



VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0

REF ES-0008-50  50 testů

Pro amplifikaci specifických mykobakteriálních sekvencí



In vitro diagnostický zdravotnický prostředek
podle EU směrnice 98/79/EC

1. Doporučené použití

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 je určen k amplifikaci a biotylaci specifických částí ITS a v případě komplexu *M. tuberculosis* oblastí IS6110 i oblastí SR4 (Zozaya-Valdés et al 2017) mykobakteriálních genomů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití vzorků DNA extrahovaných např. z klinických vzorků, plicních nátěrů nebo z kultivovaných vzorků.

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 je navržen tak, aby amplifikoval mykobakterie, včetně těch, které jsou detekovány odpovídajícími VisionArray MYCO Chips a, pokud jsou přítomny ve vzorku DNA, genomových sekvencí lidského genu HLA-DQA1 jako pozitivní kontroly PCR.

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 musí být použit s VisionArray Detection Kit a odpovídajícími VisionArray MYCO Chips. Automatizovaná analýza musí být provedena pomocí balíčku VisionArray Software.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití *in vitro* (podle směrnice EU 98/79 / ES). Interpretace výsledků musí být provedena v kontextu klinické anamnézy pacienta s ohledem na další klinické a patologické údaje o pacientovi kvalifikovaným patologem.

2. Klinický význam

Viz pokyny pro použití příslušného čipu.

3. Princip testu

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) lze selektivně amplifikovat sekvence DNA. Základní princip PCR je založen na opakujícím se kruhu 3 kroků: denaturace, annealing a elongace. Opakování těchto kroků vede k exponenciálnímu zesílení cílových sekvencí.

Prvním krokem každého cyklu je denaturace, kdy zahřátí reakční směsi vede k jednoduchým řetězcům DNA. Během žhání se komplementární primery váží na jednovláčkovou DNA.

Primery lemuji cílovou sekvenci a slouží jako výchozí bod pro integraci nukleotidů během fáze elongace a vytvářejí identické kopie šablonové DNA. Primery použité v této soupravě jsou označeny molekulou biotinu. Proto je každý nový produkt PCR automaticky biotinylován, což později umožňuje detekci protilátek.

Aby se zabránilo kontaminaci produkty amplifikace PCR, jsou uracilové nukleotidy zahrnuty do VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0. Provedením kroku Uracil-DNA-glykosyláza před PCR mohou být odstraněny všechny sekvence, které obsahují báze uracilu, a tudíž možné kontaminace produkty PCR z předchozích PCR VisionArray. Uracil-DNA-glykosyláza je inaktivována při teplotách nad 95 ° C, takže PCR reakce může být provedena jako obvykle.

4. Dodané reagensie

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 se skládá z:

- VisionArray MYCO Primer
- Taq DNA Polymeráza
- Uracil-DNA Glykosyláza
- H₂O
- MgCl₂
- PCR-pufr
- dNTP/dUTP roztok

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 je k dispozici v jedné velikosti:

- ES-0008-50: 0.75 ml (50 reakcí po 15 μl)

5. Požadovaný materiál, který není součástí

Reagensie:

- H₂O (PCR-stupeň)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Doplňující příslušenství:

- PCR zkumavky
- Termocyklyer
- Pipety
- VisionArray MYCO Chip 2.0 (VA-0005)
- VisionArray SingleScan Software (E-4301) nebo VisionArray MultiScan Software (E-4302)

6. Skladování a zacházení

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 musí být skladován při -16 - 22 ° C ve svislé poloze. Při dodržení těchto podmínek skladování bude produkt fungovat, aniž by došlo ke ztrátě výkonu, minimálně do data expirace uvedeného na štítku.

Minimalizujte počet cyklů zmrazení a rozmrazení na maximálně 10 cyklů ukládáním do pracovních alikvotů. Po otevření lahvičky použijte zařízení do 6 měsíců.

Časové období produktu PCR při pokojové teplotě by mělo být co nejkratší.

7. Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby expirace!
- Vyvarujte se jakékoli křížové a mikrobakteriální kontaminace reagensií.
- Nikdy nepipetujte roztok ústy!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list. Aby se zabránilo kontaminaci, je nutné oddělení pracovních kroků s DNA a bez DNA, a použití čistých laviček pro přípravu hlavní směsi PCR.

8. Omezení

- Pro *in vitro* diagnostické použití.
- Pouze pro profesionální použití.
- Interpretace výsledků musí být provedena v kontextu klinické anamnézy pacienta s ohledem na další klinické a patologické údaje kvalifikovaným patologem.
- Je důležité používat uvedená množství složek, aby nedošlo k narušení reakčního procesu.
- Opakované rozmrazování a zmrazování vzorků DNA může vést ke zhoršení detekční reakce.

9. Interferující látky

- Nízká účinnost PCR v důsledku inhibice PCR v surové DNA (např. v krvi).
- Vysoké koncentrace EDTA v elučnicích pufrch DNA mohou vést k inhibici PCR. Používejte pouze doporučené množství DNA.

10. Příprava pro zacházení se vzorky

DNA vzorky extrahované např. z klinických vzorků, plicních nátěrů nebo kultivované vzorky mohou být použity jako vstupní materiál pro mykobakteriální genotypizaci.

Po extrakci je nutné měřit koncentraci DNA, aby se zkontrolovala kvalita a množství DNA. Každý vzorek by měl mít koncentraci DNA alespoň 15 ng / μ l s vysokým stupněm čistoty (260/280: ~ 1,8).

Během extrakce se vyhněte kontaminaci DNA. Při použití mikrotomu by tkáňové řezy měly být po řezání ihned umístěny do reakční zkumavky. Čepel mikrotomu by měla být vyměněna mezi různými vzorky tkáně. Totéž platí pro již fixované vzorky tkáně namontované na skleněné podložní sklíčka. Škrabka by měla být mezi různými vzorky vyměněna.

11. Příprava pro zacházení s příslušenstvím

Jako první krok určete množství požadovaných PCR (n), které vychází z množství vzorků DNA plus negativní kontroly (reakční směs bez templátu DNA).

Schéma pipetování:

Číslo	Reagencie	1x (finální konc.)	nx
1	VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0	15 μ l	
2	Vzorek DNA	2.5-5 μ l	
3	H ₂ O	ad 25 μ l	
	Celkový objem	25 μl	

- Alikvotujte VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 do lahvíček pro PCR bez DNA / DNázy.
- Pipetujte vzorek DNA do Master Mix (č. 2 v pipetovacím schématu). Pro negativní kontrolu přidejte 10 μ l vody bez DNA / DNázy.
- Je-li to nutné, přidejte vodu, abyste dosáhli konečného reakčního objemu 25 μ l (č. 3 v pipetovacím schématu).
- Přeneste vzorky do předešlého a kalibrovaného termocyklu.

12. Postup analýzy

Protokol amplifikace popsaný v této příručce byl vytvořen v 0,2 ml lahvíčkách PCR pomocí Master Mix na systému Biometra TProfessional Thermocycler. V případě potřeby je možné provést úpravy podle výrobce, jsou-li použity jiné termocykly. Proto je nutné tento protokol před použitím otestovat na kompatibilitu. Použitý termocycler musí být kalibrován podle pokynů výrobce.

Teplotní profil:

Čas	Teplota	Opakování	Krok
10 min	25°C	x1	Inkubace Uracil-DNA Glykosylázou
10 min	95°C	x1	Aktivace HotStart Taq polymerázy, Deaktivace uracil-DNA glykosylázy
20 s	95°C	x35	Denaturace
90 s	60°C		Annealing a Elongace
60 s	95°C	x1	Denaturace
∞	10°C	x1	

Ramping time: Δ 5°C/s

Teplotní profil je optimalizován pro činidla doporučená v této příručce. Změny chemického složení nebo nastavení musí uživatel před použitím ověřit.

Po dokončení PCR by měla být reakční lahev uložena na -16 °C -22 °C.

13. Interpretace výsledků

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 je doporučováno použít s VisionArray MYCO Chip a VisionArray Detection Kit. Interpretace výsledků musí být provedena pomocí příslušného VisionArray Software.

14. Doporučené postupy kontroly kvality

Za účelem sledování správného výkonu zpracovaných vzorků a testovacích reagentů by ke každému testu měly být přiloženy externí validované pozitivní a negativní kontrolní vzorky. Pokud interní a / nebo externí kontroly neprokazují vhodné zbarvení, musí být výsledky se vzorky pacientů považovány za neplatné.

Kontrolu PCR a amplifikátů lze poté provést separací v elektroforéze na agarózovém gelu. Délka fragmentu mykobakteriálních druhů je 212 - 314 bp pro část oblasti ITS a 122 bp pro oblast IS6110 komplexu M. tuberculosis. Pozitivní kontrola vykazuje band 227 bp.

Kvůli podmínkám PCR, které upřednostňují jednovláčkové produkty, nejsou jasně ohraničené pásy přítomny v každém testu. Úspěšná hybridizace čipů je však stále možná. Další podrobnosti najdete v části řešení problémů.

15. Charakteristika provedení

Viz výkonové charakteristiky příslušných VisionArray MYCO Chip.

16. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

17. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k použití může vést ke zhoršení detekční reakce cílové sekvence.

Problém	Možná příčina	Řešení
Chybějící nebo malý produkt amplifikace	Expirovaná nebo degenerovaná reakční činidla PCR; špatný program termocyklu.	Zkontrolujte PCR reagenty a program termálního cyklu.
	Degradovaná templátová DNA; nízký výtěžek DNA.	Uložte DNA na -16 -20 °C; vyhnout se opakovanému rozmrazování a zmrazování; použít alternativní extrakční protokol.
	Inhibitory PCR v reakční směsi.	Použijte alternativní extrakční protokol.
PCR amplifikáty v negativní kontrole.	Kontaminace reagentů během přípravy vzorku nebo v nastavení PCR.	Použijte čerstvé reagenty; zamezte kontaminaci vzorků.

18. Literatura

- Griffith D.E., et al (2007) Am J Respir Crit Care Med. 175(4):367-416
- Official statement of the american thoracic society (1997), Am J Respir Crit Care Med. 156(2 Pt 2):S1-25
- Simons S., et al (2011) Emerg Infect Dis. 17(3):343-9
- Gupta R.S., et al (2018) doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
- Oren A. and Garrity G. (2018) Int J Syst Evol Microbiol 68:1411–1417
- Zozaya-Valdés E., et al (2017) J Clin Microbiol 55:1847–1856.

Naši odborníci jsou k dispozici pro zodpovězení vašich otázek.
Prosím kontaktujte helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Ochranná známka:
VisionArray® je pod ochrannou známkou
ZytoVision GmbH