

Anyplex™

MTB/NTM

Real-time detekce (V2.0)

(kat. č. TB7200X)

Souprava pro multiplexní Real-time PCR analýzu k detekci *Mycobacterium tuberculosis* a netuberkulózních mykobakterií.

Pro použití s

1. Microlab NIMBUS IVD a Microlab STARlet IVD
2. Seegene NIMBUS a Seegene STARlet

Souprava je určena pro použití v přístroji

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)
2. CFX96™ Dx System (software CFX Manager™ Dx v3.1)
3. 7500 Real-time PCR System, Software v2.0.5 (Life Technologies)



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
PRINCIP METODY A SCHÉMA POSTUPU	5
ZÁKLADNÍ INFORMACE	7
REAGENCIE	8
SKLADOVÁNÍ PRODUKTU, ZACHÁZENÍ S PRODUKTEM	9
POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ	9
PROTOKOL	10
NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO REAL-TIME PCR, ANALÝZA VÝSLEDKŮ	17
CFX96™ Real- PCR Detection System (Bio-Rad)	17
CFX96™ Dx System (Bio-Rad)	27
7500 Real-time PCR System, Software v2.0.5 (LifeTechnologies)	37
VÝSLEDKY	42
ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	48
CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI	49
LITERATURA	52
VÝZNAM SYMBOLŮ	53
INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ	54

UPOZORNĚNÍ

- Pouze pro diagnostiku in vitro.
- Spolehlivost výsledků závisí na správném provedení odběru vzorku, jeho vhodném skladování, přepravě a zpracování.
- **Tento produkt je určen pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet maximálně 5 samostatných běhů.**
- **Tento test byl validován pro následující typy vzorků: sputum, kultivace, čerstvá tkáň a bronchiální výplach.** Test nebyl validován pro žádné jiné typy vzorků.
- **Před zpracováním musí být vzorky DNA uchovávány při teplotě ≤ -20 °C, během zpracování musí být uloženy na ledu.**
- Citlivost testu může být snížena u opakovaně zmrazovaných a rozmrazovaných vzorků nebo u vzorků skladovaných po delší dobu.
- Pracovní postup v laboratoři musí probíhat vždy jednosměrně.
- Ve všech pracovních prostorech používejte vždy jednorázové rukavice, před vstupem do jiného pracovního prostoru rukavice vždy vyměňte. Dojde-li ke kontaminaci rukavic, neprodleně je vyměňte, nebo ošetřete vhodným dekontaminačním prostředkem (na dekontaminaci DNA).
- Materiál a používané prostředky vyhradte vždy pro jednotlivé oddělené pracovní prostory a nepřemísťujte je z jednoho prostoru do druhého.
- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensy používejte jednorázové bezprašné rukavice, laboratorní pláště a ochranné brýle. Po manipulaci se vzorky a reagensy si důkladně umyjte ruce.
- Při odebrání alikvotních částí z lahvíček s reagensy zabraňte jejich kontaminaci. Doporučujeme používat sterilní jednorázové špičky na pipety.
- Nemíchejte reagenty z různých šarží ani z různých lahvíček stejné šarže.
- Nepoužívejte výrobek po uplynutí doby použitelnosti.
- Veškeré jednorázové prostředky jsou určeny k jednorázovému použití. Nepoužívejte je opakovaně.
- Používejte zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zabraňte případnému rozstříku nebo křížové kontaminaci vzorků během přípravy.
- Dbejte, aby nedošlo ke kontaminaci reagentů s izolovanými nukleovými kyselinami, produkty PCR nebo pozitivní kontrolou. Jako prevenci kontaminace reagentů, doporučujeme používat špičky s filtrem.
- Pro každé měření používejte oddělené a izolované pracovní prostory.

- Reakční zkušavky a stripy zkumavek po amplifikaci otevírejte pouze na k tomu určeném místě, zamezte tak kontaminaci amplikonem.
- Pozitivní materiály skladujte odděleně od soupravy reagensů.
- Při práci se vzorky je nezbytné postupovat v souladu s Bezpečnostními pokyny a postupy laboratoře (viz Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích a dokumenty CLSI). Pečlivě vyčistěte a vydezinfikujte všechny pracovní povrchy pomocí 0,5 % roztoku chlornanu sodného (v deionizované nebo destilované vodě). Komponenty produktu (zbytky produktu, obaly) jsou považovány za laboratorní odpad. Nepoužité reagensie a zbytky reagensů likvidujte v souladu s pokyny příslušných mezinárodních, národních a místních předpisů a nařízení.
- Doba použitelnosti je 12 měsíců při teplotě $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ od data výroby. Informace o konečném datu expirace naleznete na štítku.
- Seegene NIMBUS a Seegene STARlet jsou stejná zařízení jako Microlab NIMBUS IVD a Microlab STARlet IVD, i když výrobce je jiný. Vzhledem k tomu, že na zařízení nedošlo k žádným hardwarovým změnám, jsou výsledky testů stejné.
- 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, budou výsledky obou systémů stejné.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" je aktualizovaná verze softwaru "CFX Manager™ Software-IVD v1.6". Aktualizovaný software obsahuje vylepšení nabídky "Spustit". Tyto aktualizace nijak neovlivňují výsledky analýzy dat; výsledky tedy budou stejné.
- Tato souprava je určena jako pomůcka při diferenciální diagnostice infekcí cílovými patogeny; *Mycobacterium tuberculosis* a netuberkulózní mykobakterie.

ÚČEL POUŽITÍ

Analýza Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) je kvalitativní in vitro test určený k detekci *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a netuberkulózních mykobakterií (NTM) ze sputa, kultivace (pevné kultury a tekuté kultury), čerstvé tkáně a bronchiálního výplachu symptomatických pacientů.

Analýza Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) nerozlišuje mezi jednotlivými členy skupiny *M. tuberculosis* complex, tj. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* a *M. pinnipedii*.

PRINCIP METODY A SCHÉMA POSTUPU

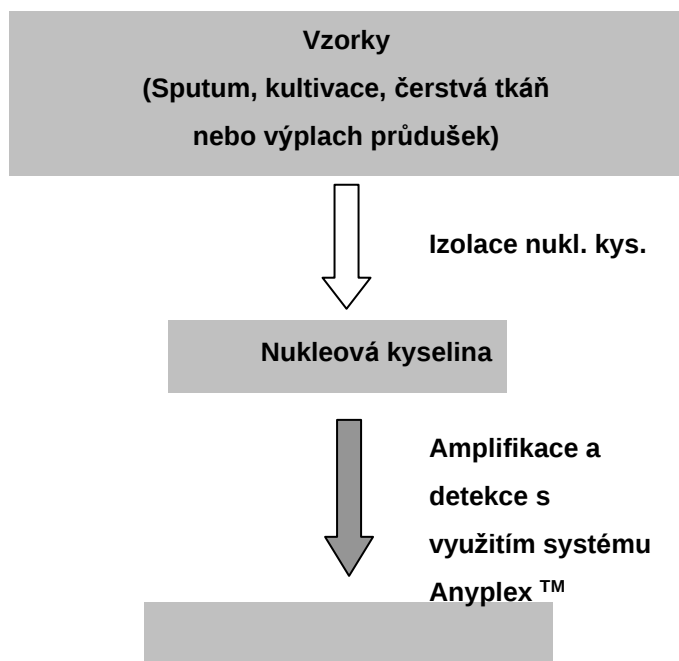
1. Princip

Technika amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) je vysoce citlivá a specifická. Společnost Seegene vyvinula patentovanou technologii oligo nazvanou "Dual Priming Oligonucleotide (DPO™)", která poskytuje volnost při navrhování primerů a optimalizaci PCR a maximalizuje specifičnost a citlivost PCR tím, že zásadním způsobem blokuje nespecifický priming. Anyplex™ MTB/NTM real-time detekce (V2.0) je založena na dvou hlavních procesech: izolaci nukleové kyseliny a PCR amplifikaci cílové nukleové kyseliny pomocí DPO primerů za použití soupravy pro real-time PCR. Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) je multiplexní analýza real-time PCR, která umožňuje amplifikaci cílových nukleových kyselin *M. tuberculosis* (MTB), mykobakterií a vnitřní kontroly (IC).

Vnitřní kontrola se přidává do Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) k identifikaci zpracovaných vzorků obsahujících látky, které mohou interferovat s amplifikací PCR. Vnitřní kontrola je plasmid DNA. Tyto vlastnosti jsou vybrány tak, aby byla zajištěna rovnocenná amplifikace vnitřní kontroly, cílové DNA MTB a mykobakterií. Vnitřní kontrola se zavádí do každé amplifikační reakce a koamplifikuje se s cílovou DNA z klinického vzorku.

K zamezení amplifikace produktů, které by mohly působit jako potenciální kontaminanty, je v soupravě Allplex™ STI Essential Assay využit systém Uracil-DNA glycosylase (UDG). Přirozenou funkcí UDG je prevence mutagenese eliminací uracilu z DNA molekul rozštěpením N-glykosidové vazby a iniciací opravy základní excize (BER). Tato vlastnost je důvodem využití UDG k zamezení křížové kontaminaci vzorků ampikonem.

2. Schéma postupu



ZÁKLADNÍ INFORMACE

Rychlá a přesná diagnostika symptomatických pacientů je základem globálních strategií pro kontrolu tuberkulózy (TBC). Výhody a omezení jednotlivých dostupných metod diagnostiky TBC jsou zřejmé a dosud není k dispozici žádný test, který by splňoval cílovou specifitu. Kvalita výsledků testů u stávajících metod navíc závisí na dostupnosti dostatečných lidských a finančních zdrojů, školení laboratorního personálu a sledování efektivity.

Aktivní tuberkulóza se v současné době diagnostikuje pomocí různých technik, symptomů a klinických příznaků. Mezi tyto techniky patří rentgenové vyšetření, mikroskopie (po obarvení AFB), kultivace a molekulární diagnostika. V dnešní době je nejlepší technikou kultivace. Přestože současné techniky mohou podstatně zkrátit potřebný čas, lékař plánující léčbu pacienta s podezřením na tuberkulózu tyto diagnostické informace potřebuje velmi rychle. V minulosti bylo zpoždění při získávání těchto informací považováno za přijatelné. To však již neplatí. Rychlý vývoj onemocnění u osob nakažených virem HIV a neustálý výskyt onemocnění rezistentních vůči lékům podtrhují potřebu nových rychlých a citlivých diagnostických postupů.

REAGENCIE

Reagencie obsažené v jedné sadě vystačí na 100 reakcí.

Objednací číslo soupravy (**REF** **TB7200X**)

Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)			
Symbol	Obsah	Objem	Popis
PRIMER	10X MTB/NTM OM	200 µl	Oligo Mix (OM): ➤ reagencie pro amplifikaci a detekci ➤ šablona vnitřní kontroly
PREMIX	EM3	1 000 µl	➤ DNA polymeráza ➤ Uracil-DNA glykosyláza (UDG) ➤ pufr s dNTP
CONTROL +	MTB/NTM PC	50 µl	pozitivní kontrola (PC): ➤ směs klonů patogenu a IC
WATER	RNase-free Water	1 000 µl	ultračistá kvalita, stupeň PCR
DNA ES	Roztok pro extrakci DNA	10 ml X 2	reagencie pro izolaci bakteriální DNA
	Návod k použití		

SKLADOVÁNÍ PRODUKTU, ZACHÁZENÍ S PRODUKTEM

Všechny komponenty Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) je třeba skladovat při $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Všechny složky jsou za doporučených skladovacích podmínek stabilní až do data expirace uvedeného na etiketě. Účinnost složek soupravy není ovlivněna až 5 zmrazeními a rozmrazeními. Pokud budou reagenty používány pouze občasně, je vhodné je uskladnit po aliquótních částech.

POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ

- NALC-NaOH (0,5 % NALC, 2 % NaOH, 1,47 % citronan trisodný) nebo 4 % NaOH (1N NaOH).
- 1X roztok PBS
- Jednorázové bezprašné rukavice (latexové nebo nitrilové)
- Pipety (nastavitelné) a sterilní špičky na pipety
- 1,5ml zkumavky do mikrocetrifugy
- Výrobník ledu
- Vařič
- Stolní centrifuga
- Vortex
- Čistá lavice
- CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Stripy 8 zkumavek s nízkým profilem o objemu 0,2 ml bez víček (bílá barva, kat. č. TLS0851, Bio-Rad)
- Stripy 8 víček s opticky rovnou plochou (kat. č. TCS0803, Bio-Rad)
- EU 0,1 ml, tenkostěnný strip, 8 zkumavek, bílý (kat. č. B77009; BIOplastics)
- Strip EU 8 víček s opticky širokou plochou (kat. č. B79501; BIOplastics)
- 7500 Real-time PCR System, Software v2.0.5 (Life Technologies)
- MicroAmp® Optical 8-Tube Strip (0,2 ml) (č. dílu 4316567, Life Technologies)
- MicroAmp® Optical 8-Cap Strip (č. dílu 4323032, Life Technologies)

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

Poznámka: Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Je povoleno zpracovávat pouze ty vzorky, které byly odebrány, skladovány a přepravovány za přísného dodržování následujících pravidel a pokynů.

Poznámka: Pro zajištění vysoké kvality vzorků musí být vzorky přepravovány co nejrychleji. Vzorky je třeba přepravovat při teplotách uvedených níže.

A. Odběr vzorků**Sputum**

- Při odběru vzorků sputa dávejte pacienty jasně instruujte. Pacienti musí odebírat vzorky buď venku na čerstvém vzduchu, nebo mimo dosah dalších osob. Je třeba, aby pacienti neodebírali vzorky v uzavřených prostorách, jako jsou toalety.
- Před odběrem sputa vypláchněte ústa vodou. Je třeba, aby pacient hluboce zakašlal a vykašlal sputum přímo do nádoby.
- Vzorek sputa musí mít objem 3–5 ml.

Pevná kultura (Ogawa)

- Vzorky lze testovat od objevení růstu 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 zkoumají pomocí UV lampy každý den. Je sledováno, zda se na dně zkumavky odráží jasně oranžová fluorescence na menisku. Při pozitivním signálu fluorescence ze dna zkumavky pipetou odeberte 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 vzorek stále vlhký. Až do přepravy uchovávejte v chladu.

Bronchiální výplach

- Bronchiální výplach lékař asepticky odebere do sterilní nádoby pomocí aspirační techniky nebo chirurgických postupů.

B. Skladování a přeprava vzorků

Vzorek	Skladování a přeprava		
	Teplota	Doba *	
Sputum	2~8°C	3 dny	- Účinnost může být ovlivněna delším skladováním vzorků. Při přepravě vzorků je nutné postupovat v souladu s místními a národními předpisy a nařízeními, týkajícími se přepravy patogenních materiálů.
Pevná kultura (Ogawa)			
Tekutá kultura (MGIT)			
Čerstvá tkáň			
Bronchiální výplach			

* Doba: Doba od odběru vzorku do jeho zpracování včetně přepravy a skladování.

2. Příprava vzorku**Sputum****1) Pro manuální izolaci nukleové kyseliny**

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

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 odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Odstraňte supernatant, přidejte 1 ml 1X roztoku PBS a dobře promíchejte.
- Odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a pipetou odstraňte supernatant.
- Přidejte 1 ml 1X roztoku PBS a dobře promíchejte.
- Odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut a pipetou odstraňte supernatant.

2) Pro automatizovanou izolaci nukleové kyseliny

- Přidejte stejný objem NALC-NaOH (0,5 % NALC, 2 % NaOH a 1,47 % citrátu trisodného) ke vzorku v nádobce na sputum a 1 minutu vortexujte.
- Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
- Přeneste 1 ml do nové sterilní zkumavky a odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Odstraňte supernatant, přidejte 300 µl lyzačního pufru z univerzální sady k peletě a dobře promíchejte.
- Uzavřete uzávěr zkumavky pomocí uzávěru a vařte 5 minut na vařiči.

Čerstvá tkáň

- Vzorek tkáně rozřízněte nebo rozmělněte ve sterilní nádobě.
- Suspendujte v 1 ml 1X roztoku PBS.
- Odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut. Pipetou odstraňte supernatant.

Bronchiální výplach

- Bez přidání NALC-NaOH odstředějte 1,5 ml vzorku při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Odstraňte supernatant, přidejte 1 ml 1X roztoku PBS a dobře promíchejte.
- Odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut. Pipetou odstraňte supernatant.

3 Izolace nukleové kyseliny**A. Manuální soupravy pro izolaci nukleových kyselin**

Roztok pro izolaci DNA je součástí sady Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0).

Všechny vzorky kromě vzorků kultur

- (volitelně) K připravenému sedimentu přidejte 1 ml sterilní vody, odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min) po dobu 5 minut. Pipetou odstraňte supernatant.
- Přidejte 100 µl roztoku pro izolaci DNA do sedimentu a 30 sekund vortexujte.
- Uzavřete zkumavku pomocí víčka a vařte na vařiči při 100 °C po dobu 20 minut.
- Odstředějte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako PCR templát použijte 5 µl supernatantu.

Pevná kultura (Ogawa)

- Suspendujte kolonii ve 200 µl roztoku pro extrakci DNA v 1,5 ml zkumavce do mikrocentrifugy.
- Vortexujte 30 sekund.
- Uzavřete zkumavku pomocí víčka a vařte na vařiči při 100 °C po dobu 20 minut.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako PCR templát použijte 5 µl supernatantu.

Tekutá kultura (MGIT)

- Přeneste 0,5 ml kultury na dně 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 k peletě 200 µl roztoku pro extrakci DNA.
- Vortexujte 30 sekund.
- Uzavřete uzávěr zkumavky pomocí uzávěru a vařte při 100 °C po dobu 20 minut na vařiči.
- Odstřed'ujte při 15 000 x g (13 000 ot./min.) po dobu 5 minut.
- Jako PCR templát použijte 5 µl supernatantu.

B. Automatizovaná izolace nukleové kyseliny

Poznámka: Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet byly validovány pouze pro sputum.

Poznámka: Použijte doporučené objemy vzorků a roztoků eluce, jak je uvedeno níže. U všech ostatních se řiďte protokolem výrobce.

B-1. Microlab NIMBUS IVD

Poznámka: Postupujte podle operačního manuálu pro Microlab NIMBUS IVD.

Automatický extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
Univerzální kazeta STARMag 96 X 4 Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

* Pokud si přejete zakoupit tento produkt od společnosti Seegene Inc., použijte toto katalogové číslo.

B-2. Microlab STARlet IVD

Poznámka: Postupujte podle operačního manuálu pro Microlab STARlet IVD.

Automatický extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
Univerzální kazeta STARMag 96 X 4 Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

* Pokud chcete tento produkt zakoupit od společnosti Seegene Inc., použijte toto katalogové číslo.

B-3. Seegene NIMBUS

Poznámka: Postupujte podle operačního manuálu pro Seegene NIMBUS.

Automatický extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
Univerzální kazeta STARMag 96 X 4 Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

B-4. Seegene STARlet

Poznámka: Postupujte podle operačního manuálu pro Seegene STARlet.

Automatický extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
Univerzální kazeta STARMag 96 X 4 Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

4. Příprava pro Real-time PCR

Poznámka: Je nutné použít správné typy zkumavek a víček (viz kapitola POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ).

Poznámka: Při přípravě vzorků používejte špičky s filtrem proti aerosolu a přiléhavé rukavice. Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

Poznámka: Reagencie zcela rozmrazte na ledu.

Poznámka: Zkumavky s reagenциemi krátce odstředte, odstraníte tak kapičky z vnitřní strany víčka.

Poznámka: Kroky A~D jsou automaticky zpracovávány na Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet. Viz operační manuál k jednotlivým zařízením.

A. Připravte PCR Mastermix.

2 µL	10X MTB/NTM OM
3 µL	RNase-free Water
10 µl	EM3
15 µl	celkový objem PCR Mastermixu

Poznámka: Celkový potřebný objem jednotlivých reagenциí vypočtete podle počtu reakcí (vzorky a kontroly).

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

C. Přeneste alikvótní částí 15 µl PCR Mastermixu do 0,2ml PCR zkumavek.

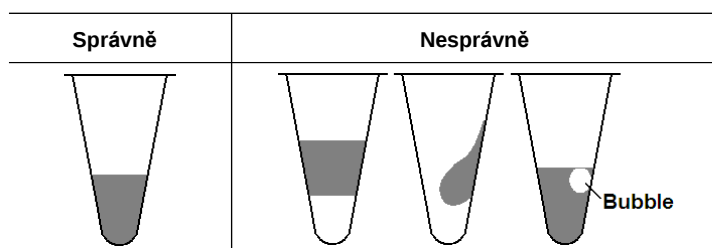
D. Do zkumavek obsahujících PCR Mastermix přidejte 5 µl jednotlivých vzorků nukleové kyseliny.

15 µl	PCR Mastermix
5 µl	nukleová kyselina vzorku
20 µl	celkový objem reakce

E. Uzavřete víčko a PCR zkumavky krátce odstředte.

F. U všech PCR zkumavek se přesvědčte se, že veškerá tekutina obsahující komponenty pro PCR reakci je na dně zkumavky. Pokud ne, znovu odstředte při vyšších otáčkách a po delší dobu.

Poznámka: Před spuštěním PCR reakce musí být PCR zkumavky odstředěny. Tekutina musí být zcela na dně zkumavky a veškeré vzduchové bublinky musí být vypuzeny.



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

Poznámka: Jako **negativní kontrolu (NC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 µl RNasefree Water.

Poznámka: Jako **pozitivní kontrolu (PC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 µl MTB/NTM PC.

Poznámka: Postupujte opatrně tak, aby nedošlo ke křížové kontaminaci PCR Mastermixu a vzorků s pozitivní kontrolou.

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

NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO REAL-TIME PCR A ANALÝZA VÝSLEDKŮ

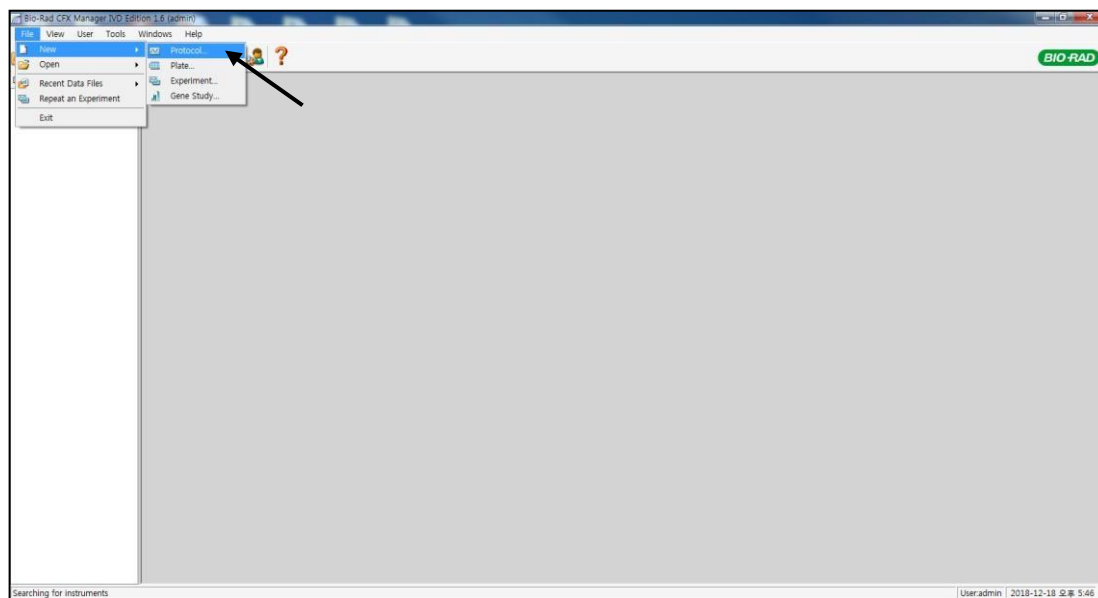
1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Nastavení přístroje RT PCR

Poznámka: Nastavení přístroje CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) pro experiment lze rozdělit do tří kroků: Setup Protocol (nastavení protokolu), Setup Plate (nastavení pláta) a Start Run (spuštění runu).

A. Nastavení protokolu

- 1) V hlavní nabídce zvolte **File** → **New** → **Protocol** a otevřete **Editor protokolu**.

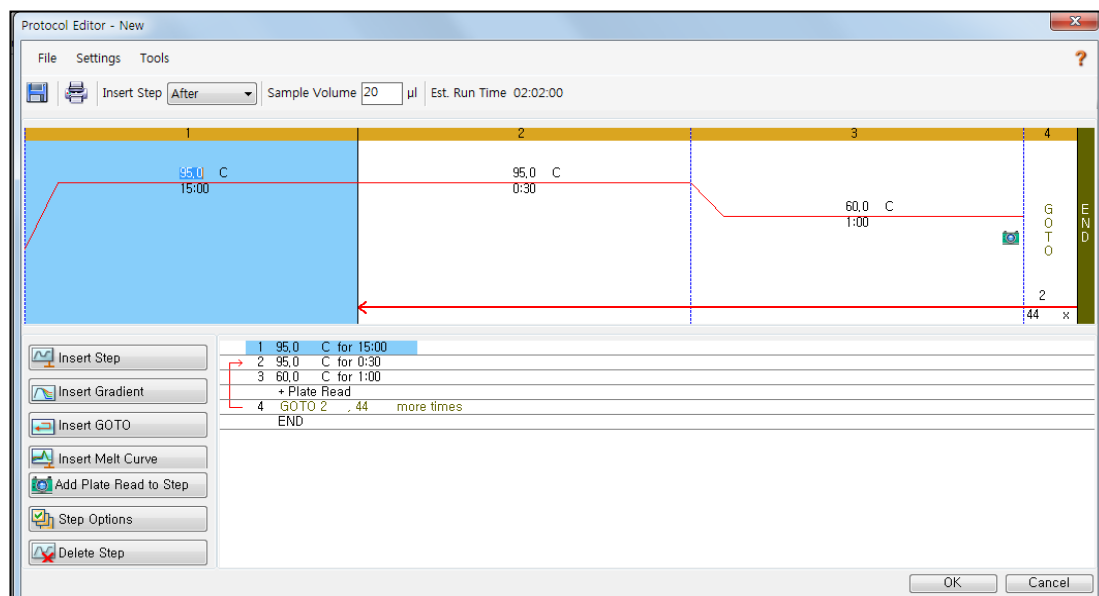


Obr. 1. **Nastavení protokolu** Pro dané měření vytvořte nový nebo načtěte již existující protokol měření.

- 2) V **Protocol Editoru** zadejte teplotní profil podle následující tabulky:

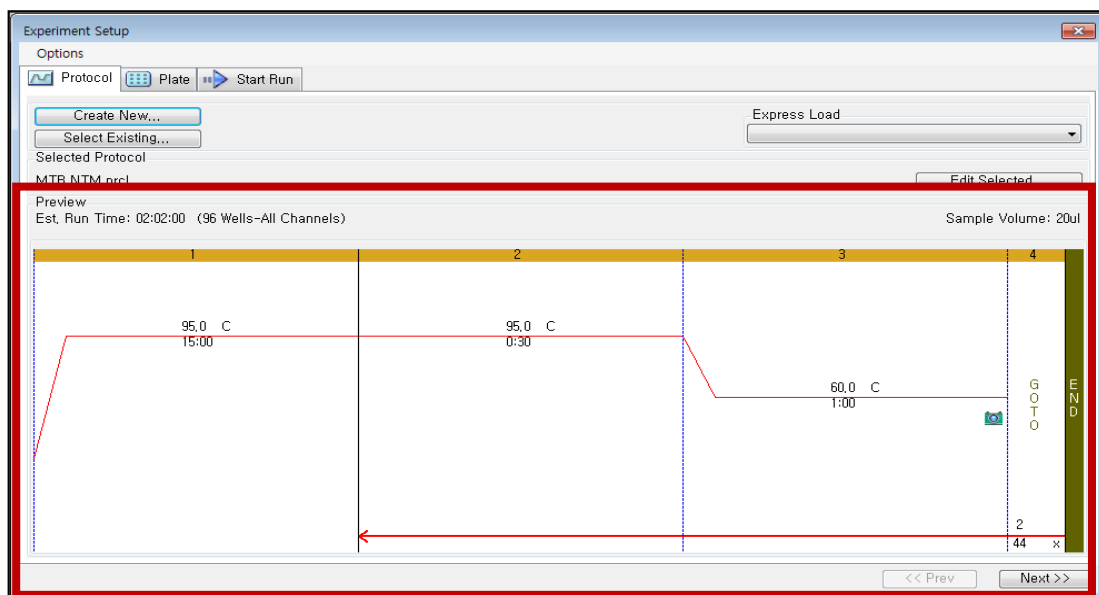
Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	95°C	15 minut
2	45	95°C	30 s
3*		60°C	1 min
4	GOTO Step 2, 44 more times		

* **Plate Read na Step 3.** Fluorescence je detekována při 60 °C.



Obr. 2. Protocol Editor

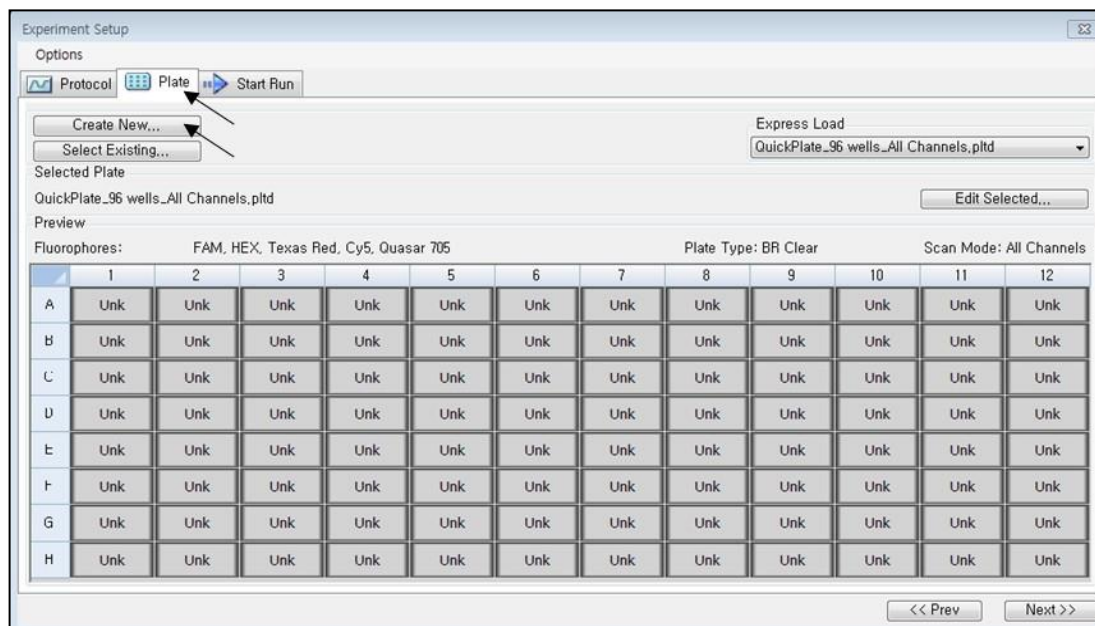
- 3) Klikněte do okénka vedle **Sample Volume (Objem vzorku)** přímo zadejte 20 µl.
- 4) Klikněte na tlačítko **OK**. Tak uložíte protokol a otevře se okno **Experiment Setup**.



Obr. 3. Experiment Setup: Protocol

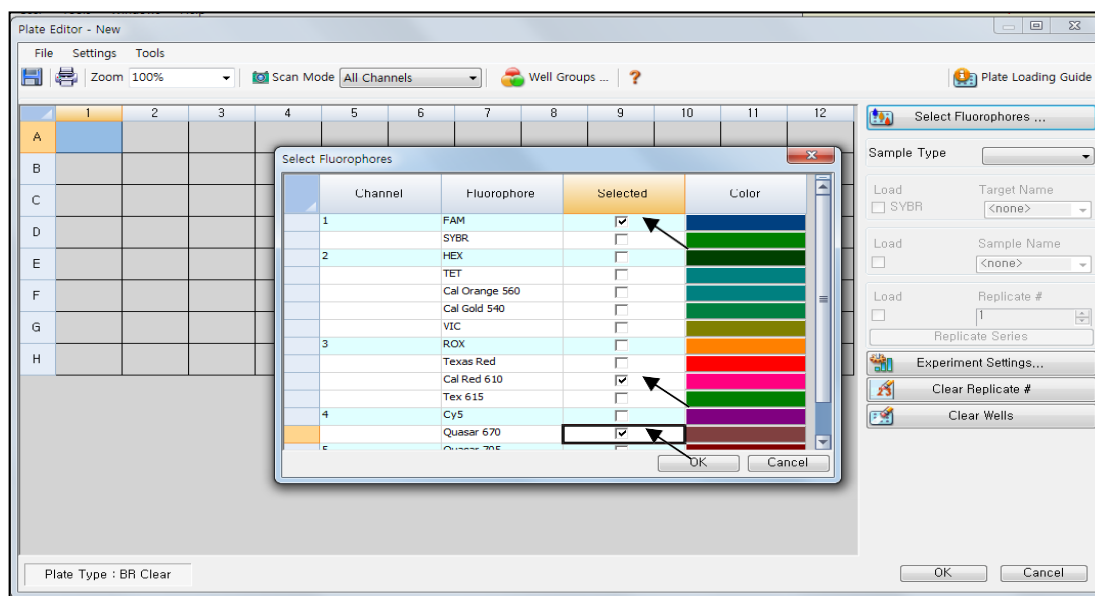
B. Nastavení plata

- 1) Na záložce **Plate** v okně **Experiment Setup** klikněte na tlačítko **Create New**, tím otevřete okno **Plate Editor**.



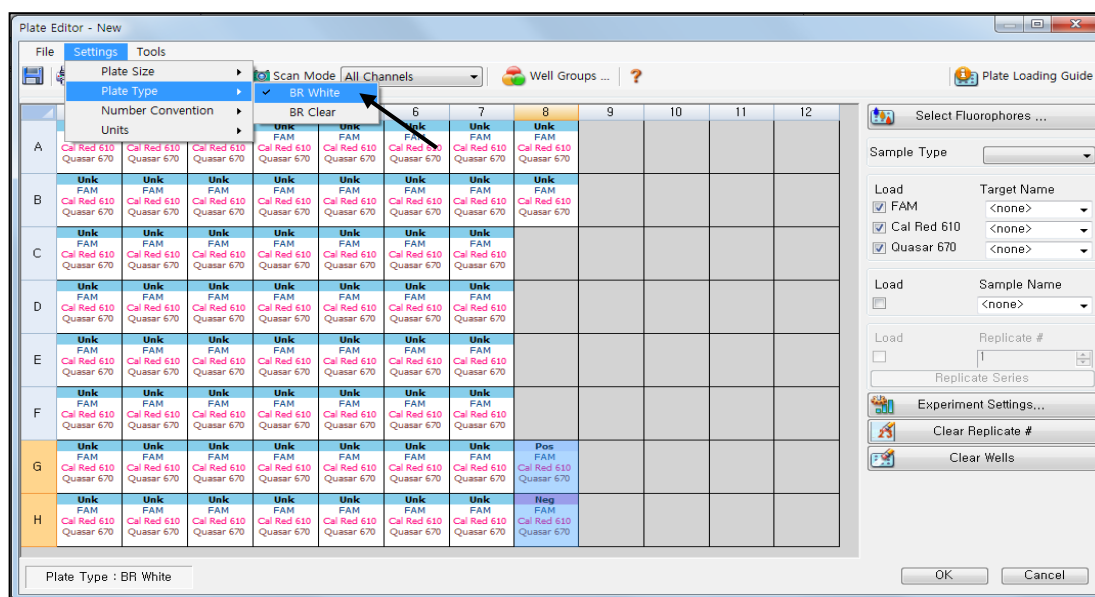
Obr. 4. **Plate Editor**. Zadejte parametry nového plata.

- 2) Klikněte na tlačítko **Select Fluorophores**, v následně otevřeném okně označte fluorofory, které budou při měření použity (**FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670**). Poté klikněte na tlačítko **OK**.



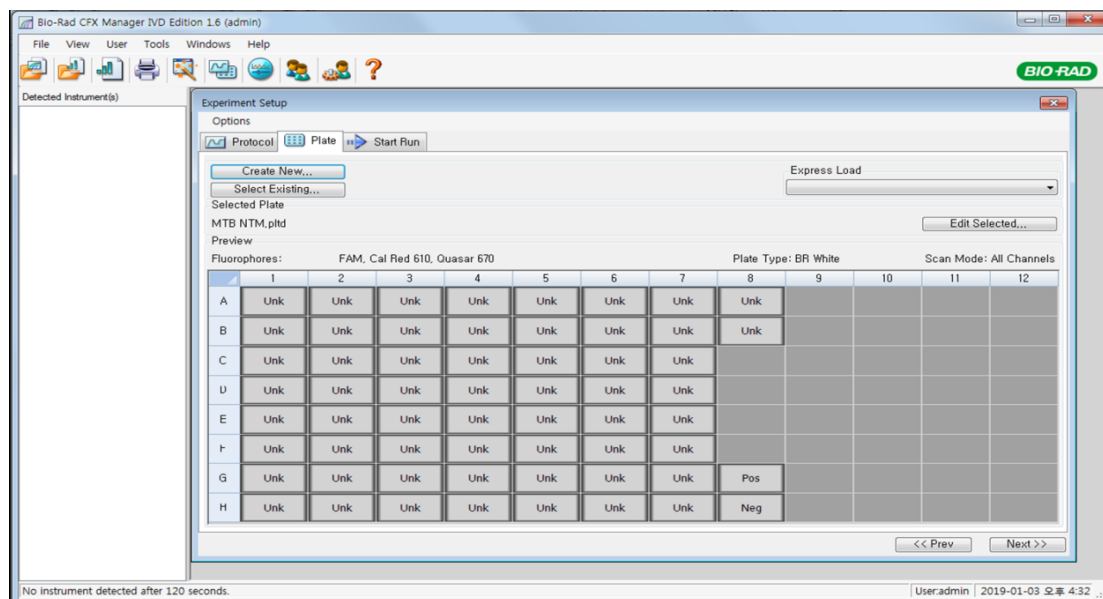
Obr. 5. **Select Fluorophores** (FAM, Cal Red 610 a Quasar 670)

- 3) Vyberte jamky, které mají být změřeny, v roletovém menu Sample Type vyberte typ vzorku v dané jamce.
 - **Unknown:** Klinické vzorky
 - **Negative Control:** negativní kontrola
 - **Positive Control:** pozitivní kontrola
- 4) Kliknutím na odpovídající zaškrťovací okénka (**FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670**) tak pro vybrané jamky provedete výběr měřících kanálů.
- 5) Zadejte Sample Name (název vzorku) a stiskněte Enter.
- 6) V ve volbě Settings hlavního menu Plate Editor zvolte Plate Size (96 wells) a Plate Type (BR White)).



Obr. 6. Plate setup

- 7) Klikněte na tlačítko **OK** a tak uložíte nastavení nového plátu.
- 8) Budete vráceni do okna **Experiment setup**.

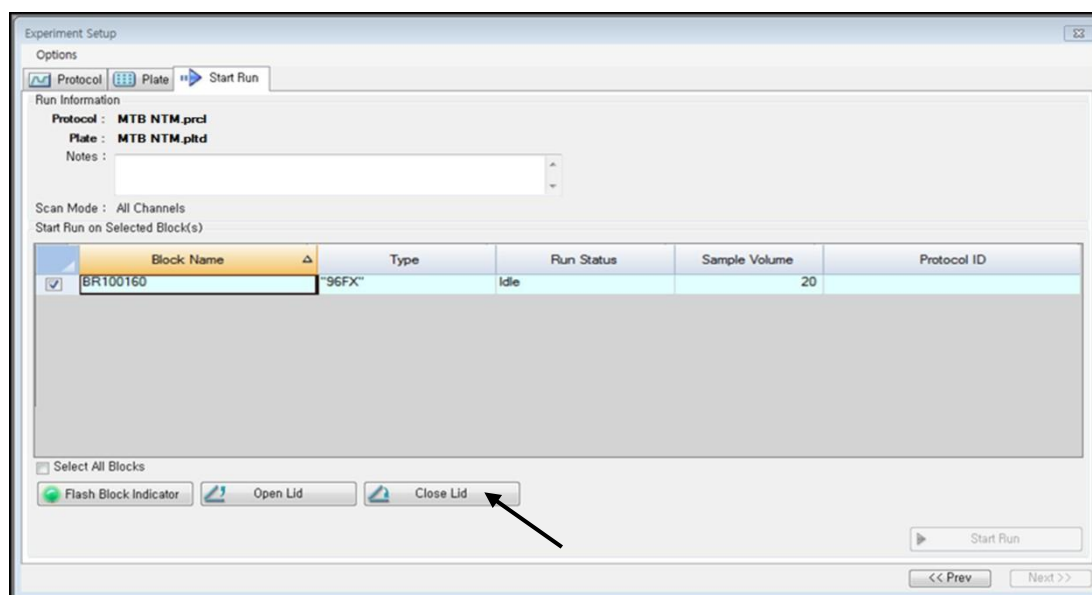


Obr. 7. Experiment Setup: Plate

- 9) Kliknutím na tlačítko **Next** spustíte zařízení

C. Start Run

- 1) Na záložce **Start Run** v okně **Experiment Setup** klikněte na **Close Lid**. Tak dojde k zavření víka přístroje.



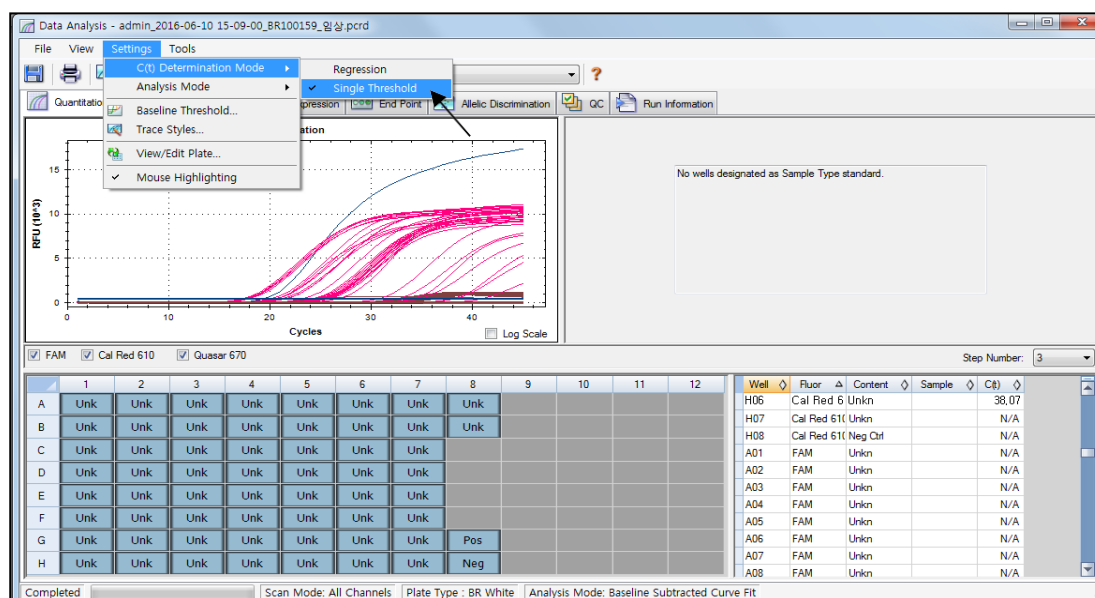
Obr. 8. Close Lid

- 2) Klikněte na **Start Run**.
- 3) Soubor měření uložte buď ve složce My Documents, nebo v jiné, k tomu určené složce. Zadejte jméno souboru, klikněte na tlačítko **SAVE**. Tím dojde ke spuštění runu.

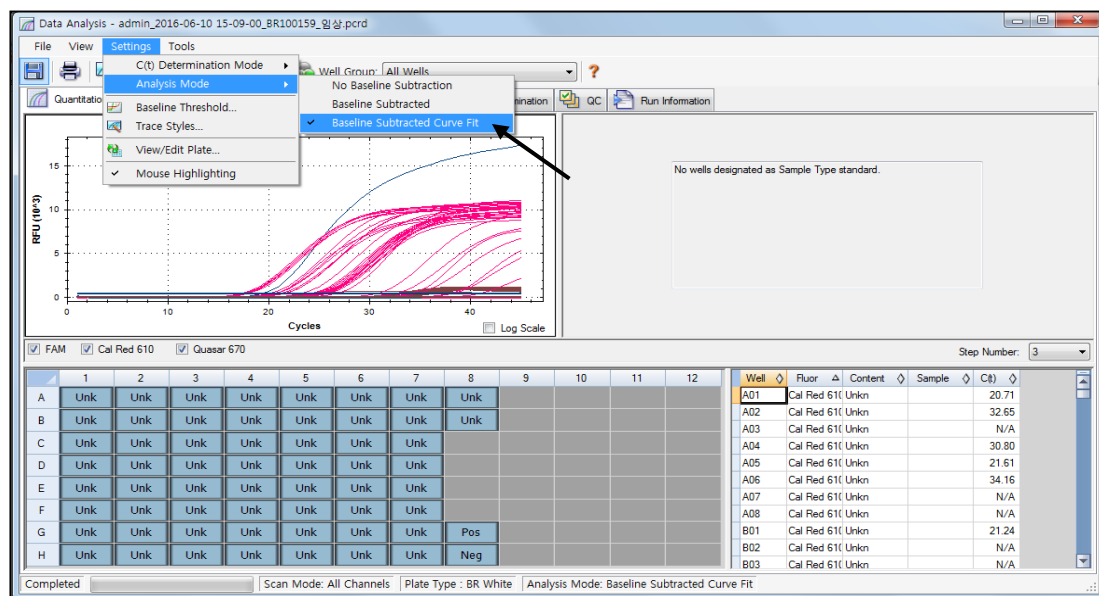
1.2. Nastavení pro analýzu dat v aplikaci CFX Manager™

A. Nastavení

Poznámka: Zkontrolujte nastavení **Single Threshold** a **Baseline Subtracted Curve Fit**.



Obr. 9. Single Threshold



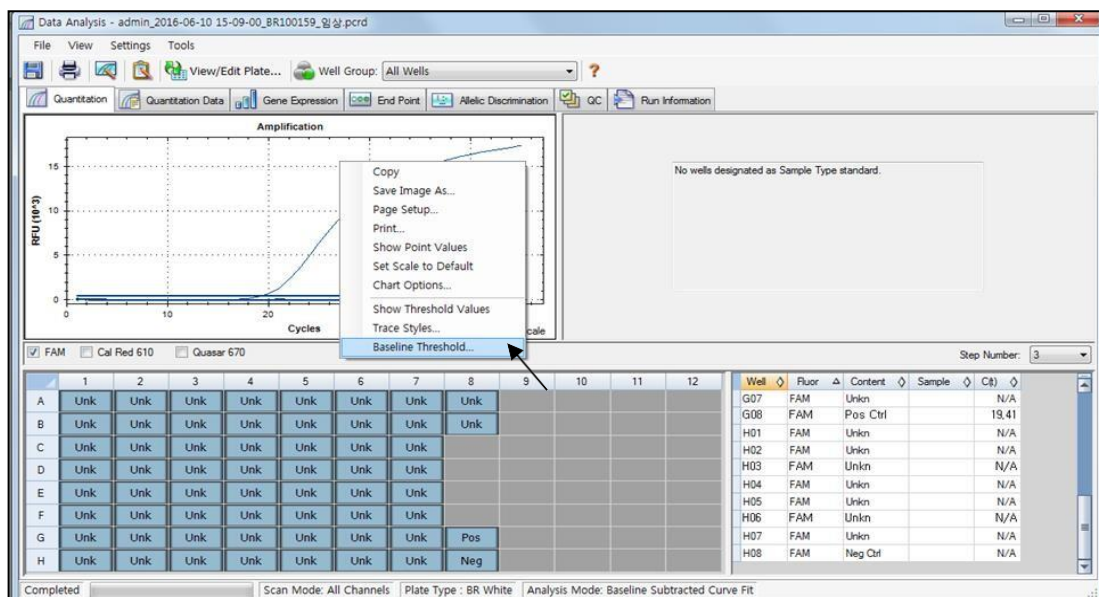
Obr. 10. Baseline Subtracted Curve Fit

B. Baseline Threshold (Základní prahová hodnota)

B-1. Baseline Threshold pro zkušavky Bio-Rad

Poznámka: Nastavte jednotnou prahovou hodnotu Baseline Threshold.

Poznámka: Pro nastavení hodnoty Baseline Threshold je třeba vybrat **FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670** signál samostatně.

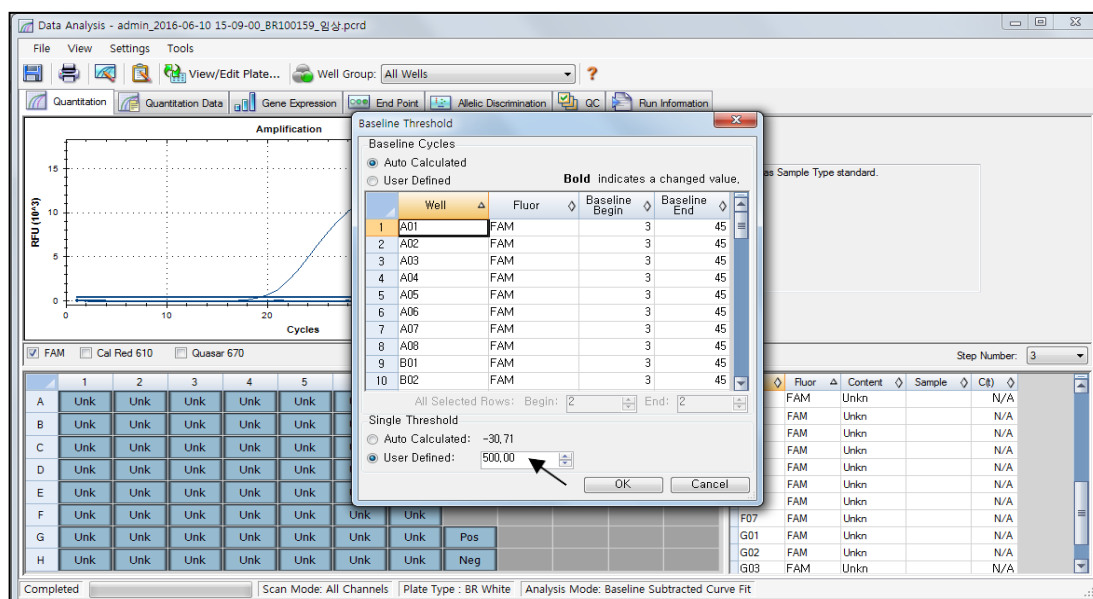


Obr. 11. Kontrola hodnoty Baseline Threshold. Klikněte pravým tlačítkem myši na graf

Poznámka: Baseline Cycles nastavte jako **Auto Calculated**.

Poznámka: Hodnotu Single Threshold pro každý fluorofor nastavte takto:

Analyt	Fluorofor	Threshold value
MTB	FAM	500
Mykobakterie	Cal Red 610	500
Vnitřní kontrola	Quasar 670	60

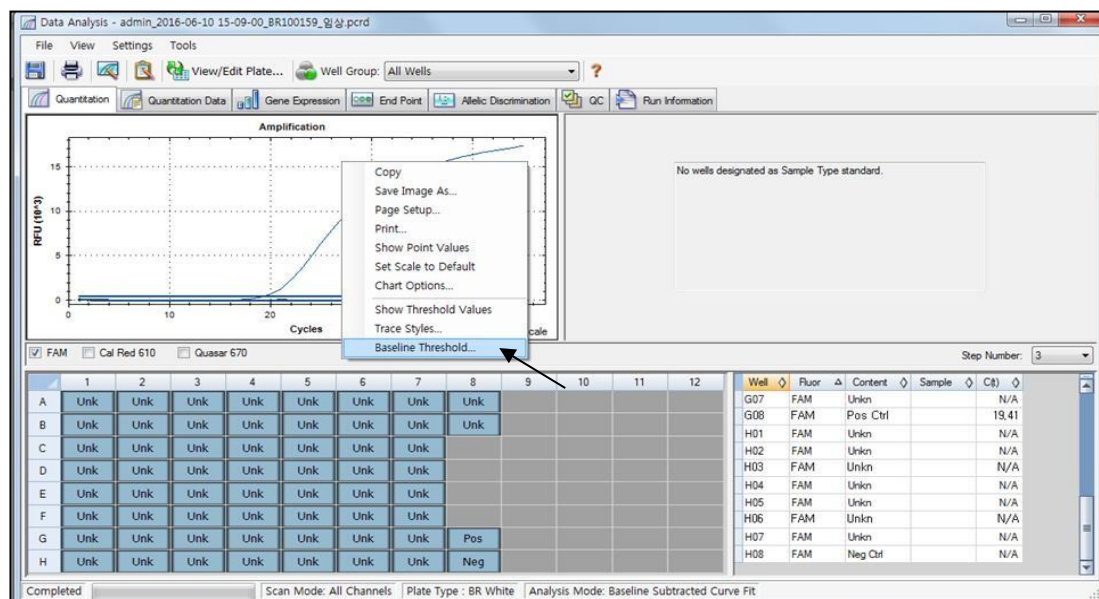


Obr. 12. Nastavení hodnoty Single Threshold. Klikněte na tlačítko User Defined a změňte hodnotu Single Threshold.

B-2. Hodnota Baseline Threshold pro zkumavky BIOplastics

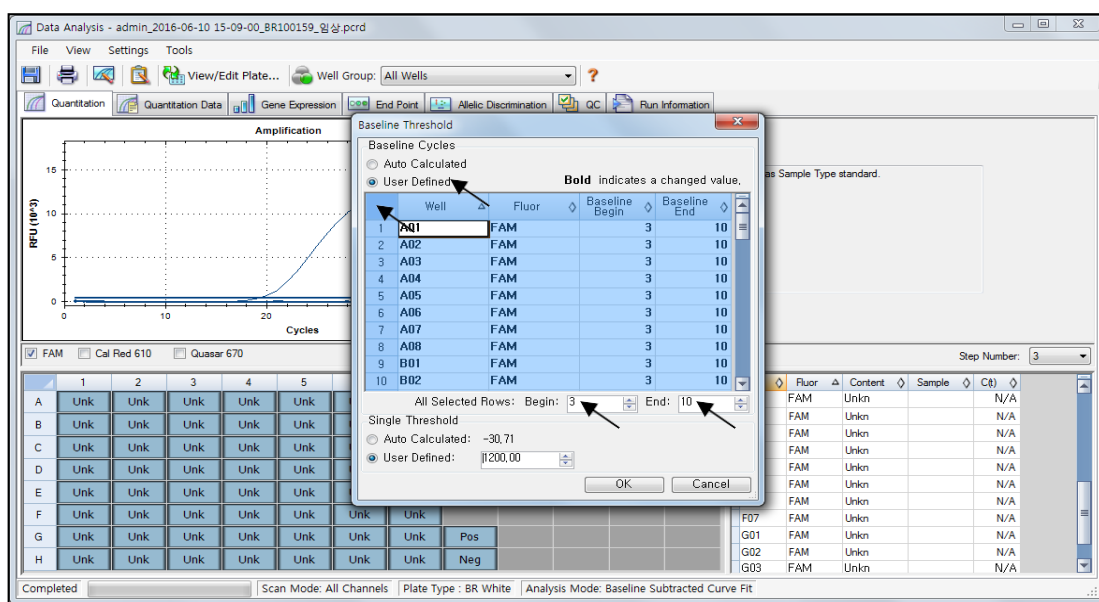
Poznámka: Nastavte jednotnou prahovou hodnotu Baseline Threshold.

Poznámka: Pro nastavení hodnoty Baseline Threshold je třeba vybrat **FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670** signál samostatně.



Obr. 13. Kontrola hodnoty **Baseline Threshold**. Klikněte pravým tlačítkem myši na graf

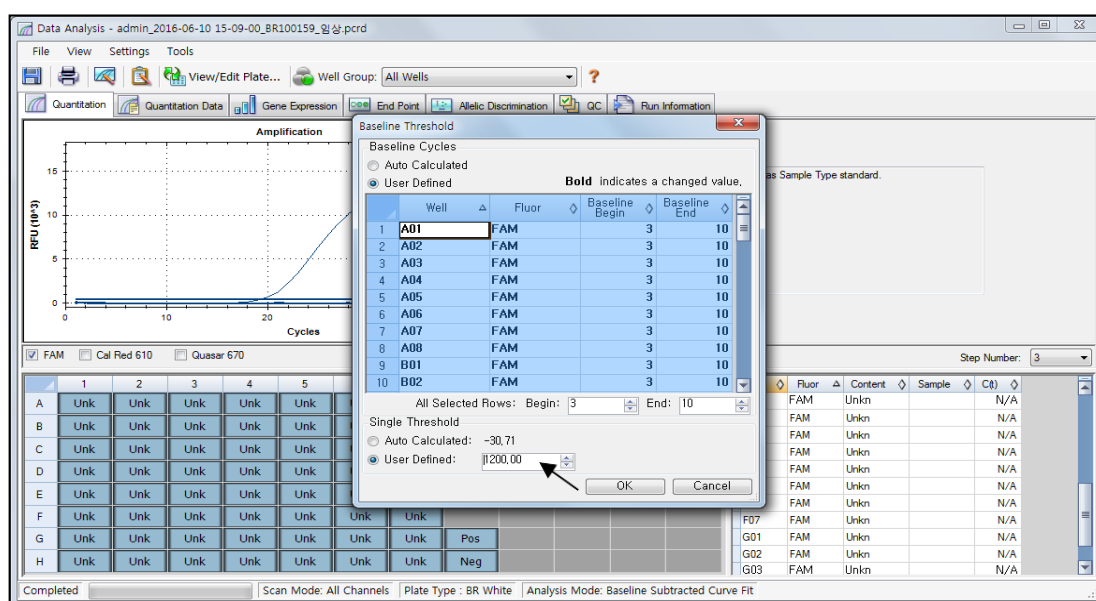
Poznámka: Baseline cykly nastavte takto: **Begin: 3, End: 10**



Obr. 14. **Nastavení Baseline cyklů**. Klepněte na tlačítko **User Defined** a změňte položku **Baseline Cycles**.

Poznámka: Hodnotu Single Threshold pro každý fluorofor nastavte takto:

Analyt	Fluorofor	Threshold value
MTB	FAM	1200
Mykobakterie	Cal Red 610	1000
Vnitřní kontrola	Quasar 670	100



Obr. 15. Nastavení hodnoty Single Threshold. Klikněte na tlačítko User Defined a změňte hodnotu Single Threshold.

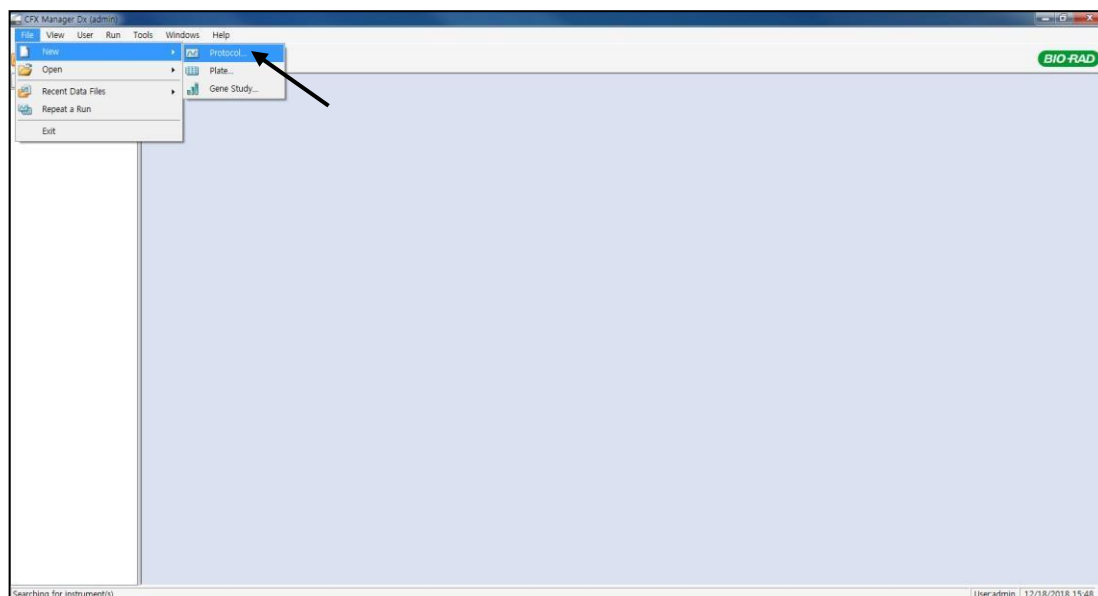
2. CFX96™ Dx System (software CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1. Nastavení přístroje pro RT PCR

Poznámka: Nastavení experimentu v systému CFX96™ Dx (Bio-Rad) pro experiment 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 **File → New → Protocol** a otevřete **Protocol Editor**.

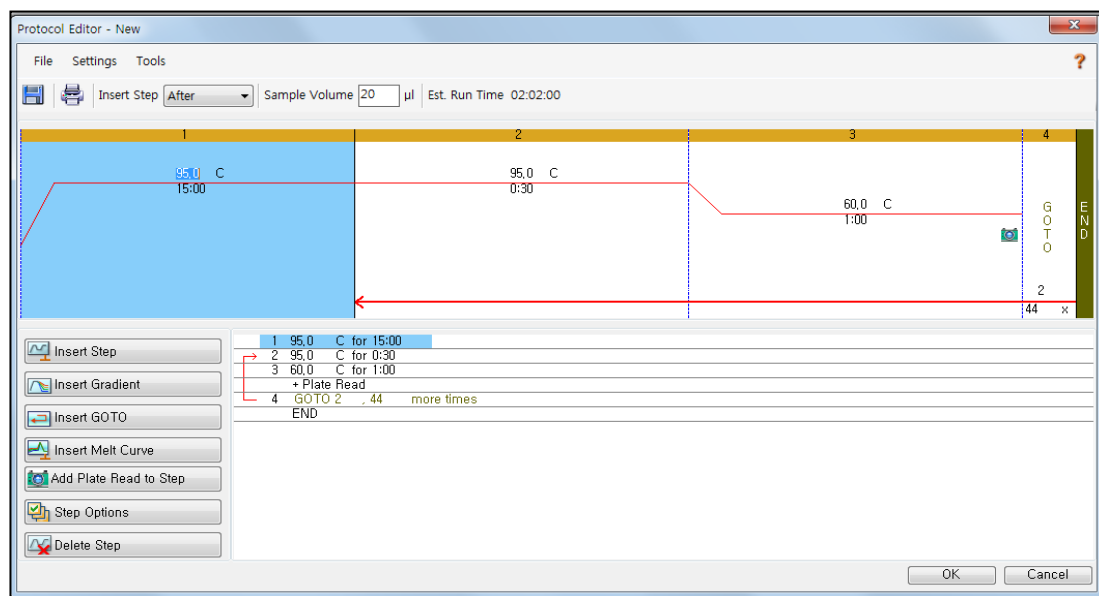


Obr. 1. **Nastavení protokolu.** Pro dané měření vytvořte nový nebo načtěte již existující protokol měření

2) V **Protocol Editoru** zadejte teplotní profil podle následující tabulky:

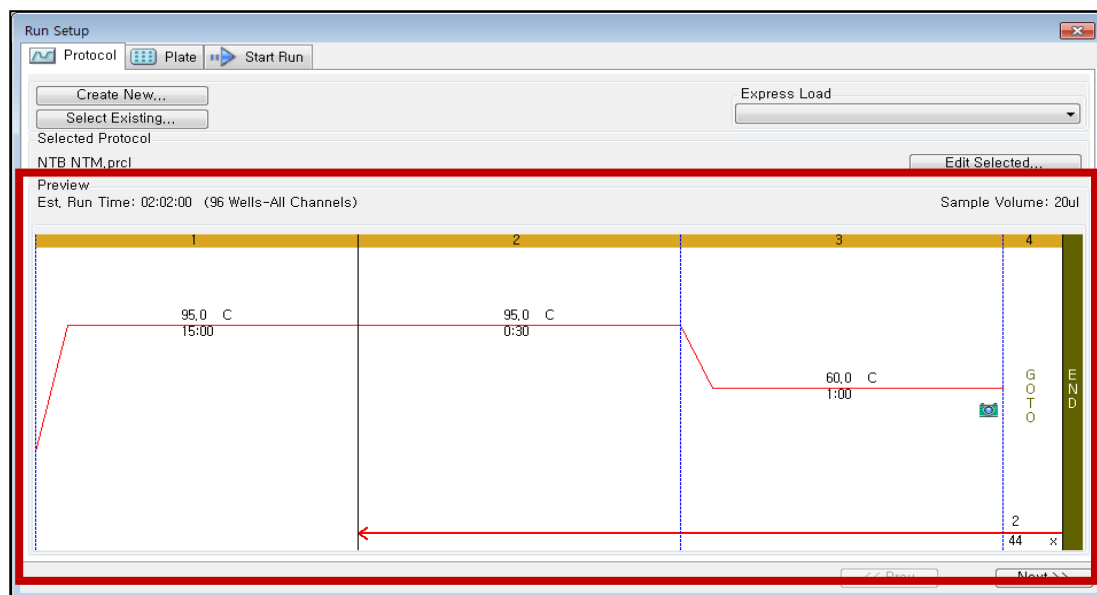
Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	95°C	15 minut
2	45	95°C	30 s
3*		60°C	1 min
4	GOTO Krok 2, ještě 44krát		

* **Plate read na Step 3.** Fluorescence se detekuje při 60 °C.



Obr. 2. **Protocol Editor**

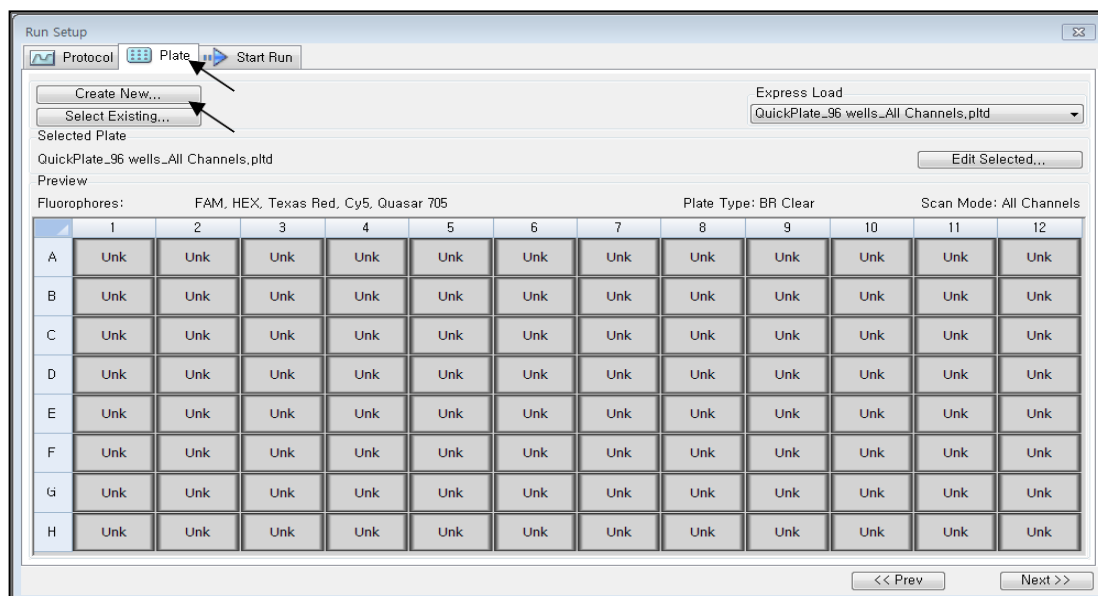
- 3) Klikněte do okénka vedle **Sample Volume** a přímo zadejte 20 µl.
- 4) Klikněte na tlačítko **OK**, tak uložíte protokol a otevře se okno **Experiment Setup**.



Obr. 3. **Experiment Setup: Protocol**

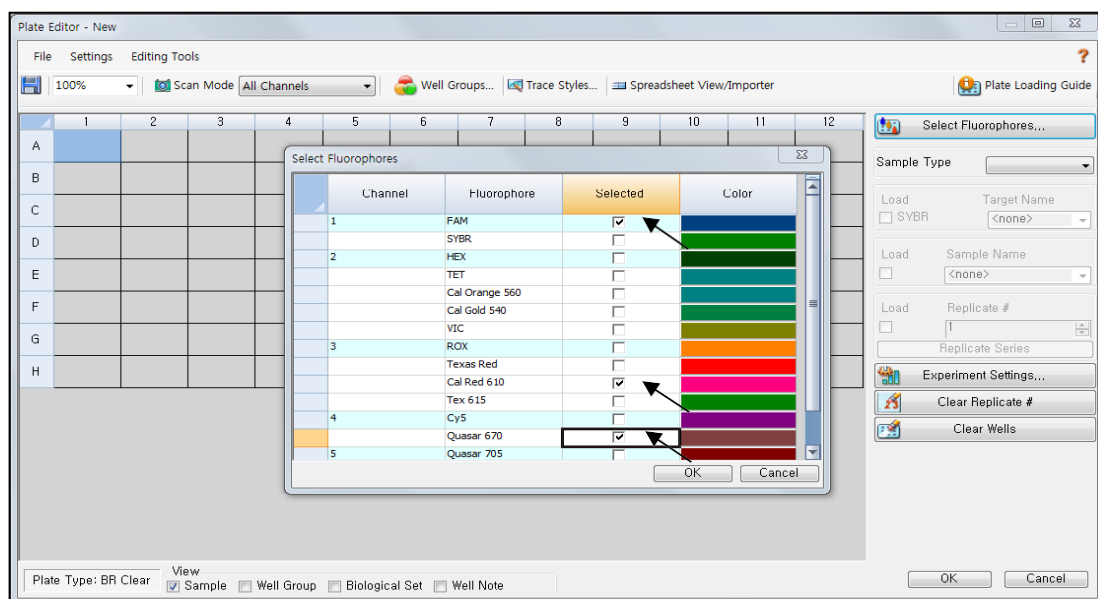
B. Nastavení plata

- 1) Na záložce **Plate** v okně **Experiment Setup** klikněte na tlačítko **Create New**, tím otevřete okno **Plate Editor**.



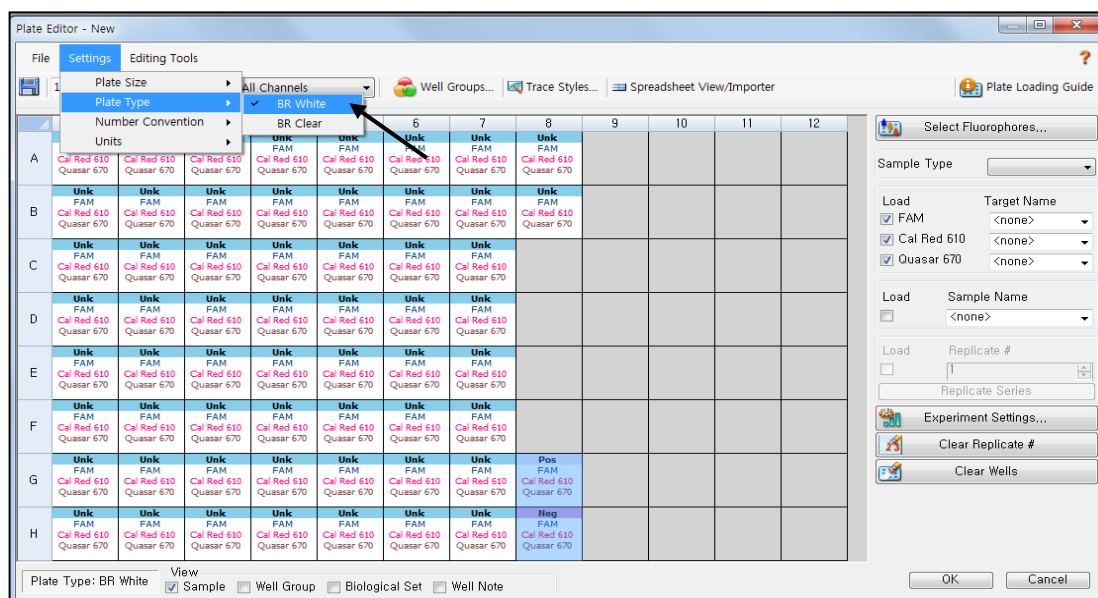
Obr. 4. **Plate Editor**. Zadejte parametry nového plata

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



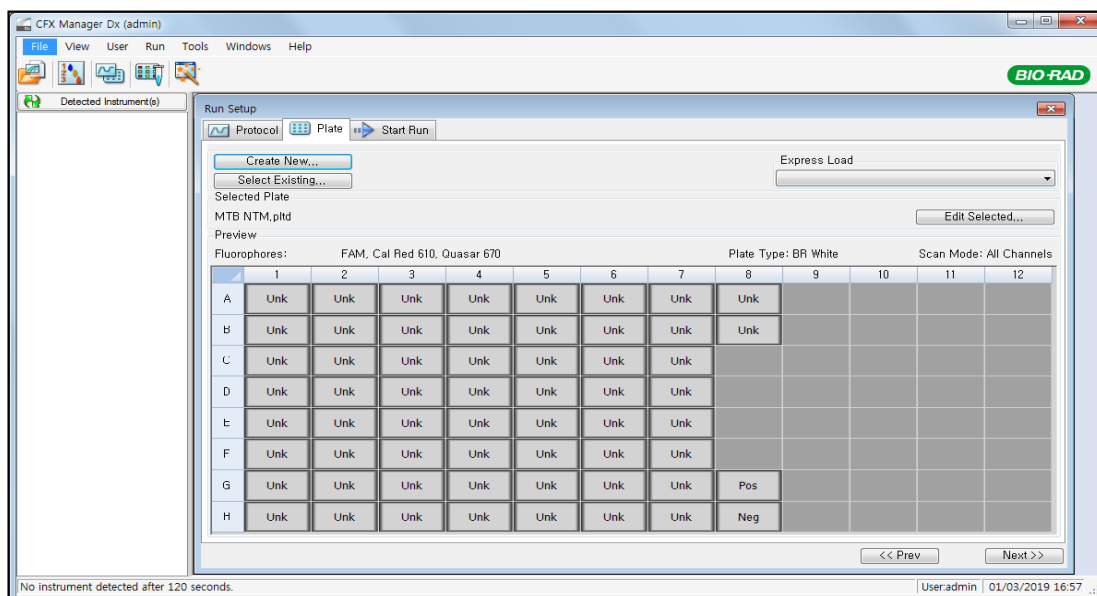
Obr. 5. **Select Fluorophores** (FAM, Cal Red 610 a Quasar 670)

- 3) Zvolte jamky, které mají být změřeny, v roletovém menu **Sample Type** vyberte typ vzorku v dané jamce.
 - **Unknown:** Klinické vzorky
 - **Negative control:** negativní kontrola
 - **Positive control:** Pozitivní kontrola
- 4) Klikněte na příslušná zaškrťovací okénka (**FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670**) tak pro vybrané jamky provedete výběr měřících kanálů.
- 5) Zadejte **Sample name (název vzorku)** a stiskněte klávesu enter.
- 6) Ve volbě **Settings** hlavního menu **Plate Editor** zvolte **Plate Size (96 wells)** a **Plate Type (BR White)**.



Obr. 6. Plate Setup

- 7) Klikněte na tlačítko **OK**. Tak uložíte nastavení nového plata.
- 8) Budete vráceni do okna **Run Setup**.

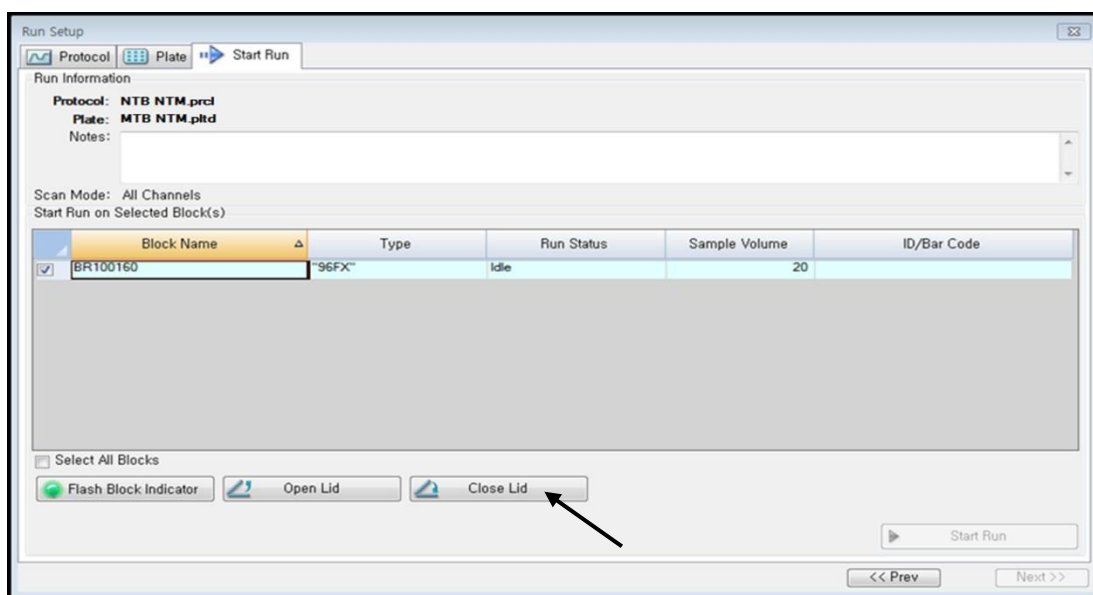


Obr. 7. Nastavení běhu: .

- 9) Kliknutím na tlačítko **Další** spustíte spuštění.

C. Start Run

- 1) Na záložce **Start Run** v okně **Run Setup** klikněte na **Close Lid**. Tak dojde k zavření víka přístroje.



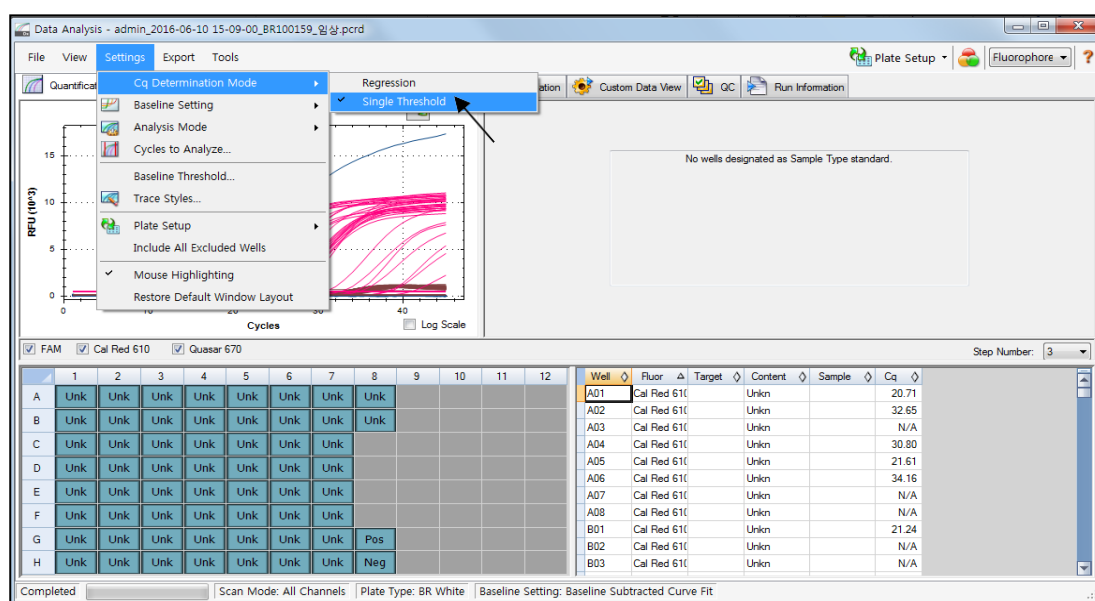
Obr. 8. Close Lid

- 2) Klikněte na tlačítko **Start Run**.
- 3) Soubor měření uložte buď ve složce My Documents, nebo v jiné, k tomu určené složce. Zadejte jméno souboru, klikněte na tlačítko **SAVE**, tím dojde ke spuštění runu.

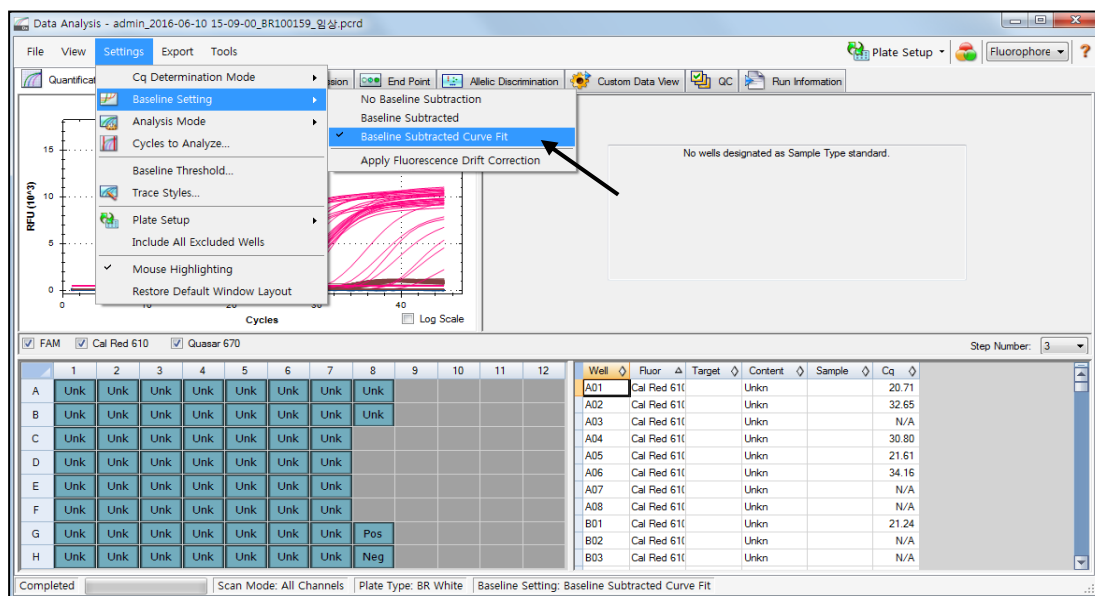
2.2. Nastavení pro analýzu dat v aplikaci CFX Manager™

A. Nastavení

Poznámka: Zkontrolujte nastavení **Single Threshold** a **Baseline Subtracted Curve Fit**.



Obr. 9. Single Threshold



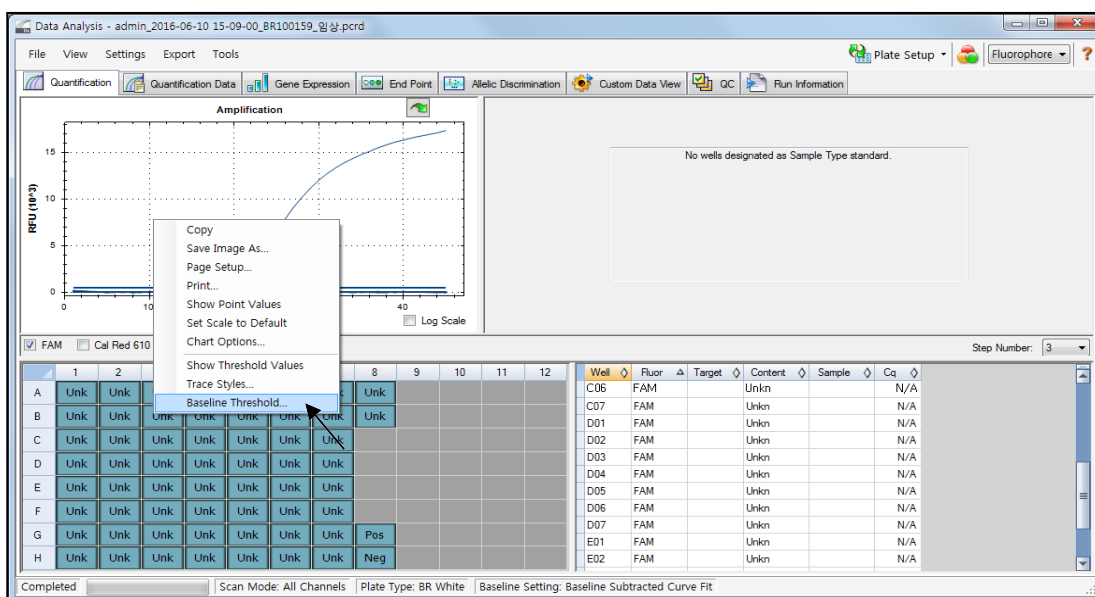
Obr. 10. Baseline Subtracted Curve Fit

B. Baseline Threshold (základní prahová hodnota)

B-1. Baseline Threshold pro zkušavku Bio-Rad

Poznámka: Nastavte jednotlivou prahovou hodnotu – Single Threshold základní prahové hodnoty Baseline Threshold.

Poznámka: Pro nastavení hodnoty Baseline Threshold je třeba vybrat **FAM**, **Cal Red 610** a **Quasar 670** signál samostatně.

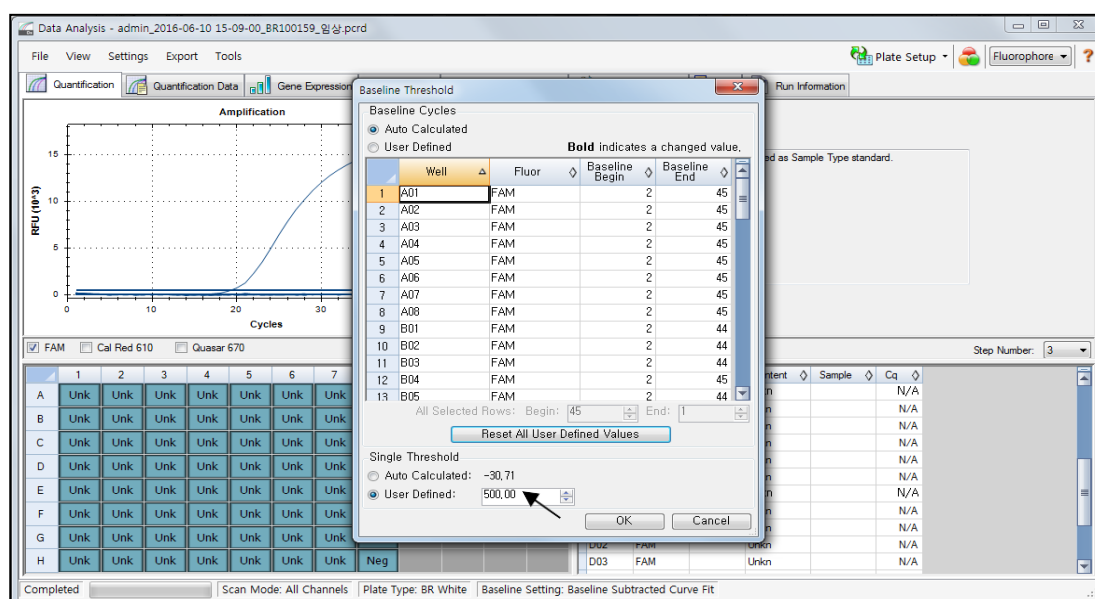


Obr. 11. Checking of Baseline Threshold. Klikněte pravým tlačítkem myši na graf

Poznámka: Baseline cycles nastavte jako Auto Calculated.

Poznámka: Hodnotu Single Threshold pro každý fluorofor nastavte takto:

Analyt	Fluorofor	Threshold value
MTB	FAM	500
Mykobakterie	Cal Red 610	500
Vnitřní kontrola	Quasar 670	60

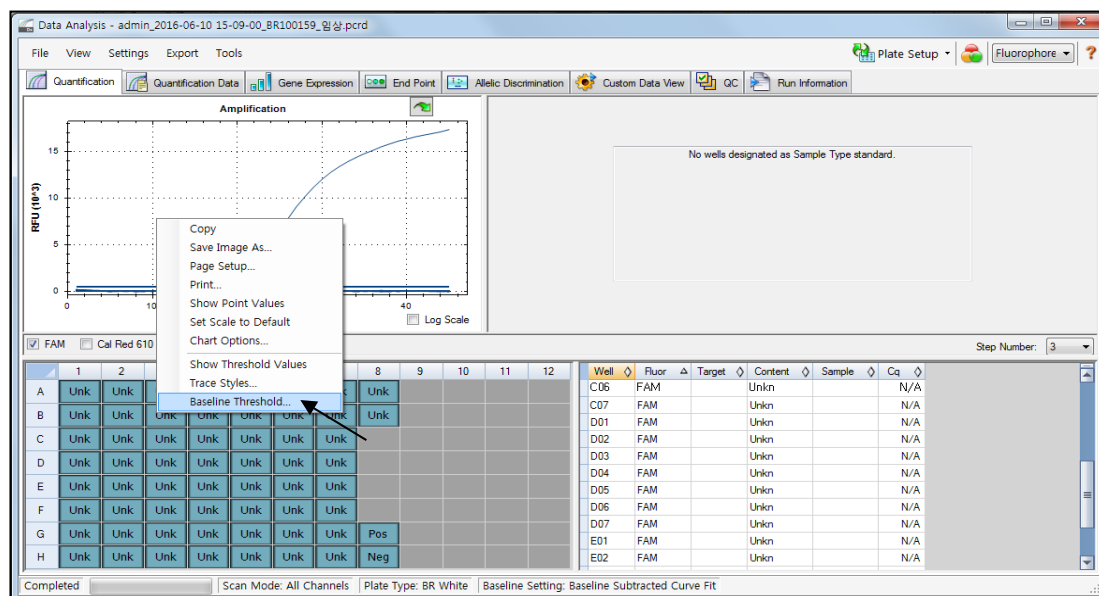


Obr. 12. **Setting of Single Threshold value.** Klepněte na tlačítko User Defined a změňte hodnotu Single Threshold.

B-2. Hodnota Baseline Threshold pro zkumavky BIOplastics

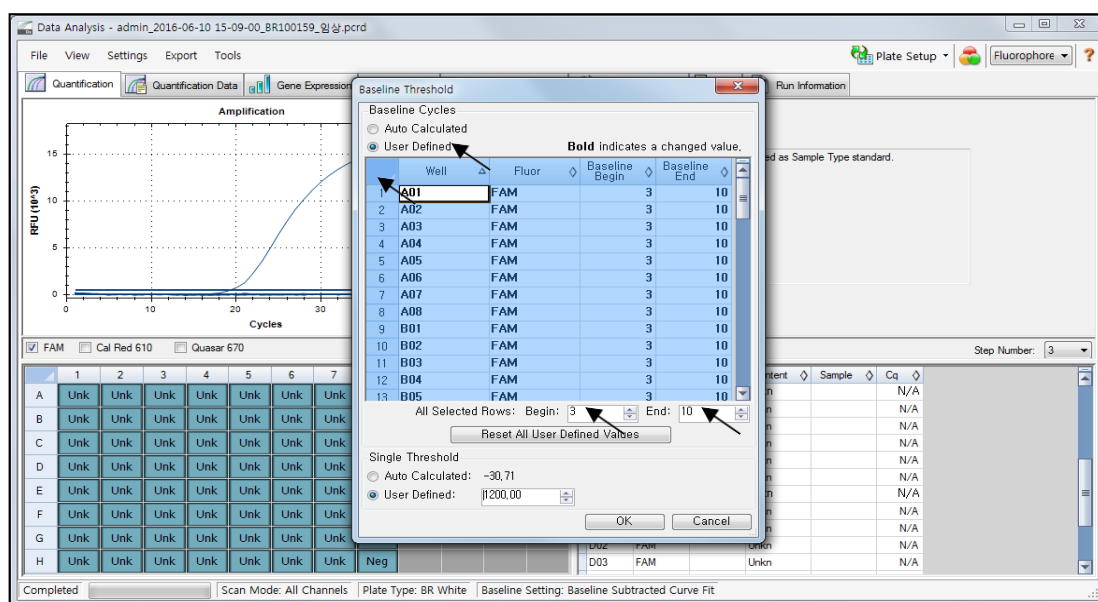
Poznámka: Nastavte jednotlivou hodnotu Single Threshold ze základní prahové hodnoty – Baseline Threshold.

Poznámka: Pro nastavení hodnoty Baseline Threshold je třeba vybrat **FAM, Cal Red 610 a Quasar 670** signál samostatně.



Obr. 13. **Checking of Baseline Threshold.** Klikněte pravým tlačítkem myši na graf

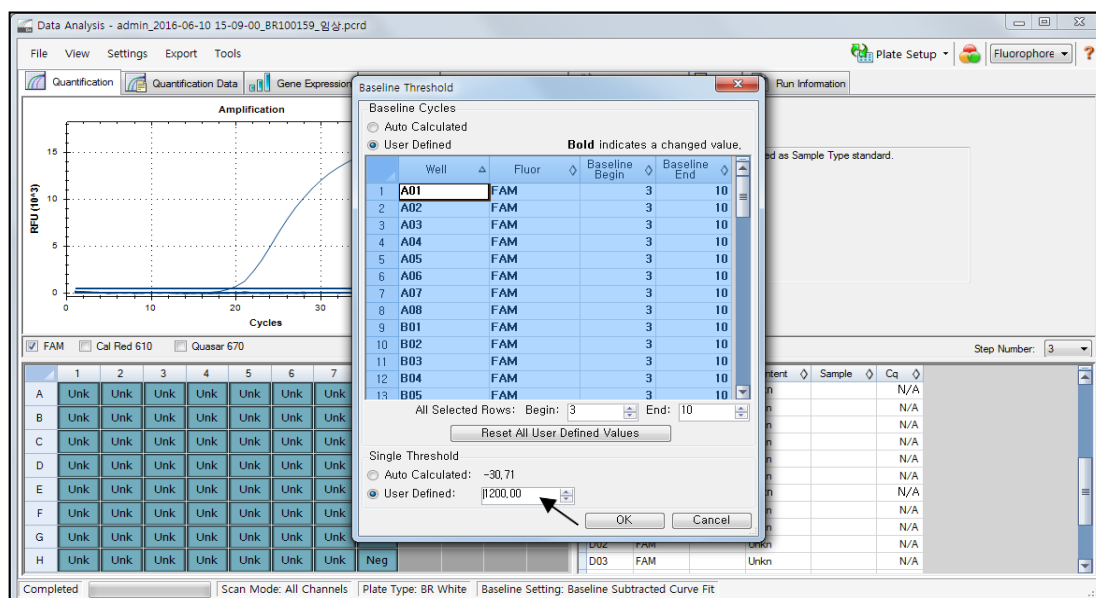
Poznámka: Baseline Cycles nastavte takto: **Begin: 3, End: 10**



Obr. 14. **Setting of Baseline Cycles.** Klepněte na tlačítko User Defined a změňte položku Baseline Cycles.

Poznámka: Hodnotu Single Threshold pro každý fluorofor nastavte takto:

Analyt	Fluorofor	Threshold value
MTB	FAM	1200
Mykobakterie	Cal Red 610	1000
Vnitřní kontrola	Quasar 670	100



Obr. 15. Nastavení hodnoty Single Threshold. Klepněte na tlačítko User Defined a změňte hodnotu Single Threshold.

3. 7500Real-time PCR System, Software v2.0.5 (Life Technologies)

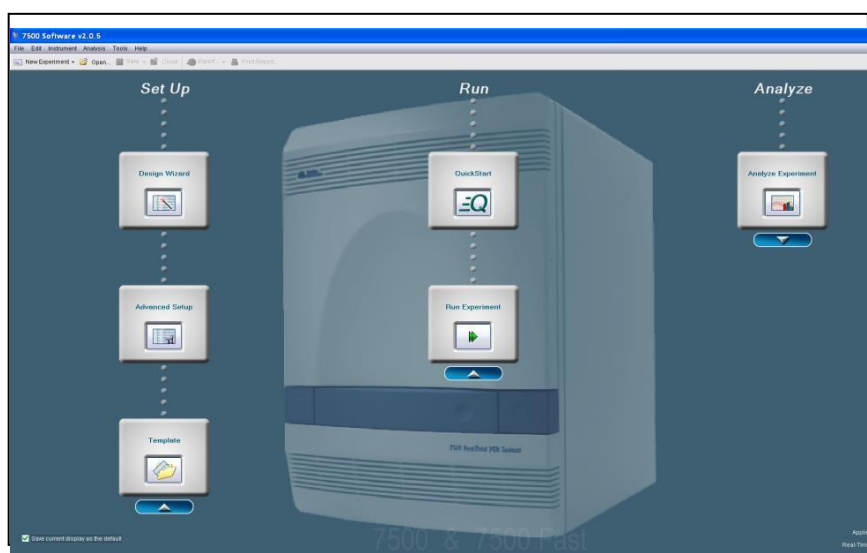
3.1 Nastavení přístroje pro RT PCR

Poznámka: Pokyny jsou určeny pro přístroj 7500 Real-time PCR, **software v2.0.5**.

Poznámka: Program pro nastavení experimentu 7500 Real-time PCR System (Life Technologies) pro detekci MTB, mykobakterií a interní kontroly lze rozdělit do následujících kroků: Experiment Properties Set Up (Nastavení vlastností analýzy), Plate Set Up (Nastavení plata) a Run Method Set Up (Nastavení metody runu).

A. Nastavení vlastností analýzy

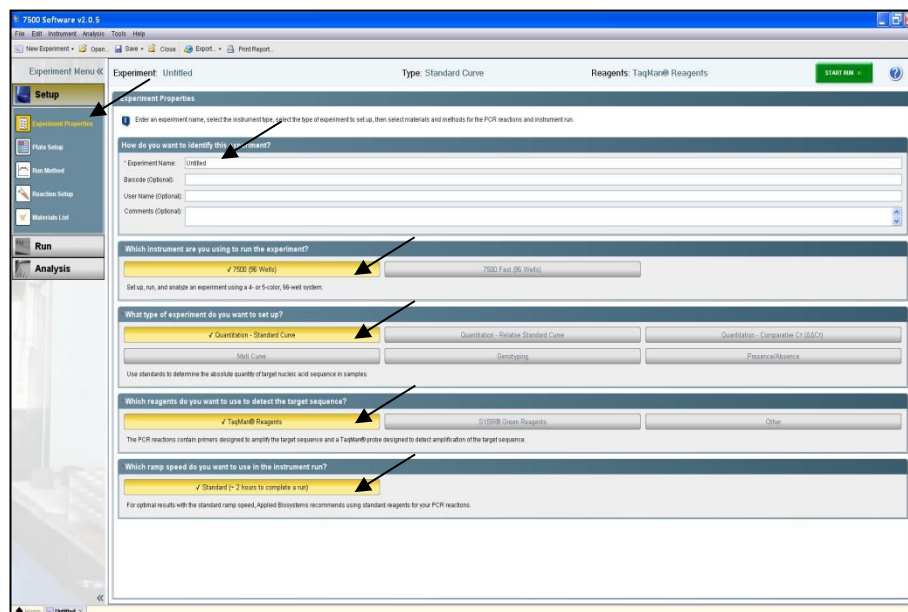
- 1) V domovské obrazovce programu vyberte ikonu **Advanced Setup**.



Obr. 1. Create new document – Vytvořit nový dokument

- 2) V nabídce **Experiment** nastavte **Experiment properties** nového testu.

- **Experiment name: název testu:** zadejte název testu.
- **Instrument Type: typ přístroje :** 7500 (96 jamek)
- **Type of experiment to set up: typ testu který je třeba nastavit :** Kvantifikace - Standardní křivka
- **Reagents to detection: reagentie k detekci:** TaqMan Reagents
- **Run Mode: Režim runu :** Standardní

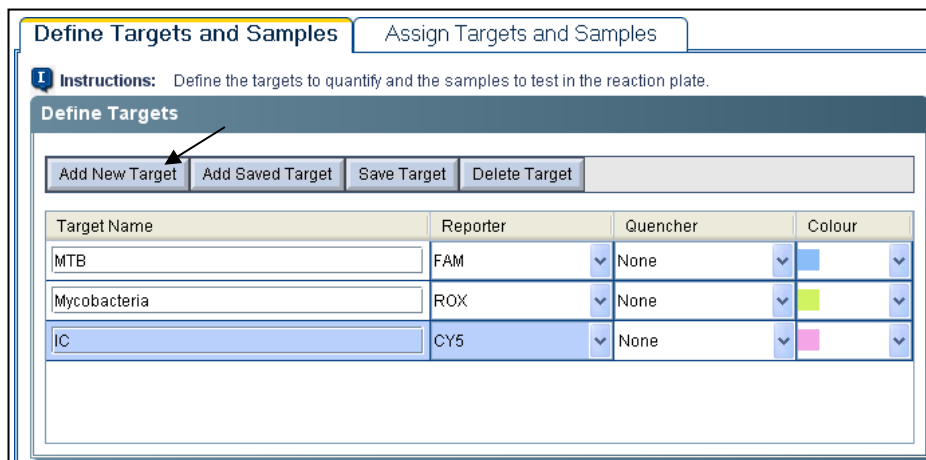


Obr. 2. Set Properties of New Experiment

B. Nastavení plata

- 1) V nabídce **Experiment** klikněte na položku **Plate Setup**.
- 2) Definujte cíle: Klikněte na okénko **Add New Target** podle potřeby.
- 3) Pro každý cíl zadejte název – **Target Name**.
- 4) Pro cíle vyberte **Reporter** a **Quencher** následujícím způsobem:

Target Name	Reporter	Quencher
MTB	FAM	Žádné
Mykobakterie	ROX	
Vnitřní kontrola	CY5	



Define Targets and Samples | Assign Targets and Samples

Instructions: Define the targets to quantify and the samples to test in the reaction plate.

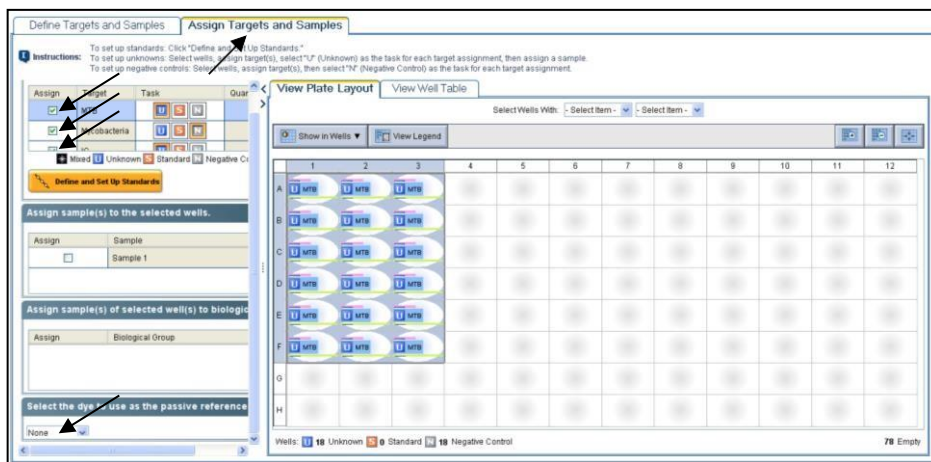
Define Targets

Add New Target | Add Saved Target | Save Target | Delete Target

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
MTB	FAM	None	Blue
Mycobacteria	ROX	None	Green
IC	CY5	None	Pink

Obr. 3. Select detector

- 5) Na kartě **Assign Targets and Samples** v okně **Plate Setup** vyberte **jamky**, které chcete načíst.
- 6) Přiřaďte cíle k vybraným jamkám.
- 7) Vyberte barvivo, které se má použít jako **pasivní odkaz na "None"**.



Define Targets and Samples | **Assign Targets and Samples**

Instructions: To set up standards: Click "Define and Set Up Standards." To set up unknowns: Select wells, assign target(s), select "U" (Unknown) as the task for each target assignment, then assign a sample. To set up negative controls: Select wells, assign target(s), then select "N" (Negative Control) as the task for each target assignment.

Assign | Task | Quencher

Assign | Sample

Assign | Biological Group

Select the dye to use as the passive reference

None

View Plate Layout | View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Wells | View Legend

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A B C D E F G H

Wells: 18 Unknown 9 Standard 18 Negative Control

78 Empty

Obr. 4. Assign Targets

C. Nastavení metody runu

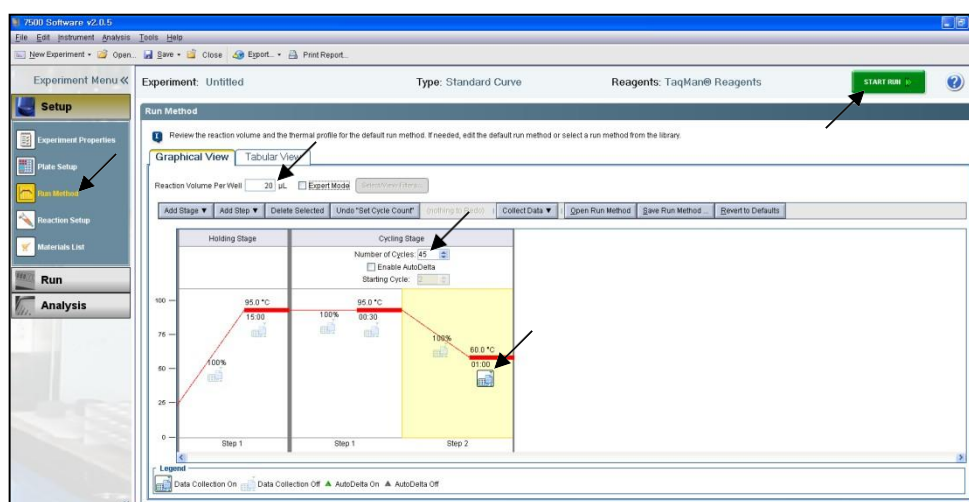
- 1) V nabídce **Experiment** klikněte na možnost **Run Method**.
- 2) Zadejte reakční objem: **20 (µl)**.
- 3) Nastavte tepelný profil takto:

	Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba
	Step	No. of cycles	Temperature	Duration
Holding Stage	1	1	95°C	15 minut
Cycling Stage	1	45	95°C	30 s
	2		60°C	1 min

Poznámka: V kroku 2 fáze cyklu klikněte na možnost **Data Collection On**. Reporter je detekován při 60 °C.

Poznámka: Zrušte zaškrtnutí rámečku **Enable AutoDelta**.

4) Klikněte na **Start Run**.



Obr. 5. Set up Run Method

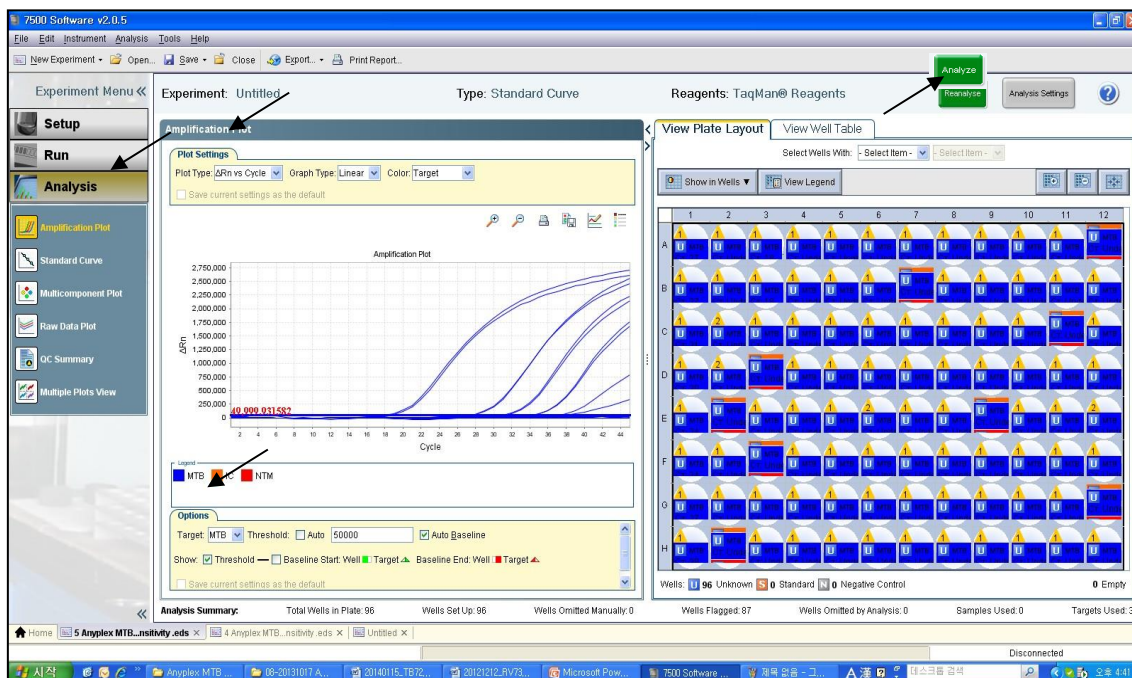
3.2 Nastavení pro analýzu dat

A. Nwastavení

- 1) V nabídce **Experiment**, v záložce **Analysis** klikněte na položku **Amplification Plot**.
- 2) V záložce **Plot Settings** vyberte **Plot Type** (ΔR_n vs Cycle) a **Graph Type** (Linear).
- 3) Nastavte prahovou hodnotu pro každý cíl na záložce **Options**.
- 4) Prahové hodnoty pro jednotlivé cíle jsou uvedeny níže:

Analyt	Reporter	Threshold value
MTB	FAM	5.0e+004
Mykobakterie	ROX	5.0e+004
Vnitřní kontrola	CY5	5.0e+003

Poznámka: Pro nastavení prahové hodnoty je třeba analyzovat signál **FAM**, signál **ROX** a signál **CY5 odděleně**.



Obr. 6. Analysis settings

- 5) Zvolte možnost **Auto Baseline**.
- 6) Klikněte na tlačítko **Analyze**.

VÝSLEDKY
1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
1.1. Interpretace výsledků

Analyt	Fluorofor	Vzorek / negativní kontrola		Pozitivní kontrola	
		Hodnota Ct	Výsledek	Hodnota Ct	Výsledek
MTB	FAM	< 40	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 40	Záporný (-)	≥ 25	Neplatný
		N/A		N/A	
Mykobakterie	Cal Red 610	< 38	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 38	Záporný (-)	≥ 25	Neplatný
		N/A		N/A	
Vnitřní kontrola	Quasar 670	< 35	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 35	Záporný (-)	≥ 25	Neplatný
		N/A		N/A	

Výsledek					
Quasar 670		FAM	Cal Red 610	Výklad	
(IC)		(MTB)	(Mykobakterie)		
Případ 1	+	+	+	MTB : Zjištěno	MTB
				Mykobakterie : Zjištěno	
Hodnota Ct mykobakterií		MTB&NTM			
< Hodnota Ct MTB		koinfekce			
Případ 2		+	-	MTB : Zjištěno	MTB
			Mykobakterie : Nezjištěno		
Případ 3		-	+	MTB : Nezjištěno	NTM
				Mykobakterie : Zjištěno	
Případ 4		-	-	MTB : Nezjištěno	Negativní
				Mykobakterie : Nezjištěno	
Případ 5	-	+	+	MTB : Zjištěno	MTB*
				Mykobakterie : Zjištěno	
Hodnota Ct mykobakterií		MTB&NTM			
< Hodnota Ct MTB		koinfekce*			
Případ 6		+	-	MTB : Zjištěno	MTB*
			Mykobakterie : Nezjištěno		
Případ 7		-	+	MTB : Nezjištěno	NTM*
				Mykobakterie : Zjištěno	
Případ 8		-	-	MTB : Nezjištěno	Neplatné**
				Mykobakterie : Nezjištěno	

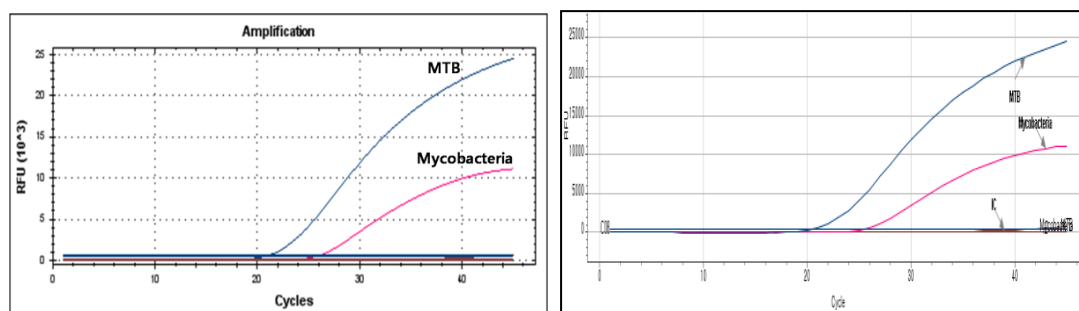
* PCR reakce byla inhibována. Výsledek je stále platný.

** V případě neplatných výsledků vzorků by nukleová kyselina patogenu, nebyla detekovatelná, i v případě že by byla přítomná Zpracujte další alikvotní část původního vzorku a test opakujte. Inhibitory jsou často labilní a vzorky původně inhibiční nemusí být při opakování inhibovány. Pokud není k dispozici původní vzorek, může výsledek PCR zlepšit 10~100násobné zředění templátu nukleové kyseliny v destilované vodě.

1.2. Testování klinických vzorků

Vzorek1

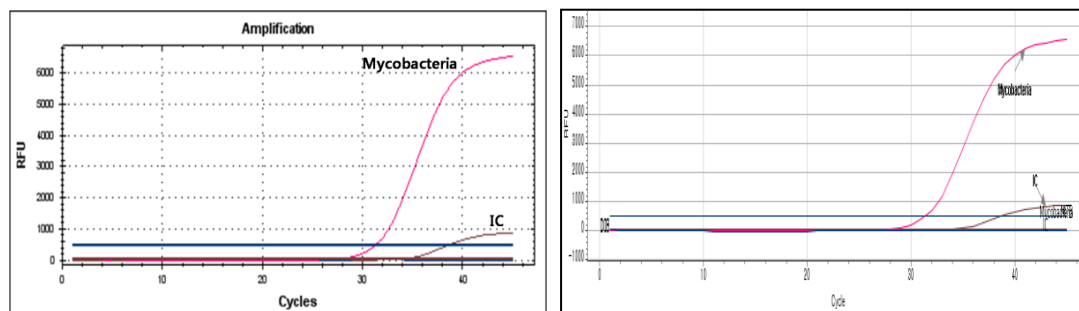
CFX96™Seegene Viewer



Fluorofor	Hodnota Ct	Výsledek
FAM	20.81	MTB
Cal Red 610	25.84	
Quasar 670	33.60	

Vzorek2

CFX96™Seegene Viewer



Fluorofor	Hodnota Ct	Výsledek
FAM	N/A	NTM
Cal Red 610	31.33	
Quasar 670	34.38	

2. 7500 Real-time PCR System (Life Technologies)

2.1. Interpretace výsledků

		Vzorek / negativní kontrola		Pozitivní kontrola	
		Hodnota Ct	Výsledek	Hodnota Ct	Výsledek
MTB	FAM	< 40	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 40 Nedek.	Záporný (-)	≥ 25 Nedek.	Neplatný
Mykobakterie	ROX	< 38	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 38 Nedek.	Záporný (-)	≥ 25 Nedek.	Neplatný
Vnitřní kontrol	CY5	< 35	Pozitivní (+)	< 25	Platný
		≥ 35 Nedek.	Záporný (-)	≥ 25 Nedek.	Neplatný

Výsledek						
CY5		FAM	ROX	Výklad		
(IC)		(MTB)	(Mykobakterie)			
Případ 1	+	+	+	MTB : Zjištěno Mykobakterie : Zjištěno	MTB	
				Hodnota Ct mykobakterií < Hodnota Ct MTB	MTB&NTM koinfekce	
Případ 2		+	-	MTB : Zjištěno Mykobakterie : Nezjištěno	MTB	
Případ 3		-	+	MTB : Nezjištěno Mykobakterie : Zjištěno	NTM	
Případ 4		-	-	MTB : Nezjištěno Mykobakterie : Nezjištěno	Negativní	
Případ 5		-	+	+	MTB : Zjištěno Mykobakterie : Zjištěno	MTB*
					Hodnota Ct mykobakterií < Hodnota Ct MTB	MTB&NTM koinfekce*
Případ 6			+	-	MTB : Zjištěno Mykobakterie : Nezjištěno	MTB*
Případ 7	-		+	MTB : Nezjištěno Mykobakterie : Zjištěno	NTM*	
Případ 8	-		-	MTB : Nezjištěno Mykobakterie : Nezjištěno	Neplatné**	

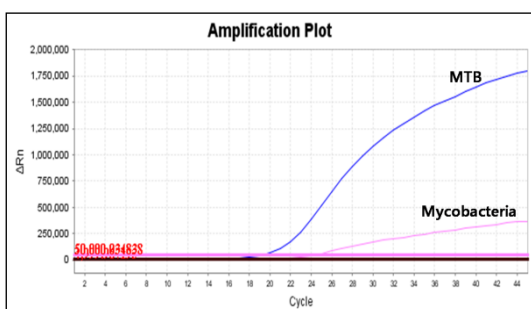
* PCR reakce byla inhibována. Výsledek je stále platný

** V případě neplatných výsledků vzorků by nukleová kyselina patogenu, nebyla detekovatelná i v případě, že by byla přítomná. Zpracujte další alikvotní část původního vzorku a test opakujte. Inhibitory jsou často labilní a vzorky původně inhibiční nemusí být při opakování inhibovány. Pokud není k dispozici původní vzorek, může výsledek PCR zlepšit 10~100násobné zředění templátu nukleové kyseliny v destilované vodě.

2.2. Testování klinických vzorků

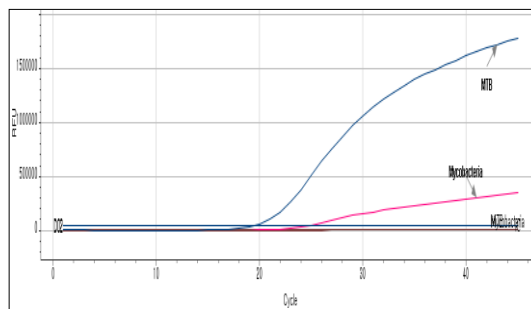
Vzorek1

7500 Real-time PCR System



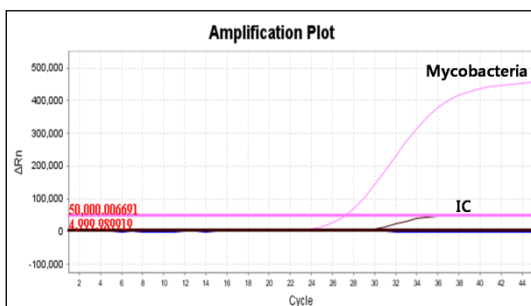
Fluorofor	Hodnota Ct	Výsledek
FAM	19.66	MTB
ROX	25.14	
CY5	40.04	

SeegeneViewer



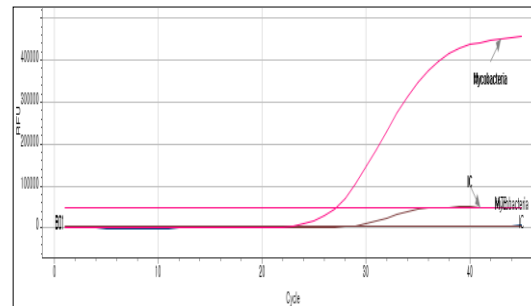
Vzorek2

7500 Real-time PCR System



Fluorofor	Hodnota Ct	Výsledek
FAM	N/A	NTM
ROX	27.14	
CY5	28.54	

SeegeneViewer



ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Anyplex™ MTB/NTM Detekce v reálném čase (V2.0)		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Není pozorován žádný signál	Fluorofory pro analýzu dat nejsou ve shodě s protokolem	Vyberte správné fluorofory pro analýzu dat a data znovu exportujte. V tomto případě není třeba opakovat test.
	Nesprávné nastavení real-time teplotního cyklu	Zkontrolujte teplotní podmínky tepelného cyklu a zopakujte test při správném nastavení.
	Nesprávné skladování nebo prošlá doba použitelnosti testovací soupravy	Zkontrolujte podmínky skladování (viz strana 11) a datum expirace (viz štítek) testovací soupravy, a pokud možno použijte novou sadu.
Není pozorován signál interní kontroly	Vysoká koncentrace nukleové kyseliny patogenu	Naředte prosím (1/10~1/100) templátovou nukleovou kyselinu pomocí RNase-free Water a opakujte test s naředěnou nukleovou kyselinou.
	Přítomnost inhibitoru	Naředte prosím (1/10~1/100) templátovou nukleovou kyselinu pomocí RNase-free Water a zopakujte test s naředěnou nukleovou kyselinou.
Zdánlivě falešně pozitivní nebo signály cíle pozorované u negativní kontroly	Kontaminace	Dekontaminujte všechny povrchy a nástroje chlornanem sodným a etanolem. Po celou dobu postupu používejte pouze špičky s filtrem a mezi jednotlivými zkumavkami špičky vyměňujte. Celý postup opakujte od izolace nukleových kyselin s novou sadou reagensů.
Zdánlivě falešně negativní signál nebo žádný signál pozorovaný u pozitivní kontroly	Chyba při odběru vzorku	Zkontrolujte prosím způsob odběru vzorku a odeberte jej znovu.
	Nesprávné skladování vzorku	Zkontrolujte podmínky teplotního cyklu a zopakujte test při správném nastavení.
	Chyba při izolaci nukleové kyseliny.	Zkontrolujte postup izolace nukleových kyselin a koncentrace nukleové kyseliny. Izolujte nukleovou kyselinu 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. Pokud je to nutné, test opakujte.
	Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda jsou do směsi PCR přidány všechny složky. (Citlivost je snížena při použití předem připravené směsi.) Všechny reagenty musí být před použitím homogenizovány a stočeny.

	Přítomnost inhibitoru	Naředte prosím templát nukleové kyseliny (1/10~1/100) RNase free water a zopakujte test s naředěnou nukleovou kyselinou.
--	-----------------------	--

ÚČINNOST

1. Specifická

Vysoká specifita Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) je zajištěna oligy navrženými specificky pro cílové objekty za stanovených reakčních podmínek. Souprava Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) byla testována z hlediska křížové reaktivity 49 různých patogenů a PCR amplifikace a detekce byla identifikována pouze u určených cílů.

Organismus	Zdroj č.	Výsledek testu†	Analyt	
			MTB	Mykobakterie
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Korejská izolace	+	+	+
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977D-5	+	-	+
<i>Mycobacterium avium</i> (Chester)	ATCC 700735	+	-	+
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	KCTC 9503	+	-	+
<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i>	ATCC 25291	+	-	+
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Korejská izolace	+	+	+
<i>Mycobacterium chelonae</i>	KCTC 9505	+	-	+
<i>Mycobacterium fallax</i>	KCTC 9508	+	-	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	KCTC 1122	+	-	+
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	KCTC 9514	+	-	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	KCTC 9515	+	-	+
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	KCTC 19096	+	-	+
<i>Mycobacterium paraseoulense</i>	KCTC 19145	+	-	+
<i>Mycobacterium phlei</i>	KCTC 9087	+	-	+
<i>Mycobacterium seoulense</i>	KCTC 19146	+	-	+
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC 9108	+	-	+
<i>Mycobacterium szulgai</i>	KCTC 9520	+	-	+
<i>Mycobacterium terrae</i>	KCTC 9614	+	-	+
<i>Mycobacterium goodii</i>	KCTC 9513	+	-	+
<i>Mycobacterium vaccae</i>	KCTC 19087	+	-	+
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	KCTC 19088	+	-	+

Organismus	Zdroj č.	IC	Výsledek testu†	
			MTB	Mykobakterie
<i>Nocardia asteroides</i>	KCTC 9956	+	-	-
<i>Nocardia brasiliensis</i>	KCTC 9136	+	-	-
<i>Nocardia farcinica</i>	KCTC 9958	+	-	-
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	KCTC 9960	+	-	-
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	KCTC 9098	+	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	KCTC 3075	+	-	-
<i>Corynebacterium flavescens</i>	KCTC 3414	+	-	-
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	KCTC 1854	+	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC 1298	+	-	-
<i>Gordonia bronchialis</i>	KCTC 3076	+	-	-
<i>Gordonia sputi</i>	KCTC 3436	+	-	-
<i>Gordonia rubripertincta</i>	ATCC 27864	+	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC 3932	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 40881	+	-	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	KCTC 5485	+	-	-
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC BAA-589D	+	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 29342	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 1636	+	-	-
<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC 700724D-5	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231D-5	+	-	-
<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC 19319	+	-	-
<i>Dietzia</i> sp.	KCTC 19232	+	-	-
<i>Arthrobacter oxydans</i>	KCTC 3383	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 2011	+	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	KCTC 2022	+	-	-
<i>Parvopolyspora pallida</i>	KCTC 9188	+	-	-
Lidská gDNA	Biochain D1234275	+	-	-

† Pro prokázání reprodukovatelnosti výsledků byl test třikrát opakován.

2. Citlivost

Ke stanovení citlivosti Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) byl test proveden s genomovou DNA v koncentracích od 10^4 do 10^0 kopií/reakci. Mez detekce pro MTB a mykobakterie byla 100 kopií/reakci. Avšak v případě vzorku MTB, který má vícenásobný počet kopií IS6110, lze cíl MTB detekce Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) detekovat až do 10 kopií/reakci.

3. Reprodukovatelnost

Testy reprodukovatelnosti byly provedeny v pěti různých časech v rozmezí pěti dnů třemi různými experimentátory. Ve všech testech byly získány stejné výsledky. Reprodukovatelnost testu Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) tak bylo prokázáno.

4. Interference

Tento test byl proveden s použitím interferujících látek složených z 8 látek s cílem potvrdit účinnost Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) v přítomnosti potenciálních interferujících látek. Přidání látek nemělo žádný vliv na výsledek: nespecifická detekce nebo inhibice amplifikace cíle. Na základě výsledků bylo zjištěno, že 8 interferujících látek nemá žádný vliv na Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0).

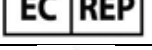
Ne.	Interferující	Koncentrace
1	Mucin (hovězí podčelistní žláza, typ I-S)	60 µg/ml
2	Mupirocin (antibiotikum, nosní mast)	6,6 mg/ml
3	Tobramycin (antibakteriální, systémový)	4,0 µg/ml
4	Oxymetazolin (Afrin nosní sprej)	15 % (v/v)
5	Zanamivir (antivirotikum - chřipka)	3,3 mg/ml
6	Oseltamivir (antivirotikum - Tamiflu)	25 mg/ml
7	Isoniazid	50 µg/ml
8	Rifampicin	25 µg/ml

LITERATURA

- 1 N. Medappa, V. K. Srivastava. [What is new in the diagnosis of Tuberculosis?] ICMR BULLETIN (2002). 32(9)
- 2 K. Lily Therese, U. Jayanthi & H.N. Madhavan. [Application of nested polymerase chain reaction (PCR) using MPB64 gene primers to detect Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical specimens from extrapulmonary tuberculosis patients]. Indian J. Med. Res. (2005). 122:165–170
- 3 Bum-Joon Kim, Seong-Karp Hong, Keun-Hwa Lee, Yeo-Jun Yun, Eui-chong Kim, Young-Gil Park, Gil-Han Bai, and Yoon-Hog Kook. [Differential Identification of Mycobacterium tuberculosis complex and Nontuberculosis Mycobacteria by Duplex PCR assay Using the RNA Polymerase Gene (rpoB).] J. Clin. Microbiol.(2004). 42:1308–1312
- 4 Linda M. Parsons et al. [Rapid and Simple Approach for Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates by PCR-based Genomic Deletion Analysis.] J. Clin. Microbiol. (2002). 40:2339–2345
- 5 TDR, FIND SA. Diagnostics for Tuberculosis: Global demand and market potential. 2006
<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/tbdi/tbdi.pdf>
- 6 Jong-Yoon Chun. [Dual Priming Oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Research. (2007). 1–6
- 7 A. S. Mustafa, A. T. Abal and T. D. Chugh. [Detection of Mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculosis mycobacteria by multiplex polymerase chain reaction.] Eastern Mediterranean Health Journal. (1999). 5:61–70
- 8 Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal ML, Gutierrez J, et al. [Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli.] J. Clin. Microbiol. (1997). 35:364–368
- 9 Heifets, L., T. Linder, T. Sanchez, D. Spencer, and J. Brennan. [Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for Mycobacterium tuberculosis isolation from sputum specimens.] J. Clin. Microbiol. (2000). 28:1227–1230
- 10 Vivan Jonas, Martha J. Alden, Janis I. Curry, Keichii Kamissango, Caroline A. Knott, Roger Lamkford, Julia M. Wolfe and Douglas F. Moore. [Detection and Identification of Mycobacterium tuberculosis Directly from Sputum Sediments by Amplification of rRNA.] J. Clin. Microbiol. (1993). 31:2410–2416
- 11 Adjers-Koskela, K., and M. L. Katila. [Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis.] J. Clin. Microbiol. (2003). 41:1235–1239
- 12 Naoki Hasegawa, Takao Miura, Koudou Ishii, Kazuhiro Yamaguchi, Thomas H. Lindner, Samuel Merritt, Janis D. Matthews, and Salman H. Siddiqi. [New Simple and Rapid Test for Culture Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex: a Multicenter Study.] J. clin. Microbiol. (2002). 40:908–912

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
	Směs oligonukleotidů pro amplifikaci a detekci
	PCR Master Mix nebo Detection Mix
	RNase-free Water
	Pozitivní kontrola (PC)
	Roztok pro izolaci DNA
	Viz návod k použití
	Výrobce
	Datum výroby
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství
	Upozornění
	Obsahuje dostatečné množství pro <n> testů
	Jedinečný identifikátor zařízení
	Čárový kód reakce zařízení pro automatickou izolaci

INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ

Kat.č.	Produkt	Veli kost
--------	---------	--------------

Řada Anyplex™ TB

TB7200Y	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)	50 reakcí
TB7200X	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)	100 reakcí*
TB7202Y	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	50 reakcí
TB7202X	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	100 reakcí*
TB7203Y	Anyplex™ MTB/NTM Combi	50 reakcí
TB7203X	Anyplex™ MTB/NTM Combi	100 reakcí*

* Pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet.

Řada Allplex™ TB

TB10173Y	Allplex™ MTB/MDR/XDRe Detection	50 reakcí
TB10174X	Allplex™ MTB/MDR/XDRe Detection	100 reakcí*
TB9400Y	Allplex™ MTB/MDRe Detection	50 reakcí
TB9400X	Allplex™ MTB/MDRe Detection	100 reakcí*
TB9500Y	Allplex™ MTB/XDRe Detection	50 reakcí
TB9500X	Allplex™ MTB/XDRe Detection	100 reakcí*

* Pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet.

Anyplex™ II řada TB

TB7500Y	Anyplex™ MTB/MDR/XDR II Detection	50 reakcí
TB7301Y	Anyplex™ MTB/MDR II Detection	50 reakcí
TB7302Y	Anyplex™ MTB/XDR II Detection	50 reakcí

Řada Seeplex® TB

TB2110Y	Seeplex® MTB Nested ACE Detection (V2.3)	50 reakcí
---------	--	-----------

Zařízení pro automatickou izolaci

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	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T / 1box