vortexu po dobu 30 sekund.
- Uzavřete zkumavku pomocí uzávěru a vařte 20 minut při teplotě 100 °C na tepelném tělese.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako vzorek PCR použijte 5 µl supernatantu.

Tekutá kultura (MGIT)

- Přeneste 0,5 ml kultury ze dna do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Zlikvidujte supernatant a přidejte 200 µl roztoku pro extrakci DNA.
- Míchejte ve vortexu po dobu 30 sekund.
- Uzavřete zkumavku pomocí uzávěru a vařte 20 minut při teplotě 100 °C na tepelném tělese.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako vzorek PCR použijte 5 µl supernatantu.

4. Příprava pro real-time PCR

Poznámka: Je třeba použít správné zkumavky a uzávěry (viz POŽADOVANÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ BALENÍ).

Poznámka: Při přípravě reakcí PCR je třeba používat filtrační špičky odolné proti aerosolu a těsné rukavice. Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

Poznámka: Všechny reagensie zcela rozmrazte na ledu.

Poznámka: Zkumavky s reagensiemi krátce odstředte, abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka.

A. Připravte PCR Mastermix.

5 µl	4X MTB/MDR TOM
5 µl	EM1
5 µl	RNase-free Water
15 µl	Celkový objem PCR Mastermixu

Poznámka: Vypočítejte potřebné množství každé reagensie na základě počtu reakcí (vzorky + kontroly).

B. Promíchejte pětinasobným převrácením nebo krátce vortexujte a pak krátce odstředte.

C. Přeneste alikvótní části 15 µl PCR Mastermixu do zkumavek pro PCR.

D. Do zkumavek obsahujících PCR Mastermix přidejte 5 µl jednotlivých vzorků nukleové kyseliny.

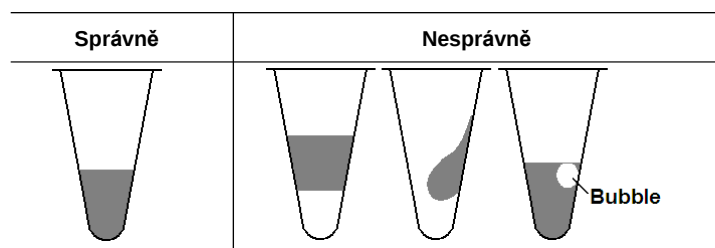
15 µl	PCR Mastermix
5 µl	Nukleové kyseliny vzorku
20 µl	Celkový objem reakce

E. Uzavřete víčka a zkumavky s PCR krátce odstředte.

F. Zkontrolujte, zda je kapalina obsahující všechny složky PCR na dně každé zkumavky PCR.

Pokud tomu tak není, odstředte znovu při vyšších otáčkách za minutu po delší dobu.

Poznámka: Před spuštěním PCR reakce je nutné zkumavky odstředit. Je třeba vytlačit kapalinu na dno a vypudit vzduchové bubliny.



Poznámka: Pro každý vzorek použijte novou sterilní špičku na pipetu.

Poznámka: Pro **negativní kontrolu (NC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 μ l vody bez RNázy.

Poznámka: Pro **pozitivní kontrolu (PC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 μ l MTB/DR PC. **Poznámka:** Pro **kontrolu typu Wild (WTC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 μ l MTB/DR WTC.

Poznámka: Kontrolní reakce typu Wild by se měla provádět při každém testování. Výsledek rezistence neznámých vzorků k léčivům se analyzuje na základě výsledku kontrolní reakce typu Wild.

Poznámka: Dbejte na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci PCR mastermixu a vzorků s pozitivní kontrolou nebo kontrolou typu Wild.

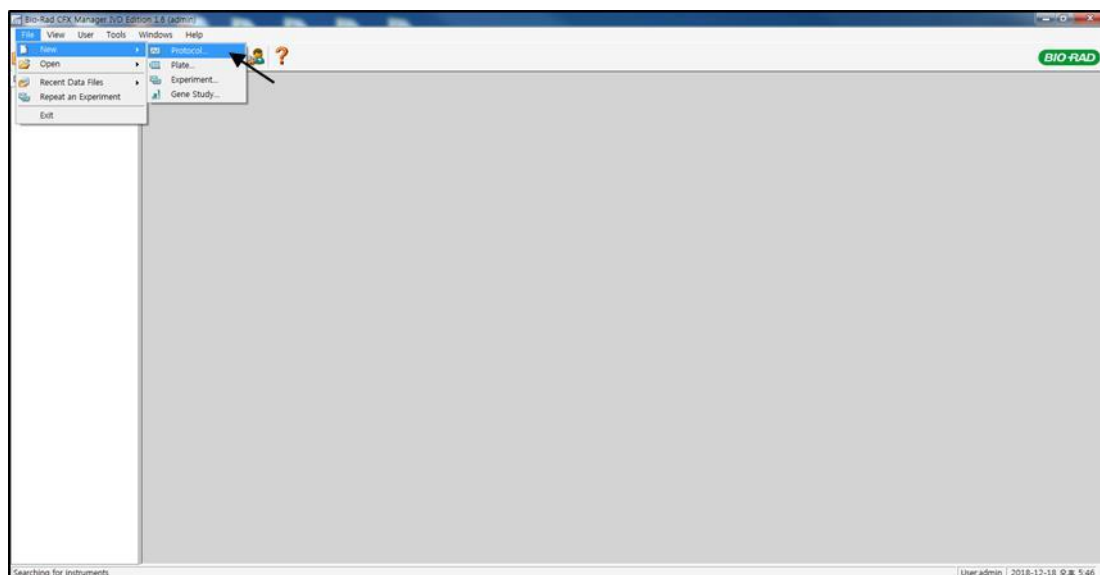
Poznámka: Štítek neumísťujte na víčko zkumavky, fluorescence je detekována skrz víčko.

NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO REAL-TIME PCR A ANALÝZA VÝSLEDKŮ**1. CFX96™ Detekční systém Real-time PCR v (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)****1.1. Nastavení přístroje pro Real-time PCR**

Poznámka: Nastavení experimentu CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) lze rozdělit do tří kroků: Setup Protocol (Nastavení protokolu), Setup Plate (Nastavení plata) a Start Run (Spuštění runu).

A. Nastavení protokolu

1) V hlavní nabídce zvolte možnost **File (Soubor) → New (Nový) → Protocol**. Otevře se **Editor protokolu**.

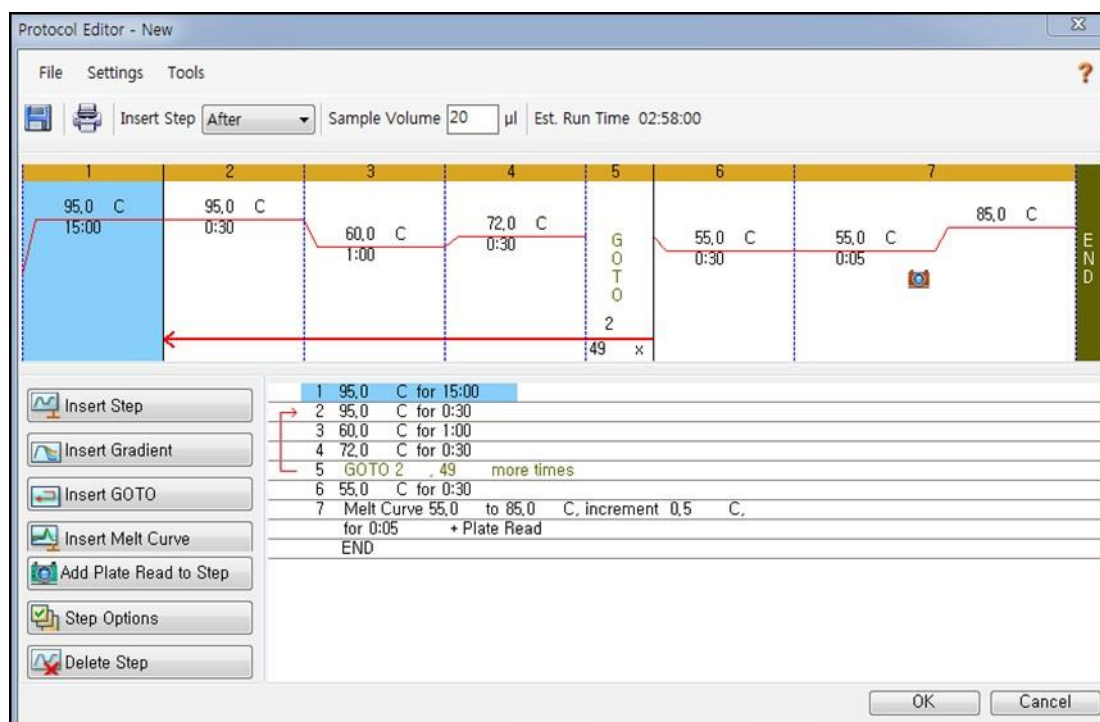


Obr. 1. **Nastavení protokolu.** Vytvoření nového protokolu nebo načtení existujícího protokolu runu.

2) V Editoru protokolu definujte tepelný profil takto:

Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	1	95°C	15 minut
2	50	95°C	30 s
3		60°C	1 min
4		72°C	30 s
5		GOTO Krok 2, 49 more times	
6	1	55°C	30 s
7*	1	Křivka tání 55 °C ~ 85 °C (5 s/0,5 °C)	

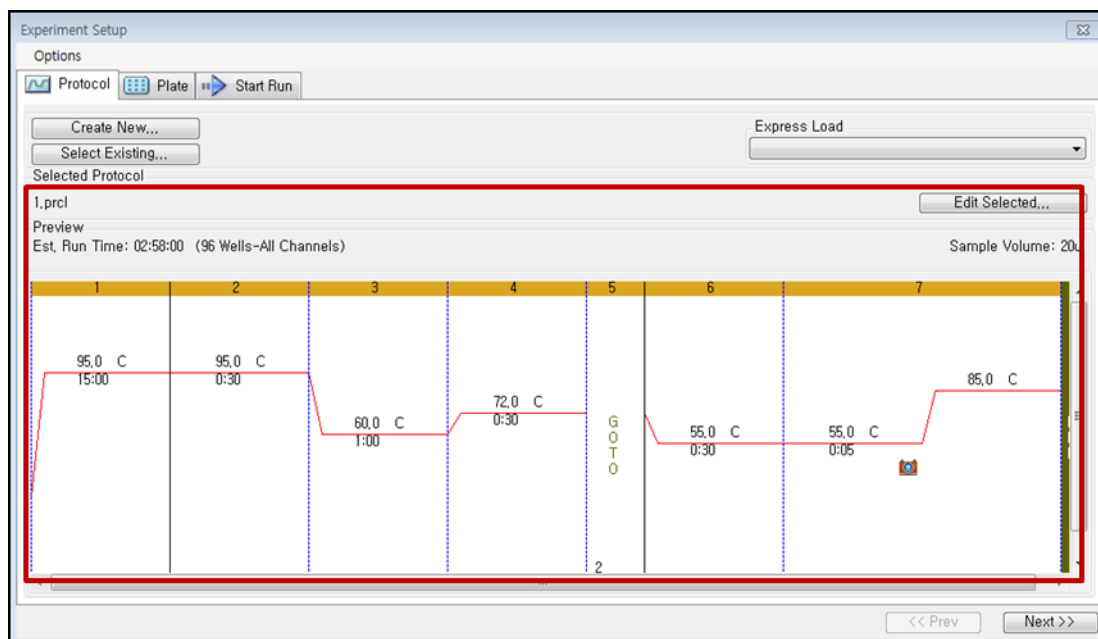
*Tabulka se odečte v kroku 7. Fluorescence se detekuje při tání.



Obr. 2. Editor protokolu

3) Kliknutím na políčko vedle položky **Sample Volume (Objem vzorku)** přímo zadejte **20 µl**.

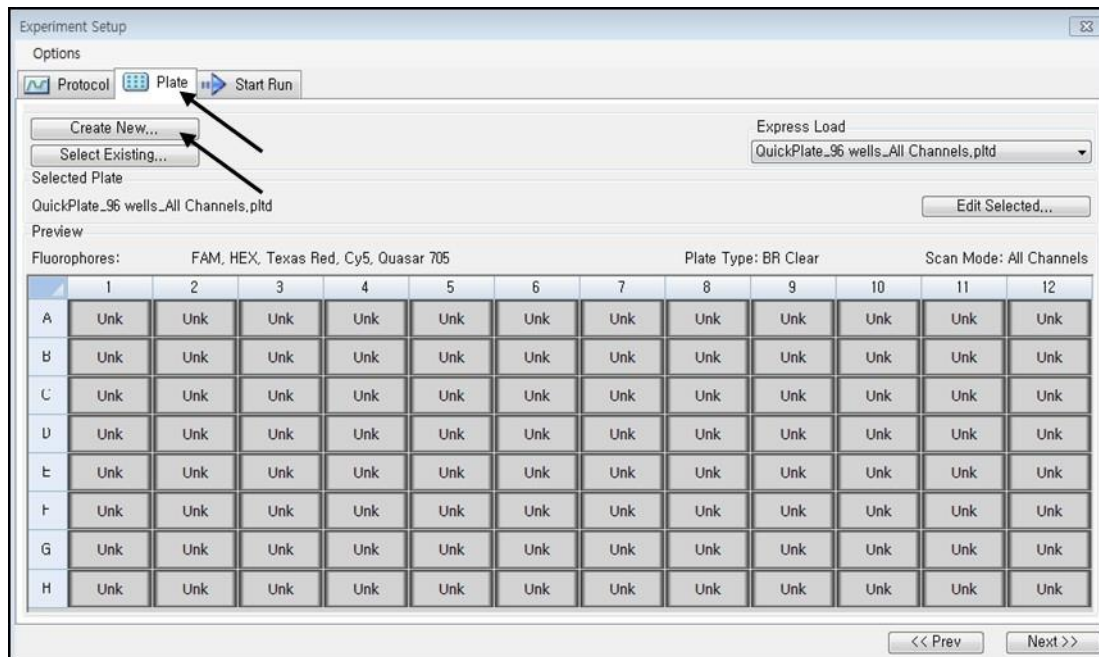
- 4) Kliknutím na tlačítko **OK** a uložením protokolu otevřete okno **Nastavení experimentu**.



Obr. 3. Nastavení experimentu: Protokol

B. Nastavení plata

- 1) Na kartě **Plate (Plato)** v okně **Experiment Setup (Nastavení experimentu)** klikněte na tlačítko **Create New (Vytvořit nový)**. Otevřete tak okno **Plate Editor (Editor plata)**.



Experiment Setup

Options

Protocol Plate Start Run

Create New... Select Existing...

Express Load: QuickPlate_96 wells_All Channels.pltd

Selected Plate: QuickPlate_96 wells_All Channels.pltd

Edit Selected...

Preview

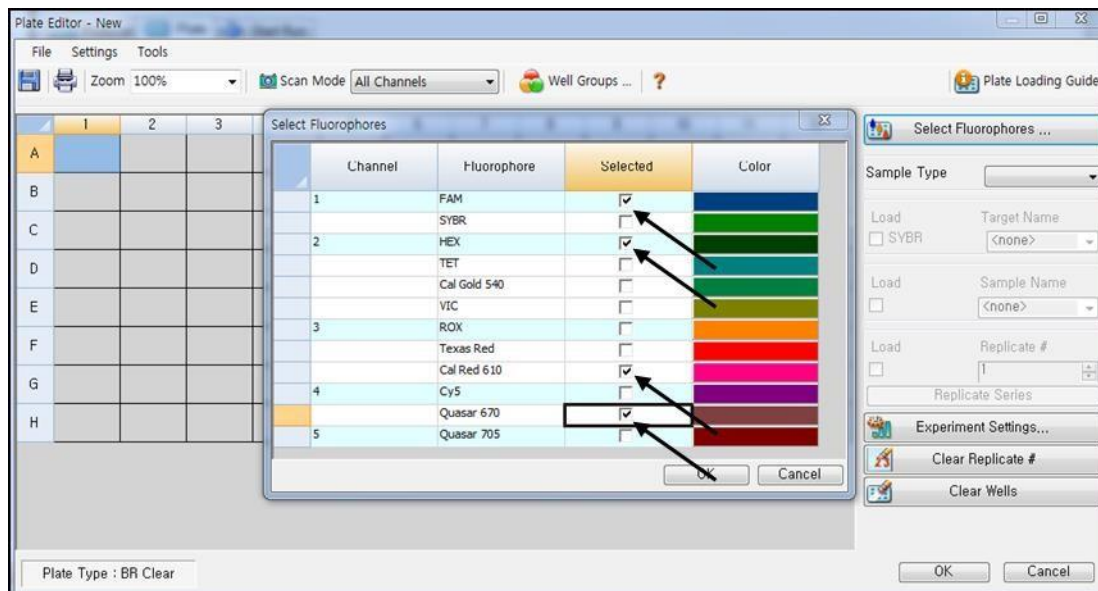
Fluorophores: FAM, HEX, Texas Red, Cy5, Quasar 705 Plate Type: BR Clear Scan Mode: All Channels

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

<< Prev Next >>

Obr. 4. Editor plata. Vytvoření nového plata

- 2) Kliknutím na tlačítko **Select Fluorophores (Vybrat fluorofory)** určete fluorofory (**FAM, HEX, Cal Red 610, a Quasar 670**), které budou použity, a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 5. Vybrané fluorofory (FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670)

- 3) Zvolte jamky, do kterých bude umístěna zkumavka PCR, a vyberte typ vzorku z nabídky.

Rozbalovací nabídka **Typ vzorku**.

- **Unknown – Neznámý**: Klinické vzorky a kontroly divokého typu
- **Negative Control – Negativní kontrola**
- **Positive Control – Pozitivní kontrola**

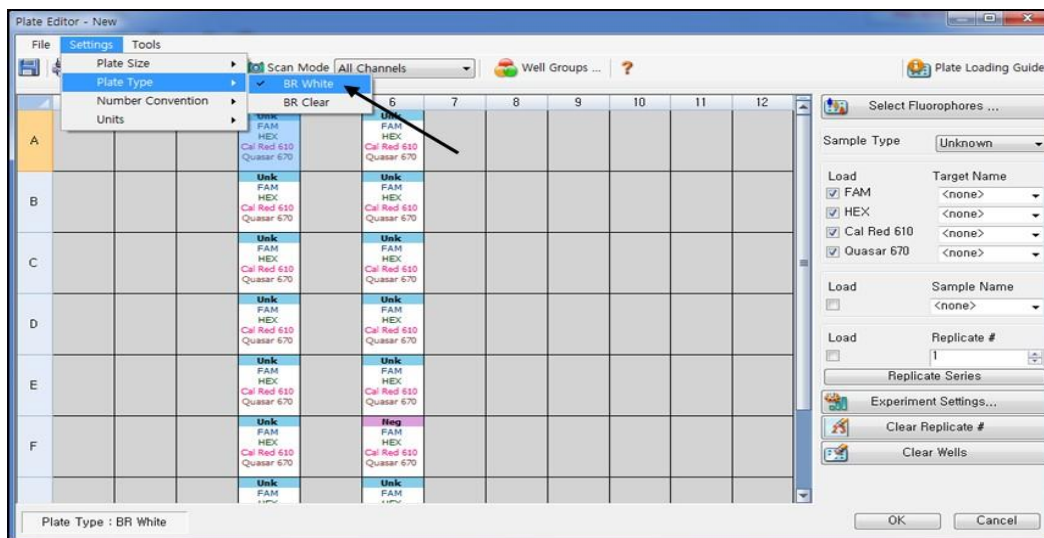
- 4) Kliknutím na příslušná zaškrťovací políčka (**FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670**)

provedete výběr měřicích kanálů pro příslušné jamky.

- 5) Zadejte **Sample name (Název vzorku)** a stiskněte klávesu enter.

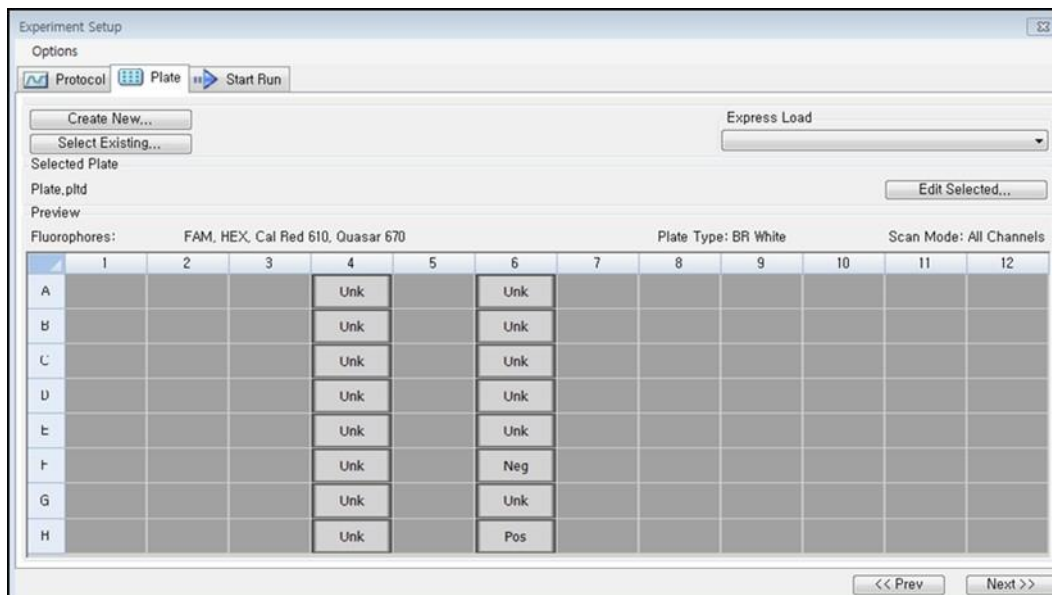
Poznámka: V případě kontroly typu Wild je třeba zadat správný název [MWTC (pro reakci MTB/MDR)].

- 6) Ve volbě **Settings (Nastavení)** hlavního menu **Plate Editor (Editoru plata)** zvolte **Plate Size (Velikost plata) (96 wells)** a **Plate Type (Typ plata) (BR White)**.



Obr. 6. Nastavení desky

- 7) Kliknutím na tlačítko **OK** nové plato uložte.
- 8) Budete vráceni do okna **Experiment Setup (Nastavení experimentu)**.

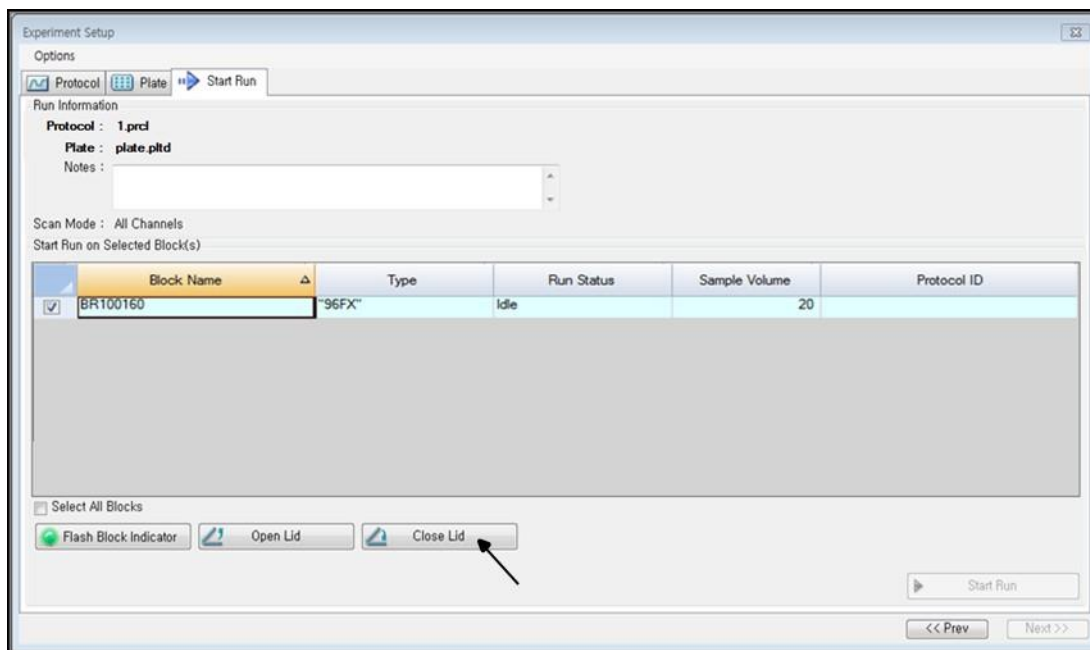


Obr. 7. Nastavení experimentu: .

- 9) Kliknutím na tlačítko **Další** spusťte run.

C. Start Run (Spustit run)

- 1) V záložce **Start Run (Spustit)** v okně **Experiment Setup (Nastavení experiment)** klikněte na **Close Lid (Zavřít víko)**. Tak dojde k zavření víka přístroje.



Obr. 8. Zavření víka

- 2) Klikněte na tlačítko **Start Run (Spustit run)**.
- 3) Spuštěný soubor uložte do složky **Moje dokumenty** nebo do určené složky. Zadejte název souboru, klikněte na tlačítko **Save (Uložit)** a tím dojde ke spuštění runu.

1.2. Analýza dat

A. Vytvoření složek pro uložení exportovaných dat

- Při použití funkce "Exportovat všechny datové listy do aplikace Excel"

1) Chcete-li uložit data ze všech kroků detekce křivky tání ze souboru s výsledky, vytvořte jednu složku.

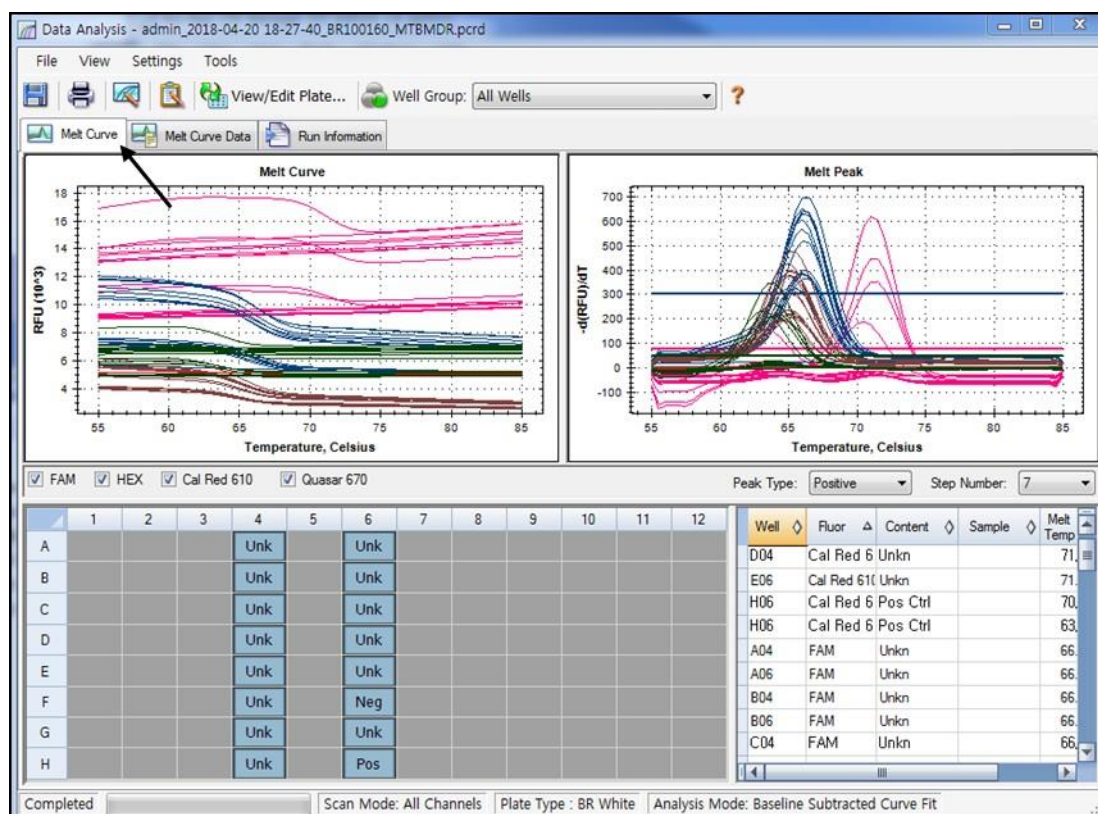
- Při použití funkce „Seegene Export“

1) Chcete-li uložit data ze všech kroků detekce křivky tání ze souboru s výsledky, vytvořte jednu složku.

2) Název složky může uživatel zadat podle své volby (v případě použití funkce „Seegene Export“ je ve složce vytvořené uživatelem automaticky vytvořena podsložka MeltStep7, do které se uloží data bodu tání).

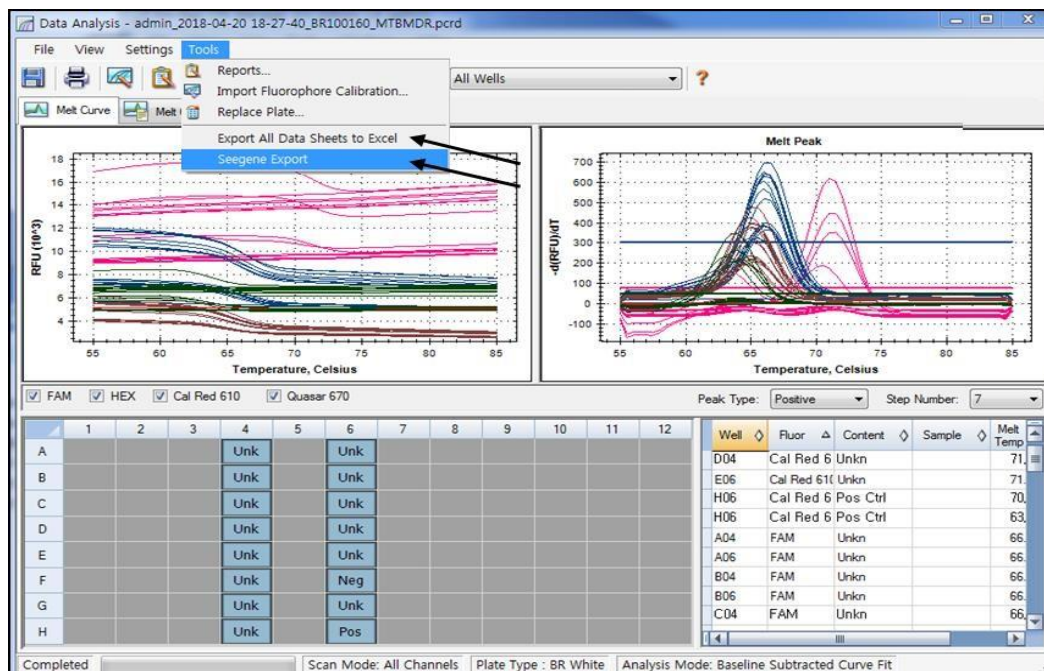
B. Přednastavení pro analýzu dat v programu CFX Manager™

1) Po dokončení testu klikněte na záložku **Melt Curve (Křivka tání)**. Tím potvrdíte výsledky **Melt Peak** (Špička tání).



Obr. 9. Výsledky Melt Peak

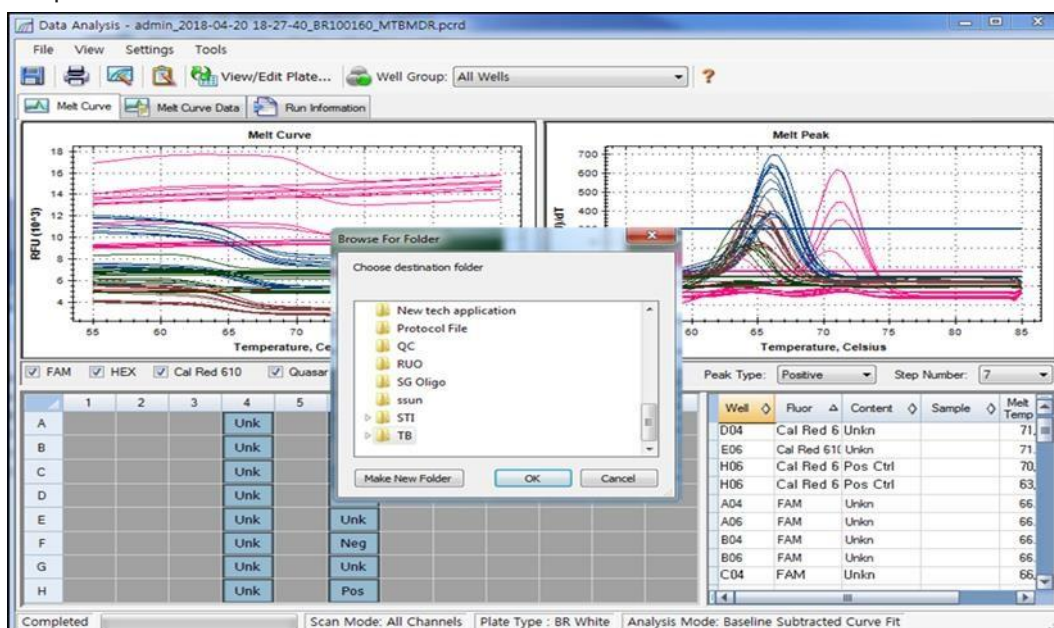
- 2) V nabídce **Tools (Nástroje)** zvolte **Export All Data Sheets to Excel (Exportovat všechna data do Excelu)** nebo **Seegene Export**.



Obr. 10. Export dat do aplikace Excel nebo Seegene Export

- 3) Vyberte umístění pro uložení dat a klikněte na tlačítko **OK**.

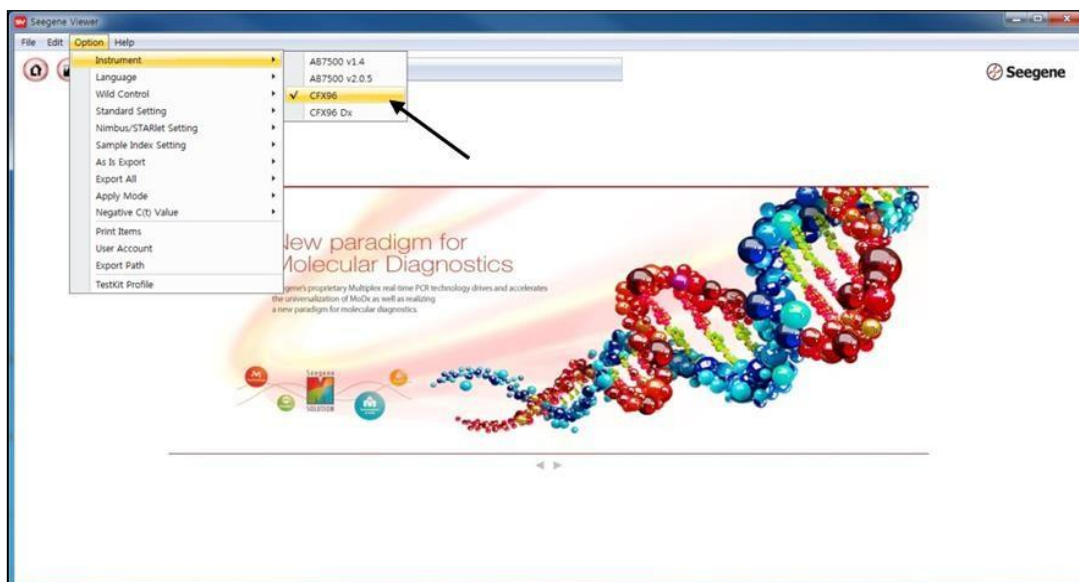
Poznámka: Pokud v kroku 2) vyberete možnost **Seegene Export**, automaticky se vytvoří složka Meltstep7 a data se uloží.



Obr. 11. Export dat do určené složky

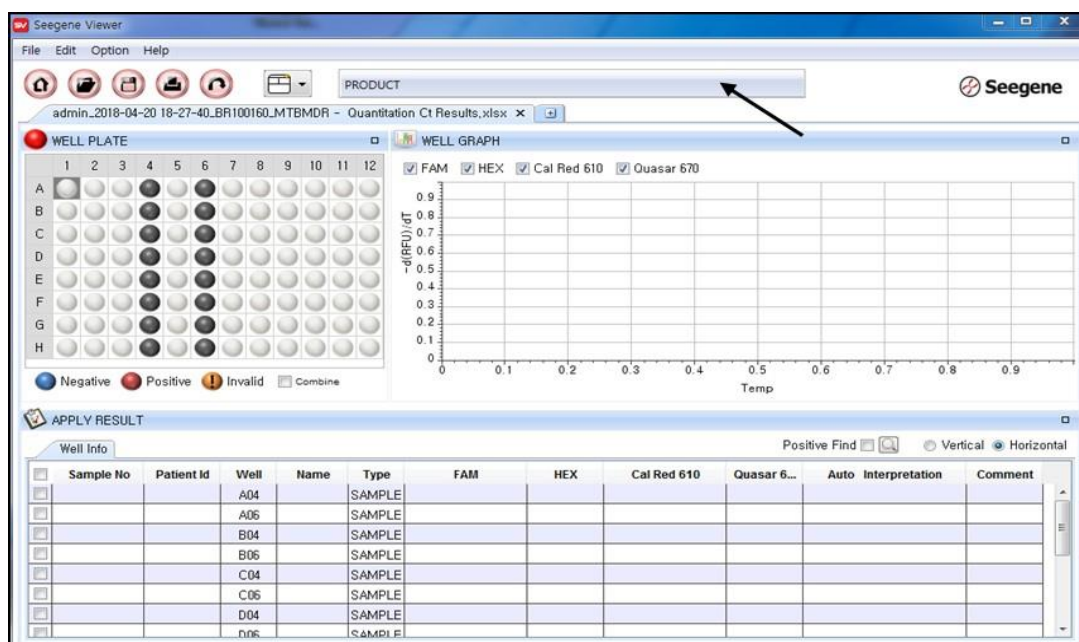
C. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

- 1) Spustíte program Seegene Viewer a kliknutím na **Option (Možnost)** vyberte v **Instrument (Nástroj)** možnost **CFX96**.



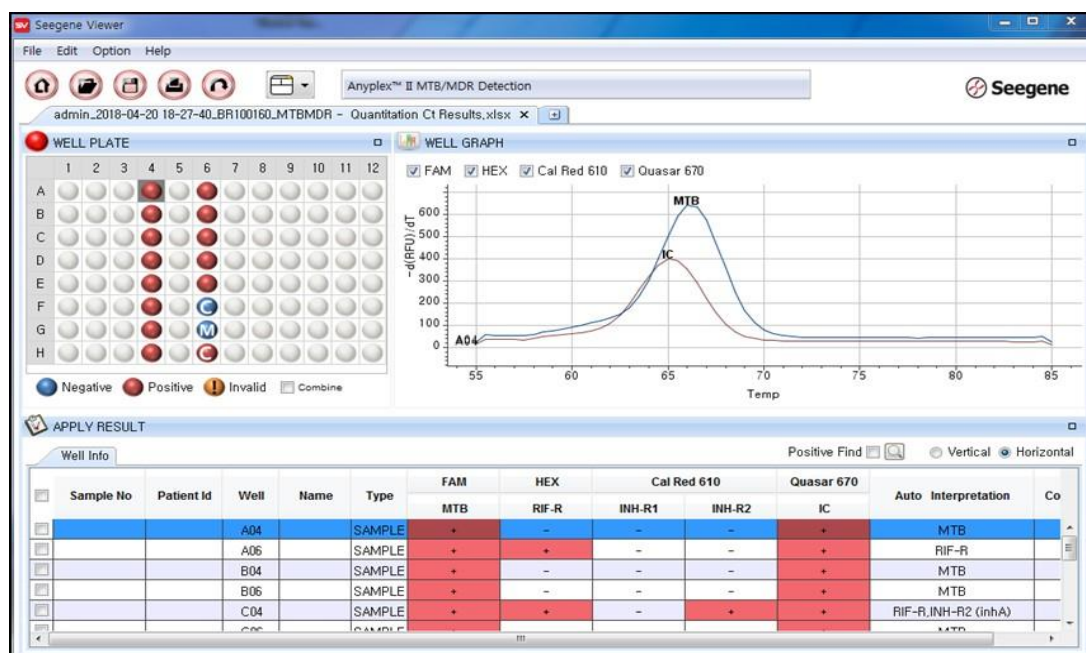
Obr. 12. Prohlížeč Seegene

- 2) Klikněte na tlačítko **Open (Otevřít)** a vyhledejte soubor uložený ve zvolené složce nebo složce **"MeltStep7"**. Otevřete soubor s výsledky a z nabídky **PRODUKT** vyberte testovací sadu.



Obr. 13. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

3) Zkontrolujte výsledky všech jamek.



Obr. 14. Výsledek testu v prohlížeči Seegene Viewer

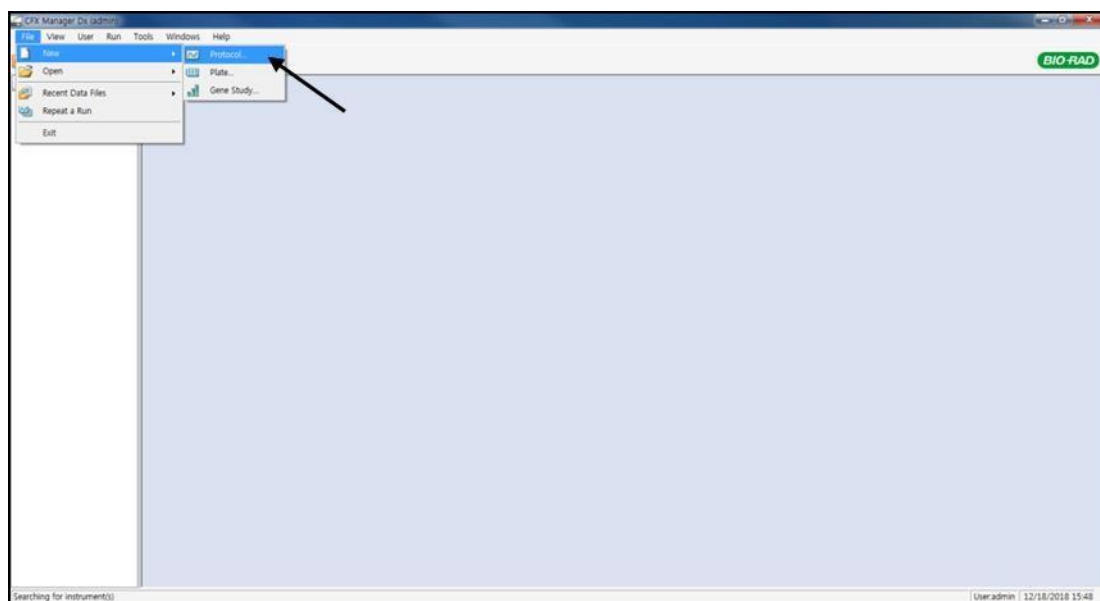
2. Systém CFX96™ Dx (software CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1. Nastavení přístroje pro Real-time PCR

Poznámka: Nastavení experimentu v systému CFX96™ Dx (Bio-Rad) lze rozdělit do tří kroků: Setup Protocol (Nastavení protokolu), Setup Plate (Nastavení plata) a Start Run (Spuštění runu).

A. Nastavení protokolu

- 1) V hlavní nabídce zvolte možnost **File (Soubor) → New (Nový) → Protocol**. Otevře se **Editor protokolu**.

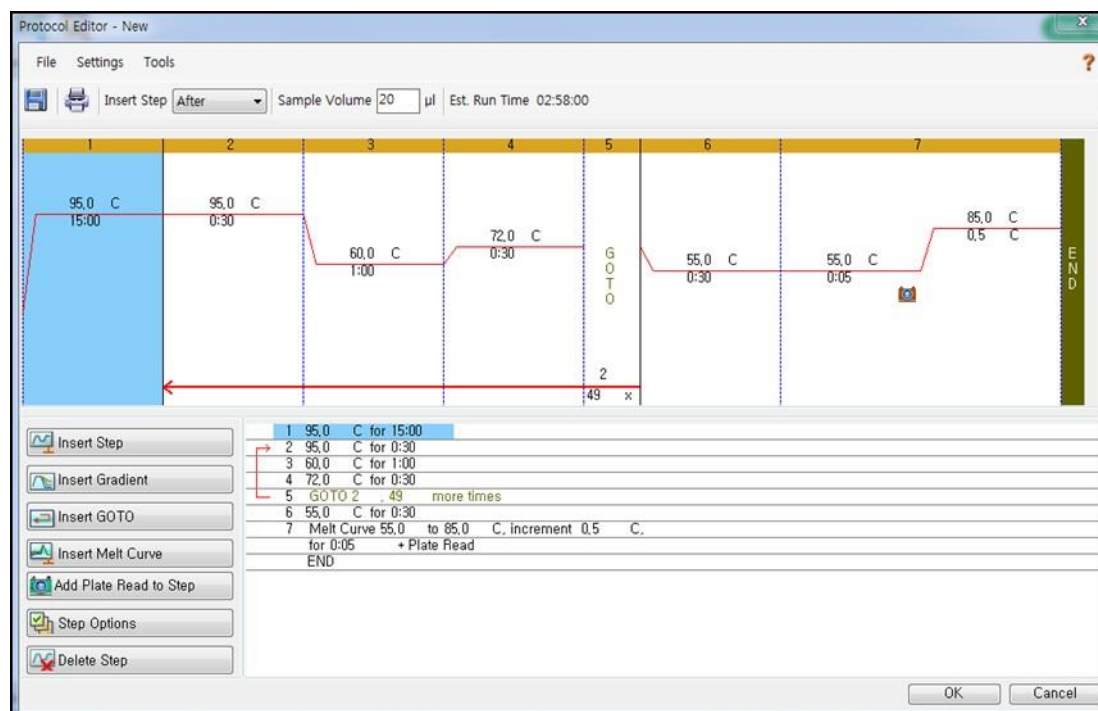


Obr. 1. **Nastavení protokolu.** Vytvoření nového protokolu nebo načtení existujícího pro run

2) V Editoru protokolu definujte tepelný profil takto:

Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	1	95°C	15 minut
2	50	95°C	30 s
3		60°C	1 min
4		72°C	30 s
5		GOTO Krok 2, 49 more times	
6	1	55°C	30 s
7*	1	Křivka tání 55 °C ~ 85 °C (5 s/0,5 °C)	

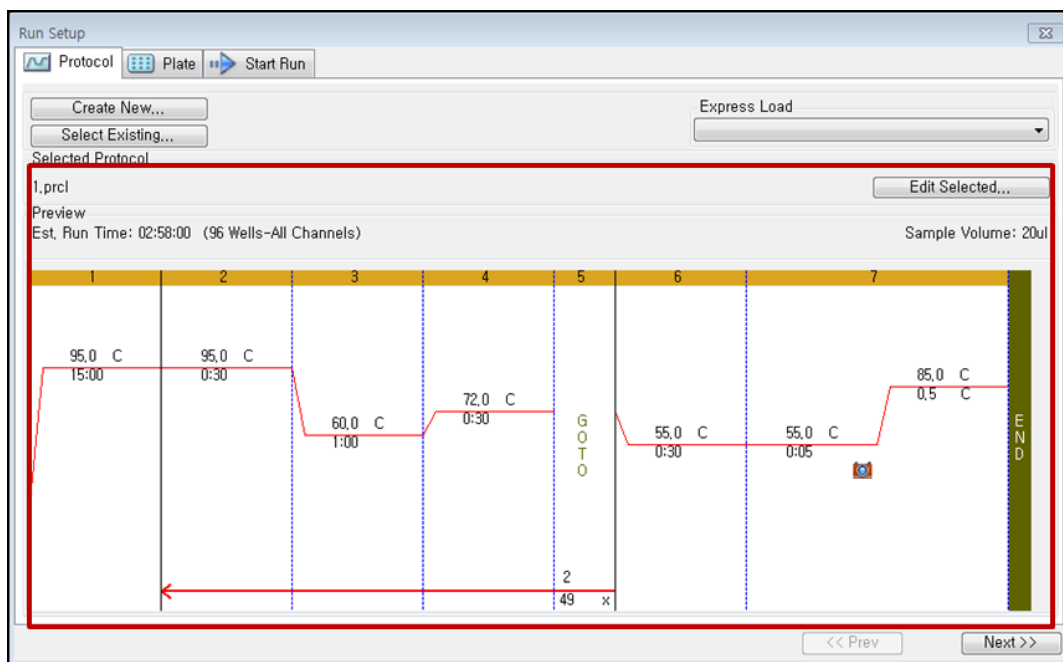
*Tabulka se odečte v kroku 7. Fluorescence je detekována při tání.



Obr. 2. Editor protokolu

3) Kliknutím na políčko vedle položky **Sample Volume (Objem vzorku)** a přímo zadejte **20 µl**.

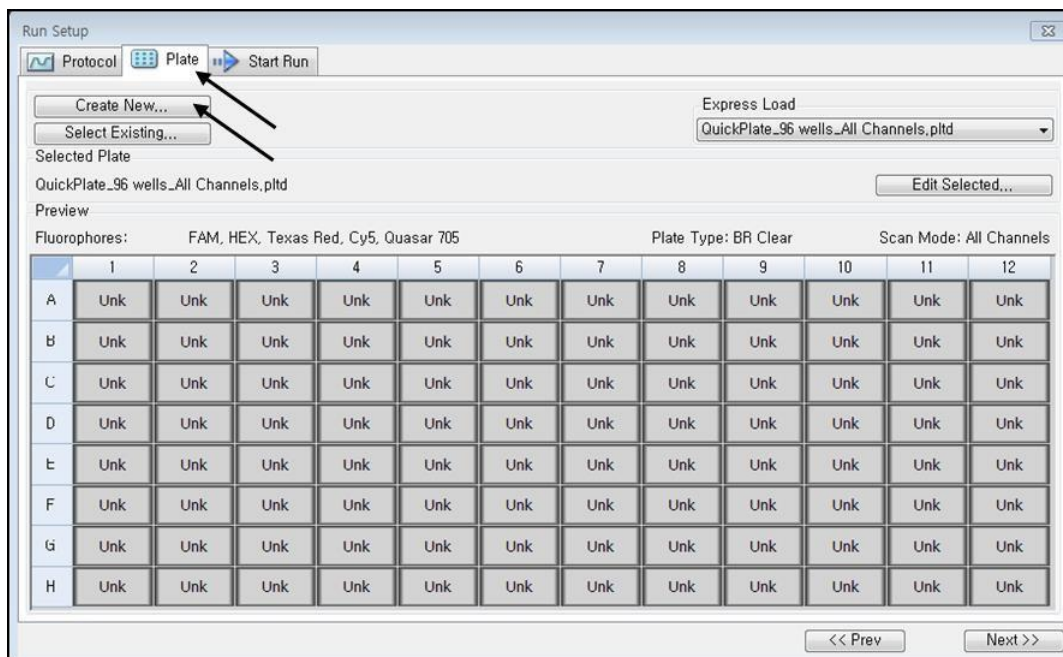
- 4) Kliknutím na tlačítko **OK** a uložením protokolu otevřete okno **Run Setup (Nastavení runu)**.



Obr. 3. Nastavení runu: Protokol

B. Nastavení plata

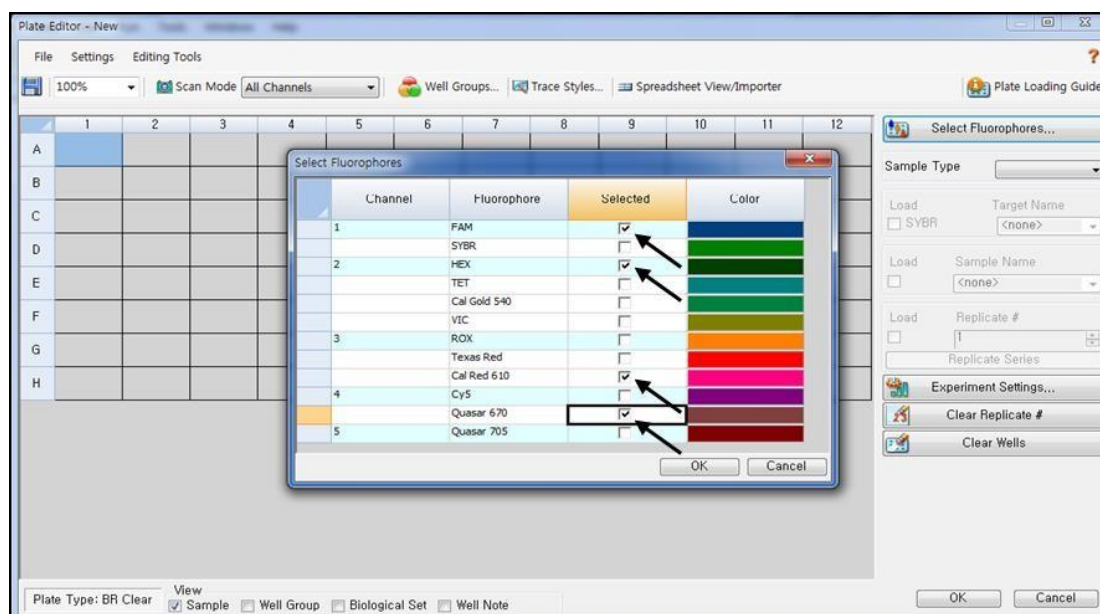
- 1) V záložce **Plate (Plato)** v **Run Setup (Nastavení runu)** klikněte na tlačítko **Create New (Vytvořit nový)**. Otevře se okno **Plate Editor (Editor plata)**.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

Obr. 4. Editor plata. Vytvoření nového plata

- 2) Kliknutím na tlačítko **Select Fluorophores (Vybrat fluorofory)** označte fluorofory (**FAM, HEX, Cal Red 610, a Quasar 670**), které budou použity, a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 5. Zvolit fluorofory (FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670)

- 3) Zvolte jamky, do kterých bude umístěna zkumavka PCR, a vyberte typ vzorku z roletového menu.

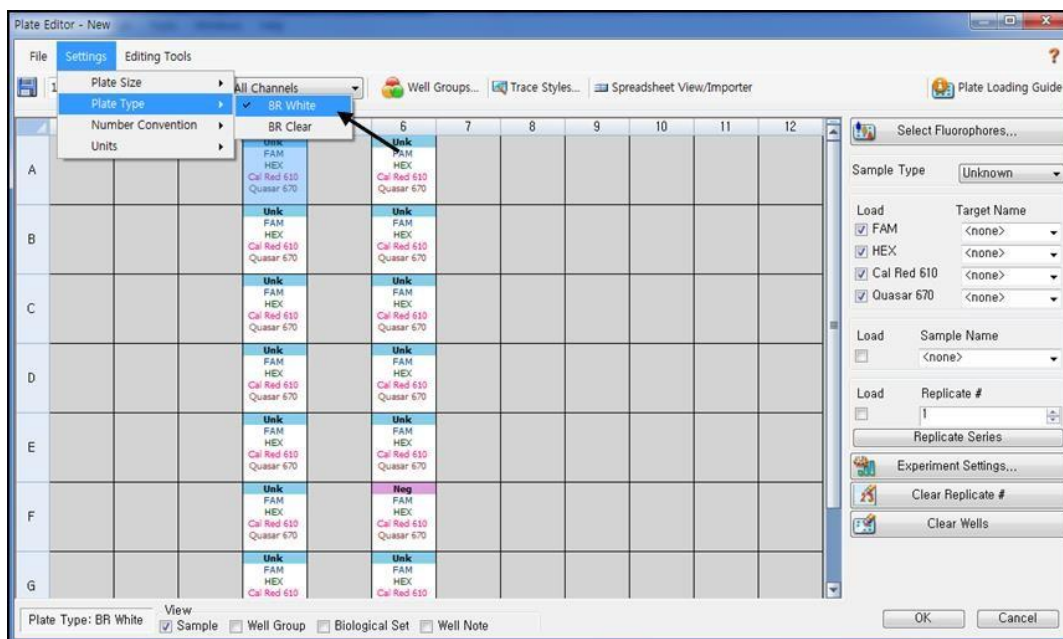
- **Unknown – Neznámý:** Klinické vzorky
- **Negative Control – Negativní kontrola**
- **Positive Control – Pozitivní kontrola**

- 4) Kliknutím na příslušná zaškrťovací políčka (**FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670**) provedete pro zvolené jamky výběr měřících kanálů.

- 5) Zadejte **Sample name (Název vzorku)** a stiskněte klávesu enter.

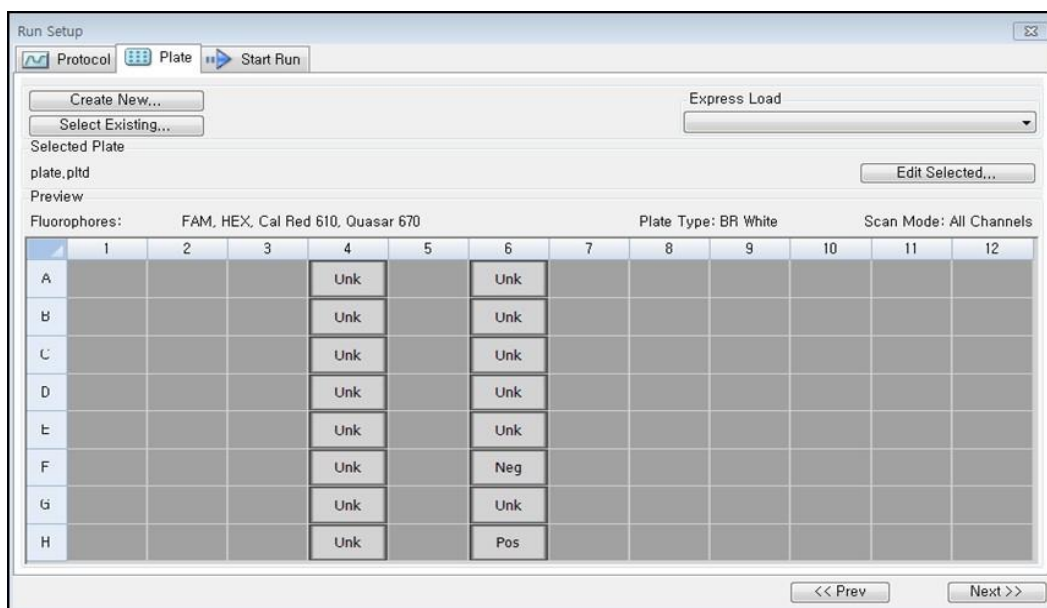
Poznámka: V případě kontroly typu Wild je třeba zadat správný název [MWTC (pro reakci MTB/MDR)].

- 6) Ve volbě **Settings (Nastavení)** hlavního menu **Plate Editor (Editoru plata)** zvolte **Plate Size (Velikost plata) (96 wells)** a **Plate Type (Typ plata) (BR White)**.



Obr. 6. Nastavení plata

- 7) Kliknutím na tlačítko **OK** uložte nové plato.
- 8) Vraťte se do okna **Run Setup (Nastavení runu)**.

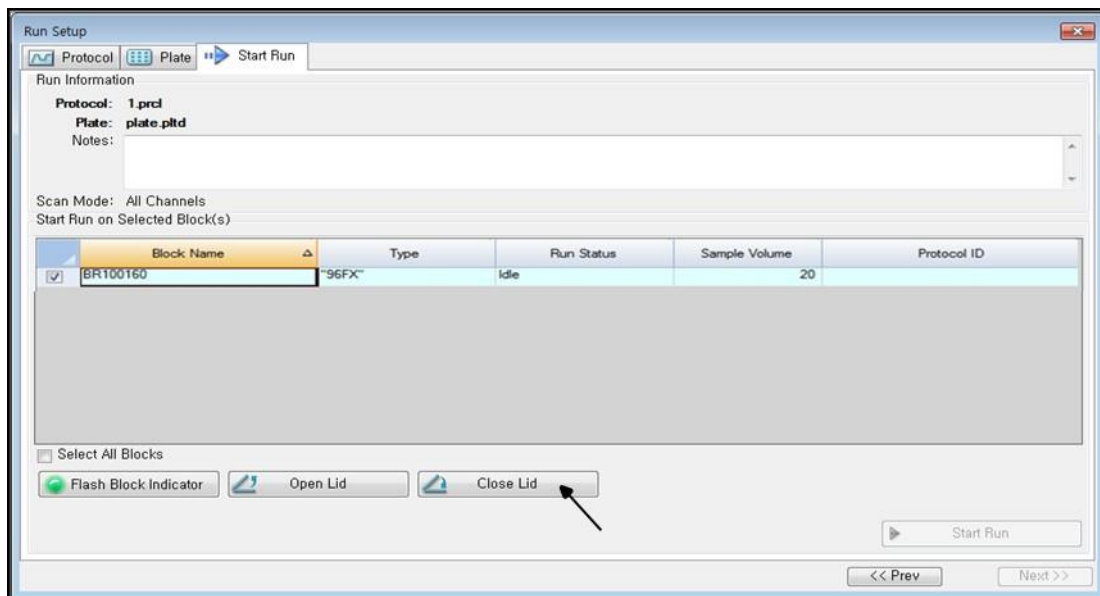


Obr. 7. Nastavení runu: Plato

9) Kliknutím na tlačítko **Next (Další)** spustíte run.

C. Spustit run

1) V záložce **Start Run (Spustit)** v okně **Run Setup (Nastavení runu)** klikněte na tlačítko **Close Lid (Zavřít víko)**. Tak dojde k zavření víka přístroje.



Obr. 8. Zavření víka

2) Klikněte na tlačítko **Start run (Spustit run)**.

3) Spuštěný soubor uložte do složky **Moje dokumenty** nebo do určené složky. Zadejte název souboru, klikněte na tlačítko **Save (Uložit)** a run se spustí.

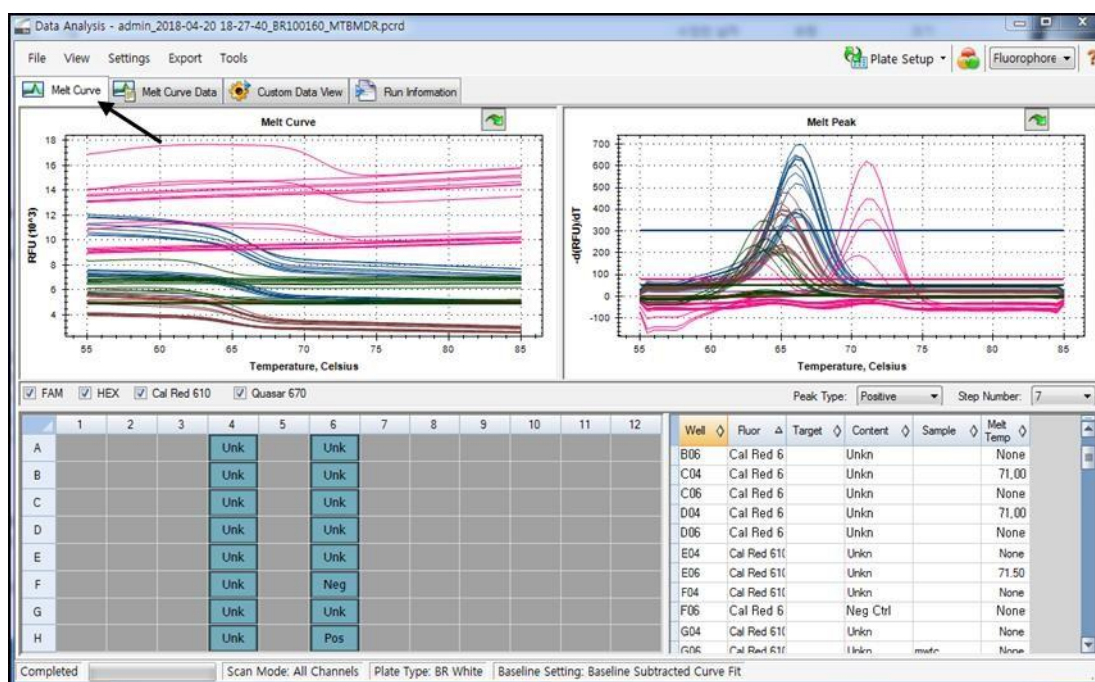
2.2 Analýza dat

A. Vytvoření složek pro uložení exportovaných dat

- 1) Pro uložení dat ze všech kroků detekce křivky tání ze souboru výsledků vytvořte jednu složku.
- 2) Název složky může uživatel zadat podle své volby (pro funkci „Seegene Export“ se ve složce vytvořené uživatelem automaticky vytvoří podsložka MeltStep7, do které se uloží data bodu tání).

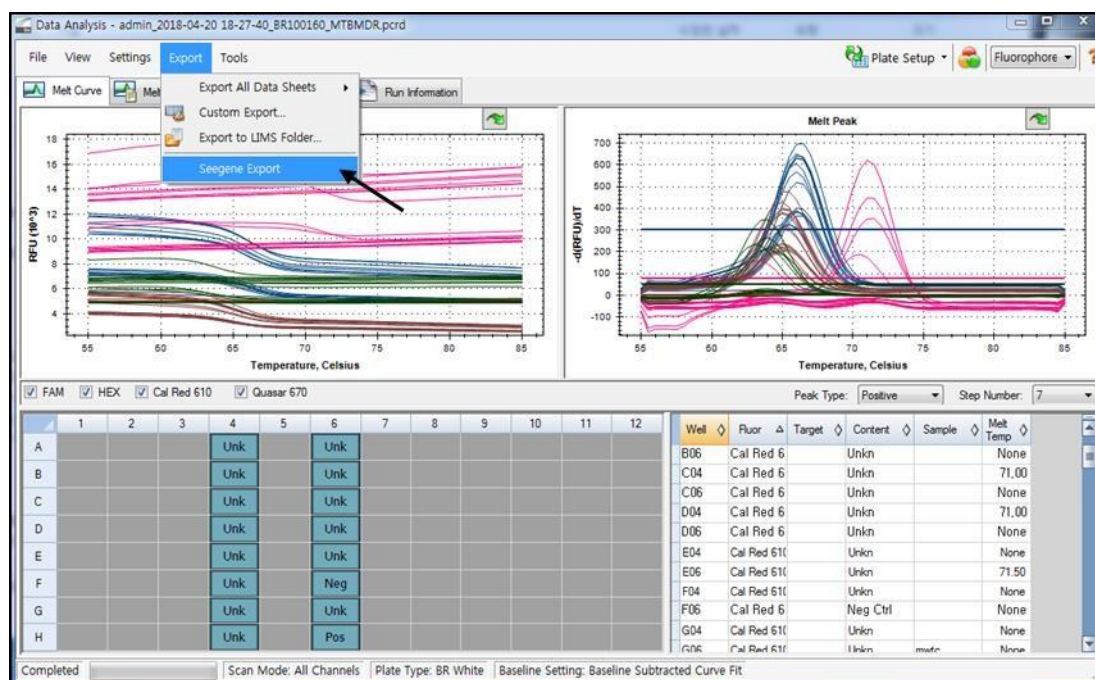
B. Přednastavení pro analýzu dat v programu CFX Manager™

- 1) Po dokončení testu klikněte na záložku **Melt Curve (Křivka tání)** a potvrďte výsledky **Melt Peak** (Špička tání).



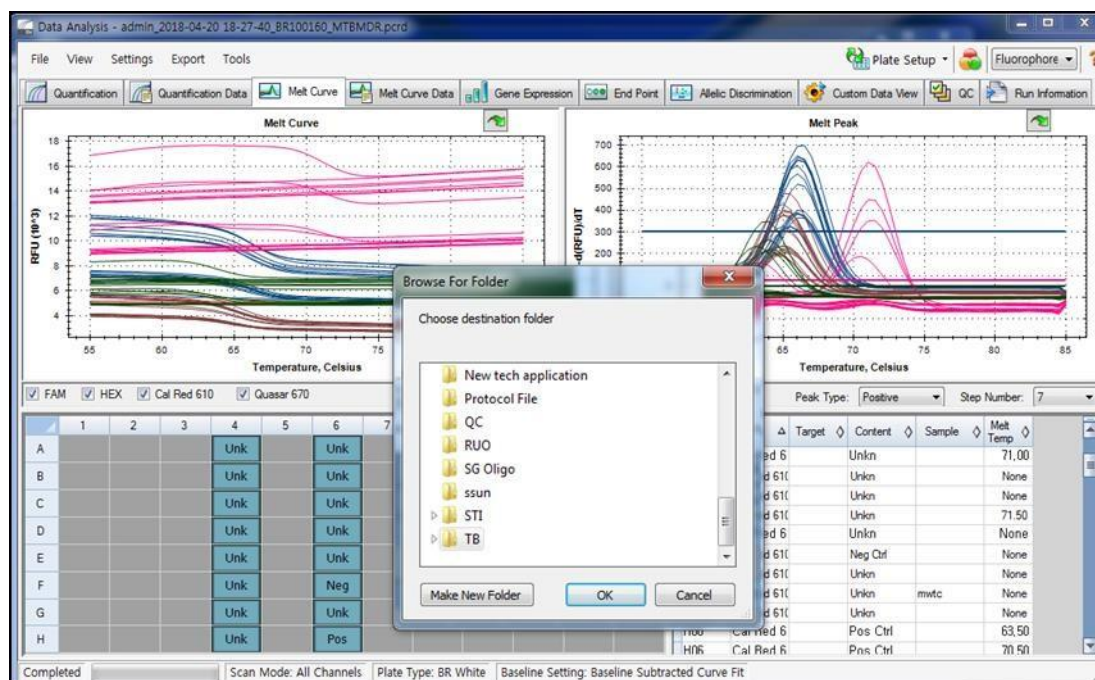
Obr. 9. Výsledky Melt Peak

2) V nabídce **Export** vyberte možnost **Seegene Export**.



Obr. 10. Seegene Export

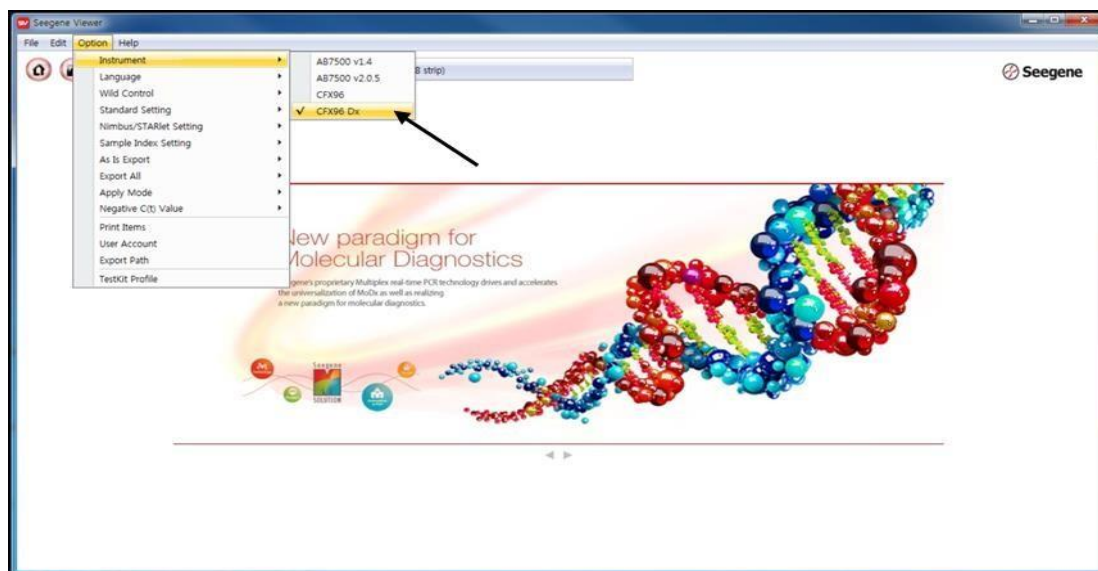
3) Vyberte umístění pro uložení dat a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 11. Seegene Export do určené složky

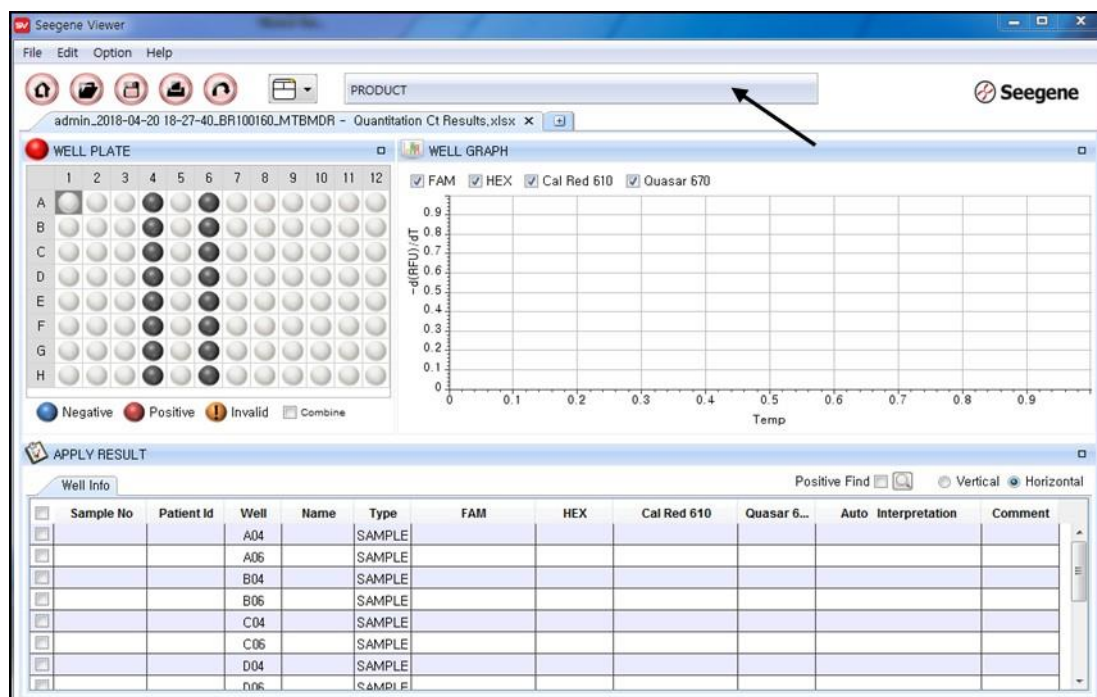
C. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

- 1) Otevřete program Seegene Viewer a kliknutím na **Option (Možnost)** zvolte v **Instrument (Nástroj)** možnost **CFX96 Dx**.



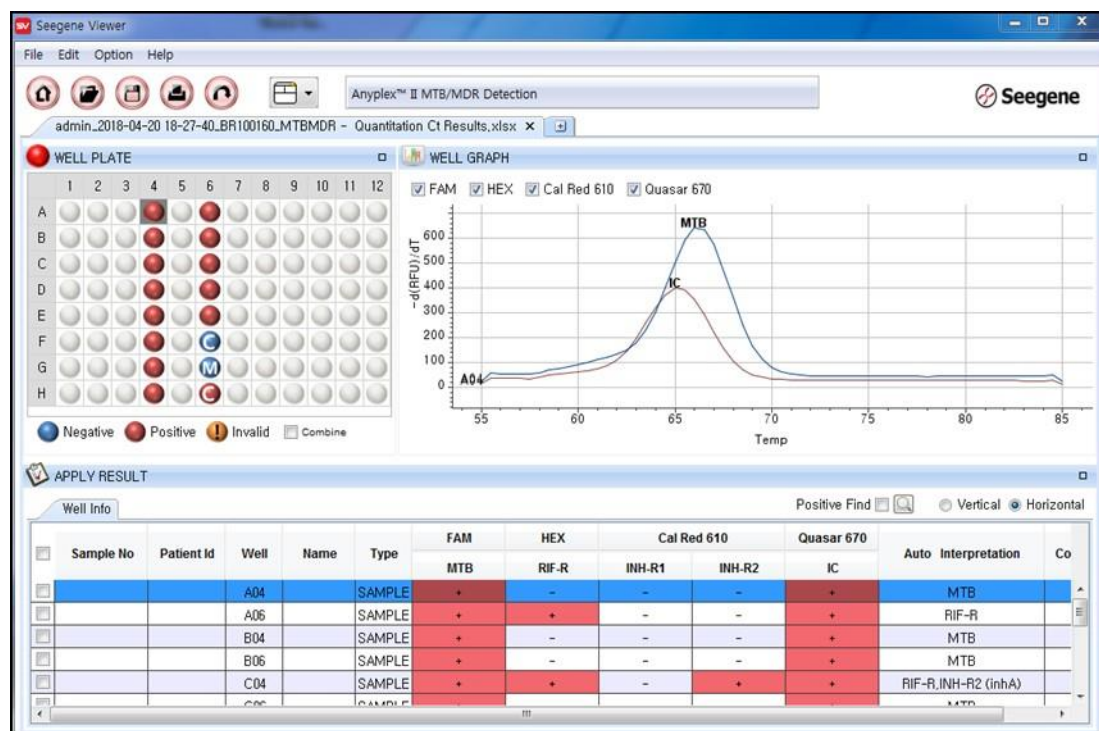
Obr. 12. Prohlížeč Seegene Viewer

- 2) Kliknutím na tlačítko **Otevřít** vyhledejte uložený soubor ve složce „**MeltStep7**“. Otevřete soubor s výsledky a z nabídky **PRODUKT** vyberte testovací sadu.



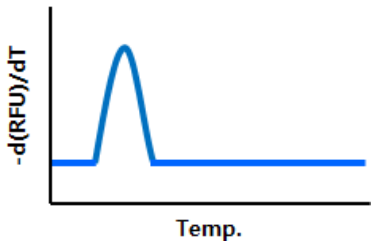
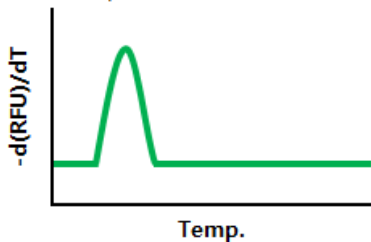
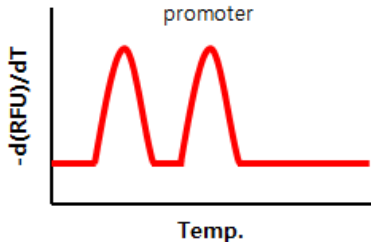
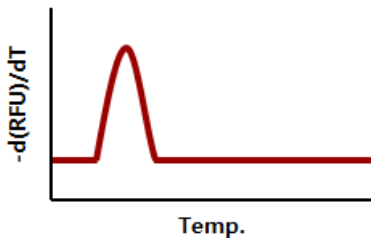
Obr. 13. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

3) Zkontrolujte výsledky všech jamek.



Obr. 14. Výsledek testu v prohlížeči Seegene Viewer

VÝSLEDKY
1. Informace o analytu

Fluorofoř	Reakce MTB/MDR
FAM	MTB 
HEX	RIF-R <i>rpoB</i> 
Cal Red 610	INH-R <i>katG</i> <i>inhA</i> promoter 
Quasar 670	IC 

Fluorofor	Analyt	Výsledek v prohlížeči Seegene Viewer
FAM	MTB	MTB
HEX	RIF-R (18 mutací v <i>rpoB</i>)	RIF-R
Cal Red 610	INH-R (4 mutace v <i>katG</i>)	INH-R1 (<i>katG</i>)
	INH-R (3 mutace v promotoru <i>inhA</i>)	INH-R2 (<i>inhA</i>)
Quasar 670	IC	IC

2. Interpretace výsledků

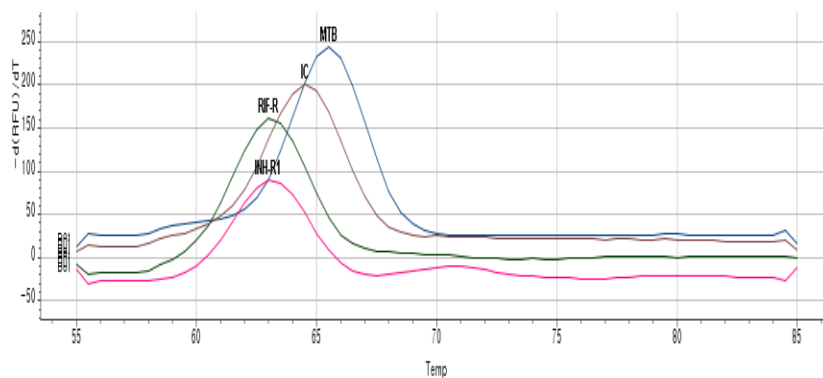
Přípa d	Výsled ek				Výklad
	IC (Quasar 670)	MTB (FAM)	RIF-R (HEX)	INH-R (Cal Red 610)	
1	+	+	+	+	Detekce INH-R a RIF-R
2			+	-	Detekce RIF-R
3			-	+	Detekce INH-R
4			-	-	Detekce MTB
5		-	+	+	Neplatný ¹⁾
6			+	-	Neplatný ¹⁾
7			-	+	Neplatný ¹⁾
8			-	-	MTB nebyl detekován
9	-	+/-	+/-	+/-	Neplatný ²⁾

¹⁾ Opakovaný test by měl být proveden s původní DNA. Pokud je výsledek stejný, porovnejte výsledky jiných diagnostických metod.

²⁾ Opakovaný test by měl být proveden s původní DNA zředěnou na 1/10~1/100.

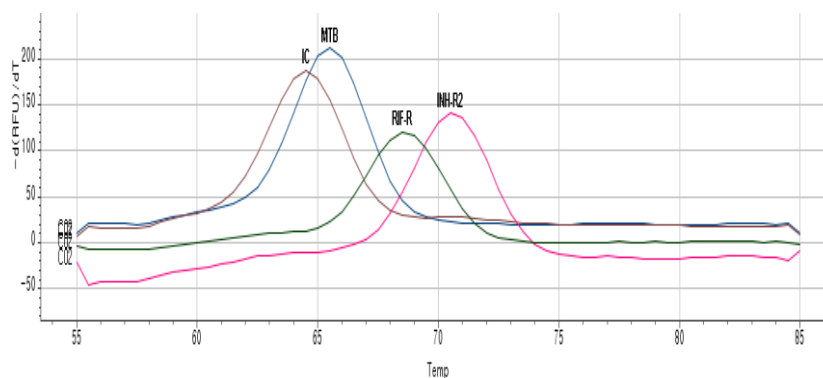
3. Testování klinických vzorků

<Vzorek 1>

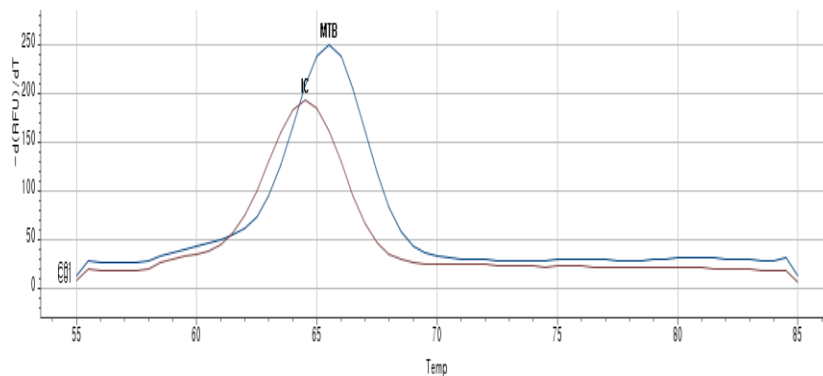


Název	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Automatický výklad
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
1	+	+	+	-	+	RIF-R, INH-R1 (katG)

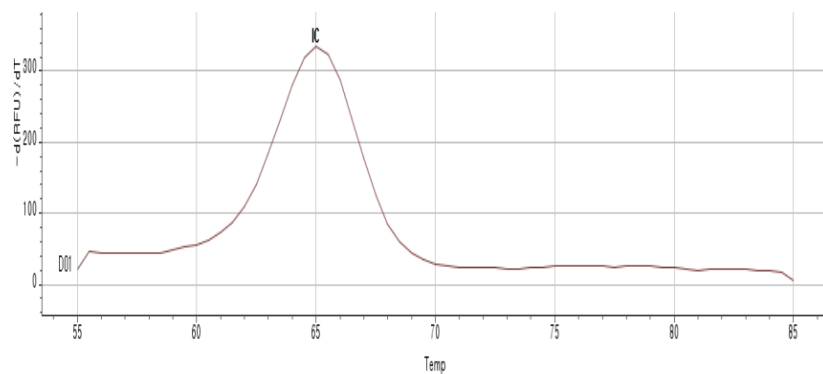
<Vzorek 2>



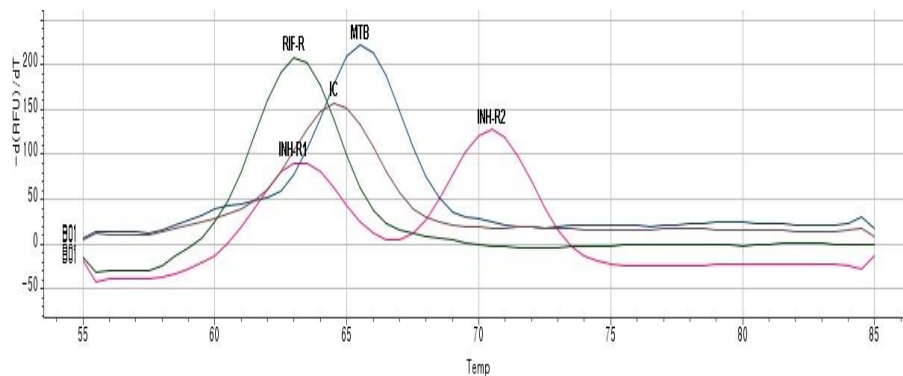
Název	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Automatický výklad
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
2	+	+	-	+	+	RIF-R, INH-R2 (inhA)

<Vzorek 3>


Název	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Automatický výklad
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
3	+	-	-	-	+	MTB

<Vzorek 4>


Název	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Automatický výklad
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
4	-	-	-	-	+	-

<Pozitivní kontrola>


Název	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Automatický výklad
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
MDR PC	+	+	+	+	+	Pozitivní kontrola (+)

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Detekce MTB/MDR pomocí Anyplex™ II		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Žádný signál	Fluorofory pro analýzu dat nejsou ve shodě s protokolem	Vyberte správné fluorofory pro analýzu dat a data znovu exportujte. Není třeba v tomto případě test opakovat.
	Nesprávné nastavení real-time termálního cyklu	Zkontrolujte podmínky tepelného cyklování a zopakujte test při správném nastavení
	Nesprávné skladování nebo prošlá doba použitelnosti testovací soupravy	Zkontrolujte podmínky skladování (viz strana 12) a datum spotřeby (viz štítek) testovací soupravy a pokud je to možné, použijte novou soupravu.
Žádný signál interní kontroly	Vysoká koncentrace nukleové kyseliny vzorku	Zředte prosím vzorek nukleové kyseliny v poměru (1/10–1/100) RNase-free water a opakujte test se zředěnou nukleovou kyselinou.
	Přítomnost inhibitoru	Zředte prosím vzorek nukleové kyseliny v poměru (1/10–1/100) RNase-free water a opakujte test se zředěnou nukleovou kyselinou.
Domnělé falešně pozitivní nebo cílové signály pozorované v negativní kontrole	Kontaminace	Dekontaminujte všechny povrchy a nástroje chlornanem sodným a etanolem. Po celou dobu procesu používejte pouze filtrační špičky a mezi jednotlivými zkumavkami je vyměňujte. Celý postup od extrakce nukleových kyselin po detekci opakujte s novou sadou reagentů.
Domnělá falešná negativita	Chyba při odběru vzorku	Zkontrolujte prosím odběr vzorků a znovu odeberte vzorek.
	Nesprávné skladování vzorku	Znovu odeberte vzorek a celý postup zopakujte. Zkontrolujte, že je vzorek skladován podle doporučení.

Detekce MTB/MDR pomocí Anyplex™ II		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Domnělá falešná negativita (pokračování)	Chyba při extrakci nukleové kyseliny	Zkontrolujte postup extrakce nukleové kyseliny a její koncentraci. Nukleovou kyselinu extrahujte znovu.
	Chyba při přidávání nukleové kyseliny do příslušných zkumavek PCR	Zkontrolujte čísla vzorků ve zkumavkách obsahujících nukleovou kyselinu a ujistěte se, že jste přidali nukleovou kyselinu do správných zkumavek pro PCR. V případě potřeby test zopakujte.
	Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda jsou do směsi PCR přidány všechny komponenty. (Citlivost je snížena při použití předem připravené premixové směsi). Všechny reagenty je třeba před použitím homogenizovat a odstředit.
	Přítomnost inhibitoru	Zředte prosím vzorek nukleové kyseliny v poměru (1/10–1/100) RNase-free water a opakujte test se zředěnou nukleovou kyselinou
Hlášení o chybě v prohlížeči Seegene Viewer	"WTC není identifikováno"	Provedte test WTC a přiřadte jamku testování WTC pro analýzu výsledků.
	"Výsledek testu WTC není v normě"	Toto chybové hlášení se zobrazí v následujících případech: (1) maximální hodnota Melt Peak je vyšší než stanovená maximální prahová hodnota v kanálech HEX a/nebo Cal Red 610; nebo když (2) je hodnota Melt Peak nižší než stanovená prahová hodnota v kanálech FAM a/nebo Quasar 670. Případ (1) může být způsoben kontaminací reagentů nebo prostor. Zkontrolujte, zda nedošlo ke kontaminaci. Případ (2) může být způsoben chybou v přípravě reakční směsi nebo v nastavení termálního cyklu nebo nesprávným skladováním soupravy. Pečlivě opakujte test a zkontrolujte podmínky skladování soupravy.

ÚČINNOST

1. Specifická

Vysoká specifita detekce Anyplex™ II MTB/MDR je zajištěna oligy navrženými speciálně pro sledované cíle a nastavenými reakčními podmínkami. Test Anyplex™ II MTB/MDR Detection byl testován na zkříženou reaktivitu vůči 122 různým patogenům a amplifikace a detekce PCR byla identifikována pouze u specifikovaných cílů.

			MTB/MDR†			
			IC	MTB	INH-R	RIF-R
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Korejská izolace	+	+	-	-
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB L511P)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB Q513K)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB Q513L)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB Q513P)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB 3 amino odstranění kyseliny v 513~516)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB D516V)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB D516Y)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S522L)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
10	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S522Q)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526C)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526D)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526L)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526N)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
15	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526R)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526Y)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S531L)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
18	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S531W)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
19	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB L533P)	Jihoafrická izolace	+	+	-	+
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315T(ACC))	Jihoafrická izolace	+	+	+	-

				MTB/MDR†			
				IC	MTB	INH-R	RIF-R
21	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315T(ACA))	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315N)	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315I)	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor inhA -15T)	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor inhA -8A)	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
26	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor inhA -8C)	Jihoafriká izolace		+	+	+	-
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA A90V)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA S91P)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94A)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
30	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94G)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94H)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
32	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94N)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94Y)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1401G)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
35	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1402T)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
36	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1484T)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
37	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor eis -37T)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
38	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor eis -14T)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
39	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (promotor eis -10A)	Jihoafriká izolace		+	+	-	-
40	<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC	19977D-5	+	-	-	-
41	<i>Mycobacterium asiaticum</i>	KCTC	9503	+	-	-	-
42	<i>Mycobacterium avium</i> (Chester)	ATCC	700735	+	-	-	-
43	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC	25291	+	-	-	-
44	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC	19698	+	-	-	-
45	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC	49884	+	-	-	-
46	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>suis</i>	ATCC	19978	+	-	-	-
47	<i>Mycobacterium celatum</i>	ATCC	51131	+	-	-	-
48	<i>Mycobacterium chelonae</i>	KCTC	9505	+	-	-	-
49	<i>Mycobacterium fallax</i>	KCTC	9508	+	-	-	-
50	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC	43266	+	-	-	-

				MTB/MDR†			
				IC	MTB	INH-R	RIF-R
51	<i>Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum</i>	KCTC	1122	+	-	-	-
52	<i>Mycobacterium fortuitum subsp. thermophilum</i>	ATCC	27408	+	-	-	-
53	<i>Mycobacterium gastri</i>	ATCC	25162	+	-	-	-
54	<i>Mycobacterium goodii</i>	KCTC	9513	+	-	-	-
55	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC	25122	+	-	-	-
56	<i>Mycobacterium kansasii</i>	KCTC	9515	+	-	-	-
57	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	ATCC	51988	+	-	-	-
58	<i>Mycobacterium malmoense</i>	ATCC	29571	+	-	-	-
59	<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC	BAA535D-5	+	-	-	-
60	<i>Mycobacterium massiliense</i>	KCTC	19086	+	-	-	-
61	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	KCTC	9516	+	-	-	-
62	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	KCTC	19088	+	-	-	-
63	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	KCTC	19096	+	-	-	-
64	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC	25265	+	-	-	-
65	<i>Mycobacterium phlei</i>	KCTC	9087	+	-	-	-
66	<i>Mycobacterium porcinum</i>	KCTC	9517	+	-	-	-
67	<i>Mycobacterium seoulense</i>	KCTC	19146	+	-	-	-
68	<i>Mycobacterium simiae</i>	ATCC	BAA-1478	+	-	-	-
69	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC	9108	+	-	-	-
70	<i>Mycobacterium szulgai</i>	KCTC	9520	+	-	-	-
71	<i>Mycobacterium terrae</i>	KCTC	9614	+	-	-	-
72	<i>Mycobacterium triviale</i>	ATCC	23292	+	-	-	-
73	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	ATCC	33728	+	-	-	-
74	<i>Mycobacterium vaccae</i>	KCTC	19087	+	-	-	-
75	<i>Arthrobacter oxydans</i>	KCTC	3383	+	-	-	-
76	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	KCTC	9905	+	-	-	-
77	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	KCTC	3432	+	-	-	-
78	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	KCTC	9098	+	-	-	-
79	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	KCTC	3075	+	-	-	-
80	<i>Corynebacterium durum</i>	KCTC	19318	+	-	-	-

				MTB/MDR†			
				IC	MTB	INH-R	RIF-R
81	<i>Corynebacterium flavescent</i>	KCTC	3414	+	-	-	-
82	<i>Corynebacterium genitalium</i>	ATCC	33030	+	-	-	-
83	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	KCTC	1854	+	-	-	-
84	<i>Corynebacterium imitans</i>	ATCC	700354	+	-	-	-
85	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	KCCM	41661	+	-	-	-
86	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	ATCC	10700	+	-	-	-
87	<i>Corynebacterium striatum</i>	ATCC	43751	+	-	-	-
88	<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>	ATCC	35692	+	-	-	-
89	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	ATCC	51799	+	-	-	-
90	<i>Corynebacterium xerosis</i>	KCTC	3435	+	-	-	-
91	<i>Dietzia</i> sp.	KCTC	19232	+	-	-	-
92	<i>Gordonia bronchialis</i>	KCTC	3076	+	-	-	-
93	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	ATCC	BAA-14	+	-	-	-
94	<i>Gordonia rubripertincta</i>	ATCC	27864	+	-	-	-
95	<i>Gordonia sputi</i>	KCTC	3436	+	-	-	-
96	<i>Nocardia abscessus</i>	ATCC	23824	+	-	-	-
97	<i>Nocardia asteroides</i>	KCTC	9956	+	-	-	-
98	<i>Nocardia blacklockiae</i>	ATCC	BAA-1635	+	-	-	-
99	<i>Nocardia brasiliensis</i>	KCTC	9136	+	-	-	-
100	<i>Nocardia farcinica</i>	KCTC	9958	+	-	-	-
101	<i>Nocardia nova</i>	ATCC	33727	+	-	-	-
102	<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	ATCC	51512	+	-	-	-
103	<i>Nocardia transvalensis</i>	ATCC	29982	+	-	-	-
104	<i>Nocardia wallacei</i>	ATCC	BAA-1636	+	-	-	-
105	<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC	1298	+	-	-	-
106	<i>Candida albicans</i>	ATCC	7965	+	-	-	-
107	<i>Escherichia coli</i>	KCCM	11591	+	-	-	-
108	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	51299	+	-	-	-
109	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	51559	+	-	-	-
110	<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC	700724D-5	+	-	-	-

				MTB/MDR†			
				IC	MTB	INH-R	RIF-R
111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC	47085D	+	-	-	-
112	<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC	19319	+	-	-	-
113	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC	BAA-255D	+	-	-	-
114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCCM	40890	+	-	-	-
115	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM	40881	+	-	-	-
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCCM	35494	+	-	-	-
117	<i>Streptococcus pyogenes</i>	KCCM	40411	+	-	-	-
118	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC	3556	+	-	-	-
119	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC	700532D	+	-	-	-
120	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC	BAA-589D	+	-	-	-
121	<i>Legionella pneumophila</i>	KCCM	41783	+	-	-	-
122	Lidská genomová DNA (500 ng)	Biochain	D1234275	+	-	-	-

† Pro prokázání reprodukovatelnosti výsledků byl experiment třikrát opakován.

2. Citlivost

Ke stanovení citlivosti Anyplex™ II MTB/MDR Detection byl test proveden s klonovanou DNA v koncentracích ¹⁰⁶, ¹⁰⁴, ¹⁰², 50, 20 a 10 kopií/reakci. Mez detekce byla 20 kopií/reakce.

	Související gen	Cíl mutace	Koncentrace (kopie/reakce)						
			10 ⁶	10 ⁴	10 ²	50	20	10	NC
MTB		-	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
RIF-R	<i>rpoB</i>	L511P	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		Q513K	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		Q513L	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		Q513P	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		513del	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		D516V	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
		D516Y	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
		S522L	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3
		S522Q	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		H526C	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		H526D	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		H526L	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
		H526N	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		H526R	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		H526Y	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
		S531L	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		S531W	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		L533P	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3
INH-R	<i>katG</i>	S315N	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		S315I	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		S315T(ACC)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		S315T(ACA)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	<i>inhA</i> promotor	-15T	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		-8A	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
		-8C	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3

Ve všech reakcích byla detekována vnitřní kontrola (IC).

3. Reprodukovatelnost

Test reprodukovatelnosti byl proveden ve 3 různých časech v průběhu 10 dnů 3 různými technikami. V každém testu byly získány stejné výsledky, což potvrzuje reprodukovatelnost Anyplex™ II MTB/MDR Detection,

Technik	Čas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> s rezistencí na všechny cílové léky	Negativní klinický vzorek	Pozitiv. kontrola	Negativní kontrola
A	Den 1	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 5	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 10	2/2	0/2	2/2	0/2
B	Den 1	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 5	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 10	2/2	0/2	2/2	0/2
C	Den 1	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 5	2/2	0/2	2/2	0/2
	Den 10	2/2	0/2	2/2	0/2

4. Interference

Bylo jasně prokázáno, že výsledky Anyplex™ II MTB/MDR Detection nebyly nijak ovlivněny.

LITERATURA

1. Chun, J. Y., Kim, K. J., Hwang, I. T., Kim, Y. J., Lee, D. H., and Lee, I. K. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene] *Nucleic Acids Res.* (2007) 35: e40
2. Da Silva, P. E. A. and Palomino, J. C. [Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs] *J. Antimicrob. Chemother.* (2011) 66: 1417-1430
3. Georghiou, S. B., Magana, M., Garfein, R. S., Catanzaro, D. G., Catanzaro, A., and Rodwell, T. C. [Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review] *PLoS ONE* (2012) 7(3): e33275
4. Gikalo, M. B., Nosoca, E. Y., Krylova, L. Y., Moroz, A. M. [The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region] *J. Antimicrob. Chemother.* (2012) 67(9): 2017-2109
5. Johnson, R., Streicher, E. M., Louw, G. E., Warren, R. M., van Helden, P. D., and Victor, T. C. [Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] *Curr. Issues Mol. Biol.* (2006) 8(2): 97-111
6. Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. [Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*] *Antimicrob. Agents Chemother.* (2005) 49(8): 3192-3197
7. Medappa, N. and Srivastava, V. K. [What is new in the diagnosis of tuberculosis?] *ICMR Bulletin* (2002) 32
8. Merza, M. and Masjedi, M. R. [Extensively drug resistant tuberculosis (XDR) and extremely drug resistant tuberculosis (XXDR): risk factors and molecular perspectives] *Iranian J. Clin. Infect. Dis.* (2010) 5(3): 174-188
9. Migliori, G. B., Dheda, K., Centis, R., Mwaba, P., Bates, M., O'Grady, J., Hoelscher, M., and Zumla, A. [Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa] *Trop. Med. Int. Health* (2010) 15(9): 1052-1066
10. Qi, Y. C., Ma, M. J., Li, D. J., Chen, M. J., Lu, Q. B., Li, X. J., Li, J. L., Liu, W., and Cao, W. C. [Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in multi-ethnic region, Xinjiang Uygur Autonomous region, China] *PLoS ONE* (2012) 7(2): e32103
11. Santos, L. C. [Review: the molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] *J. Med. Microbiol.* (2012) 2(1): 24-36
12. Yuan, X., Zhang, T., Kawakami, K., Zhu, J., Li, H., Lei, J., and Tu, S. [Molecular characterization of multidrug and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China] *J. Clin. Microbiol.* (2012) 50(7): 2403-2413
13. World Health Organization. [Global tuberculosis control] WHO Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.16
14. World Health Organization. [Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015] WHO Progress Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.3

VÝZNAM SYMBOLŮ

Význam symbolů použitých v Návodu k použití a na štítcích produktu.

Symbol	Význam
	Prostředek pro zdravotnickou diagnostiku In vitro
	Číslo šarže
	Katalogové číslo
	Datum spotřeby
	Horní teplotní limit
	Upozornění
	Směs oligonukleotidů pro amplifikaci a detekci
	PCR Master Mix nebo Detection Mix
	RNase free water
	Roztok pro extrakci DNA
	Pozitivní kontrola (PC)
	Kontrola typu Wild (WTC)
	Výrobce
	Datum výroby
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství
	Přečtěte si návod k použití
	Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Jedinečný identifikátor zařízení

INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ

Kat. č.	Produkt	Velikost
Anyplex™ TB series		
TB7200X	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)	100 rxns
TB7202Y	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	50 rxns
TB7202X	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	100 rxns*
TB7203Y	Anyplex™ MTB/NTM Combi	50 rxns
TB7203X	Anyplex™ MTB/NTM Combi	100 rxns*
* Pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet.		
Allplex™ TB series		
TB10173Y	Detekce Allplex™ MTB/MDR/XDRe	50 reakcí
TB10174X	Detekce Allplex™ MTB/MDR/XDRe	100 reakcí *
TB9400Y	Detekce Allplex™ MTB/MDRe	50 reakcí
TB9400X	Detekce Allplex™ MTB/MDRe	100 reakcí *
TB9500Y	Detekce Allplex™ MTB/XDRe	50 reakcí
TB9500X	Detekce Allplex™ MTB/XDRe	100 reakcí *
* Pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet.		
Anyplex™ II TB series		
TB7500Y	Detekce MTB/MDR/XDR pomocí Anyplex™ II	50 reakcí
TB7301Y	Anyplex™ II Detekce MTB/MDR	50 reakcí
TB7302Y	Detekce MTB/XDR Anyplex™ II	50 reakcí
Seeplex® TB series		
TB2110Y	Seeplex® MTB Nested ACE Detection (V2.3)	50 reakcí

Automatizované extrakční systémy

65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	Univerzální sada kazet STARMag 96 X 4	384T / 1box