



## VisionArray MYCO Chip 2.0

REF VA-0005-10  $\Sigma$  10 testů

Pro specifickou detekci rodu *Mycobacterium* a několika klinicky relevantních druhů mykobakterií, které byly vyrobeny pomocí VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0



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

### 1. Doporučené použití

VisionArray MYCO Chip 2.0 je určen k použití s balíčkem VisionArray Software pro kvalitativní detekci a identifikaci PCR amplifikátů rodu *Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacter* a *Mycolicibacterium* a také několika klinicky relevantních druhů mykobakterií, které v nich byly vyrobeny pomocí VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0.

Rod *Mycobacterium* byl nedávno rozdělen do 5 odlišných rodů *Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacter* a *Mycolicibacterium*, jak navrhli Gupta et al. (2018) a platně zveřejněna v seznamu ověřování č. 181 (Oren and Garrity 2018). Kvůli jasnosti a konzistenci se však v částech této příručky bude i nadále používat bývalý jediný rod *Mycobacterium*.

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

Vydané rody mykobakterií zahrnují více než 140 druhů, které byly za účelem diagnostiky a léčby rozděleny do tří kategorií: komplex *M. tuberculosis* (MTC), *M. leprae* a netuberkulózní mykobakterie (NTM). Vzhledem k jejich rozdílu v patogenitě, virulenci a reakci na léky má detekce a diferenciaci těchto patogenů v klinických vzorcích pacientů s klinicky suspektní tuberkulóznou zásadní význam.

VisionArray MYCO Chip 2.0 je navržen tak, aby detekoval druhy mykobakterií uvedené v kapitole 4 „Poskytovaná činidla“.

### 3. Princip testu

Fragmenty DNA se specifickou sekvencí jsou detekovány ze skupiny fragmentů DNA na skleněném čipu pomocí imobilizovaných sekvencí pro zachycení DNA pomocí hybridizace DNA / DNA. Pro tento detekční systém byly vzorky DNA extrahovány např. jako surovina lze použít klinické vzorky, plicní nátěry nebo kultivované vzorky. Jako první krok musí být cílové sekvence v těchto vzorcích amplifikovány a biotinylovány pomocí PCR. Hybridizace mezi amplifikovanými sekvencemi a komplementárními sekvencemi pro zachycení DNA se provádí následně. Po hybridizaci je nespecificky vázaná DNA odplavena krátkými přísnými promývacími kroky. Specificky vázané biotinylované sekvence jsou sekundárně značeny konjugátem streptavidin-peroxidáza poté a vizualizovány barvením tetramethylbenzidinem (TMB).

### 4. Dodaná činidla

Zahrnutý jsou následující komponenty:

| Kód     | Komponenty                | Množství    |
|---------|---------------------------|-------------|
|         |                           | 10 $\Sigma$ |
| VA-0005 | VisionArray MYCO Chip 2.0 | 10          |
|         | Návod k použití           | 1           |

#### Popis čipu:

Umístění zachycených sekvencí na čipu:

|    |   |    |    |    |    |    |    |   |    |
|----|---|----|----|----|----|----|----|---|----|
| GD |   |    |    |    |    |    |    |   | GD |
|    |   |    |    |    |    |    |    |   |    |
|    | + | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  |   |    |
|    |   | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |   |    |
|    |   | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |   |    |
|    |   | 6  | 5  | 4  | 3  | 2  | 1  | + |    |
|    |   | 12 | 11 | 10 | 9  | 8  | 7  |   |    |
|    |   | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 |   |    |
|    |   |    |    |    |    |    |    |   |    |
| GD |   |    |    |    |    |    |    |   |    |

|    |  |    |  |
|----|--|----|--|
| GD | Guide Dot  | 9  | <i>M. gordonae</i>                                     |
| +  | PCR pozitivní kontrola                             | 10 | <i>M. haemophilum</i>                                  |
| 1  | <i>M. tuberculosis</i> complex (ITS Region)        | 11 | <i>M. kansasii</i>                                     |
| 2  | <i>M. tuberculosis</i> complex (IS6110 Region)     | 12 | <i>M. malmoense</i>                                    |
| 3  | <i>M. abscessus</i>                                | 13 | <i>M. marinum</i> /<br><i>M. ulcerans</i>              |
| 4  | <i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> complex | 14 | <i>M. scrofulaceum</i> /<br><i>M. parascrofulaceum</i> |
| 5  | <i>M. chelonae</i>                                 | 15 | <i>M. simiae</i>                                       |
| 6  | <i>M. chimaera</i>                                 | 16 | <i>M. smegmatis</i>                                    |
| 7  | <i>M. fortuitum</i>                                | 17 | <i>M. szulgai</i>                                      |
| 8  | <i>M. genavense</i>                                | 18 | <i>M. xenopi</i>                                       |

Bod pro komplex *M. tuberculosis* zahrnuje: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* a *M. pinnipedii*.

Bod pro komplex *M. avium* / *M. intracellulare* zahrnuje:

*M. avium*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. timonense*, *M. yongonense*, *M. lepraemurium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. bouchardurhonense*, *M. marseillense* a *M. paraintracellulare*.

## 5. Potřebný materiál, který ale není součástí

- VisionArray SingleScan Software (E-4301) nebo VisionArray MultiScan Software (E-4302)
- VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 (ES-0008)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

VisionArray Softwares musí pro úspěšné skenování obsahovat VisionArray MYCO Chip File 2.0 (E-4205).

## 6. Skladování a manipulace

Čipy musí být skladovány v neporušeném původním obalu při -16 až -22 ° C. Při dodržení těchto podmínek skladování jsou čipy stabilní, bez ztráty výkonu, alespoň do data expirace vytištěného na štítku.

Po otevření původního obalu skladujte při -16 až -22 ° C a čipy použijte do dvou měsíců.

## 7. Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte čipy po uplynutí doby použitelnosti!
- Čipy by se měly používat v bezprašném prostředí. Zabraňte kontaminaci povrchu třísky prachem nebo jinými částicemi!
- Vyvarujte se přímého kontaktu s polem pole na povrchu čipu!
- K hybridizaci lze použít pouze označenou stranu sklíčka.
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože by to mohlo vést k chybným výsledkům.

## 8. Omezení

- Pro diagnostické použití in vitro.
- Pouze pro profesionální použití.
- Interpretace výsledků musí být provedena v kontextu klinické anamnézy pacienta s ohledem na další klinické a patologické údaje kvalifikovaným patologem.
- Čip by měl být používán pouze pro detekci mykobakteriálních druhů popsaných v bodě 2. „Klinický význam“.

Dále mohou na detekční systém ovlivnit následující faktory:

- Odchylka od navrhovaného detekčního protokolu (např. Teplota nebo objemy reagensů).
- Degradovaný nebo málo koncentrovaný materiál DNA.
- Nevhodná surovina.
- Použití nekalibrovaného nebo poškozeného zařízení.
- U silných mykobakteriálních infekcí nebo v případě více infekcí může být snížena intenzita pozitivní kontroly PCR.
- Během postupu nepracujte pod laminárním tokem, protože by to mohlo vést ke zhoršení výsledků.results.

## 9. Interferující látky

- Nízká účinnost PCR díky inhibitorům PCR ve vstupní DNA (např. v krvi).
- Použití přísad PCR, které by mohly ovlivnit hybridizaci (např. DMSO, betain, močovina).

## 10. Příprava zacházení se vzorky

Výchozím materiálem pro tento detekční systém jsou produkty amplifikace PCR, které byly vyrobeny s VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0.

Hybridizaci a detekci čipů je třeba provést pomocí sady VisionArray Detection Kit podle pokynů k použití.

## 11. Příprava čipu před použitím

Před použitím nechte čipy vytemperovat na pokojovou teplotu (18-25°C).

## 12. Postup analýzy

Proveďte skenování podle pokynů pro použití příslušného balíčku pro VisionArray Software.

## 13. Interpretace výsledků

S pomocí VisionArray MYCO Chip 2.0 je možné udělat kvalitativní prohlášení o přítomnosti nebo nepřítomnosti jednoho nebo více druhů mykobakterií ve zkoumaném vzorku.

Intenzitu signálů ovlivňuje prevalence cílových sekvencí ve vzorku i různé faktory detekčního systému. Absolutní čísla intenzity signálu nelze použít ke kvantifikaci koncentrace DNA.

### Software hodnocení

Automatizované vyhodnocení výsledků se provádí pomocí příslušného VisionArray Software. K softwaru je přiložen komplexní manuál pro analýzu čipů. Softwarem.

## 14. Doporučené postupy kontroly kvality

### Interní kontrola

- Vodicí tečky / kontrola hybridizace (GD): Tyto tečky používá příslušný VisionArray Software pro umístění měřičky. Barvení vodicích teček je navíc důkazem úspěšné hybridizační, značkovací a barvicí reakce a používá se k výpočtu relativní intenzity signálů.
- Pozitivní kontrola / kontrola PCR (+): Tyto kontroly se používají k vyhodnocení reakce PCR a kvality templátu PCR.
- Všechny sekvence zachycení a pozitivní kontrola jsou nastaveny na čipu jako duplikáty a vodicí body jako triplikáty. Signály jsou na čipu viditelné jako signály kruhové hybridizace.

### Externí kontrola:

Za účelem sledování správného výkonu zpracovaných vzorků a testovacích reagensů by ke každému testu měly být přiloženy externí validované pozitivní a negativní kontrolní vzorky. Pokud některá z interních a / nebo externích kontrol nedokáže prokázat vhodné zbarvení, musí být výsledky se vzorky pacientů považovány za neplatné.

## 15. Výkonostní charakteristika

### 15.1 Analytický výkon

Analytická specifita a citlivost čipu VisionArray MYCO 1.0 byla testována pro každý mykobakteriální druh na čipu samostatně. Za tímto účelem byly testovány sekvencně ověřené plazmidy s koncentrací 5-500 000 ekvivalentů genomu (GEQ).

### Specifita a limit detekce pro druhy mykobakterií.

| Mycobacterium                         | Specifita [%] | Limit detekce (GEQ) |
|---------------------------------------|---------------|---------------------|
| M. tuberculosis complex (ITS)         | 100           | 50                  |
| M. tuberculosis complex (IS6110)      | 100           | 5                   |
| M. abscessus                          | 100           | 500                 |
| M. avium / M. intracellulare complex  | 100           | 50                  |
| M. chelonae                           | 100           | 1000                |
| M. chimaera                           | 100           | 50                  |
| M. fortuitum                          | 100           | 50                  |
| M. genavense                          | 100           | 50                  |
| M. goodii                             | 100           | 50                  |
| M. haemophilum                        | 100           | 50                  |
| M. kansasii                           | 100           | 50                  |
| M. malmoense                          | 100           | 50                  |
| M. marinum / M. ulcerans              | 100           | 50                  |
| M. scrofulaceum / M. parascrofulaceum | 100           | 50                  |
| M. simiae                             | 100           | 50                  |
| M. smegmatis                          | 100           | 50                  |
| M. szulgai                            | 100           | 50                  |
| M. xenopi                             | 100           | 50                  |

Citlivost závisí na množství a účinnosti cyklů PCR, a afinitě sekvencí pro zachycení DNA.

Zjištěná citlivost se týká detekce jediné cílové sekvence. Detekce mnohonásobné infekce může vést ke zhoršení citlivosti některých mykobakteriálních druhů v důsledku kompetice během reakce PCR, zejména ve směsných vzorcích se silným rozdílem v koncentraci.

Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon a musí být ověřeny uživatelem.

## 15.2 Zkřížená hybridizace

Při testování s koncentrací až 500 000 GEQ nebyly pozorovány žádné křížové hybridizace.

## 15.3 Odpojení

Pro vyhodnocení výsledků je velikost bodu nastavena na 50.

Prahová hodnota (mezní hodnota) byla nastavena na 25 pro obrázek ve stupních šedi této velikosti tečky. Signál pod touto hodnotou je považován za pozadí při služném [VisionArray Software](#).

## 16. Likvidace

Likvidace čidel 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. sequence.

| Problém   | Možná příčina  | Řešení  |
|---|--|---|
| Žádný signál  | Špatná teplota   | Zkontrolujte teplotu hybridizace  |
|   | Expirovaná činidla   | Zkontrolujte reagenty   |
| Pouze vodící tečky a žádné další signály                        | Problémy s PCR-produktem (PCR není dostatečně účinná nebo je degradován templát DNA)                         | Zkontrolujte účinnost PCR s pozitivní kontrolou;<br>Zkontrolujte PCR-chemikálie a program termocyklu;<br>Zkontrolujte PCR-produkt v agarosovém gelu |
|   | Špatný původní materiál  | Zkontrolujte původní materiál   |
|   | Špatná kombinace čip a vzorek  | Zkontrolujte vzorek /čip kombinaci  |
| Pouze vodící tečky a PCR-kontrola, ale žádný jiný signál        | Není k dispozici žádná cílová sekvence   | Použijte pozitivní kontrolu   |
| Pouze vodící tečky a signály MYCO, ale žádná pozitivní kontrola | Silná infekce mykobakteriemi nebo mnohočetná infekce mykobakteriemi  | Nařeďte vzorek DNA  |
|   | Materiál pro buněčnou kulturu mykobakterií, ve vzorku žádná lidská genomová DNA                              | -   |
|   | Degradovaný vzorek   | Nová extrakce DNA; skladujte při -16...-22°C  |
| Příliš mnoho pozadí   | Inkubační doba detekčního roztoku nebo roztoku Blue Spot příliš dlouhá; teplota během inkubace příliš vysoká | Zkontrolujte inkubační čas a teplotu detekčního roztoku a roztoku Blue Spot   |
|   | Sklička nejsou řádně vysušena  | Zkontrolujte krok sušení  |
| Silné, netěsné signály  | Inkubační doba detekčního roztoku nebo roztoku modré skvrny příliš dlouhá nebo příliš vysoká teplota         | Postupně nastavení doby inkubace a teploty detekčního roztoku a roztoku Blue Spot   |
| Slabé signály   | Hybridizační teplota je nesprávná  | Zkontrolujte teplotu  |
|   | Hybridizační čas je příliš krátký  | Prodlužte dobu hybridizace na maximálně 30 minut  |
|   | Inkubační doba detekčního roztoku nebo roztoku Blue Spot je příliš krátká                                    | Prodlužte inkubační dobu detekčního roztoku a roztoku Blue Spot   |
|   | Slabá PCR amplifikace / špatná kvalita DNA Templátu  | Zkontrolujte DNA templát  |
| Crosshybridizační signály, falešně pozitivní signály            | Kontaminace chemikálií PCR nebo produktu PCR   | Vyměňte používané chemikálie pro PCR  |
|   | Kontaminace během přípravy PCR nebo hybridizační směsi   | Během přípravy směsi se vyhněte přenosu vzorku  |

|                              |  |  |
|------------------------------|--|--|
|                              | Hybridizační teplota je příliš nízká   | Zkontrolujte teplotu hybridizace                                   |
|                              | Několik čipů inkubovaných příliš dlouho ve stejném promývacím pufru          | Rychlé provedení mycích kroků                                      |
| Jeden signál místo duplikátů | Mechanická eliminace druhého signálu, např. kvůli kontaktu se špičkou pipety | Vyhnete se při ímém kontaktu s polem analýzy                       |
|                              | Nepřesné zakrytí pole pole v důsledku vzduchových bublin                     | Aplikujte roztoky bez vzduchových bublin                           |
|                              | Slabé signály kolem prahu (1 nahore a 1 dole)                                | Opakujte PCR a detekci s ohledem na podmínky požadované v příručce |

## 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
- Roth et al (1998) J Clin Microbiol. 36(1):139-47
- 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

Naši odborníci jsou k dispozici pro zodpovězení vašich otázek. Prosím kontaktujte [help@zytovision.com](mailto:help@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