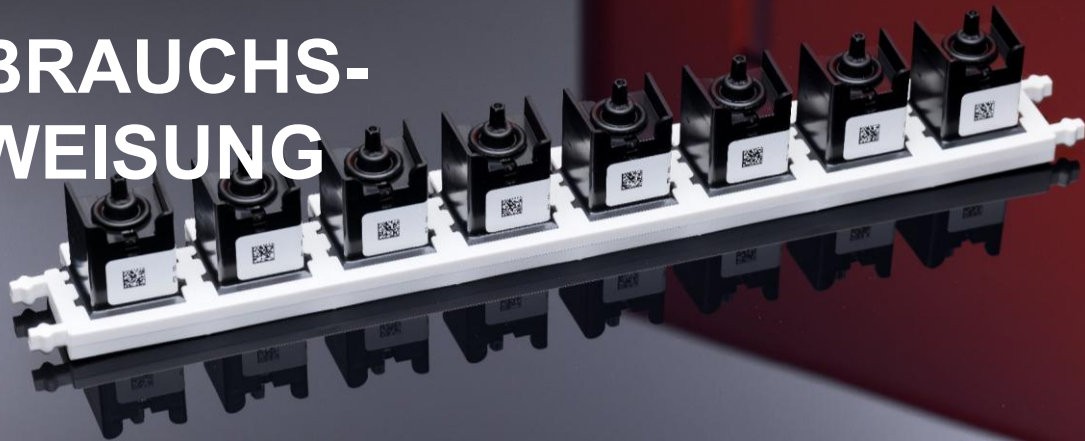


GEBRAUCHS- ANWEISUNG



Pathogens xB_instructions for use D_2025_07_01
© 2025 Cube Dx GmbH



Juli 2025.

Produkte der Risikoklasse A (IVDR – EU 2017/746)

IPC	Basic UDI-DI 912012773PathoxBK8	REF / UDI-DI 09120127730169
PCR-Box IPC		REF / UDI-DI 09120127730114
GINA 500	Basic UDI-DI 912012773GINA7H	REF / UDI-DI 09120127730244
GINA 500 + DNA Purification		REF / UDI-DI 09120127730145
Kit zur Anreicherung bakterieller und fungaler DNA aus menschlichem Blut (+ DNA-Aufreinigung) einschließlich einer internen Prozesskontrolle (IPC)		
LINA	Basic UDI-DI 912012773LINA8L	REF / UDI-DI 09120127730152
Modulationspuffer für die extraktionsfreie Testung Bronchoalveolärer Lavage (BAL) und positiver Blutkultur		

Legacy Devices / Produkte der Risikoklasse C (IVDR – EU 2017/746)

PCR-Box Bacteria	Basic UDI-DI 912012773PathoxBK8	REF / UDI-DI 09120127730084
PCR-Box Bacteria 48rx-s		REF / UDI-DI 09120127730725
PCR-Box Resistance		REF / UDI-DI 09120127730763
PCR-Box Fungi		REF / UDI-DI 09120127730091
PCR-Box Fungi 48rx-s		REF / UDI-DI 09120127730732
hybcell Bacteria DNA xB		REF / UDI-DI 09120127730053
hybcell Fungi DNA xB		REF / UDI-DI 09120127730060
hybcell Pathogens DNA xB		REF / UDI-DI 09120127730077
Multiplexe DNA-Tests zum Nachweis bakterieller 16S rDNA und bakteriellen Antibiotikaresistenzgenen mit Hinweis auf Homologien zu bekannten bakteriellen Typstämmen und zum Nachweis fungaler 28S rDNA mit Hinweis auf Homologien zu bekannten fungalen Typstämmen aus menschlichen Proben.		



Inhalt








1. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE	3
2. ZWECKBESTIMMUNG	4
3. ALLGEMEINE PRODUKTBESCHREIBUNG	6
4. PRODUKTKOMPONENTEN	12
5. LAGERUNG, TRANSPORT, HALTBARKEIT UND ENTSORGUNG	14
6. ZUBEHÖR UND GERÄTEKOMBINATIONEN	16
7. TESTVERFAHREN	18
8. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	28
9. ANALYTISCHE LEISTUNGSMERKMALE	35
10. KLINISCHE LEISTUNG	38
11. VERÄNDERUNGEN DER ANALYTISCHEN LEISTUNG	40
12. FEHLERBEHEBUNG	41

Versionsinformationen

Diese Gebrauchsanweisung wurde in einigen Teilen überarbeitet. Insbesondere die Zweckbestimmungen wurden an die Vorschriften der IVDR-Verordnung (EU 2017/746 und deren Ergänzungen und Empfehlungen) angepasst. Zur besseren Lesbarkeit und Klarheit wurden die technische Beschreibung und die Anwendungsbeschreibung zusammengefasst. Änderungen bei der Testung von Antibiotikaresistenzgenen und der Bereitstellung von Produktvarianten der PCR-Mixe wurden berücksichtigt. Die Beschreibung des Arbeitsablaufs unter Verwendung von geneLEAD VIII (von PSS) wurde hinzugefügt. Es wurden geringfügige Änderungen und Korrekturen vorgenommen.



1. Erklärung der Symbole

Symbol	Erklärung
	CE-Kennzeichnung. In-vitro-Diagnostikum.
	Hersteller.
EXP	Verfallsdatum.
REF	Katalognummer, UDI-DI.
SN	Seriennummer.
	Verweis auf die Gebrauchsanweisung.
	Nur einmal verwenden. Nicht wiederverwenden.
	Verwendungsdatum.
	Temperaturgrenze für die Lagerung.
	Ausreichend für <n> Tests.
CONTROL	Kontrollmaterial.
H225	Hochentzündliche Flüssigkeit und Dampf.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizungen.
H371	Kann die Organe schädigen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dämpfe/Aerosole nicht einatmen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P301+P310	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat/Hilfe einholen/hinzuziehen.
P370+P378	Im Brandfall: Mit Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöscher löschen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort lagern. Kühl halten.
P501	Inhalt/Behälter gemäß den lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften entsorgen.



2. Zweckbestimmung

GINA 500

Das *GINA 500 + DNA-Purification* -Kit und seine Variante *GINA 500* sind Probenvorbereitungskits, die für die manuelle Probenvorbereitung zur anschließenden Extraktion von mikrobieller (bakterieller/fungaler) DNA/RNA aus EDTA-Vollblut entwickelt wurden. Die Kits bestehen aus mehreren Reagenzien, die menschliche Zellen und DNA aus EDTA-Vollblutproben entfernen und verbleibende mikrobielle Zellen effizient lysieren.

Nach der Probenvorbereitung muss die mikrobielle DNA/RNA gereinigt/extrahiert werden. Es können unterschiedliche DNA/RNA-Extraktionsprodukte die geeignet sind verwendet werden.

Die Produkte werden in Verbindung mit DNA-basierten Tests, beispielsweise PCR-Tests oder DNA-Sequenzierung, verwendet, um qualitative Ergebnisse zu liefern und die Diagnose oder das Screening von vermuteten bakteriellen und/oder Pilz-Infektionen im klinischen Kontext von Blutbahninfektionen zu unterstützen.

Die Verwendung der Produkte ist unabhängig vom Alter, Geschlecht, Genotyp oder anderen demografischen Merkmalen des Patienten. Keine bestimmte Patientengruppe ist von der Untersuchung ausgeschlossen. Der behandelnde Arzt entscheidet, ob die Probenentnahme für einen einzelnen Patienten gerechtfertigt ist.

Die Produkte sind für den professionellen Einsatz im Rahmen umfassender Diagnoseprozesse bestimmt.

LINA

LINA ist ein Probenvorbereitungskit für die manuelle Vorbereitung von (positiven) Blutkulturen und Bronchoalveolaren Lavagen (BAL) für anschließende DNA-basierte Tests auf Bakterien und Pilze. Das Kit ist ein Reagenz, das die Probe für die direkte Verwendung – ohne DNA-Extraktion – für DNA-basierte Tests vorbereitet.

Das Produkt wird in Verbindung mit DNA-basierten Tests, beispielsweise PCR-Tests oder DNA-Sequenzierung, verwendet, liefert qualitative Ergebnisse und unterstützt die Diagnose von bakteriellen und/oder Pilz-Infektionen der Atemwege (BAL) oder anderen Infektionen (Blutkultur).

Die Verwendung des Produkts ist unabhängig vom Alter, Geschlecht, Genotyp oder anderen demografischen Merkmalen des Patienten. Keine bestimmte Patientengruppe ist von der Untersuchung ausgeschlossen. Der behandelnde Arzt entscheidet, ob die Probenentnahme für einen einzelnen Patienten gerechtfertigt ist.

Das Produkt ist für den professionellen Einsatz im Rahmen umfassender Diagnoseprozesse vorgesehen.

PCR-Boxen

PCR-Box Bacteria ist ein gebrauchsfertiger Polymerase-Kettenreaktionsmix – erhältlich in verschiedenen Abfüllungen – zur Amplifikation und zum Nachweis von bakterieller 16S-rDNA in Eluaten aus geeigneten RNA/DNA-Extraktionsverfahren.

PCR-Box Fungi ist ein gebrauchsfertiger Polymerase-Kettenreaktionsmix – erhältlich in verschiedenen Abfüllungen – zur Amplifikation und zum Nachweis von fungaler 28S-rDNA in Eluaten aus geeigneten RNA/DNA-Extraktionsverfahren.

Beide Produkte liefern qualitative Ergebnisse, die zum Screening und zur Diagnose von bakteriellen und Pilz-Infektionen in verschiedenen klinischen Kontexten verwendet werden.

PCR-Box Resistance ist ein gebrauchsfertiger Polymerase-Kettenreaktionsmix zur Amplifikation und zum Nachweis verschiedener Antibiotikaresistenzgenen in Eluaten aus geeigneten RNA/DNA-Extraktionsverfahren.

Das Produkt liefert qualitative Ergebnisse, die zur Diagnose möglicher Antibiotikaresistenzen in verschiedenen klinischen Kontexten auf der Grundlage genotypischer Assoziationen von Mutationen mit beobachteter phänotypischer Resistenz verwendet werden.

Die Verwendung der Produkte ist unabhängig vom Alter, Geschlecht, Genotyp oder anderen demografischen Merkmalen des Patienten. Keine bestimmte Patientengruppe ist von der Untersuchung ausgeschlossen.



Die Produkte sind für den professionellen Einsatz im Rahmen umfassender Diagnoseprozesse vorgesehen.

hybcells Pathogens xB

hybcell Bacteria DNA xB ist ein kartuschenbasierter Test zur Identifizierung von Bakterienspezies, -gattungen oder -gruppen sowie Antibiotikaresistenzgenen unter Verwendung des proprietären *compact sequencing* von Cube Dx und des *hyborg Dx RED2/3* (Analysegerät). *hybcell Fungi DNA xB* ist ein kartuschenbasierter Test zur Identifizierung von Fungispezies, -gattungen oder -gruppen unter Verwendung des proprietären *compact sequencing* von Cube Dx und des *hyborg Dx RED2/3* (Analysegerät).

hybcell Pathogens DNA xB ist ein kartuschenbasierter Test zur Identifizierung von Bakterien- und Fungispezies, -gattungen oder -gruppen und Antibiotikaresistenzgenen unter Verwendung des proprietären *compact sequencing* von Cube Dx und des *hyborg Dx RED2/3* (Analysegerät).

Die mit *PCR-Box Bacteria xB* und/oder *PCR-Box Resistance xB* und/oder *PCR-Box Fungi xB* erzeugten Amplikons werden in die Kartuschen eingefüllt und dienen als Proben (siehe oben).

Die Produkte liefern qualitative Ergebnisse, die zur Diagnose von bakteriellen und Pilz-Infektionen in verschiedenen klinischen Kontexten verwendet werden.

Die Verwendung der Produkte ist unabhängig vom Alter, Geschlecht, Genotyp oder anderen demografischen Merkmalen des Patienten. Keine bestimmte Patientengruppe ist von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die Produkte sind für den professionellen Einsatz im Rahmen umfassender Diagnoseprozesse vorgesehen.



3. Allgemeine Produktbeschreibung

Allgemeine Informationen

Bei Verdacht auf eine Blutstrominfektion ermöglicht der Nachweis des verursachenden Mikroorganismus direkt aus dem Vollblut eine frühzeitige und gezielte antimikrobielle Therapie. Letztere ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Behandlung der Infektion und die Begrenzung oft schwerwiegender Nebenwirkungen, die letztendlich zum Tod des Patienten führen können. Herkömmliche Kulturmethode liefern möglicherweise keine frühzeitigen Ergebnisse, insbesondere wenn es sich bei dem verursachenden Mikroorganismus um ein Bakterium handelt, das spezielle Wachstumsbedingungen fordert (z. B. *Bordetella pertussis*), oder um ein langsam wachsendes Bakterium (z. B. *Helicobacter pylori*, das bis zu 7 Tage benötigt, um in Kultur zu wachsen) oder um Pilze (z. B. *Candida glabrata*). Insbesondere in solchen Fällen kann die frühzeitige Identifizierung von Mikroorganismen durch Cube Dx für Patienten von entscheidendem Vorteil sein, da die Überlebenschancen und die Genesung nach einer Sepsis und anderen schweren Infektionen durch die frühzeitige Identifizierung und gezielte Behandlung der verursachenden Erreger erhöht werden können.

Die Produkte sind allerdings für den komplementären Einsatz zur klassischen Blutkultur konzipiert. Sie sind keinesfalls als Ersatz für Blutkulturtechniken gedacht. Die Ergebnisse der direkten Blutuntersuchung sollten in Verbindung mit anderen relevanten klinischen und Laborbefunden interpretiert werden, um eine gezielte Therapie für Patienten mit Verdacht auf Sepsis zu ermöglichen.

Gelegentlich kann es zu widersprüchlichen Ergebnissen gegenüber der Blutkultur kommen: Beispielsweise kann das Produkt ein negatives Ergebnis anzeigen, während das Ergebnis der Blutkultur positiv ist, und umgekehrt. Solche Diskrepanzen können auf eine sehr geringe Anzahl von Mikroorganismen im Blut des Patienten zurückzuführen sein, da für den Test nur eine Probenmenge von 0,5 ml entnommen wird (im Vergleich zu 2 x 10 mL für die Blutkultur). Ein weiterer Grund könnte das Auftreten seltener Typstämme sein, die bei der Testkonzeption nicht berücksichtigt wurden, oder die grundlegenden Unterschiede in den zugrunde liegenden Technologien für die Auswertung der Ergebnisse (genetische Informationen basierend auf ausgewählten Typstämmen vs. Proteinmuster, die von MALDI-TOF verwendet werden).

Unterschiedliche Zeitpunkte der Probenentnahme können ebenfalls zu abweichenden Ergebnissen führen. Wir empfehlen dringend, EDTA-Proben zur gleichen Zeit wie die Blutkulturproben zu entnehmen, wenn möglich noch vor der Verabreichung von Antibiotika.

Dieser Test ist gemäß den Anweisungen in dieser Gebrauchsanweisung durchzuführen; Unterbrechungen des Arbeitsablaufs, können ebenfalls zu veränderten Ergebnissen führen.

IPC, GINA 500, GINA 500 + DNA Purification

Das Kit *GINA 500* (für 500 µl Probenvolumen, mit oder ohne DNA/RNA-Aufreinigung) ist für den klinischen Routineeinsatz zur Anreicherung pathogener (bakterieller, fungaler) DNA konzipiert. Nach der Anreicherung wird die Lösung gereinigt, und das Eluat kann für verschiedene PCR-Reaktionen verwendet werden (z. B. bakterielle DNA, fungale DNA, Resistenzmarker-Gene). Wenn PCR-Mixe von Cube Dx verwendet werden, kann der jeweilige Erreger gleich nach der PCR durch compact sequencing identifiziert werden.

GINA-Kits zur Anreicherung von Pathogenen entfernen den Großteil humaner Zellen und Zellbestandteile aus Vollblut. Das Verfahren soll den Anteil der pathogenen (bakterieller und fungaler) DNA intakter Mikroorganismen im Verhältnis zur menschlichen DNA in der resultierenden Lösung drastisch erhöhen und bessere Bedingungen für nachgeschaltete PCR-Reaktionen schaffen. Intakte Mikroorganismen sind solche, die noch lebensfähig sind (aktiv oder abgeschwächt (= in ihrem Wachstum gehemmt, beispielsweise durch die Verabreichung bestimmter



Antibiotika)). Im Gegensatz dazu werden beschädigte Mikroorganismen und freie DNA während des Verfahrens entfernt.

Folglich sind nur Mikroorganismen, die dem Patienten noch Schaden zufügen können, für die Folgeprozesse (*compact sequencing*) relevant. Einige antimikrobielle Mittel konzentrieren sich darauf, das Wachstum zu verhindern, neutralisieren jedoch keine Mikroben. In solchen Fällen werden Mikroorganismen nicht entfernt, da sie intakt bleiben. Diese Mikroorganismen stellen ein Risiko für den Patienten dar, sobald die antimikrobielle Behandlung beendet ist.

Das zweite grundlegende Merkmal der GINA-Pathogenanreicherung ist die hochwirksame und effiziente Lyse von Bakterien- und Pilzzellen (nach der Anreicherung).

Das Kit basiert auf folgenden Prozessschritten:

- Lyse und Entfernung menschlicher Zellen: Die Probe wird zur *LE Solution* hinzugefügt, und die meisten menschlichen (und geschwächten mikrobiellen) Zellen werden nach der Zentrifugation lysiert und entfernt.
- Lyse der Pathogenzellen: Die *NA Solution* wird hinzugefügt und inkubiert. Die pelletierten Pathogenzellen werden lysiert.
- Neutralisierung: Das Lysat wird in die *T Solution* überführt, um den Lyseprozess zu stoppen und die resultierende Lösung zu neutralisieren.
- Einschließlich DNA-Reinigung: Zur Reinigung der DNA aus dem GINA-Lysat wird die Spin-Column-Technologie verwendet.

Das Ergebnis kann aufgrund der Beschaffenheit der Probe, Fehlern während des Verfahrens (geringe DNA-Menge, Kontamination mit Umweltmikroorganismen/DNA), anderen Einflüssen (abgebaute DNA, Kontamination mit Chemikalien) oder technischen Fehlern verfälscht sein.

Die folgenden Umstände verschlechtern die Ergebnisse für eine Probe:

- Die Zeit zwischen der Entnahme der (Blut-)Probe und dem Beginn der Probenvorbereitung beträgt mehr als 4 Stunden.
- Die Lagerung der Probe zwischen der Entnahme und dem Beginn der Probenvorbereitung entspricht nicht den Vorgaben (siehe Kapitel [Lagerung, Transport, Haltbarkeit und Entsorgung](#)).

Qualitätssicherungskonzepte für einen derart empfindlichen molekularen Erregernachweis müssen sicherstellen, dass negative Ergebnisse nur durch negative Proben verursacht werden – und nicht durch Fehler bei der Verarbeitung der Probe. Daher muss eine strenge Prozesskontrolle denselben Verfahren unterzogen werden wie die Probe selbst – ohne die Empfindlichkeit der Tests zu beeinträchtigen. Die interne Prozesskontrolle (IPC) von Cube Dx besteht aus gefrorenem biologischem Material, das vor Beginn des Anreicherungsprozesses in der menschlichen Probe aufgelöst wird. Die IPC durchläuft die gleichen Extraktionsverfahren wie die Probe selbst. Sowohl die anschließende PCR als auch der *hybcell*-Test (bei dem das Amplikon übertragen wird) bestätigen den Nachweis der IPC und damit die Gültigkeit der Ergebnisse.

Für die Verarbeitung von GINA-Kits werden eine Tischzentrifuge mit 11.000g mit einem Rotor für 2-ml-Röhrchen (z. B. Eppendorf, Hermle usw.) und ein herkömmlicher Heizblock der bis auf 100°C heizt (z. B. Analytic Jena, Coyote Bioscience) benötigt.

LINA

Die Identifizierung von Krankheitserregern und Antibiotikaresistenzgenen sollte einfach und schnell sein. Der LINA Transfer- und Modulationspuffer verkürzt die Zeit für die molekulare Identifikation, da er den DNA/RNA-Extraktionsprozesse überflüssig macht und einen direkten Transfer in die PCR ermöglicht.



Dieser Puffer ist für die Verwendung mit Proben konzipiert, die eine hohe Konzentration an Mikroorganismen enthalten, z. B. Bronchoalveolare Lavage (BAL) bei der Diagnose von Lungenentzündung oder positive Blutkulturen.

Zusammen mit den PCR-Produkten von Cube Dx (Bakterien, Pilze, Resistenz) und den *hybcells* zur Identifizierung von Krankheitserregern können Mikroorganismen und Resistenzgene in weniger als 2 Stunden bestimmt werden.

LINA besteht aus 8 ml Puffer, der in gebrauchsfertigen Probengefäßen abgefüllt ist. Der Puffer verdünnt alle PCR-Inhibitoren in der Probe, sodass diese nicht mehr wirksam sind. Die Proben-Puffer-Mischung wird direkt in die PCR-Reaktionen überführt (ohne weiteren Extraktionsprozess). Das kurze und einfache Protokoll reduziert die Zeit bis zum Ergebnis drastisch.

Das Ergebnis kann aufgrund der Beschaffenheit der Probe oder aufgrund von Fehlern während des Verfahrens verfälscht werden (z. B. geringe Anzahl von Mikroorganismen in der Probe oder technische Fehler).

Die folgenden Umstände verschlechtern die Ergebnisse für eine Probe:

- Verwendung eines größeren Probenvolumens als angegeben (erhöht die Hemmstoffe).

PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB

Die Tests *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* sowie die dazugehörigen PCR-Mixe – *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistance*, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box IPC* – sind für den klinischen Routineeinsatz zum Nachweis und zur Identifizierung pathogener Bakterien und ihrer Antibiotikaresistenzgene sowie pathogener Fungi unter Verwendung von DNA aus Proben wie Vollblut, BAL oder positiven Blutkulturen auf der Grundlage von Homologien zu bekannten DNA-Sequenzen konzipiert.

PCR-Box IPC amplifiziert DNA aus der *IPC*, um die Validität des Ergebnisses durch ein positives IPC-Ergebnis auf der *hybcell* zu bestätigen. Bei Verwendung des geneLEAD VIII von PSS wird in allen PCR-Mischungen (*PCR-Box Bacteria 48rx-s*, *PCR-Box Fungi 48rx-s*) ein alternatives Konzept für die interne Kontrolle verwendet. Bei diesen Mixen dient ein synthetisches langes DNA-Oligo als interne Kontrolle (IC), um die Validität der Ergebnisse (insbesondere negativer Ergebnisse) zu bestätigen.

Die Tests sind besonders nützlich für Patienten, die eine sofortige und spezifische antimikrobielle Behandlung benötigen (z. B. bei Sepsis, Lungenentzündung), für Patienten, die bereits mit Antibiotika/Antimykotika behandelt wurden (da die Kultur dann möglicherweise gehemmt ist), oder wenn die verursachenden Erreger schwer zu kultivieren sind.

Der Test basiert auf den folgenden Prozessschritten/Testprinzipien:

- DNA-Amplifikation – Nachweis von Bakterien/Pilzen/Resistenzgenen: Die isolierte DNA wird mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zielregionen sind 16S rDNA für Bakterien, 28S rDNA für Pilze und die jeweiligen Resistenzgene. Während der Amplifikation werden einzelne DNA-Stränge mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei Verwendung eines qPCR-Geräts kann das Vorhandensein von Bakterien, Pilzen oder Resistenzgenen aus den resultierenden Amplifikations- und Schmelzkurven abgeleitet werden.
- Identifizierung: Die qualitative Analyse erfolgt durch *compact sequencing*. Die Amplifikate binden an ihre komplementären, immobilisierten Sonden, die bei perfekter Übereinstimmung durch eine hochspezifische DNA-Polymerase verlängert werden (Primerverlängerung). Unspezifische Amplifikate und nicht verlängerte Primer werden in stringenten Waschschritten entfernt. Der *hyborg* (das Analysegerät) scannt und analysiert die spezifischen Fluoreszenzsignale.



Bakterien und Antibiotikaresistenzgene, die möglicherweise durch *hybcell Bacteria DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* nachgewiesen werden:

■ Blood Culture
 ■ Sepsis
 ■ Pneumonia

Gattung	Spezies	Profil		
Abiotrophia	<i>Abiotrophia defectiva</i>			
Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	<i>Acinetobacter calcoaceticus complex</i>			
Actinobacillus	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>			
Anaerococcus				
Bacteroides	<i>Bacteroides fragilis</i>			
Bordetella	<i>Bordetella pertussis</i>			
Borrelia				
	<i>Borrelia burgdorferi</i>			
Brucella				
Burkholderia	<i>Burkholderia cepacia complex</i>			
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>			
Campylobacter				
Citrobacter	<i>Citrobacter koseri</i>			
	<i>Citrobacter freundii</i> -Komplex			
Corynebacterium				
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>			
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>			
Enterobacter	<i>Enterobacter cloacae</i>			
	<i>Enterobacter cloacae complex</i>			
Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	<i>Enterococcus faecium</i>			
Escherichia	<i>Escherichia coli</i>			
Finegoldia	<i>Finegoldia magna</i>			
Fusobacterium				
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>			
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>			
Granulicatella	<i>Granulicatella adiacens</i>			
Haemophilus	<i>Haemophilus haemolyticus</i>			
	<i>Haemophilus influenzae</i>			
Helicobacter	<i>Helicobacter pylori</i>			
Klebsiella	<i>Klebsiella aerogenes</i>			
	<i>Klebsiella oxytoca</i>			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Legionella	<i>Legionella pneumophila</i>			
Listeria				
Moraxella	<i>Moraxella catarrhalis</i>			
Morganella	<i>Morganella morganii</i>			



Neisseria	<i>Neisseria meningitidis</i>			
Pasteurella	<i>Pasteurella multocida</i>			
Prevotella	<i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella intermedia</i>			
Propionibacterium	<i>Propionibacterium acnes</i>			
Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>			
Providencia	<i>Providencia stuartii</i>			
Pseudomonas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas non-aeruginosa</i>			
Salmonella	<i>Salmonella enterica</i>			
Serratia	<i>Serratia marcescens</i>			
Staphylococcus	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus non-aureus</i>			
Stenotrophomonas	<i>Stenotrophomonas maltophilia-Gruppe</i>			
Streptococcus	<i>Streptococcus anginosus-Gruppe</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis-Gruppe</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus salivarius-Gruppe</i>			
Yersinia	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis complex</i>			

Resistenz	Resistenzgen	Profil
Vancomycin- Resistenzen	<i>vanA</i>	
	<i>vanB</i>	
Methicillin- Resistenzen	<i>mecA</i>	
	<i>mecC</i>	

Pilze, die möglicherweise durch *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* nachgewiesen werden:

Gattung	Spezies	Profil
Aspergillus	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i>	
Candida	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i>	



	<i>Candida parapsilosis</i>			
	<i>Candida tropicalis</i>			
Nakaseomyces	<i>Candida glabrata</i>			
Clavispora	<i>Candida auris</i>			
Cladosporium				
Filobasidiella	<i>Cryptococcus neoformans</i>			
	<i>Cryptococcus gattii</i>			
Fusarium	<i>Fusarium oxysporum species complex</i>			
	<i>Fusarium solani species complex</i>			
Pichia	<i>Pichia kudriavzevii</i>			
Pneumocystis	<i>Pneumocystis jirovecii</i>			
	<i>Pneumocystis murina</i>			
Saccharomyces	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Scedosporium				

Der Test kann für verschiedene diagnostische Anwendungen eingesetzt werden, jedoch sind nicht alle Bakterien und Fungi als Zielorganismen für alle Anwendungen relevant. Daher ist es möglich, den Umfang der Ergebnisse eines Berichts innerhalb der *hyborg-Software* einzugrenzen, indem ein Profil definiert wird (durch Auswahl der Zielorganismen, die für den Bericht berücksichtigt werden sollen). Seitens Cube Dx werden drei Profile geliefert: Blood Culture (für positive Blutkulturen), Sepsis (für Vollblut), Pneumonia (für BAL).

Das Ergebnis kann aufgrund von Fehlern bei der Probenvorbereitung (geringe DNA-Menge, Kontamination mit Umweltkeimen/-DNA) oder anderen Einflüssen während der Vorbereitung (abgebaute DNA, Kontamination mit Chemikalien), technischen Fehlern oder Fehlern während der Amplifikation oder Identifizierung verfälscht sein. Bei Verdacht auf ein falsches oder verfälschtes Ergebnis sollten die Ergebnisse nicht für diagnostische Entscheidungen herangezogen und die Probe erneut getestet werden. Auch wenn interne Kontrollen die meisten fehlerhaften Ergebnisse herausfiltern sollten, können einige dieser Einflüsse unentdeckt bleiben.

Zur erforderlichen Ausrüstung gehören ein Gefrierschrank (-15°C bis -25°C) sowie ein DNA-Arbeitsplatz. Bei den Probenmaterialien handelt es sich um DNA-haltige Lösungen (= Eluate), die mit einem geeigneten DNA-Extraktionsprodukt/-verfahren, beispielsweise geneLEAD VIII von PSS, extrahiert wurden.

Für die Abarbeitung von *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistances*, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box IPC* wird entweder ein qPCR-Gerät (entweder CFX96 von Biorad oder Quantstudio von Thermo Fisher Scientific) oder ein Thermocycler (Biometra TOne / TPersonal von Analytic Jena) oder der geneLEAD VIII von PSS (kombiniertes DNA-Extraktion und PCR-Gerät) benötigt.

Für die Verarbeitung von *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* oder *hybcell Pathogens DNA xB* ist ein *hyborg Dx RED2/3* mit vorinstallierter *hyborg-Software* (Cube Dx) erforderlich.



4. Produktkomponenten

IPC:

- *IPC* (REF / UDI-DI 09120127730169)
 - 25 x 20 µL *IPC* (1 Schachtel mit 25 Microtubes (0,5 mL) jeweils mit 20 µL *IPC* befüllt)

GINA 500, GINA 500 + DNA Purification:

- *GINA 500* (REF / UDI-DI 09120127730244)
 - 100 x 1400 µL *LE Solution* (4 Schachteln mit 25 Microtubes (2 mL) jeweils mit 1400 µL *LE Solution* befüllt)
 - 100 x 200 µL *NA Solution* (4 Schachteln mit 25 Microtubes (2 mL) jeweils mit 200 µL *NA Solution* befüllt)
- *GINA 500 + DNA Purification* (REF / UDI-DI 09120127730145)
 - 50 x 1400 µL *LE Solution* (2 Schachteln mit 25 Microtubes (2 mL) jeweils mit 1400 µL *LE Solution* befüllt)
 - 50 x 200 µL *NA Solution* (2 Schachteln mit 25 Microtubes (2 mL) jeweils mit 200 µL *NA Solution* befüllt)
 - 50 x 400 µL *T Solution* (2 Schachteln mit 25 Microtubes (2 mL) jeweils mit 400 µL *T Solution* befüllt)
 - 1 x 30 mL *Wash Buffer BW* (1 Fläschchen mit 30 mL *Wash Buffer* befüllt)
 - 1 x 60 mL *Wash Buffer B5* (1 Fläschchen mit 60 mL *Wash Buffer B5* befüllt)
 - 1 x 13 mL *Elution Buffer BE* (1 Fläschchen mit 13 mL *Elution Buffer BE* befüllt)
 - 50 x *Column* (1 Sack mit 50 *Columns*)
 - 50 x *Collection Tube* (1 Sack mit 50 *Collection Tubes*)
 - 50 x *Elution Tube* (1 Sack mit 50 *Elution Tubes*)

LINA:

- *LINA* (REF / UDI-DI 09120127730152)
 - 50 x 8 mL *LINA* (1 Sack mit 50 Gefässen mit 8 mL *LINA* befüllt)

PCR-Boxes xB:

- *PCR-Box Bacteria* (REF / UDI-DI 09120127730084)
 - 12 x 20 µL PCR-mix Bacteria (1 Sack mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix Bacteria befüllt)
- *PCR-Box Bacteria 48rx-s* (REF / UDI-DI 09120127730725)
 - 48 x 20 µL PCR-mix Bacteria (4 Säcke mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix Bacteria befüllt)
 - 1 x 1000 µL NTC (1 Fläschchen (2 mL) mit 1000 µL *NTC* (no template control) befüllt)
- *PCR-Box Fungi* (REF / UDI-DI 09120127730091)
 - 12 x 20 µL PCR-mix Fungi (1 Sack mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix Bacteria befüllt)
- *PCR-Box Fungi 48rx-s* (REF / UDI-DI 09120127730732)
 - 48 x 20 µL PCR-mix Fungi (4 Säcke mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix Fungi befüllt)
 - 1 x 1000 µL NTC (1 Fläschchen (2 mL) mit 1000 µL *NTC* (no template control) befüllt)
- *PCR-Box Resistance* (REF / UDI-DI 09120127730763)
 - 12 x 20 µL PCR-mix Resistance (1 Sack mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix Resistance befüllt)
- *PCR-Box IPC* (REF / UDI-DI 09120127730114)
 - 12 x 20 µL PCR-mixes IPC (1 Sack mit 12 PCR tubes (0,2 mL) jeweils mit 20 µL PCR-mix IPC befüllt)

Seite 12 der 43

Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Österreich, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx entwickelt und produziert Systeme und Tests für die klinische Diagnostik. Unsere Produkte – Protein- und DNA-basierte Tests – zielen darauf ab, Lücken in der medizinischen Versorgung zu schließen und die hybcoell-Technologie als Standard in der Multiplex-Diagnostik zu etablieren. Die Produkte sind für die Verwendung gemäß CE-IVD bestimmt. Die Informationen, Beschreibungen und Spezifikationen in diesem Dokument können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Die Cube Dx GmbH haftet nicht für Fehler in dieser Veröffentlichung oder für zufällige oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung der Produkte und dieses Dokuments.

hybcell DNA xB

- *hybcell Bacteria DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730053)
 - 24 x *hybcell Bacteria DNA xB* Rev.2 (24 *hybcells* separate und luftdicht verpackt)
 - 24 x *Lid* (1 Sack mit 24 *Lid*)
 - 1x 900 µL *PPE-Additive* (1 Gefäß (2 mL) mit 900 µL *PPE-Additive* befüllt)
- *hybcell Fungi DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730060)
 - 24 x *hybcell Fungi DNA xB* Rev.2 (24 *hybcells* separate und luftdicht verpackt)
 - 24 x *Lid* (1 Sack mit 24 *Lid*)
 - 1x 900 µL *PPE-Additive* (1 Gefäß (2 mL) mit 900 µL *PPE-Additive* befüllt)
- *hybcell Pathogens DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730077)
 - 24 x *hybcell Pathogens DNA xB* Rev.2 (24 *hybcells* separate und luftdicht verpackt)
 - 24 x *Lid* (1 Sack mit 24 *Lid*)
 - 1x 900 µL *PPE-Additive* (1 Gefäß (2 mL) mit 900 µL *PPE-Additive* befüllt)

Achten Sie darauf, Komponenten verschiedener Chargen nicht zu vermischen!



5. Lagerung, Transport, Haltbarkeit und Entsorgung

Alle Produkte müssen trocken gelagert und vor Sonnenlicht geschützt werden. Die maximale Haltbarkeit der Produkte ist nur gewährleistet, wenn die Produkte während des Transports und der Lagerung den vorgeschriebenen Temperaturen unterliegen. Das Verfallsdatum der Produkte ist auf den Produktetiketten aufgedruckt.

Produkte	Haltbarkeit [Monate]	Temperaturen [°C]		Entsorgung
		Lagerung	Transport	
<i>GINA 500</i> <i>GINA 500 + DNA Purification</i>	24	8 bis 25°C	4 bis 40°C	LE-Lösung: potenziell infektiös
<i>LINA</i>	24	8 bis 25°C	4 bis 40°C	Potenziell infektiös
<i>hybcell Bacteria DNA xB</i> <i>hybcell Fungi DNA xB</i> <i>hybcell Pathogens DNA xB</i>	24	8 bis 25 °C	4 bis 40°C	Restmüll
<i>IPC</i>	24	-15 bis -25°C	< 0°C	Restmüll
<i>PCR-Box Bacteria</i> <i>PCR-Box Fungi</i> <i>PCR-Box Resistance</i> <i>PCR-Box IPC</i>	24	-15 bis -25°C	< 0°C	Restmüll

Wenn die Schutzversiegelung von hybcells oder anderen Verpackungen (z. B. Behälter) beschädigt, die Mindesthaltbarkeitsdauer abgelaufen ist oder die Lagerbedingungen nicht eingehalten werden konnten, darf das Produkt nicht verwendet werden.

hybcells müssen sofort nach dem Öffnen der Schutzversiegelung verwendet werden.

Das Einfrieren von PCR-Reaktionen oder IPC nach dem Auftauen zerstört das Produkt und das Produkt darf nicht verwendet werden. Aufgetaute PCR-Reaktionen und IPC müssen sofort nach dem Auftauen verwendet werden.

Entsorgung

Alle Einwegmaterialien (PCR-Behälter, *hybcells*, Pipettenspitzen usw.) können ohne besondere Vorkehrungen mit dem Restmüll entsorgt werden. Es sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für potenziell infektiöses Material zu beachten.

Patientenprobenbehälter (z. B. EDTA-Röhrchen), *LINA*- und *LE Solution* -Behälter (*GINA 500* Kit) können aufgrund ihres direkten Kontakts mit der Probe potenziell infektiöses Material enthalten und müssen gemäß den Vorschriften Ihrer Einrichtung für die Entsorgung von infektiösem Material entsorgt werden.



Lagerung von Proben

ETDA-Blut

- Die Verarbeitung einer frischen Probe sollte innerhalb von 4 Stunden nach der Probenentnahme beginnen. Bewahren Sie die Probe vor Beginn des Tests bei Raumtemperatur (zwischen 8°C und 25°C) oder im Kühlschrank (zwischen 4°C und 8°C) auf.
- Lagern Sie die Probe maximal 48 Stunden im Kühlschrank (zwischen 4°C und 8°C).
- Wenn Sie mit *GINA* arbeiten, verarbeiten Sie keine zuvor gefrorenen ETDA-Vollblutproben!

BAL und positive Blutkultur

- Die Verarbeitung einer frischen Probe sollte innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme beginnen. Bewahren Sie die Probe vor Beginn des Tests bei Raumtemperatur (zwischen 8°C und 25°C) oder im Kühlschrank (zwischen 4°C und 8°C) auf.
- Lagern Sie die Probe maximal 48 Stunden im Kühlschrank (zwischen 4°C und 8°C).
- Das Einfrieren von Proben sollte vermieden werden. Falls erforderlich, lagern Sie die Probe maximal 1 Monat im Gefrierschrank (-15°C bis -25°C).

Lagerung von Lysaten, Eluaten und Amplifikaten

Die Verarbeitung der Proben kann beispielsweise aufgrund von Zeitbeschränkungen unterbrochen werden. Die Verarbeitung muss jedoch fortgesetzt werden bis entweder ein Lysat (Ergebnis des GINA-Prozesses), ein Eluat (Ergebnis der DNA-Aufreinigung) oder ein Amplikon (Ergebnis des PCR-Prozesses) verfügbar ist.

- Bei Raumtemperatur (zwischen 8°C und 25°C) maximal 4 Stunden lang aufbewahren.
- Maximal 18 Stunden im Kühlschrank (zwischen 4°C und 8°C) lagern.
- Maximal 1 Monat im Gefrierschrank (zwischen -15°C und -25°C) lagern.



6. Zubehör und Gerätekombinationen

Für die Durchführung des Testverfahrens sind folgendes Zubehör und Geräte erforderlich:

Erforderliches Zubehör / Infrastruktur		REF / UDI-DI	Alternative Produkte zulässig?
Mini-Zentrifuge (0,2-ml-Rotor)	Thermo ¹ : MySpin		ja
Mini-Vortexer	Fisher Scientific ²		ja
Gefrierschrank (-20°C)	--		--
DNA-Werkbank	Starlab ³ (Beispiel): GuardOne Laminar Flow-Werkbank		ja
Pipetten: ▪ 20 – 200 µL ▪ 100 – 1000 µL	GILSON ⁴ : PIPETMAN P200N PIPETMAN P1000N		ja
Standard-Tischzentrifuge (mit Rotor für 2-ml-Röhrchen)	Eppendorf ⁵ : Zentrifuge 5430		ja, mit 11.000g
Standard-Heizblock	Coyote Bioscience ⁶ : H2O3-H		ja
DNA-Extraktor und qPCR-Gerät	PSS ⁷ : geneLEAD VIII		nein
qPCR-Gerät oder Thermocycler	Biorad ⁸ : CFX96 Thermo Fisher Scientific ⁹ : Quantstudio 3 / 5 Analytic Jena ¹⁰ : Biometra TOne Thermocycler		nein
System Liquid	Cube Dx: 1 l, ausreichend für 8 Wochen	09120127730022	nein
PE-Puffer	Cube Dx: 1 l, ausreichend für 96 <i>hybcells</i>	09120127730138	nein
Hyborg	Cube Dx: hyborg Dx RED2/3	09120127730015	nein

Gerätekombinationen

Für die DNA-Extraktion/Aufreinigung und die anschließende PCR stehen verschiedene Optionen hinsichtlich der Instrumentierung zur Verfügung. Die entsprechenden Gerätekombinationen sind:

- 1 www.thermofisher.com/order/catalog/product/75004081
- 2 www.fishersci.com/shop/products/variable-speed-mini-vortex-mix/14955163
- 3 www.starlab.de
- 4 www.gilson.com
- 5 www.eppendorf.com
- 6 www.coyotebio.com
- 7 www.pss.co.jp/english/
- 8 www.bio-rad.com
- 9 www.thermofisher.com
- 10 www.biometra.com



Option 1: Verwendung von geneLEAD VIII von PSS für die DNA-Extraktion und PCR

DNA-Extraktion + PCR: geneLEAD VIII (PSS)

Mikrobielle Identifizierung: hyborg Dx RED2/3 (Cube Dx)

Option 2: Manuelle DNA-Extraktion und PCR mit herkömmlichen PCR-Geräten

DNA-Extraktion: Zentrifuge 5430 (Eppendorf) – oder gleichwertig

PCR: CFX 96 (Biorad) oder Quantstudio 3/5 (Thermo) oder Biometra TOne (Analytic Jena)

Mikrobielle Identifizierung: hyborg Dx RED2/3 (Cube Dx)

Die Kits wurden für die Verwendung mit den oben aufgeführten Geräten/Ausrüstungen validiert. Die Verwendung von nicht ausdrücklich aufgeführten Geräten kann die Leistungsmerkmale beeinträchtigen. Wenn der Anwender sich für die Verwendung alternativer Geräte entscheidet (z. B. ein anderes PCR-Gerät oder einen DNA-Extraktor zur DNA-Reinigung), liegt es in seiner Verantwortung, eine Leistungsbewertung für die neue Gerätekombination durchzuführen, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse gleichwertig und zuverlässig sind.

Die Leistungsbewertung muss den IVDR-Vorschriften entsprechen. Cube Dx stellt ein Leitliniendokument mit Vorschlägen zur Strukturierung einer solchen Bewertung auf Englisch zur Verfügung: Pathogens xB+xC_guidline device combination evaluation (Download unter www.cubedx.com/documents).



7. Testverfahren

! Stellen Sie vor der Testung sicher, dass die verwendeten Geräte (z. B. DNA-Extraktoren, geneLEAD VIII, PCR-Gerät, hyborg Dx RED2/3) betriebsbereit sind!

- Überprüfen Sie die Betriebsbereitschaft aller verwendeten Laborinstrumente (z. B. geneLeadVIII, PCR-Geräte usw.).
- Überprüfen Sie, ob der *hyborg* eingeschaltet ist (überprüfen Sie den Bildschirm des Geräts – weitere Informationen finden Sie in der aktuellen *hyborg* Dx-Gebrauchsanweisung unter www.cubedx.com/documents).
- Überprüfen Sie, ob der *hyborg* mit ausreichend *System Liquid* und *PE Buffer* ausgestattet ist. Ist dies nicht der Fall, füllen Sie diese Flüssigkeiten nach.
- Leeren Sie gegebenenfalls den Abfallbehälter.
- Überprüfen Sie, ob das erforderliche *hybcell*-Protokoll verfügbar ist (wenn nicht, laden Sie das Protokoll, das unter www.cubedx.com/protocols verfügbar ist; weitere Informationen finden Sie in der *hyborg* Dx-Gebrauchsanweisung).

Beachten Sie, dass einige Schritte des Verfahrens die Vorbereitung von Geräten oder Reagenzien oder das Auftauen von Reagenzien erfordern. Da diese Aufgaben mit Wartezeiten verbunden sein können, lesen Sie vor Beginn das gesamte Kapitel zum Testverfahrens durch.

Während der Verarbeitung der Proben müssen ein Laborkittel, Einweghandschuhe, Ärmelschoner, eine chirurgische Maske und, falls sinnvoll, ein Haar- und Bartnetz getragen werden, um eine Kontamination der Testreagenzien und damit der Probe zu vermeiden. Die Anreicherung von Krankheitserregern (GINA-Verfahren) und die PCR-Vorbereitung müssen unter einer PCR-Werkbank oder einer Laminar-Flow-Werkbank (oder einem ähnlichen, gegen mikrobielle Kontamination geschützten Bereich) durchgeführt werden. Schritte, die unter diesen Bedingungen durchgeführt werden sollten, sind folgend rot geschrieben.

Weitere Informationen finden Sie in unseren Empfehlungen und Richtlinien zur Vermeidung von Kontaminationen: Pathogens xB+xC_guidline contamination prevention (Download unter www.cubedx.com/documents).

In den folgenden Abschnitten wird der Arbeitsablauf anhand der folgenden 3 Schritte beschrieben:

1. Probenvorbereitung verschiedener Probentypen (z. B. Anreicherung von Vollblut mit *GINA 500*)
2. DNA/RNA-Extraktion und Nachweis mit PCR/qPCR (verschiedene Gerätekonfigurationen)
3. Identifizierung: *compact sequencing* auf *hyborg Dx RED 2/3*



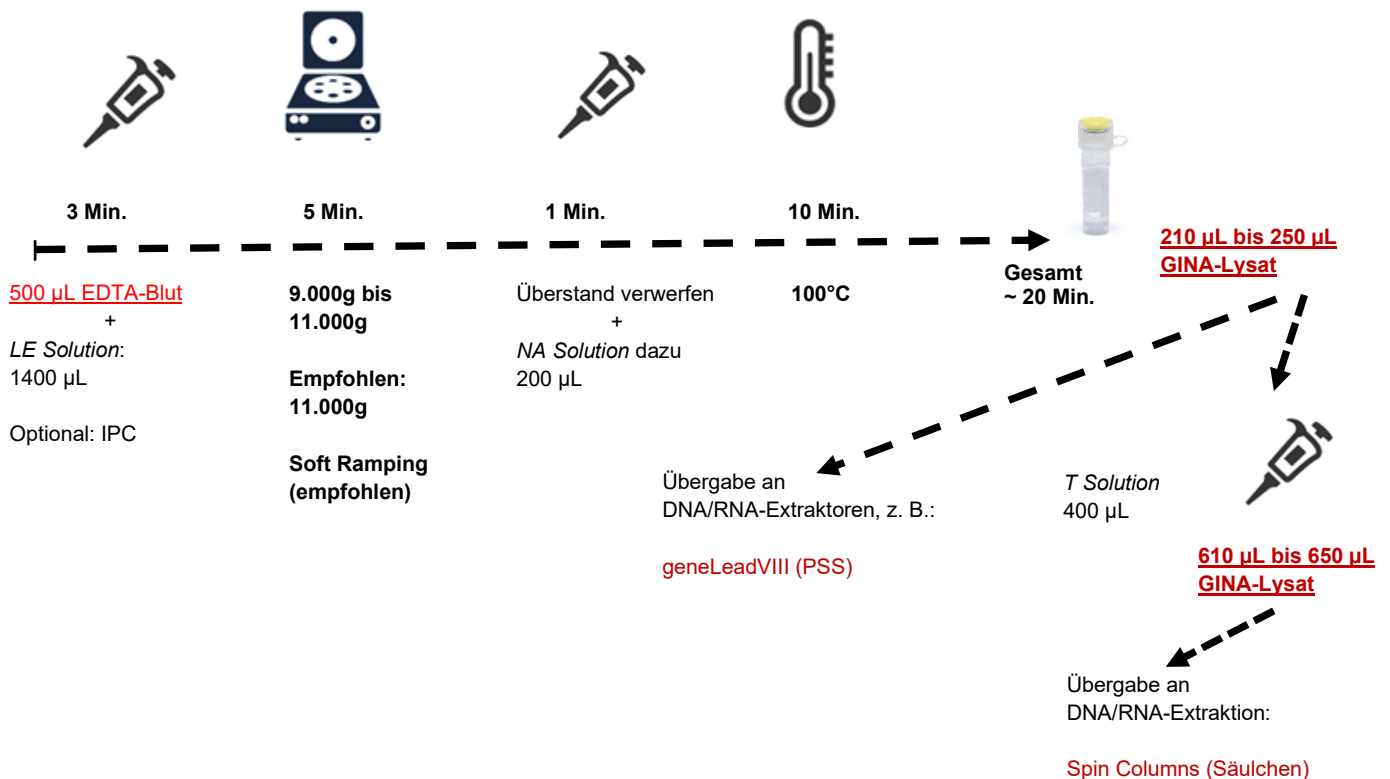
1 Probenvorbereitung

ETDA-Vollblut – Anreicherung von Mikroben: GINA 500

Vollblutproben können in K3EDTA- oder K2EDTA-Vacuetten (Greiner BioOne) oder ähnlichen Produkten anderer Hersteller entnommen werden.

Jede mikrobielle Kontamination während der Probenahme verfälscht das spätere Ergebnis. Wir empfehlen daher, das medizinische Personal, das die Proben entnimmt, hinsichtlich dieses Problems zu sensibilisieren. Falls erforderlich, schulen Sie das medizinische Personal entsprechend.

Das Verfahren beginnt mit einer nativen Probe von EDTA-Vollblut von entweder 500 µL (oder weniger). Vor Gebrauch die Probe vortexen! Die Anreicherung erfolgt unter Verwendung von 2 verschiedenen Puffern und erfordert einen Zentrifugations- und Hitzeschritt.



Erforderliche Produkte: GINA 500 / GINA 500 + DNA Purification, IPC

1. Stellen Sie sicher, dass die Geräte und alle Kit-Komponenten einsatzbereit sind. Wenn Sie Gefäße wie LE Solution oder andere Materialien (z.B. EPC) öffnen, schütteln oder spinnen Sie diese kurz vorab, um ein Auslaufen von Flüssigkeiten die sich möglicherweise in den Schraubverschlüssen befinden zu vermeiden. Starten Sie den Heizblock und stellen Sie die Temperatur auf 100°C ein. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Röhrchen in die Vertiefungen des Heizblocks passen (LE Solution und bei Verwendung von Spin Columns auch die Elution Tubes).

Anmerkung:

Die Zentrifuge benötigt **einen Rotor für 2-mL-Röhrchen**.

Überprüfen Sie, ob die Zentrifuge die empfohlene Zentrifugalkraft von 11.000g liefert. Die Zentrifuge sollte auch die Option für sanftes Hochfahren bieten (Soft Ramping). Verwechseln Sie Drehzahl (U/min) nicht mit Zentrifugalkraft (g)!



1. Bereiten Sie die *LE Solution* und die Vollblutprobe vor. **Schütteln oder kippen Sie die *LE Solution* nicht, um Schaumbildung zu vermeiden!** Übertragen Sie 500 µL (oder weniger) EDTA-Blut in die *LE Solution* und pipettieren Sie auf und ab, um zu mischen.
2. Optional: Pipettieren Sie 500 µL der Blutprobe in die *IPC* (und/oder Spike-Material wie Cube Dx' *EPC S. aureus 10000* und *EPC C. albicans 10000*) und übertragen Sie die Mischung anschließend in die *LE Solution*.
3. Verschließen Sie das Röhrchen, beschriften Sie es und schütteln Sie es 5 Sekunden lang kräftig oder drehen Sie es mehrmals um, bis die Flüssigkeit homogen erscheint. Inkubieren Sie es ca. 2 Minuten lang bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C).
4. Zentrifugieren Sie 5 Minuten lang bei 9.000g bis 11.000g (vorzugsweise 11.000g). Verwenden Sie falls verfügbar das Soft Ramping der Zentrifugation, um ein Verlieren des Pellets zu verhindern.
5. Entfernen Sie den Überstand vorsichtig durch **Dekantieren** und geben Sie 200 µL *NA Solution* in das *LE Solution* Röhrchen. Schließen Sie den Schraubverschluss fest.

Anmerkung:

Nach dem Dekantieren kann etwas Überstand (~50 µL) auf dem Pellet zurückbleiben. Vollblutproben sollten zu diesem Zeitpunkt eine grüne Färbung aufweisen.

6. 5 Sekunden lang kräftig vortexen. Sicherstellen, dass die Röhrchen noch fest verschlossen sind.
7. Bei 100°C 10 Minuten lang in einem Heizblock inkubieren.
8. Wenn Sie mit den im *GINA 500 + DNA Purification* enthaltenen Spin Columns (Säulchen) fortfahren, geben Sie 400 µL *T Solution* in das Röhrchen.

Anmerkung:

Vollblutproben sollten sich von grünlich zu dunkelrot verfärben.

BAL oder positive Blutkulturen: LINA

Erforderliche Produkte: *LINA*, *IPC*

1. Bei positiv getesteten Blutkulturen: Die Blutkulturflasche mehrmals umdrehen und mit einer sterilen Spritze 20–50 µL durch das Septum der Blutkulturflaschen entnehmen. Die Probe in ein steriles und DNA-freies Röhrchen (z. B. 2 mL-Röhrchen) geben.
2. Optional: Pipettieren Sie 20 µL *IPC* (eine Reaktion) in *LINA*-Gefäß.
3. Pipettieren Sie die Probe in das *LINA*-Gefäß:
 - **2 µL positive Blutkultur**
 - **10–20 µL BAL**
4. Verschließen Sie das *LINA*-Gefäß und schütteln Sie es mehrmals oder vortexen Sie es kräftig.
5. Es ist keine weitere DNA-Extraktion erforderlich. Verwenden Sie die Lösung direkt für die PCR (20 µL der Lösung für jede PCR-Reaktion).

Anmerkung:

*Verschiedene Institute wenden unterschiedliche Methoden zur Entnahme von BAL-Proben an. Daher muss das verwendete BAL-Volumen möglicherweise angepasst werden. Zu hohe BAL-Volumen können jedoch zu einer Inhibition führen. Daher wird die Verwendung der *IPC* empfohlen, um eine Inhibition in der PCR anzuzeigen.*



2 RNA/DNA-Extraktion und Nachweis durch PCR/qPCR

Das Testverfahren beginnt mit der Lösung, die aus der *GINA*-Pathogenanreicherung (siehe oben, *GINA*-Lysat) resultiert. Die beiden verfügbaren Optionen unterscheiden sich in den verwendeten Geräten und damit im Arbeitsablauf.

- Option 1:** Verwendung von geneLEAD VIII von PSS für die DNA-Extraktion und PCR
- Option 2:** Manuelle DNA-Extraktion und PCR mit herkömmlichen PCR-Geräten (Einzelheiten siehe [Zubehör und Gerätekombinationen](#)).

Das **Elutionsvolumen sollte 100 µL betragen** – unabhängig davon, für welche Option Sie sich entschieden haben.

Option 1: geneLEAD VIII

Erforderliche Produkte: *Kits zur RNA/DNA-Extraktion für den geneLEAD VIII (PSS)*
PCR-Box Bacteria 48rx-s / PCR-Box Fungi 48rx-s

Je nach Probentyp muss die Beladung des Geräts angepasst werden.

ETDA-Vollblut

Bei Verwendung von *GINA* und EDTA-Vollblut: Entfernen Sie nach Abschluss des *GINA*-Prozesses (siehe oben) den Deckel vom *LE Solution*-Röhrchen und verwenden Sie dieses Röhrchen als Probenbehälter für das geneLEAD VIII-Gerät.

BAL oder positive Blutkulturen

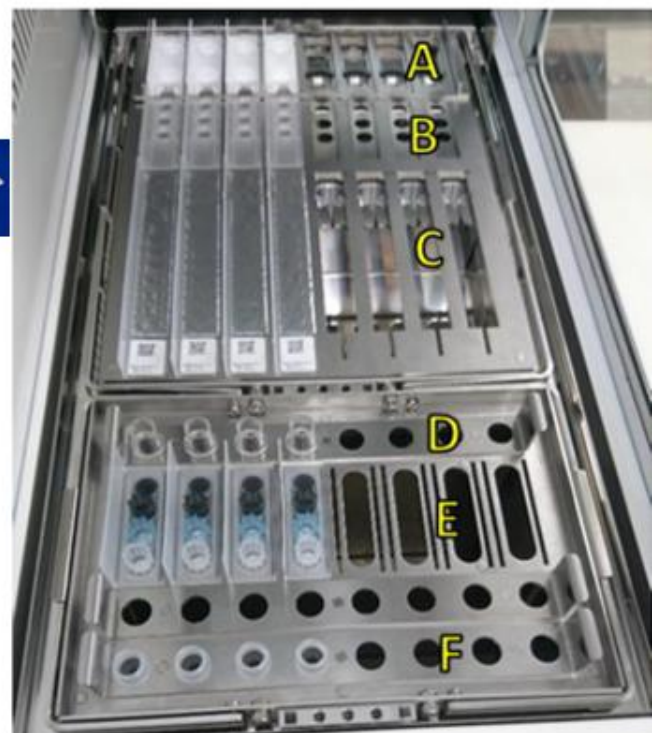
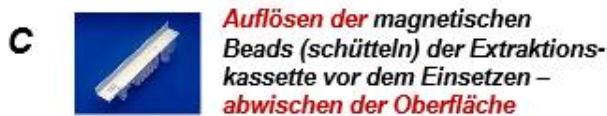
Bei Verwendung von *LINA* und BAL oder positiver Blutkultur: Verwenden Sie ein *Elution Tube* aus dem geneLEAD VIII Verbrauchsmaterial-Set (F8900) und pipettieren Sie 50 µL der *LINA*-Probenmischung in dieses Röhrchen.

Laden und Starten des Geräts

1. Packen Sie die erforderlichen PCR-Mixe aus und tauen Sie diese auf (*PCR-Box Bacteria 48rx-s / PCR-Box Fungi 48rx-s*).
2. Nachdem Sie die erforderlichen PCR-Mixe entnommen haben, frieren Sie das Kit sofort wieder ein (-15°C bis -25°C).
3. Zentrifugieren Sie die PCR-Mixe kurz und pipettieren Sie jeweils 20 µL (= Volumen eines einzelnen PCR-Mixes) tief in die erste Vertiefung (Ausrichtung von der Rückseite des Geräts aus gesehen) jeder *PCR Reagent Cassette* des Geräts (geneLEAD VIII PCR Reagent Cassette Set / F8820). **Achten Sie darauf, dass der pipettierte PCR-Mix die Vertiefung bedeckt und keine Luftblasen am Boden eingeschlossen sind!**
4. Laden Sie das Gerät für die DNA-Aufreinigung und die anschließende PCR. Die meisten Verbrauchsmaterialien für den geneLEAD VIII (außer Proben- und Elutionsröhrchen) haben einen rechtwinkligen Querschnitt. Alle Verbrauchsmaterialien müssen so in das Gerät eingelegt werden, dass der nach oben zeigende Winkel auf der linken Seite erscheint, wenn man von vorne (Türseite) in das Gerät schaut.
 - Tray 1 (näher zur Rückseite des Geräts):
 - A. Laden Sie die *PCR Cassettes* in das Gerät (geneLEAD VIII PCR Cassette / F8840) und entfernen Sie die Abdeckung der Kartuschen.
 - B. Legen Sie die befüllten *PCR Reagent Cassettes* (3.) in das Gerät ein (geneLEAD VIII PCR Reagent Cassette Set / F8820).



- C. Nur für mit GINA verarbeitetem ETDA-Vollblut (siehe oben): Legen Sie die Extraktionskartusche in das Gerät ein (MagDEA Dx SV / E1300) – **Schütteln Sie diese vorher kräftig, damit sich die Magnetkügelchen auflösen!**
- Setzen Sie Tray 1 in das Gerät ein.
- Tray 2 (näher zur Vorderseite des Geräts):
- D. Nur für mit GINA verarbeitetem ETDA-Vollblut (siehe oben): Legen Sie die Probe (*LE Solution*-Gefäß, siehe oben) in das Gerät ein. Das Probenvolumen muss mindestens 200 µL betragen.
- E. Legen Sie die Spitzenhalter in das Gerät ein (geneLEAD VIII Consumable Set / F8900).
- F. Legen Sie das Elutionsröhrchen in das Gerät ein (geneLEAD VIII Consumable Set / F8900). Das Elutionsröhrchen ist zu seinem Ende hin konisch (verwechseln Sie es nicht mit den Probenröhrchen, die ebenfalls im Kit enthalten sind). Öffnen Sie das verwendete Elutionsröhrchen.
- ETDA-Vollblut (*GINA*): Verwenden Sie ein neues (leeres) Elutionsröhrchen.
 - BAL und positive Blutkultur (*LINA*): Elutionsröhrchen mit LINA-Probenmischung (siehe oben).
- Setzen Sie Tray 2 in das Gerät ein.



Alle Reagenzien müssen **auf einer Linie** sein

5. Starten Sie das Gerät und konfigurieren Sie den Lauf gemäß der Gebrauchsanweisung des geneLEAD VIII. Main menu → Perform Run → Wählen Sie: Extraction Input Volume – 200 µL, Extracted Elute Volume – 100 µL.



6. Wählen Sie das entsprechende Protokoll mit dem Namen *CDX_Bacteria_xB_gLVIII_xx* oder *CDX_Fungi_xB_gLVIII_xx* oder *CDX_Resistance_xB_gLVIII_xx* und wählen Sie *Extraction + PCR* (xx steht für die aktuelle Version des Protokolls) für ETDA-Vollblut (*GINA*) oder *PCR Only* für BAL und positive Blutkulturen (*LINA*). Wenn die Protokolle auf dem Gerät nicht verfügbar sind, müssen sie zuerst hochgeladen werden (laden Sie die Datei von www.cubedx.com/pcrprotocols herunter und importieren Sie die Datei gemäß der Gebrauchsanweisung für geneLEAD VIII).
 7. Analysieren Sie die Ergebnisse und überprüfen Sie die Amplifikations- und Schmelzkurven aller Tracks (Proben). Siehe [Interpretation der Ergebnisse](#).
 8. Entfernen Sie die Elutionsröhrchen aus dem Gerät und verschließen Sie diese. Entfernen Sie alle Verbrauchsmaterialien - mit Ausnahme der *PCR Cassettes* der Proben die weiter mit hybcell analysiert werden (siehe 3. Identifizierung) - aus dem Gerät und entsorgen Sie diese. Bringen Sie die verbleibenden *PCR Cassettes* in den Post-PCR-Bereich (wo auch der *hyborg Dx RED2/3* betrieben wird).
- Die amplifizierte DNA wird entweder sofort für die Identifizierung / compact sequencing unter Verwendung einer entsprechenden hybcell (siehe unten) verwendet oder gelagert. Der Rest vom Eluat sollte ebenfalls bis zur Freigabe der Ergebnisse gelagert werden (siehe [Lagerung, Transport, Haltbarkeit und Entsorgung](#)).**
9. Starten Sie die UV-Sterilisation nach der Verwendung des Geräts: Hauptmenü → UV Irradiation.

Achtung! Öffnen Sie *PCR Cassettes* nicht in der Nähe des geneLEAD VIII oder anderer PCR-Geräte oder im Bereich der Probenvorbereitung!

Option 2: Manuelle Extraktion + PCR-Gerät

Erforderliche Produkte: *GINA 500 + DNA Purification*
PCR-Box Bacteria / PCR-Box Fungi / PCR-Box Resistance

Die DNA-Aufreinigung für diese Option erfolgt mittels Spin Columns (Säulchen). Für diese Methode wird dieselbe Zentrifuge wie für die Verarbeitung von Vollblut mit *GINA* verwendet. Die Methode erfordert im Vergleich zur automatisierten Extraktion mehr Zeitaufwand, ist jedoch sehr effizient, wenn nur eine geringe Anzahl von Proben zu erwarten ist.

Das für die DNA-Aufreinigung erforderliche Material ist im Kit *GINA 500 + DNA Purification* enthalten.

ETDA-Vollblut

Bei der Arbeit mit *GINA* und EDTA-Vollblut: Fahren Sie mit dem *GINA*-Lysat (einschließlich der 400 µL T-Lösung, siehe Arbeitsablauf oben) mit Schritt 1. (siehe unten).

BAL oder positive Blutkulturen

Bei Verwendung von *LINA* und BAL oder positiver Blutkultur: Fahren Sie mit Schritt 9. (siehe unten) fort. Anstelle des Eluats füllen Sie 20 µl der *LINA*-Probenmischung in die PCR-Röhrchen.

1. Setzen Sie für jedes *GINA*-Lysat eine *Column* in ein *Collection Tube* ein und kennzeichnen Sie das *Collection Tube* mit der Proben-ID. Übertragen Sie das gesamte *GINA*-Lysat (600 bis 650 µl) in die *Column*. Entsorgen Sie das *LE Solution*-Röhrchen.
2. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 9.000 g bis 11.000 g. Entfernen Sie die *Column* und dekantieren Sie die Flüssigkeit aus dem *Collection Tube*. Setzen Sie die *Column* wieder ein.
3. Fügen Sie 500 µl *Wash Buffer BW* zur *Column* hinzu und zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 9.000 g bis 11.000 g. Entfernen Sie die *Column* und dekantieren Sie die Flüssigkeit aus dem *Collection Tube*. Setzen Sie die *Column* wieder ein.



4. 600 µl *Wash Buffer B5* in die *Column* geben und 1 Minute lang bei 9.000 g bis 11.000 g zentrifugieren. Entfernen Sie die *Column* und dekantieren Sie die Flüssigkeit aus dem *Collection Tube*. Setzen Sie die *Column* wieder ein.
5. 3 Minuten lang bei 9.000 g bis 11.000 g zentrifugieren, um die Silikamembran zu trocknen. Prüfen Sie, ob sich noch Flüssigkeit am Boden der *Column* befindet. Wenn ja, wiederholen Sie diesen Schritt.
6. Setzen Sie die *Säule* in ein *Elution Tube* ein und kennzeichnen Sie das *Elution Tube* mit der Proben-ID. Geben Sie 100 µl *Elution Buffer BE* hinzu. Inkubieren Sie 1 Minute lang bei Raumtemperatur. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 9.000 g bis 11.000 g. Überprüfen Sie das Elutionsvolumen. Wenn das Volumen zu gering erscheint, wiederholen Sie die Zentrifugation. Entsorgen Sie die *Column*.
7. Öffnen Sie das *Elution Tube* und inkubieren Sie es bei geöffnetem Deckel 3 Minuten lang bei 100 °C im Heizblock.
8. Das Eluat (die DNA-enhaltende Flüssigkeit) sollte sofort verwendet oder für die spätere Verwendung gelagert werden (siehe [Lagerung, Transport, Haltbarkeit und Entsorgung](#)). Vor der Verwendung des Eluats das *Elution Tube* kräftig vortexen.
9. Programmieren Sie das (q)PCR-Gerät und speichern Sie das Programm als *Patho_xB* oder laden Sie die Datei von www.cubedx.com/pcrprotocols herunter und importieren Sie dieses in das PCR-Gerät.

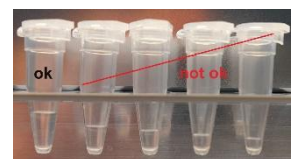
10. 1	95 °C für 2:00
➔ 2	95 °C für 0:10
3	56 °C für 0:10
4	72 °C für 0:30
	+Platte lesen
	GEHE ZU 2, 44 weitere Male
5	75 °C für 1:00
6	Schmelzkurve 75 °C bis 95 °C in Schritten von 0,3 °C für 0:10
	+Platte lesen
7	25 °C für Halten

Fluorophor/Kanal: SYBR Green/FAM

Anmerkung!

Einzelne PCR-Geräte können sich in ihren thermischen Eigenschaften unterscheiden. Daher wird die Optimierung der Temperaturen empfohlen, wenn unerwartete Ergebnisse beobachtet werden.

10. Entpacken und tauen Sie einzelne 0,2-ml-Röhrchen mit den erforderlichen PCR-Mixen für IPC, Bakterien, Fungi und Resistenzgene auf. Homogenisieren (vortexen) Sie die Flüssigkeit in jedem Röhrchen und zentrifugieren Sie sie kurz.
11. Überprüfen Sie, ob das Volumen des PCR-Mixes ungefähr 20 µl beträgt (siehe Abbildung, das linke Röhrchen ist mit 20 µl gefüllt). Verwenden Sie keine PCR-Mixes, die nicht ordnungsgemäß befüllt wurden.
12. Fügen Sie 20 µl DNA-Eluat aus der Probe / 20 µl *L/NA*-Probe Gemisch (oder 20 µl NTC oder 20 µl Kontroll-DNA SA/CA – erhältlich bei Cube Dx) zu den PCR-Mixen hinzu.



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Österreich, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx entwickelt und produziert Systeme und Tests für die klinische Diagnostik. Unsere Produkte – Protein- und DNA-basierte Tests – zielen darauf ab, Lücken in der medizinischen Versorgung zu schließen und die hybcoell-Technologie als Standard in der Multiplex-Diagnostik zu etablieren. Die Produkte sind für die Verwendung gemäß CE-IVD bestimmt. Die Informationen, Beschreibungen und Spezifikationen in diesem Dokument können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Die Cube Dx GmbH haftet nicht für Fehler in dieser Veröffentlichung oder für zufällige oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung der Produkte und dieses Dokuments.

13. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen, homogenisieren Sie diese und zentrifugieren Sie die Flüssigkeiten vor Beginn der PCR ab.
14. Starten Sie das (q)PCR-Programm *Patho_xB* (siehe oben).

Die amplifizierte DNA wird entweder sofort für die Identifizierung / compact sequencing unter Verwendung einer entsprechenden hybcell (siehe unten) verwendet oder gelagert (siehe [Lagerung, Transport, Haltbarkeit und Entsorgung](#)).

15. Analysieren Sie die Ergebnisse und überprüfen Sie die Amplifikations- und Schmelzkurven aller Wells / Proben (siehe [Interpretation der Ergebnisse](#)).

Achtung! Öffnen Sie PCR-Röhrchen nicht in der Nähe des PCR-Geräts oder im Bereich der Probenvorbereitung!



3 Identifizierung: unter Verwendung von hybcell und compact sequencing

Das Testverfahren beginnt mit einem oder mehreren Amplikons die aus der (q)PCR resultieren (siehe oben).

Erforderliche Produkte: *hybcell Bacteria DNA xB* / *hybcell Fungi DNA xB* / *hybcell Pathogens DNA xB*

1. Stellen Sie sicher, dass der *hyborg* betriebsbereit ist.
2. Öffnen Sie die Verpackung der *hybcell* (reißen Sie die Verpackung an der Kerbe auf) und setzen Sie die *hybcell* in das Rack ein (Positionen A-H).
3. Pipettieren Sie maximal 3 Amplikons aus derselben Probe in eine *hybcell*. Verwenden Sie eines der PCR-Röhrchen, um zunächst die Mischung herzustellen und fügen Sie das *PPE-Additive* hinzu. Pipettieren Sie beispielsweise jeweils 40 µl *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Fungi* oder *PCR-Box Resistance* in eines der PCR-Röhrchen (z. B. *PCR-Box Bacteria*). Pipettieren Sie anschließend 30 µl des *PPE-Additive* (im Lieferumfang der *hybcell*-Kits enthalten) in das Röhrchen mit der Mischung aus Amplikons.

Achtung!

Die Verwendung von nur 1 oder 2 PCR-Amplikons für den hybcell-Test führt aufgrund des geringeren Signalhintergrunds zu den besten Ergebnissen. Es können bis zu 3 PCR-Amplikons in die hybcell eingefüllt werden. Durch die Verwendung aller 4 Amplikons steigt das Risiko eines erhöhten Signalhintergrunds, was zu einer verminderten Spezifität und Sensitivität des Tests führen kann.

Beachten Sie, dass die Validität der internen Prozesskontrolle (IPC) bereits aus den PCR-Amplifikationskurven abgeleitet werden kann (vergleiche [Interpretation der Ergebnisse](#)).

Unterschiedliche *hybcells* erfordern unterschiedliche Amplifikate (aus unterschiedlichen *PCR-Boxen*).

Beispiele für Kombinationen aus Amplikons, die für die Beladung der hybcell geeignet sind

Ergebnisse der PCR				hybcell...	Übertragen Amplikons
Bakt.	Fungi	Resist.	IPC		
pos.	pos.	pos.	pos.	...Pathogene DNA xB	Bacteria + Fungi + Resistance.
pos.	pos.	neg.	pos.		Bacteria + Fungi
pos.	neg.	pos.	pos.	...Bacteria-DNA xB	Bacteria + Resistance
pos.	--	pos.	pos.		Bacteria + Resistance
pos.	--	neg.	pos.		Bacteria + IPC
--	pos.	--	pos.	...Fungi DNA xB	Fungi + IPC
neg.	pos.	neg.	pos.		Fungi + IPC

4. Pipettieren Sie auf und ab, um alle Bestandteile im Röhrchen zu mischen (**das Additiv enthält einen pH-Indikator; daher kann sich die Farbe der Lösung nach Zugabe verändern. Dies hat keinen Einfluss auf die Leistung des Produkts**). Vermeiden Sie Blasenbildung!
5. Pipettieren Sie das gesamte Volumen aus dem Röhrchen (~ maximal 150 µl) auf einmal in die *hybcell* (durch den zentralen Kanal). Das Endvolumen hängt von der Anzahl verwendeter Amplifikate ab (siehe oben).

Seite 26 der 43



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Österreich, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx entwickelt und produziert Systeme und Tests für die klinische Diagnostik. Unsere Produkte – Protein- und DNA-basierte Tests – zielen darauf ab, Lücken in der medizinischen Versorgung zu schließen und die hybcell-Technologie als Standard in der Multiplex-Diagnostik zu etablieren. Die Produkte sind für die Verwendung gemäß CE-IVD bestimmt. Die Informationen, Beschreibungen und Spezifikationen in diesem Dokument können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Die Cube Dx GmbH haftet nicht für Fehler in dieser Veröffentlichung oder für zufällige oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung der Produkte und dieses Dokuments.

Verwenden Sie eine 200- μ l-Pipette mit geeigneten Filterspitzen! Blockieren Sie den zentralen Kanal der hybcell (Probenzufluss) beim Einbringen der Amplikonmischung nicht mit der Pipettenspitze! Führen Sie die Spitze nur so tief wie nötig in den zentralen Kanal der hybcell ein und achten Sie darauf, dass sie locker sitzt.

6. Decken Sie die hybcell mit dem mitgelieferten Lid ab.



Führen Sie die Pipettenspitze tief in die hybcell ein – verschließen Sie den Kanal aber nicht gänzlich

Versuchen Sie, die Innenseite des Kanals nicht zu benetzen

Setzen Sie das Lid nach dem Einfüllen auf

7. Beginnen Sie mit der Testung der Proben, nachdem Sie die Proben- und hybcell-ID eingegeben haben (weitere Details finden Sie in der Gebrauchsanweisung für hyborg Dx RED2/3 (Download unter www.cubedx.com/documents)). Laden Sie das Gerät mit dem vorbereiteten Rack.

Setzen Sie das Rack korrekt ein (die Barcodes/Etiketten der hybcells müssen zur Innenseite des Geräts zeigen)! Achten Sie darauf, dass alle hybcells in der richtigen Position sind.



8. Interpretation der Ergebnisse

PCR-Analyse

Die PCR-Ergebnisse wie die Amplifikations- und Schmelzkurve sind entscheidend dafür, ob die Verarbeitung einer Probe als erfolgreich betrachtet werden kann (z. B. kein Verdacht auf PCR-Inhibition). Außerdem zeigen die Ergebnisse, ob bakterielle oder fungale DNA, sowie Resistenzgene in der Probe vermutet werden können.

Alle PCR-Mixe verwenden denselben Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green*.

Alle Proben, die mittels PCR nicht eindeutig negativ auf diese DNA getestet wurden, müssen mit der *hybcell* weiter getestet werden (Identifizierung des Erregers). Ein negatives Ergebnis (not detected) bedeutet, dass keine Erreger-DNA oder Resistenzgene nachgewiesen wurden und daher keine Identifizierung durch die *hybcell* erforderlich ist.

Achtung!

Beachten Sie, dass jedes PCR-Instrument in seinen Eigenschaften leicht unterschiedlich ist und dass Ct-Werte und Schmelztemperaturen etwas variieren. Daher können auch alle vorgeschlagenen Cut-off-Werte variieren und sollten als Empfehlungen betrachtet werden.

Jedes Labor muss diese Empfehlungen überprüfen und gegebenenfalls an seine eigenen Schwellenwerte anpassen. Das endgültige positive Ergebnis wird durch den *hybcell*-Test ermittelt. Ziehen Sie daher in Betracht, alle Proben bei denen auch nur der geringste Zweifel besteht mit der *hybcell* zu testen. Seien Sie insbesondere während der Einrichtung des Tests in Ihrem Labor und in der Anfangsphase seiner Verwendung großzügiger bei der Aufnahme von Proben in Ihre *hybcell*-Tests.

Einige Gründe für Abweichungen bei Ct-Werten und Schmelztemperaturen:

- Der Schwellenwert für die Ct-Wert-Berechnung wird vom Benutzer unterschiedlich festgelegt
- Verschiedene PCR-Geräte bieten unterschiedliche Software mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dazu gehören beispielsweise die automatische Skalierung, Schwellenwerteinstellungen usw., die die Ct-Werte und die visuelle Darstellung der Kurven beeinflussen können.
- Die *PCR-Box Resistance* umfasst mehrere Primer (Resistenz-Gene). Daher treten Primerdimere häufiger auf als bei der Single-Plex-PCR wie *PCR-Box Bacteria* oder *Fungi*.
- Bakterielle oder pilzliche Kontaminationen, die während der Probenahme oder des Testverfahrens auftreten, senken den Ct-Wert. Mögliche Gründe für Kontaminationen sind in unseren kurzen Leitlinien zur Kontaminationsprävention beschrieben. Die Leitlinien enthalten Informationen zur erforderlichen Infrastruktur, zur Probenverarbeitung, zur erforderlichen Schutzausrüstung, zur Desinfektion von Oberflächen usw.
- Die Salzkonzentration und andere Bedingungen der Eluate können aufgrund von Schwankungen in der Zusammensetzung der Proben und der Verwendung unterschiedlicher Probenentnahmeprodukte variieren.
- Schließlich kann der amplifizierte Mikroorganismus selbst den Ct-Wert und noch stärker die Schmelztemperatur beeinflussen.



Allgemeiner Arbeitsablauf

- Überprüfen Sie das Erscheinungsbild der Amplifikations- und Schmelzkurve.
 - Bewerten Sie das Erscheinungsbild und die Form der Amplifikations- und Schmelzkurven.
 - Überprüfen Sie die berechneten Ct-Werte und Schmelzpunkte (Annäherung).
- Beurteilen Sie, ob möglicherweise eine Inhibition stattgefunden hat. Dies ist der Fall, wenn die Form der Kurven nicht den Erwartungen entspricht (z. B. flache Kurven) oder wenn beispielsweise keine Ct- und/oder keine Schmelzkurvenpeaks für die interne Kontrolle berechnet werden konnten.
- Bewerten Sie die Ct-Werte und Schmelzspitzen gemäß den unten aufgeführten Regeln und Beispielen. Detaillierte Regeln und Beispiele finden Sie in separaten Richtlinien.
- Bestimmen Sie, welche Proben negativ/nicht nachweisbar für das Zielmolekül getestet wurden.
- Wählen Sie alle anderen Proben (nicht negativ) für weitere Tests mit *hybcell* aus.

Option 1: geneLEAD VIII

PCR-Box *Bacteria 48rx-s* und PCR-Box *Fungi 48rx-s* amplifizieren nicht nur das jeweilige Ziel (Bakterien oder Fungi), sondern enthalten auch eine interne Kontrolle (IC) im PCR-Mix. Diese PCR-Tests sollten immer eine Amplifikation und einen Schmelzpeak der internen Kontrolle zeigen. Falls auch ein Target amplifiziert wird, sollten eine frühere Amplifikation (niedrigerer Ct-Wert) und ein zweiter Schmelzpeak vorhanden sein.

Die folgende Tabelle zeigt die Cut-offs zur Unterscheidung zwischen negativen Proben und Proben, die mit *hybcell* getestet werden müssen.

	Amplifikation	Schmelzkurve		
	Ct	Tm1 (Hintergrund)	Tm2 (IC)	Tm3 (Ziel)
Bakterien				
Test mit <i>hybcell</i>	< 37	(< 79,5 °C)	(79,5 – 81,5 °C)	> 83 °C
Negativ	> 37	(< 79,5 °C)	79,5 – 81,5 °C	--
Fungi				
Test mit <i>hybcell</i>	< 37	(< 80,0 °C)	(80,0 – 81,8 °C)	> 83 °C
Negativ	> 37	(< 80,0 °C)	80,0 – 81,8 °C	--

Graue Felder kennzeichnen obligatorische Kriterien.

Ct ... Zyklusschwelle (Zyklusnummer) IC ... Interne Kontrolle
 Tm ... Schmelztemperatur (°C) () ... könnte bei niedrigem Ct fehlen

Ein separates Leitliniendokument beschreibt die Interpretation der PCR-Ergebnisse für Option 1 ausführlicher. Download unter www.cubedx.com/documents.



Option 2: Manuelle Extraktion + PCR-Gerät

PCR-Box Bacteria, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box Resistance* amplifizieren nur das jeweilige Target (Bakterien, Fungi oder Resistenzgene für gram+-assoziierte Resistenzen). Bei der Untersuchung negativer Proben (kein Target in der Probe) zeigt der PCR-Test daher keine Amplifikation und keinen Schmelzpeak.

Daher bestätigt eine *Internal Process Control (IPC)* die Gültigkeit negativer Ergebnisse in einer parallelen PCR. Es handelt sich um eine positive Prozesskontrolle, die es dem Anwender ermöglicht, zwischen negativen Ergebnissen und ungültigen Ergebnissen zu unterscheiden – Ergebnissen, die höchstwahrscheinlich durch Fehler im Prozess beeinträchtigt wurden.

Die Gültigkeit der *IPC* wird entweder durch das PCR-Ergebnis (bei Verwendung von qPCR-Geräten, siehe oben) oder durch den *hybcell*-Test (siehe unten) bestätigt.

Die *IPC* und damit der Test sind gültig, wenn die folgenden Kriterien für die *PCR-Box IPC* erfüllt sind. In diesem Fall ist die Zugabe des Amplikons zum *hybcell*-Test nicht erforderlich (siehe oben, Einschränkung von PCR-Amplikons).

Achtung!

Internal Process Control (IPC) dient zur Bestätigung negativer Ergebnisse. Im Falle einer positiven Amplifikation des PCR-Mixes für Bakterien, Fungi oder Resistenzen können die Amplifikationsergebnisse für die IPC ignoriert werden, und der Hybcell-Test sollte durchgeführt werden. Analog dazu kann das Ergebnis für die IPC ignoriert werden, wenn mit der *hybcell* Bakterien oder Pilze identifiziert werden und das IPC-Ergebnis des Tests „NICHT NACHGEWIESEN“ lautet, obwohl „NACHGEWIESEN“ zu erwarten wäre.

Die folgende Tabelle zeigt die Grenzwerte zur Unterscheidung zwischen negativen Proben und Proben, die eine Folgeanalyse mit *hybcell* erfordern.

		Amplifikation	Schmelzkurve
		Ct	Tm1
IPC	Gültig	< 34	85 °C ± 1 °C
	Ungültig	> 34	--
Bakterien	Negativ	> 36	--
	Test mit <i>hybcell</i>	< 36	80 °C bis 90 °C
Pilze	Negativ	> 36	--
	Test mit <i>hybcell</i>	< 36	80 °C bis 94 °C
Resistenzen	Negativ	> 36	--
	Test mit <i>hybcell</i>	< 36	80 °C bis 90 °C

Graue Felder kennzeichnen obligatorische Kriterien.

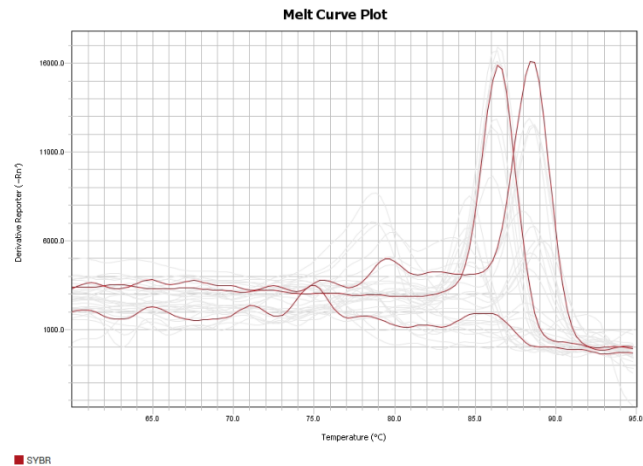
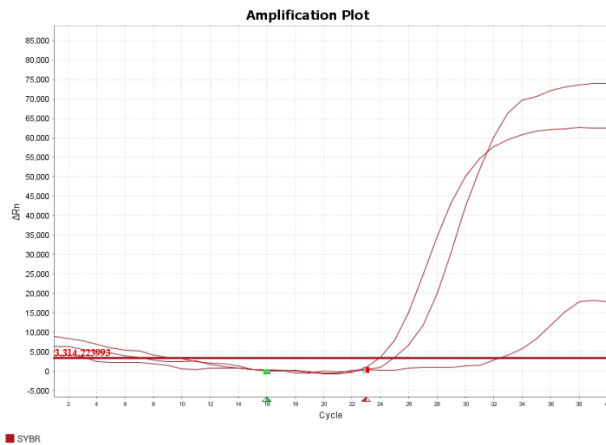
Ct ... Zyklusschwelle (Zyklusnummer)

Tm ... Schmelztemperatur (°C)

Nachstehend finden Sie ein Beispiel für eine Blutprobe, die mit einer externen Prozesskontrolle (*EPC*) von *Candida albicans* und einer internen Prozesskontrolle (*IPC*) versetzt wurde.



	Ct-Wert	Schmelztemperatur	Abgeleitetes Ergebnis
IPC	24	86,51 °C	Gültig
Bakterien	32,8	74,92 °C	Negativ
Pilze	25	88,54 °C	Positiv



hybcell-Kontrollen

hybcell-Tests verfügen über mehrere interne Kontrollen, um korrekte Ergebnisse zu gewährleisten. Wenn alle internen Kontrollen bestanden sind, lautet das Ergebnis für die Kontrollen „PASSED“ (und wird als solches im Bericht angezeigt). Wenn eine oder mehrere Kontrollen fehlschlagen, werden die Kontrollen im Bericht als „FAILED“ gekennzeichnet. Wenn eine Kontrolle fehlschlägt, sind die Ergebnisse ungültig und der Test muss wiederholt werden.

- **Prozesskontrolle:** Überprüft die Verarbeitung der *hybcell*.
- **Oberflächenkontrolle:** Überprüft den *hybcell*-Typ und das Auslesen der Fluoreszenzsignale (Scanvorgang).
- **Hintergrundrauschkontrolle:** Überprüft unspezifische Bindungen und grundlegende Anforderungen der *hyborg*-Software.

Überprüfung der PCR-Mixe

Da der Benutzer wählen kann, ob er alle oder nur ausgewählte PCR-Mixe verwenden möchte, wird die Verwendung der PCR-Mixe mit Sonden auf der Oberfläche der *hybcell* angezeigt. Wenn ein PCR-Mix hinzugefügt wurde, lautet das Ergebnis im Bericht für diesen Mix „ADDED“ (hinzugefügt), andernfalls „MISSING“ (fehlt).

- **Bacteria PCR Mix:** Überprüft, ob *PCR-Box Bacteria* verwendet wurde.
- **Fungi PCR Mix:** Überprüft, ob die *PCR-Box Fungi* verwendet wurde.

Specificity Control

Die Tests verfügen über eine testspezifische Kontrolle. Wenn die Kontrolle bestanden wird, lautet das Ergebnis „PASSED“. Andernfalls lautet das Ergebnis „NOT PASSED“. Auch wenn die Kontrolle nicht bestanden wird, wird der Test analysiert und die Ergebnisse dargestellt. Diese Kontrollen helfen jedoch dabei, die Plausibilität der Ergebnisse zu beurteilen.

- **Specificity Control:** Überprüft, ob *compact sequencing* fehlerfrei abgelaufen ist.



Interne Prozesskontrolle (IPC)

Die interne Prozesskontrolle (IPC) ist eine testspezifische Kontrolle, die bei jedem *hybcell*-Test überprüft wird. Nur wenn das CR-Amplikon der IPC in die *hybcell* gegeben wird und die entsprechenden Sonden auf der *hybcell* den Signalschwellenwert überschreiten, lautet das Ergebnis „DETECTED“ (erkannt). Andernfalls – wenn entweder kein Amplikon hinzugefügt wurde oder der Signalschwellenwert nicht überschritten wurde – lautet das Ergebnis „NOT DETECTED“ (nicht erkannt).

- **Internal Process Control:** Überprüft ob das Amplikon der IPC zugegeben und der Schwellenwert überschritten wurde.

Allgemeine Nomenklatur

- Eine **Bakterienspezies** wird nachgewiesen, wenn die 16S-rDNA einer Spezies/Art amplifiziert wurde und ein entsprechendes Signalmuster gefunden wurde (z. B. *Staphylococcus aureus*).
- Ein **Bakteriengenus** wird nachgewiesen, wenn die 16S-rDNA einer Spezies/Art amplifiziert wurde und das Signalmuster mit einem Genus/einer Gattung übereinstimmt (z. B. *Staphylococcus*).
- Eine **Fungispezies** wird nachgewiesen, wenn die 28S-rDNA einer Spezies/Art amplifiziert wurde und ein entsprechendes Signalmuster gefunden wurde (z. B. *Candida albicans*).
- Ein **Fungigenus** wird nachgewiesen, wenn die 28S-rDNA einer Spezies/Art amplifiziert wurde und das Signalmuster mit einem Genus/einer Gattung übereinstimmt (z. B. *Candida*).

Off-profile Parameter

Entsprechend dem Verwendungszweck werden klinisch relevante Ergebnisse angezeigt. Das Protokoll für eine Lot legt für die CE-IVD-Kits die definierten klinisch relevanten Bakterien, Resistenzgene und Fungi fest. Die Ergebnisse außerhalb dieses Bereichs werden als „Off-profile parameters“ gekennzeichnet. Solche Ergebnisse helfen Infektiologen bei der Interpretation des Ergebnisses.

Die folgenden Ergebnisse werden immer als „Off-profile Parameter“ angezeigt:

- **Bacteria pan** wird angezeigt, wenn amplifizierte bakterielle 16S-rDNA vorhanden ist.
- **Gram pos / Gram neg** wird angezeigt, wenn amplifizierte gram-positive/gram-negative bakterielle DNA vorhanden ist.
- **Fungi pan** wird angezeigt, wenn amplifizierte fungale 28S-rDNA vorhanden ist.



hyborg-Report

CubeDx GmbH
Westbahnstr. 55
4300 St. Valentin
Austria



Sample	SAE3 CAE2	Test	hybcell Pathogens DNA xB (1)
Date	21.01.2026 09:38	Profile	Sepsis (22.08.2025)
Remark		hybcell	2733A510277
Liquids	1: PE-Buffer (138283001) / S: System Liquid (2840010028)		

Controls		
Controls	PASSED	
Bacteria PCR Mix	ADDED	
Fungi PCR Mix	ADDED	

Parameters	Result	Representation
Specificity Control	PASSED	
Internal Process Control	NOT DETECTED	
BACTERIA	Not Detected	
FUNGI	Detected	
Candida sp.	Detected	100 99999
Candida albicans	Detected	100 99999

Off-profile parameters	Result	Representation
Bacteria Pan	Detected	100 99999
Fungi Pan	Detected	100 99999

Negative Parameters

Abiotrophia defectiva, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Anaerococcus* sp., *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus terreus*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia* sp., *Brucella* sp., *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter* sp., *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii* complex, *Citrobacter koseri*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium* sp., *Corynebacterium ulcerans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter cloacae* complex, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Finlandia magna*, *Fusarium oxysporum* species complex, *Fusarium solani* species complex, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium* sp., *Granulicatella adiacens*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Nakaseomyces glabratus*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Pichia kudriavzevii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Pneumocystis murina*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Proteus mirabilis*, *Proteus* sp., *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Soedospirium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* group, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus* group, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius* group, *Yersinia enterocolitica*

Beispiel eines PDF-Berichts für eine Probe die positiv auf Candida albicans und unspezifische Bakterien getestet wurde.



Protokoll (.hyb)

Kalibrierungskurven und Signalmuster wurden für alle Mikroorganismen und Resistenzgene festgelegt und sind Teil des *hyborg*-Protokolls (XML-Datei mit der Erweiterung .hyb). Die Kalibrierung ist unabhängig vom *hyborg*-Gerät (Gerätenutzung). Voraussetzung ist jedoch, dass der *hyborg* unter den angegebenen Umgebungsbedingungen (z. B. Flüssigkeitszufuhr, Heizung, Laserleistung usw.) betrieben wird.

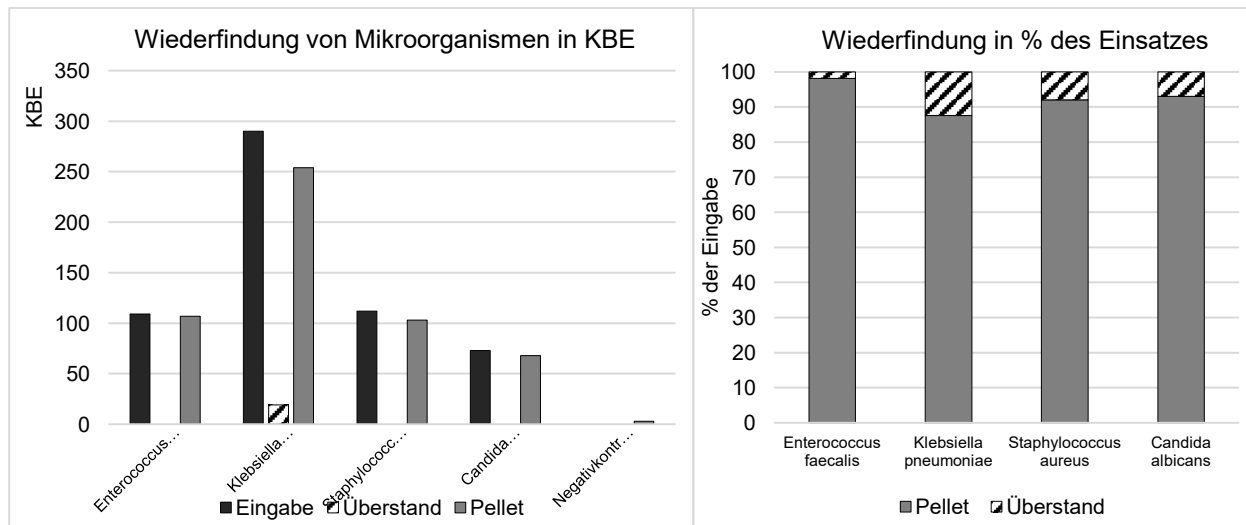
Spezifische Protokolle werden vor der ersten Verwendung einer neuen Charge in die *hyborg*-Software importiert. Aktuelle Protokolle finden Sie auf der Cube Dx-Homepage (www.cubedx.com/protocols). Protokolle können auch automatisch aktualisiert werden, wenn der *hyborg* permanent mit dem Internet verbunden ist



9. Analytische Leistungsmerkmale

GINA 500, GINA 500 + DNA Purification

Wiederfindung von Pathogenen: Lebende Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*) wurden in EDTA-Vollblutproben gesunder Probanden gegeben. Diese Proben wurden homogenisiert (gevortext). Nicht beimpftes Wachstumsmedium wurde als Negativkontrolle verwendet. Der erste Schritt des *GINA 500*-Protokolls wurde durchgeführt (*LE Solution* + Zentrifugation). Die resultierenden Pellets wurden in 100 µL EDTA-Vollblut resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach der Zentrifugation wurden 100 µL des Überstands ausplattiert, um die Anzahl der lebenden Mikroorganismen zu bestimmen, die nicht im Pellet gebunden waren (= Verlust). Die Kolonien wurden nach 24 bis 48 Stunden Inkubation gezählt und dokumentiert.



Die Wiederfindungsrate liegt zwischen 88 % (*K. pneumoniae*) und 98 % (*E. faecalis*).

PCR-Box Bacteria / hybcell Bacteria DNA xB

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection - LOD) wurde durch Verdünnen von Kulturen von *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* und deren Prozessierung nach dem *GINA 500 + DNA Purification*-Protokoll bestimmt. Zur Bestimmung der entsprechenden koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden Aliquots der Verdünnungen ausplattiert und die Kolonien nach 24/48 Stunden Inkubation gezählt.

Für alle drei Zielorganismen wurde die **LOD zwischen 10 und 20 KBE/ml bestimmt**.

Die Selektivität wurde mit Referenz-DNA-Proben von ATCC (American Type Culture Collection) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) getestet.

<i>Acinetobacter baumannii</i> c.	DSM30007	<i>Actinobacter pleuropneumoniae</i>	DSM13472
<i>Borrelia burgdorferi</i>	DSM4680	<i>Burkholderia cepacia</i> -Komplex	DSM7288
<i>Brucella</i> sp.	DSM103976	<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM4688
<i>Citrobacter freundii</i> compl.	DSM30039	<i>Citrobacter koseri</i>	DSM4596
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ATCC 700971D-5	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	DSM7113
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	DSM46325	<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM30053
<i>Enterobacter cloacae</i> compl.	DSM30054	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM20477
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM20478	<i>Escherichia coli</i>	DSM30083
<i>Fingoldia magna</i>	DSM20470	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	DSM20698
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSM15643	<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM4690
<i>Helicobacter pylori</i>	DSM21031	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM5175



<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM30104	<i>Legionella pneumophila</i>	DSM25213
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM15675	<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM9143
<i>Morganella morganii</i>	DSM30117	<i>Neisseria meningitidis</i>	DSM10036
<i>Prevotella intermedia</i>	DSM20706	<i>Propionibacterium granulosum</i>	ATCC 25746D-5
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM4479	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM50070
<i>Pseudomonas syringae</i>	DSM50274	<i>Salmonella enterica</i>	DSM554
<i>Serratia marcescens</i>	DSM30121	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM20774
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM20044	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	DSM20263
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM21257	<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM2134
<i>Streptococcus anginosus gr.</i>	DSM20563	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	DSM20662
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM20566	<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM20565
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM11067	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM8992

Für jedes Experiment wurde die DNA zweier verschiedener Spezies gemischt und getestet.

Jede getestete bakterielle DNA zeigte das **erwartete Ergebnis** im *hyborg*-Bericht.

Es wurden **keine unspezifischen Ergebnisse oder Kreuzreaktivitäten** beobachtet.

Die **Wiederholgenauigkeit** wurde durch mehrfache Amplifikation verschiedener Verdünnungen von *Staphylococcus aureus*-DNA bestimmt.

- **PCR-Box Bacteria**, berechneter CV bei einem mittleren Cq-Wert von 23,4: CV = 1,3 %.

PCR-Box Fungi / hybcell Fungi DNA xB

Die **Nachweisgrenze** (LOD) wurde durch Verdünnen von *Candida albicans*-Kulturen und deren Prozessierung mit dem *GINA 500 + DNA Purification*-Protokoll bestimmt. Zur Bestimmung der entsprechenden KBE wurden Aliquots der Verdünnungen ausplattiert und die Kolonien nach 24/48 Stunden Inkubation gezählt.

Die **LOD** für *Candida albicans* beträgt ~ 2 KBE/ml.

Die **Selektivität** wurde hauptsächlich mit Referenz-DNA-Proben von ATCC (American Type Culture Collection) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) getestet:

<i>Aspergillus clavatus</i>	ATCC 1007D-2	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 1022	<i>Aspergillus niger</i>	DSM1957
<i>Candida albicans</i>	ATCC 11006	<i>Candida dubliniensis</i>	DSM28723
<i>Candida glabrata</i>	ATCC	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019D-5
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC MYA-3404D-5	<i>Cladosporium sp.</i>	DSM19653
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC MAY-565	<i>Pichia kudriavzevii</i>	ATCC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Molzym P1</i>		

Für jedes Experiment wurde die DNA einer Bakterienspezies und einer Funguspezies gemischt und getestet.

Jede getestete Fungi-DNA zeigte das **erwartete Ergebnis** im *hyborg*-Bericht.

Die folgenden unspezifischen Ergebnisse konnten beobachtet werden:

Die Untersuchung von ***Aspergillus clavatus*** ergab positive Ergebnisse für ***Aspergillus clavatus* + *Aspergillus fumigatus***.

Die **Wiederholgenauigkeit** wurde durch mehrfache Amplifikation verschiedener Verdünnungen von *Candida albicans*-DNA bestimmt.

- **PCR-Box Fungi**, berechneter CV bei einem mittleren Cq-Wert von 35,4: CV = 2,4 %.

IPC / PCR-Box IPC

Die **Wiederholgenauigkeit** wurde mit 16 verschiedenen EDTA-Vollblutproben getestet: *IPC* (20 µl) wurde hinzugefügt, und die Proben wurden gemäß dem *GINA 500 + DNA Purification*-Protokoll verarbeitet. Die IPC-PCR

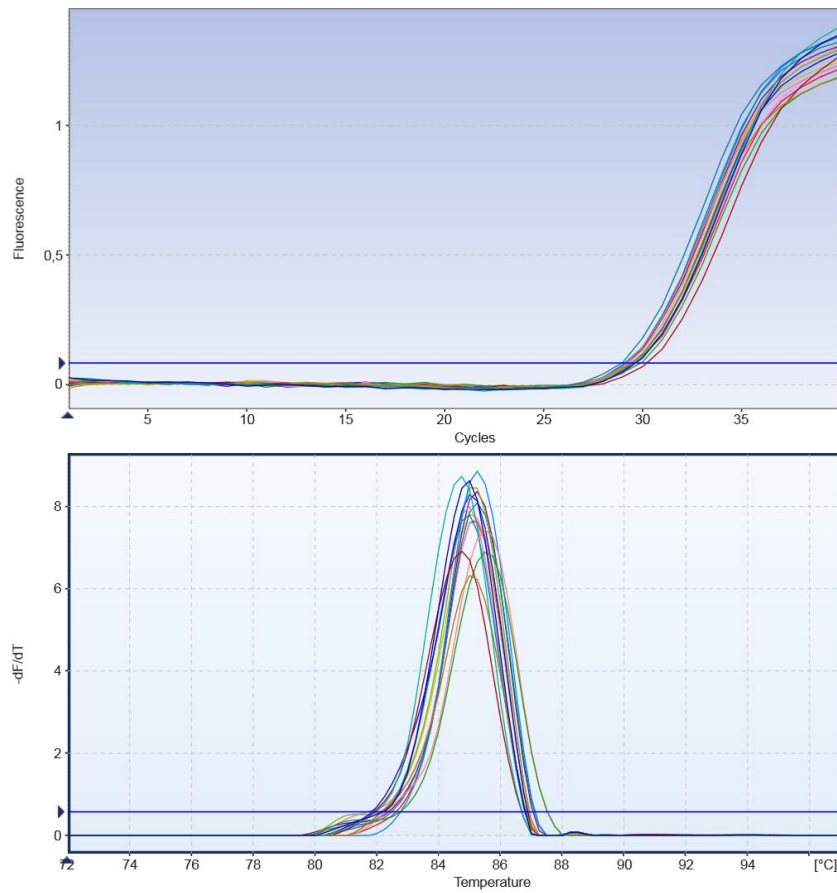
Seite 36 der 43



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Österreich, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx entwickelt und produziert Systeme und Tests für die klinische Diagnostik. Unsere Produkte – Protein- und DNA-basierte Tests – zielen darauf ab, Lücken in der medizinischen Versorgung zu schließen und die hybcell-Technologie als Standard in der Multiplex-Diagnostik zu etablieren. Die Produkte sind für die Verwendung gemäß CE-IVD bestimmt. Die Informationen, Beschreibungen und Spezifikationen in diesem Dokument können ohne vorherige Ankündigung geändert werden. Die Cube Dx GmbH haftet nicht für Fehler in dieser Veröffentlichung oder für zufällige oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung der Produkte und dieses Dokuments.

(siehe Grafiken unten) wurde durchgeführt, und die Ergebnisse wurden durch die Testung mit *hybcell Pathogens DNA xB* sowie durch Sequenzierung (Sanger) der PCR-Produkte verifiziert.



Die Analyse der Quantifizierungszyklen (Cq) ergab (alle Werte gerundet):

Durchschnitt: Cq 29,6

Standardabweichung: +/- 0,3

Variationskoeffizient (CV): 1,1 %

Der **Schwellenwert für den Cq** der *IPC* ist auf **30 +/- 4** (26 bis 34) festgelegt. Dieser Schwellenwert kann zwischen verschiedenen PCR-Geräten leicht variieren.



10. Klinische Leistung

GINA – Vollblut

Leistungsbewertung vorgestellt während der ECCMID 2021 (01833 SMARTDIAGNOS – molekulare Sepsis-Diagnostik der nächsten Generation):

Ergebnisse/Schlussfolgerungen

Insgesamt wurden 352 Proben mit *GINA und compact sequencing* getestet und mit der Blutkultur und MALDI-TOF-Identifizierung oder der klinischen Bewertung verglichen. Die Sensitivität betrug 74% und die Spezifität 98%. 96% der Proben wurden durch *GINA und compact sequencing* korrekt klassifiziert. Das System funktioniert gut bei der Erkennung von Krankheitserregern direkt im Blut und deckt mindestens 80–85% der Mikroorganismen ab, die in Europa schwere Infektionen verursachen. Das System ist einfach zu bedienen und hat eine Reaktionszeit von 3–4 Stunden für eine einzelne Probe.

		Blood Culture		Overall Correctness	Sensitivity	Specificity
		Positive	Negative	96%	74%	98%
Cube Dx	Positive	28	5			
	Negative	10	309			
Total		352				

LINA – (positive) Blutkultur

Leistungsbewertung vorgestellt während der ECCMID 2020 (Abstract 6917 – Molekulare Identifizierung von Krankheitserregern und Nachweis von Resistenzgenen aus positiven Blutkulturen):

Ergebnisse/Schlussfolgerung

Insgesamt wurden 277 Proben mit *LINA und compact sequencing* getestet und mit der Blutkultur und MALDI-TOF-Identifizierung oder klinischer Bewertung verglichen. Die Ergebnisse für positive Blutkulturproben mit *LINA und compact sequencing* lagen innerhalb von 2–3 Stunden vor. *LINA* erkannte fast alle positiven Blutkulturen übereinstimmend mit derzeit etablierten Methoden, was zu einer Sensitivität von 98 % führte. Darüber hinaus wurden mehrere Mischinfektionen und langsam wachsende Bakterien identifiziert, die bei der Kultivierung und MALDI-TOF-Identifizierung übersehen wurden, darunter *Acinetobacter*-Spezies, die hochrelevante Träger von Antibiotikaresistenzgenen sind.



		Blood Culture		Overall Correctness	Sensitivity	Specificity
		Positive	Negative	94%	98%	88%
Cube Dx	Positive	166	13			
	Negative	4	94			
Total		277				

LINA – BAL

Leistungsbewertung in Zusammenarbeit mit einer deutschen Universitätsklinik (unveröffentlicht):

Ergebnisse / Schlussfolgerung

BAL-Proben von 79 Patienten (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen / Deutschland) wurden mit hochmodernen Blutkultivierungsmethode und dem Unyvero-System (DNA basierter Test) und *LINA* und *compact sequencing* von Cube Dx analysiert. Die übereinstimmenden Ergebnisse von mindestens zwei der Referenzmethoden wurden als „wahr“ angesehen. Eine Probe wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die Referenzmethoden kein konsistentes Ergebnis erzielen konnten. Daher reduzierte sich die Gesamtzahl der Proben auf 78. Bei 31 Proben wurde das Ergebnis korrekt als positiv klassifiziert, bei 32 Proben wurde das Ergebnis korrekt als negativ klassifiziert. Von den 9 falsch-positiven Ergebnissen zeigten 5 *Haemophilus influenzae*. Von den 6 falsch-negativen Ergebnissen wiesen 3 nicht auf *Staphylococcus aureus* hin.

		Concession-Results		Overall Correctness	Sensitivity	Specificity
		Positive	Negative	81%	84%	78%
Cube Dx	Positive	31	9			
	Negative	6	32			
Total		78				



11. Veränderungen der analytischen Leistung

Veränderungen in der analytischen Leistung

Um die Funktionalität des Tests und dessen Implementierung zu überprüfen, wird eine monatliche Untersuchung mit einem Referenzstandard (z. B. Cube Dx' External Process Controls (*EPC S.aureus 10000* und *EPC C.albicans 10000*)) empfohlen.

Um die Funktionalität der EPCs zu überprüfen, führen Sie mehrere Tests durch und überprüfen Sie das Ergebnis. Wenn das Ergebnis nicht den Erwartungen entspricht, verwenden Sie EPCs aus einer anderen Charge und wiederholen Sie die Tests.

Bei einer Veränderung der analytischen Leistung lesen Sie bitte den Abschnitt [Fehlerbehebung](#) (unten) dieser Gebrauchsanweisung.

Wenn die Mängel nicht behoben werden können, wenden Sie sich bitte an Cube Dx oder die jeweiligen Vertriebspartner, um Unterstützung zu erhalten.



12. Fehlerbehebung

Probenvorbereitung

Problem	Mögliche Ursachen	Maßnahme/Vorsichtsmaßnahme
Verlust des Pellets	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Wegpipettiert / ausgeschüttet 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zunächst den Überstand dekantieren und anschließend die restliche Lösung pipettieren ▪ Wiederholen Sie den Extraktionsschritt
Kontamination	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kontamination während der Probenvorbereitung, Verarbeitung der Probe... 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Folgen Sie den Empfehlungen unserer Guidelines für die Verhinderung von Kontaminationen (www.cubedx.com/documents).

Nachweis mittels PCR

Problem	Mögliche Ursachen	Maßnahme/Vorsichtsmaßnahme
Unerwartetes Aussehen von Amplifikationskurven	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verteilung des Eluats im PCR-Röhrchen ▪ Ungleichmäßige Verteilung der Eluat-PCR-Mix-Lösung ▪ Blasen am Boden des PCR-Röhrchens 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zentrifugieren Sie die PCR-Röhrchen, bevor Sie diese in das Gerät stellen ▪ Überprüfen Sie die Befüllung des PCR-Röhrchens
PCR-Inhibition	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung des PCR-Mixes ▪ Verwendung zu hoher Probenvolumina, insbesondere bei BAL-Proben ▪ Ethanolrückstände im Eluat 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwenden Sie die empfohlene Eluatmenge für die PCR-Reaktion ▪ Verwenden Sie eine Verdünnungsreihe, wenn Sie sich nicht sicher sind, welches BAL-Volumen geeignet ist ▪ Überprüfen Sie die Säule vor der Elution auf EtOH-Rückstände und befolgen Sie nach der Elution den im Protokoll angegebenen 3-minütigen Erhitzungsschritt



Identifizierung durch die *hybcell*

Problem	Mögliche Ursachen	Maßnahme / Vorsichtsmaßnahme
Unspezifische <i>hybcell</i> -Signale	<ul style="list-style-type: none"> Vorbereitete <i>hybcells</i> (eingefülltes Amplifikat) werden nicht sofort verarbeitet Ablaufdatum geöffneter Puffer Gewaltsames Einführen der Pipettenspitze in die <i>hybcell</i> Flüssigkeiten sind leer oder die Flüssigkeitshandhabung des Geräts ist fehlerhaft Unzureichendes Waschven Verwendung abgelaufener/verbraucher <i>hybcells</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Übertragen Sie die Amplikons nur dann in die <i>hybcell</i>, wenn sie sofort verarbeitet werden können; WENN NICHT, lagern Sie die Amplikons wie beschrieben Überprüfen Sie die Haltbarkeit der Puffer nach dem Öffnen der Flaschen Führen Sie die Pipettenspitze vorsichtig in die <i>hybcell</i> ein, ohne deren zentralen Kanal zu verschließen Überprüfen Sie den Füllstand aller Flüssigkeiten. Füllen Sie die Flüssigkeiten gegebenenfalls nach
Grid	<ul style="list-style-type: none"> Verwendung der falschen <i>hybcell</i> Verwendung des „falschen“ Protokolls. Verwendung abgelaufener/verbraucher Produkte (z. B. aufgrund einer beschädigten Verpackung usw.) Softwarefehler Gerätefehler 	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen Sie den <i>hybcell</i>-Typ und das verwendete Protokoll Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Produkte. Überprüfen Sie die Funktionalität des <i>hyborgs</i> mit Hilfe von <i>hybcell Control xC</i>
Specificity Control	<ul style="list-style-type: none"> Verwendung abgelaufener Produkte Unzureichende Menge (kein) PCR-Amplikon in der <i>hybcell</i> Verbrauchte PCR Keine oder unzureichende Verwendung von <i>PE Buffer</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen Sie die Funktionalität des <i>hyborgs</i> mit Hilfe von <i>hybcell Control xC</i> Wiederholen Sie den Test Überprüfen Sie den Füllstand aller Flüssigkeiten. Füllen Sie gegebenenfalls Flüssigkeiten nach

Bei Problemen mit dem Gerät oder dem Test wenden Sie sich bitte an:



Cube Dx GmbH
Westbahnstraße 55, 4300 St. Valentin, Österreich
Kontaktinformationen: www.cubedx.com

Weitere Informationen zur Verwendung des Geräts und der Software finden Sie in der Gebrauchsanweisung für *hyborg Dx RED2/3*. Download unter www.cubedx.com/documents.



Schwerwiegende Zwischenfälle / Vigilanz

Melden Sie schwerwiegende Zwischenfälle im Zusammenhang mit der Verwendung des Tests oder des Geräts unverzüglich an Cube Dx oder die jeweiligen Vertriebspartner sowie die zuständige nationale Behörde. Beachten Sie bitte die nationalen Rechtsvorschriften zur Meldung schwerwiegender Zwischenfälle!

