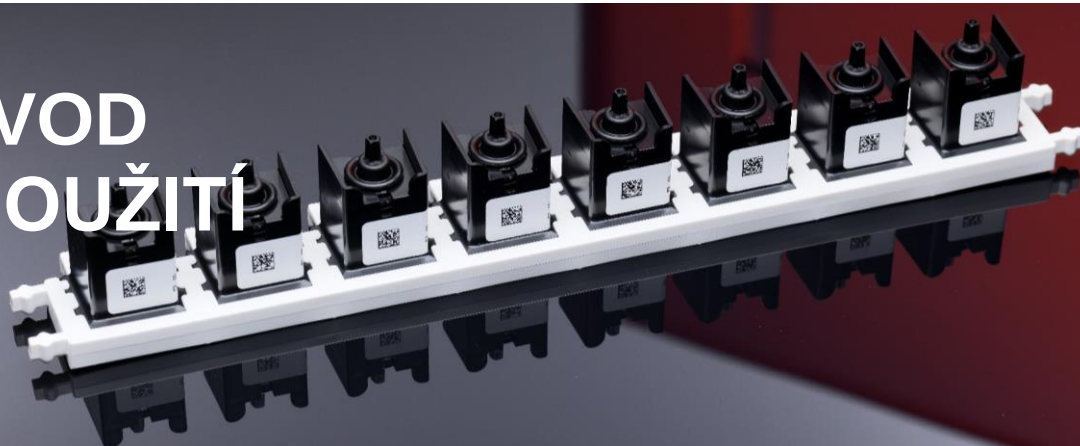


# NÁVOD K POUŽITÍ



Návod k použití Pathogens xB CZ 2023-10-24  
© 2023 Cube Dx GmbH



Říjen 2023.

|                                  |        |                |
|----------------------------------|--------|----------------|
| <b>IPC</b>                       | REF /  | 09120127730169 |
|                                  | UDI-DI |                |
| <b>GINA 500</b>                  | REF /  | 09120127730244 |
|                                  | UDI-DI |                |
| <b>GINA 500 + purifikace DNA</b> | REF /  | 09120127730145 |
|                                  | UDI-DI |                |

*Souprava pro obohacování bakteriální a houbové DNA z lidské krve (+ purifikace DNA) včetně interní kontroly procesu (IPC)*

|             |        |                |
|-------------|--------|----------------|
| <b>LINA</b> | REF /  | 09120127730152 |
|             | UDI-DI |                |

*Modulační pufr pro bezextrakční testování bronchoalveolární laváže (BAL) a krevní kultury (BC)*

|                                                    |        |                |
|----------------------------------------------------|--------|----------------|
| <b>PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC</b> | REF /  | 09120127730084 |
|                                                    | UDI-DI |                |
|                                                    | REF /  | 09120127730107 |
|                                                    | UDI-DI |                |
|                                                    | REF /  | 09120127730091 |
|                                                    | UDI-DI |                |
|                                                    | REF /  | 09120127730114 |
|                                                    | UDI-DI |                |
| <b>hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB</b> | REF /  | 09120127730053 |
|                                                    | UDI-DI |                |
|                                                    | REF /  | 09120127730060 |
|                                                    | UDI-DI |                |
|                                                    | REF /  | 09120127730077 |
|                                                    | UDI-DI |                |

*Multiplexní testy DNA pro detekci bakteriální 16S DNA a bakteriálních markerových genů rezistence vůči antibiotikům z lidských vzorků s indikací homologie se známými typickými bakteriálními kmeny a detekci 28S DNA hub z lidských vzorků s indikací homologie se známými typickými kmeny hub.*



# Obsah

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>OBSAH .....</b>                                         | <b>2</b>  |
| <b>1. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ .....</b>                         | <b>3</b>  |
| <b>2. ÚVOD A ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ .....</b>                   | <b>5</b>  |
| <b>3. TECHNICKÝ POPIS .....</b>                            | <b>11</b> |
| <b>4. SOUČÁSTI PRODUKTU .....</b>                          | <b>13</b> |
| <b>5. SKLADOVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI .....</b>            | <b>15</b> |
| <b>6. POŽADOVANÉ VYBAVENÍ .....</b>                        | <b>16</b> |
| <b>7. PROCES TESTOVÁNÍ .....</b>                           | <b>17</b> |
| <b>8. VÝSLEDKY .....</b>                                   | <b>24</b> |
| <b>9. ANALYTICKÁ VÝKONNOST .....</b>                       | <b>31</b> |
| <b>10. KLINICKÁ VÝKONNOST .....</b>                        | <b>34</b> |
| <b>11. ZMĚNY V ANALYTICKÉ VÝKONNOSTI A LIKVIDACE .....</b> | <b>36</b> |
| <b>12. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ .....</b>                           | <b>37</b> |



# 1. Vysvětlení symbolů

| Symbol                                                                              | Vysvětlení                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Označení CE.<br>Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro.                                                                                             |
|    | Výrobce.                                                                                                                                                   |
| <b>EXP</b>                                                                          | Datum expirace.                                                                                                                                            |
| <b>REF</b>                                                                          | Katalogové číslo, UDI-DI.                                                                                                                                  |
| <b>SN</b>                                                                           | Sériové číslo.                                                                                                                                             |
|    | Odkaz na návod k použití.                                                                                                                                  |
|    | Použijte pouze jednou. Nepoužívejte znovu.                                                                                                                 |
|    | Spotřebujte do data.                                                                                                                                       |
|   | Teplotní mez pro skladování.                                                                                                                               |
|  | Dostatečné pro <n> testů.                                                                                                                                  |
| <b>CONTROL</b>                                                                      | Kontrolní materiál.                                                                                                                                        |
| H225                                                                                | Vysoce hořlavá kapalina a páry.                                                                                                                            |
| H301                                                                                | Toxický při požití.                                                                                                                                        |
| H315                                                                                | Způsobuje podráždění kůže.                                                                                                                                 |
| H318                                                                                | Způsobuje vážné poškození očí.                                                                                                                             |
| H319                                                                                | Způsobuje vážné podráždění očí.                                                                                                                            |
| H371                                                                                | Může způsobit poškození orgánů.                                                                                                                            |
| H412                                                                                | Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými účinky.                                                                                                        |
| P210                                                                                | Uchovávejte mimo dosah tepla, horkých povrchů, jisker, otevřeného ohně a jiných zdrojů vznícení. Zákaz kouření.                                            |
| P233                                                                                | Uchovávejte nádobu těsně uzavřenou                                                                                                                         |
| P260                                                                                | Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/výpary/aerosol.                                                                                                            |
| P273                                                                                | Zabraňte úniku do životního prostředí.                                                                                                                     |
| P280                                                                                | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranu očí/ochranu obličeje.                                                                                   |
| P301+P310                                                                           | PŘI POŽITÍ: Okamžitě zavolejte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM / lékaře.                                                                                             |
| P305+P351+P338                                                                      | PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny, a lze je snadno vyjmout. Pokračujte v oplachování. |
| P337+P313                                                                           | Pokud podráždění očí přetrvává: Vyhledejte lékařskou pomoc/péči.                                                                                           |
| P370+P378                                                                           | V případě požáru: K hašení použijte písek, sněhový nebo práškový hasicí přístroj.                                                                          |
| P403+P235                                                                           | Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte v chladu.                                                                                                   |



|      |                                                                                              |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| P501 | Obsah/nádobu zlikvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy. |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|



## 2. Úvod a zamýšlené použití

### Zamýšlené použití

Produkty popsané v tomto návodu k použití jsou kombinovány za účelem detekce (přítomnost/nepřítomnost) a identifikace (druh, rod) bakterií, genů rezistence vůči antibiotikům a hub v lidských vzorcích na základě analýzy krátkých sekvencí DNA mikrobiálního genomu.

Produkty jsou určeny k detekci i velmi nízkých koncentrací bakteriální a/nebo houbové DNA přímo ze vzorků, jako je plná krev EDTA. V důsledku toho není pro diagnostiku infekce nutná kultivace vzorku a doba do dosažení výsledku se ve srovnání s běžnými mikrobiologickými kultivačními metodami výrazně zkracuje.

Následující vzorky – vyžadují různé úpravy vzorků (buď postup GINA, nebo LINA) – mají různá zamýšlená použití:

1. Vzorky EDTA (plná krev): Hodnocení sepse, bakteriémie, kandidózy.
2. Bronchoalveolární laváž (BAL): Hodnocení pneumonie.
3. Pozitivní kultivace krve: Identifikace bakterií a hub po kultivaci krve.

Produkty nejsou určeny k poskytování informací o množství mikroorganismů ve vzorku.

Testy mohou provádět pouze profesionální uživatelé, kteří byli vyškoleni v jeho používání v odpovídajícím laboratorním prostředí.

### Obecné informace

Identifikace původce přímo z plné krve umožňuje včasnou cílenou antimikrobiální léčbu. Cílená antimikrobiální léčba je předpokladem úspěšné léčby infekce a omezení často závažných nežádoucích účinků, které mohou v konečném důsledku vést až k úmrtí pacienta. Konvenční kultivační metody mohou selhat při získávání včasných výsledků, zejména pokud je původcem onemocnění rychle se množící bakterie (např. *Bordetella pertussis*), která vyžaduje zvláštní podmínky růstu, pomalu se množící bakterie (např. *Helicobacter pylori*, která potřebuje ke kultivaci až 7 dní) nebo houby (např. *Candida glabrata*). Zejména v takových případech může být včasná identifikace mikroorganismů pomocí Cube Dx pro pacienty přínosná.

Tyto produkty jsou však určeny k doplňkovému použití při kultivaci krve. V žádném případě nemají nahradit techniky kultivace krve. Výsledky získané z přímého krevního testu by měly být interpretovány spolu s dalšími relevantními klinickými a laboratorními nálezy, aby pomohly při poskytování cílené léčby pacientům s podezřením na sepsi.

Občas se mohou vyskytnout protichůdné výsledky kultivace krve: například produkty mohou vykazovat negativní výsledek, zatímco výsledek kultivace krve je pozitivní a naopak. Tyto rozdíly mohou být důsledkem velmi nízkého počtu mikroorganismů v krvi pacienta, protože pro test se odebírá pouze 0,5 ml vzorku (ve srovnání s 2x10 ml pro kultivaci krve). Dalším důvodem může být výskyt vzácných typových kmenů, které nebyly při návrhu testu zohledněny, nebo zásadní rozdíly v základních technologiích pro odečet výsledků (genetické informace založené na vybraných typových kmenech vs. proteinové vzorce používané MALDI-TOF).

Rozdílné časové okamžiky odběru vzorků mohou rovněž vést k rozdílným výsledkům. Důrazně doporučujeme odebírat vzorky EDTA současně s odběrem vzorků krevních kultur – pokud možno ještě před podáním antimikrobiálních látek.

Tento test je třeba provádět tak, jak je navrženo v této příručce, přerušení pracovního postupu, například zmrazením eluátu na několik dní, může rovněž změnit výsledky.



## IPC, GINA 500, GINA 500 + purifikace DNA

Soupravy *GINA* pro obohacování patogenů (a purifikaci DNA) odstraňují z plné krve a dalších lidských vzorků naprostou většinu lidských (krevních) buněk a buněčných zbytků. Cílem postupu je výrazně zvýšit procento patogenní (bakteriální a houbové) DNA intaktních mikroorganismů v poměru k lidské DNA ve výsledném roztoku a zajistit lepší podmínky pro následné reakce PCR. Intaktní mikroorganismy jsou ty, které jsou stále životaschopné (aktivní nebo oslabené (= inhibované ve svém růstu např. podáváním některých antibiotik)). Naopak, během procesu jsou odstraněny poškozené mikroorganismy a volná DNA. Test poskytuje výsledky bez zkreslení v závislosti na vlastnostech různých mikroorganismů.

V důsledku toho jsou pro následné procesy (kompaktní sekvenování) relevantní pouze mikroorganismy, které ještě mohou pacientovi uškodit. Některé antimikrobiální látky se zaměřují na prevenci růstu, ale mikroby neničí. V takových případech se mikroorganismy neodstraňují, protože jsou stále intaktní. Po ukončení antimikrobiální léčby představují tyto mikroorganismy pro pacienta riziko.

Druhým základním rysem obohacování patogenů *GINA* je vysoce účinná a efektivní lýza bakteriálních a houbových buněk (po obohacení).

Koncepce zajištění kvality pro takto vysoce citlivou molekulární identifikaci patogenů z lidských vzorků musí zajistit, aby negativní výsledky byly způsobeny pouze negativními vzorky – a nikoliv chybami při zpracování vzorku. Přísná kontrola procesu proto musí projít stejnými postupy jako samotný vzorek – aniž by došlo ke snížení citlivosti testů. Interní kontrola procesu (IPC) společnosti Cube Dx se skládá ze zmrazeného biologického materiálu rozpuštěného v lidském vzorku před zahájením procesu obohacování. IPC prochází stejnými extrakčními postupy jako samotný vzorek. Následná PCR a test hybcell (pokud je amplikon přenesen) potvrzují přítomnost DNA IPC, a tedy platnost výsledků.

Pro zpracování souprav *GINA* je zapotřebí *stolní centrifuga s rotorem pro 2ml zkumavky, která může pojmout 11 000 g* (např. Eppendorf, Hermle atd.), a běžný termoblok (např. Analytic Jena, Coyote Bioscience), který se může zahřát na 100 °C.

## LINA

Identifikace patogenů a genů rezistence vůči antibiotikům by měla být jednoduchá a rychlá. Přenosový a modulační pufr LINA zkracuje dobu molekulární identifikace, protože eliminuje procesy extrakce RNA/DNA a umožňuje přímou PCR.

Tento pufr je určen pro použití se vzorky obsahujícími velké množství mikroorganismů, například bronchoalveolární laváž (BAL) při diagnostice pneumonie a pro pozitivní kultivaci lidské krve.

Společně s produkty PCR Cube Dx (Bacteria, Fungi, Resistance) dokáže hybcell pro identifikaci patogenů určit mikroorganismy a geny rezistence za méně než 2 hodiny!

Postup musí být prováděn v prostředí vhodném pro molekulárně biologické testování. To zahrnuje pipety bez DNA a DNázy, oddělené místnosti pro izolaci DNA a amplifikaci/detekci a možnost dekontaminace UV světlem.



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

Testy *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Fungi*, *PCR-Box Resistance* a kvalitativní testy *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* a *hybcell Pathogens DNA xB* jsou in vitro testy pro detekci a identifikaci bakterií, mechanismů rezistence vůči antibiotikům a hub z lidských vzorků na základě homologie bakteriální 16S DNA, genů rezistence a houbové 28S DNA. *PCR-Box IPC* amplifikuje DNA IPC (Internal Process Control) přidanou do počátečního vzorku krve EDTA zpracovaného pomocí *GINA*. Test by mohl v kombinaci s dalšími klinickými informacemi podpořit léčebné kroky při podezření na (závažné) bakteriální a/nebo houbové infekce.

Bakterie a geny rezistence vůči antibiotikům potenciálně prokázané pomocí *hybcell Bacteria DNA xB* a *hybcell Pathogens DNA xB*:

■ Kultivace krve
 ■ Sepse
 ■ Pneumonie

| Rod             | Druhy                                      | Profil                                |                                    |                                     |
|-----------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Abiotrophia     | <i>Abiotrophia defectiva</i>               | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Acinetobacter   | <i>Acinetobacter baumannii</i>             | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> komplex | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Actinobacillus  | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>     | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Anaerococcus    |                                            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Bacteriodes     | <i>Bacterioides fragilis</i>               | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Bordetella      | <i>Bordetella pertussis</i>                | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Borrelia        |                                            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Borrelia burgdorferi</i>                | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Brucella        |                                            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Burkholderia    | <i>Burkholderia cepacia</i> komplex        | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Burkholderia pseudomallei</i>           | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Campylobacter   |                                            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Citrobacter     | <i>Citrobacter koseri</i>                  | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Citrobacter freundii</i> komplex        | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Corynebacterium | <i>Corynebacterium diphtheriae</i>         | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Corynebacterium jeikeium</i>            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Corynebacterium ulcerans</i>            | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Enterobacter    | <i>Enterobacter cloacae</i>                | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Enterobacter cloacae</i> komplex        | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Enterococcus    | <i>Enterococcus faecalis</i>               | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Enterococcus faecium</i>                | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Escherichia     | <i>Escherichia coli</i>                    | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Finegoldia      | <i>Finegoldia magna</i>                    | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Fusobacterium   | <i>Fusobacterium nucleatum</i>             | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
|                 | <i>Fusobacterium necrophorum</i>           | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |
| Granulicatella  | <i>Granulicatella adiacens</i>             | <span style="color: orange;">■</span> | <span style="color: red;">■</span> | <span style="color: blue;">■</span> |

Strana 7 z 39


 Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Rakousko, [info@cubedx.com](mailto:info@cubedx.com), [www.cubedx.com](http://www.cubedx.com)

Společnost Cube Dx vyvíjí a vyrábí systémy a testy pro klinickou diagnostiku. Naše produkty – testy na základě bílkovin a DNA – mají za cíl uspokojit poptávku ve zdravotnictví a prosadit technologii hybcell jako standardní v rámci multiplexní diagnostiky.

Tento produkt je určen pro použití s certifikací CE-IVD. Informace, popisy a specifikace v této publikaci mohou být změněny bez předchozího upozornění. Společnost Cube Dx GmbH neodpovídá za chyby obsažené v tomto materiálu ani za náhodné nebo následné škody v souvislosti s poskytnutím, provedením nebo použitím tohoto materiálu.

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |  |  |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| Haemophilus       | <i>Haemophilus haemolyticus</i><br><i>Haemophilus influenzae</i>                                                                                                                                                                                                                                     |  |  |  |
| Helicobacter      | <i>Helicobacter pylori</i>                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |  |
| Klebsiella        | <i>Klebsiella aerogenes</i><br><i>Klebsiella oxytoca</i><br><i>Klebsiella pneumoniae</i>                                                                                                                                                                                                             |  |  |  |
| Legionella        | <i>Legionella pneumophila</i>                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  |  |
| Listerie          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |  |  |
| 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><br><i>Prevotella intermedia</i>                                                                                                                                                                                                                                             |  |  |  |
| Propionibacterium | <i>Propionibacterium acnes</i>                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |  |
| Proteus           | <i>Proteus mirabilis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |  |  |
| Providencia       | <i>Providencia stuartii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |  |
| Pseudomonas       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Pseudomonas non-aeruginosa</i>                                                                                                                                                                                                                                   |  |  |  |
| Salmonella        | <i>Salmonella enterica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |  |
| Serratia          | <i>Serratia marcescens</i>                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  |  |
| Staphylococcus    | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Staphylococcus non-aureus</i>                                                                                                                                                                                                                                     |  |  |  |
| Stenotrophomonas  | <i>Skupina Stenotrophomonas maltophilia</i>                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |  |
| Streptococcus     | <i>Skupina Streptococcus anginosus</i><br><i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Streptococcus dysgalactiae</i><br><i>Streptococcus gordonii</i><br><i>Skupina Streptococcus mitis</i><br><i>Streptococcus pneumoniae</i><br><i>Streptococcus pyogenes</i><br><i>Skupina Streptococcus salivarius</i> |  |  |  |
| Yersinia          | <i>Yersinia enterocolitica</i><br><i>Yersinia pseudotuberculosis komplex</i>                                                                                                                                                                                                                         |  |  |  |



| Gram      | Rezistence                  | Geny rezistence            | Profil |  |  |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|--------|--|--|
| Pozitivní | Rezistence k vankomycinu    | <i>vanA</i><br><i>vanB</i> |        |  |  |
|           | Rezistence vůči meticilinu  | <i>mecA</i><br><i>mecC</i> |        |  |  |
| Negativní | Betalaktamáza/karpabenemáza | <i>CTX m1/m3</i>           |        |  |  |
|           |                             | <i>IMP</i>                 |        |  |  |
|           |                             | <i>KPC</i>                 |        |  |  |
|           |                             | <i>NDM</i><br><i>OXA48</i> |        |  |  |

Houby potenciálně prokázané pomocí *hybcell Fungi DNA xB* a *hybcell Pathogens DNA xB*:

| Rod            | Druhy                                   | 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</i> komplex druhů |        |  |  |
|                | <i>Fusarium solani</i> species komplex  |        |  |  |
| Pichia         | <i>Pichia kudriavzevii</i>              |        |  |  |
| Pneumocysta    | <i>Pneumocystis jirovecii</i>           |        |  |  |
|                | <i>Pneumocystis murina</i>              |        |  |  |
| Saccharomyces  |                                         |        |  |  |
|                | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         |        |  |  |
| Scedosporium   |                                         |        |  |  |

Test lze použít pro různé diagnostické aplikace, ale ne všechna zacílení na bakterie a houby jsou relevantní pro všechna použití. Proto je možné v softwaru hyborg zúžit rozsah výsledků zprávy definováním profilu (výběrem cílů, které mají být ve zprávě zohledněny).

Test musí být proveden v prostředí vhodném pro molekulárně biologické testování. To zahrnuje pipety bez DNA a DNázy, oddělené místnosti pro izolaci DNA a amplifikaci/detekci a možnost dekontaminace UV světlem.

K potřebnému vybavení patří mraznička (-15 až -25 °C) a stůl pro DNA. Materiály vzorků jsou roztoky obsahující DNA, která byla extrahována vhodným produktem/postupem extrakce DNA.



Pro zpracování *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistances*, *PCR-Box Fungi* a *PCR-Box IPC* je zapotřebí buď qPCR zařízení (buď Rotor-Gene od Qiagen; CFX96 od Biorad nebo Quantstudio od Thermo), nebo termocyklovač (T-Personal od Analytic Jena).

Pro zpracování *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* nebo *hybcell Pathogens DNA xB* je vyžadováno zařízení *hyborg Dx RED2* s předinstalovaným softwarem *hyborg* (Cube Dx).

Výsledky testů je třeba hodnotit v kontextu zdravotnické dokumentace pacienta, jeho klinického stavu a dalších nálezů.



### 3. Technický popis

Průběh sepse nebo jiných závažných infekcí a zejména šance na uzdravení a přežití závisí na včasné identifikaci původce (původců).

Šance na přežití a uzdravení po prodělané sepsi a jiných závažných infekcích lze zvýšit včasnou identifikací a cílenou léčbou původce (původců).

#### IPC, GINA 500, GINA 500 + purifikace DNA

Interní kontrola procesu (IPC) od Cube Dx sestává ze zmrazeného biologického materiálu, který se před obohacením rozpustí ve vzorku. Tento biologický materiál je podobný patogenním mikroorganismům způsobujícím sepsi nebo jiné závažné infekce.

Souprava *GINA 500 (pro 500 µl tekutého vzorku, s nebo bez purifikace DNA)* je určena pro rutinní klinické použití k obohacení patogenní (bakteriální, houbové) DNA. Po obohacení se roztok purifikuje a eluát lze použít v reakcích PCR (např. bakteriální DNA, houbová DNA, markerové geny rezistence). Pokud byly ve vzorku amplifikovány produkty PCR, lze pomocí *kompaktního sekvenování* Cube Dx snadno identifikovat příslušný patogen.

Sada je založena na následujících procesních krocích:

- Lýza a odstranění lidských buněk: K vzorku se přidá roztok LE a většina lidských buněk (a buněk rušivých patogenů) se lyzuje a odstraní po centrifugování.
- Lýza patogenních buněk: Přidá se roztok NA a inkubuje se. Peletované buňky patogenu se lyzují.
- Neutralizace: Lyzát se převede do roztoku T, aby se zastavil proces lýzy a neutralizoval výsledný roztok.
- Včetně purifikace DNA: k purifikaci DNA z roztoku *GINA* se používá technologie spinové kolony.

***Výsledek může být zkreslený v důsledku povahy vzorku, chyb při postupu (nízké množství DNA, kontaminace mikroorganismy/ DNA z prostředí), jiných vlivů (degradovaná DNA, kontaminace chemikáliemi) nebo technických chyb.***

Následující okolnosti zhoršují výsledky vzorku:

- Doba mezi odběrem vzorku (krve) a zahájením přípravy vzorku je delší než 4 hodiny.
- Skladování vzorku v době mezi odběrem a zahájením přípravy vzorku není v souladu se specifikacemi (uvedeno: skladovat v suchu a při teplotě mezi 4 °C a 8 °C, viz kapitola o skladování a době použitelnosti).

#### LINA

*LINA* je 8 ml pufru naplněného v jedné zkumavce připravené k použití. Pufér zředí veškeré inhibitory PCR ve vzorku, takže již nebudou účinné. Směs pufrů se vzorky se přenáší přímo do reakcí PCR (bez dalšího extrakčního procesu). Krátký a jednoduchý protokol výrazně zkracuje dobu potřebnou k získání výsledku.

***Výsledek může být zkreslený v důsledku povahy vzorku nebo chyb při postupu (např. nízký počet mikroorganismů ve vzorku nebo technické chyby).***

Následující okolnosti zhoršují výsledky vzorku:

- Použití většího objemu vzorku, než je uvedeno (zvyšuje množství inhibitorů).



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

Testy *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* a *hybcell Pathogens DNA xB* a jejich související reakční směs pro PCR – *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistance*, *PCR-Box Fungi* a *PCR-Box IPC* – jsou určeny pro rutinní klinické použití k detekci a identifikaci patogenních bakterií a jejich markerových genů rezistence vůči antibiotikům a patogenních hub pomocí DNA extrahované ze vzorků, jako je plná krev nebo pozitivní kultivace krve. *PCR-Box IPC* amplifikuje DNA z *IPC* a potvrzuje platnost testovacího postupu pozitivním výsledkem *IPC* na *hybcell*.

Test je zvláště užitečný u pacientů, kteří potřebují okamžitou a specifickou antimikrobiální léčbu (např. sepse), u pacientů, kteří již podstoupili léčbu antibiotiky/antimykotiky (protože kultivace by pak mohla být znemožněna), nebo v případě, že je obtížné kultivovat původce onemocnění.

Test je založen na následujících procesních krocích/principech testu:

- **Amplifikace DNA – detekce bakterií/hub/markerů genů rezistence:** Izolovaná DNA se amplifikuje polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Cílovými oblastmi jsou 16S rDNA bakterií, 28S rDNA hub a příslušné markerové geny rezistence. Během amplifikace jsou jednotlivá vlákna DNA označena fluorescenčním barvivem. Při použití zařízení qPCR lze z výsledných amplifikačních křivek odvodit přítomnost bakterií, hub nebo markerových genů rezistence.
- **Identifikace:** Kvalitativní analýza se provádí pomocí *kompaktního sekvenování*. Amplikony se vážou na své komplementární, imobilizované sondy, které jsou v případě dokonalé shody (prodloužení primeru) prodlouženy vysoce specifickou DNA polymerázou. Nespecifické amplikony a neprodloužené primery jsou odstraněny během přísných promývacích kroků. *Hyborg* (přístroj pro analýzu) skenuje a analyzuje specifické fluorescenční signály.

**Výsledek může být zkreslen v důsledku chyb při přípravě vzorku (nízké množství DNA, kontaminace patogeny z prostředí / DNA) nebo jiných vlivů při přípravě (degradovaná DNA, kontaminace chemikáliemi), technických chyb nebo chyb při amplifikaci či identifikaci. Pokud existuje podezření, že výsledek je nesprávný nebo znehodnocený, neměl by být brán v úvahu. I když by interní kontroly měly vyřadit nejvíce chybné výsledky, některé z těchto výsledků mohou zůstat nepokryté.**

Následující okolnosti zhoršují výsledky vzorku:

- Doba mezi odběrem vzorku a zahájením přípravy vzorku je delší než 4 hodiny
- Skladování vzorku mezi odběrem vzorku a zahájením přípravy vzorku není v souladu se specifikacemi (specifikováno: skladovat v suchu a při teplotě mezi 4 °C a 8 °C, viz kapitola o skladování a době použitelnosti).



## 4. Součásti produktu

Interní kontrola procesu (IPC):

- *IPC* (REF / UDI-DI 09120127730169): uchovávejte **zmrazené** při teplotě **-15 až -25 °C**
  - 25 x 20 µl IPC
  - (25 x samostatně balené 0,5 ml mikrozkušavky s biologickým materiálem (IPC, každá 20 µl))

K obohacení patogenů (bakterií a hub) z 500 µl (nebo méně) vzorku jsou zapotřebí následující specifické produkty:

- *GINA 500* (REF / UDI-DI 09120127730244): skladujte při **pokožové teplotě (8 až 25 °C)**
  - 2 x 25 *LE roztok* (1400 µl); (2 x 25 x 2ml zkumavky se žlutým uzávěrem)
  - 1 x 12 ml *roztoku NA* (červená značka na lahvičce a uzávěru)
  - 1 x 25 ml *roztoku T* (zelená značka na lahvičce a uzávěru)

Pro obohacení patogenů (bakterií a hub) a purifikaci RNA/DNA z 500 µl (nebo méně) vzorku jsou zapotřebí následující specifické produkty:

- *GINA 500 + DNA Purification* (REF / UDI-DI 09120127730145): uchovávejte při **pokožové teplotě (8 až 25 °C)**
  - 2 x 25 *LE roztok* (1400 µl); (2 x 25 x 2ml zkumavky se žlutým uzávěrem)
  - 1 x 12 ml *roztoku NA* (červená značka na lahvičce a uzávěru)
  - 1 x 25 ml *roztoku T* (zelená značka na lahvičce a uzávěru)
  - 1 x 30 ml *promývacího pufru BW* (láhev)
  - 1 x 60 ml *promývacího pufru B5* (láhev)
  - 1 x 13 ml *elučního pufru BE* (lahvička)
  - 50 x *kolona*
  - 50 x *odběrová zkumavka*
  - 50 x *eluční zkumavka*

K přímému testování vzorků s velkým množstvím mikroorganismů (pozitivní kultivace krve, BAL) je zapotřebí následující specifický produkt:

- *LINA* (REF / UDI-DI 09120127730152): skladujte při **pokožové teplotě (8 až 25 °C)**
  - 50 x *LINA* (8 ml)

K detekci bakterií jsou zapotřebí následující specifické produkty:

- *PCR-Box Bacteria* (REF / UDI-DI 09120127730084): uchovávejte **zmrazené** při teplotě **-15 až -25 °C**
  - 12 x 20 µl PCR master mix Bacteria Rev.2
  - (12 x samostatně balených 0,2ml PCR zkumavek s PCR master mix Bacteria (každá 20µl))

K detekci markerových genů rezistence jsou zapotřebí tyto specifické produkty:

- *PCR-Box Resistance* (REF / UDI-DI 09120127730107): uchovávejte **zmrazené** při teplotě **-15 až -25 °C**
  - 12 x 20 µl PCR master mix Resistance Rev.2

Strana 13 z 39



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Rakousko, [info@cubedx.com](mailto:info@cubedx.com), [www.cubedx.com](http://www.cubedx.com)

Společnost Cube Dx vyvíjí a vyrábí systémy a testy pro klinickou diagnostiku. Naše produkty – testy na základě bílkovin a DNA – mají za cíl uspokojit poptávku ve zdravotnictví a prosadit technologii hybcell jako standardní v rámci multiplexní diagnostiky.

Tento produkt je určen pro použití s certifikací CE-IVD. Informace, popisy a specifikace v této publikaci mohou být změněny bez předchozího upozornění. Společnost Cube Dx GmbH neodpovídá za chyby obsažené v tomto materiálu ani za náhodné nebo následné škody v souvislosti s poskytnutím, provedením nebo použitím tohoto materiálu.

(12 x samostatně balených 0,2ml PCR zkumavek s PCR master mix Resistance (každá 20µl))

K detekci hub jsou zapotřebí následující specifické produkty:

- *PCR-Box Fungi* (REF / UDI-DI 091201277300921): uchovávejte **zmrazené** při teplotě **-15 až -25 °C**
    - 12 x 20 µl PCR master mix Fungi Rev.2
- (12 x samostatně balených 0,2ml zkumavek PCR s PCR master mix Fungi (každá 20µl))

K detekci IPC DNA jsou zapotřebí tyto specifické produkty:

- *PCR-Box IPC* (REF / UDI-DI 09120127730114): uchovávejte **zmrazené** při teplotě **-15 až -25 °C**
    - 12 x 20 µL PCR master mix IPC Rev.2
- (12 x samostatně balených 0,2ml zkumavek PCR s PCR master mix IPC (každá 20µl))

K identifikaci bakterií a markerových genů rezistence jsou zapotřebí následující specifické produkty (kromě obecných pufrů pro zařízení hyborg):

- *Souprava hybcell Bacteria DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730053): skladujte při **pokojevé teplotě (8 až 25 °C)**
  - 24 x hybcell Bakteriální DNA xB Rev.2

(24 x samostatně balené hybcells Bacteria DNA xB)

  - 24x víko
  - 1x PPE aditivum (900 µl)

K identifikaci hub jsou zapotřebí následující specifické produkty (kromě obecných pufrů pro zařízení hyborg):

- *Souprava hybcell Fungi DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730060): skladujte při **pokojevé teplotě (8 až 25 °C)**
  - 24 x hybcell Fungi DNA xB Rev.2

(24 x samostatně balené hybcells Fungi DNA xB)

  - 24x víko
  - 1x PPE aditivum (900 µl)

K identifikaci bakterií, hub a markerových genů rezistence jsou zapotřebí následující specifické produkty (kromě obecných pufrů pro zařízení hyborg):

- *Souprava hybcell Pathogens DNA xB* (REF / UDI-DI 09120127730077): skladujte při **pokojevé teplotě (8 až 25 °C)**
  - 24 x hybcell Pathogens DNA xB Rev.2

(24 x samostatně balené hybcells Pathogens DNA xB)

  - 24x víko
  - 1x PPE aditivum (900 µl)

**Dávejte pozor, abyste nemíchali součásti různých šarží!**



## 5. Skladování a doba použitelnosti

### Produkty

Minimální trvanlivost produktů je zaručena pouze tehdy, pokud jsou během přepravy a skladování zajištěny požadované teplotní a vlhkostní podmínky. Datum použitelnosti produktů je uvedeno na etiketách produktů.

- *GINA 500, GINA 500 + DNA Purification, LINA, hybcells (Bacteria DNA xB / Fungi DNA xB / Pathogens DNA xB) a jejich PPE aditiva* jsou dodávány při pokojové teplotě a musí být skladovány při teplotě **8 až 25 °C**.
- *IPC, PCR-Box Bacteria, PCR-Box Resistance, PCR-Box Fungi a PCR-Box IPC* se dodávají zmrazené a musí se skladovat při teplotě **-15 až -25 °C**.

***Pokud je ochranný uzávěr hybcells nebo jakýkoli jiný obal (např. jakákoli zkumavka) poškozen / nebo uplynula minimální doba použitelnosti, nesmí se produkt/součást použít. hybcells se musí použít okamžitě po otevření ochranného uzávěru. Je třeba se vyhnout opakovaným cyklům zmrazování a rozmrazování (> 2x) PCR-boxů. Opakované rozmrazování a zmrazování ničí IPC a je třeba se jim vyhnout. IPC je třeba použít ihned po otevření zkumavky.***

### Vzorky

#### Krev

- Pro dosažení optimálních výsledků skladujte v chladu (mezi 4 °C a 8 °C) a v suchu po dobu maximálně 4 hodin. Skladování vzorků za těchto podmínek je přípustné maximálně po dobu 48 hodin.
- Nezmrazujte krev!

#### BAL

- Pro dosažení optimálních výsledků skladujte v chladu (mezi 4 °C a 8 °C) a v suchu po dobu maximálně 4 hodin. Skladování vzorků za těchto podmínek je přípustné maximálně po dobu 48 hodin.
- Vyhněte se zmrazení. Pokud je nutné vzorky zmrazit, uchovávejte je při teplotě mezi -15 °C a -25 °C.

#### Kultivace krve

- Uchovávejte v chladu (mezi 4 °C a 8 °C) a v suchu po dobu až 48 hodin.
- Skladujte ve zmrazeném stavu (při teplotě -15 °C až -25 °C).



## 6. Požadované vybavení

K provedení testu je zapotřebí následující vybavení:

| Požadované příslušenství / vybavení                           |                                                                                                                                                                                                                 | REF / UDI-DI   |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Minicentrifuga (0,2 ml rotor)                                 | Thermo <sup>1</sup> : MySpin                                                                                                                                                                                    |                |
| Mini Vortex Mixer                                             | Fisher Scientific <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                  |                |
| Mraznička (-20 °C)                                            |                                                                                                                                                                                                                 |                |
| Stůl pro DNA                                                  | <u>Starlab<sup>3</sup> (příklad):</u><br>Laminární stůl pro PCR s UV světlem<br><u>PEQLAB<sup>4</sup> (příklad):</u><br>Pracovní stanice PCR                                                                    |                |
| Pipety:<br>▪ 20 - 200 µl<br>▪ 100 - 1000 µl                   | <u>GILSON<sup>5</sup>:</u><br>PIPETMAN P200N<br>PIPETMAN P1000N                                                                                                                                                 |                |
| Standardní stolní centrifuga<br>(S rotorem pro 2 ml zkumavky) | <u>Eppendorf<sup>6</sup>:</u><br>Centrifuga 5430                                                                                                                                                                |                |
| Standardní termoblok                                          | <u>Coyote Bioscience<sup>7</sup></u><br>H2O3-H                                                                                                                                                                  |                |
| qPCR zařízení nebo termocyklovač                              | <u>Qiagen<sup>8</sup>:</u><br>Rotor-Gene<br><u>Biorad<sup>9</sup>:</u><br>CFX96<br><u>Thermo<sup>10</sup></u><br>Quantstudio 3 / 5<br><u>Analytik Jena<sup>11</sup>:</u><br>Termocyklovač T-Personal (Biometra) |                |
| Systémová kapalina                                            | <u>Cube Dx:</u><br><u>1l, vystačí na 8 týdnů</u>                                                                                                                                                                | 09120127730022 |
| PE pufr                                                       | <u>Cube Dx:</u><br><u>1l, dostatečný pro 96 hybcell</u>                                                                                                                                                         | 09120127730138 |
| Hyborg                                                        | Cube Dx:<br>hyborg Dx RED2                                                                                                                                                                                      | 09120127730015 |

Požadované příslušenství.

- 1 [www.thermofisher.com/order/catalog/product/75004081](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/75004081)
- 2 [www.fishersci.com/shop/products/variable-speed-mini-vortex-mix/14955163](http://www.fishersci.com/shop/products/variable-speed-mini-vortex-mix/14955163)
- 3 [www.starlab.de](http://www.starlab.de)
- 4 [www.peqlab.de](http://www.peqlab.de)
- 5 [www.gilson.com](http://www.gilson.com)
- 6 [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)
- 7 [www.coyotebio.com](http://www.coyotebio.com)
- 8 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- 9 [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
- 10 [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)
- 11 [www.biometra.com](http://www.biometra.com)



## 7. Proces testování

**! Před zahájením procesu testování. Přesvědčte se, že je přístroj hyborg připraven k provozu!**

- Zkontrolujte, zda je přístroj hyborg zapnutý (zkontrolujte obrazovku přístroje – další podrobnosti naleznete v příručce k přístroji hyborg Dx).
- Zkontrolujte, zda je přístroj hyborg vybaven dostatečným množstvím systémové kapaliny a pufru PE. Pokud ne, tyto kapaliny doplňte.
- V případě potřeby vyprázdněte odpadní nádobu (poloha W).
- Zkontrolujte, zda je k dispozici potřebný protokol (pokud ne, nahraďte protokol, další podrobnosti naleznete v příručce k přístroji hyborg Dx).

**Všimněte si, že některé kroky postupu vyžadují přípravu vybavení nebo činidel. Protože mohou být tyto úkony spojeny s čekací dobou, přečtěte si před zahájením celou kapitolu o postupu.**

**Při zpracování vzorků je nutné nosit laboratorní plášť, latexové rukavice, chrániče rukávů, síťku na vlasy (a vousy) a chirurgickou masku, aby se zabránilo kontaminaci testovacích činidel. Obohacení patogenu (viz kroky 2.-8. níže, červeně) musí být provedeno se stolem pro DNA.**

V následujících částech je popsán pracovní postup spočívající v následujících 3 krocích;

1. Příprava vzorků: s GINA/LINA
2. Detekce: PCR/qPCR
3. Identifikace: kompaktní sekvenování

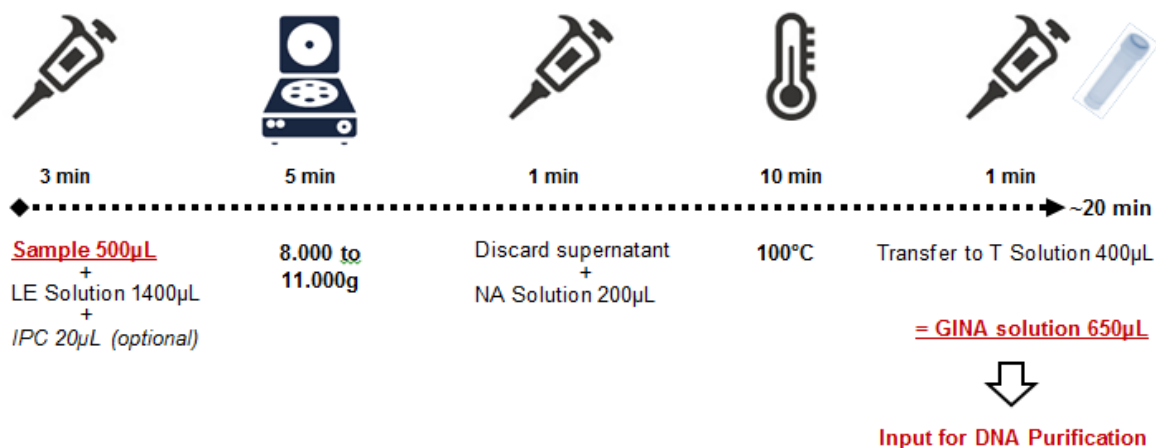


# 1 Příprava vzorku: GINA/LINA

## IPC + GINA: Proces obohacení (a purifikace)

Vzorky plné krve lze odebírat do zkumavek K3E K3EDTA nebo K2E K2EDTA.

Proces začíná s nativním vzorkem plné krve s EDTA. Před použitím vzorek vortexujte! Pokud používáte IPC, napipetujte nejprve 500 µl vzorku krve do IPC.



1. Přesvědčte se, že jsou vybavení a všechny součásti soupravy připraveny k použití. Při otevírání lahvíček krátce odstředěte potřebné zkumavky s roztokem LE, IPC nebo EPC, abyste zabránili přenosu kapalin, které by mohly být přítomny ve šroubovacích uzávěrech. Zapněte termoblok na 100 °C.
2. Připravte roztok LE a vzorek. Zkumavkou s roztokem LE (žlutý uzávěr) netřepejte ani nemíchejte, aby nedošlo k tvorbě pěny! Přeneste 500 µl (nebo méně) krve s EDTA (nebo jiných naředěných vzorků) do roztoku LE (žlutý uzávěr) a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
3. Volitelně: Napipetujte 500 µl vzorku krve do IPC (a/nebo EPC, pokud je použit) a poté směs napipetujte do pufru LE.
4. Zkumavku uzavřete, označte a po dobu 5 sekund intenzivně protřepejte nebo zkumavky několikrát převraťte. Inkubujte ~2 minuty při pokojové teplotě (18 °C až 25 °C).
5. Centrifugujte 5 minut při 9 000 až 11 000 g (nejlépe při 11 000 g). Pokud je to možné, použijte plynulé zvyšování rychlosti centrifugace.
6. Supernatant opatrně odeberte **dekantací** a do zkumavky se žlutým uzávěrem přidejte 200 µl roztoku NA (červený uzávěr). Uzávěr pevně utáhněte.
  - Poznámka: Po dekantaci může na peletu zůstat trochu kapaliny (~50 µl). **Vzorky plné krve by se měly v tomto okamžiku zbarvit do zelená.**
7. Po dobu 5 sekund intenzivně vortexujte. Ujistěte se, že jsou zkumavky stále pevně uzavřeny.
8. Inkubujte při teplotě 100 °C po dobu 10 minut (+/- 1 minuta) pomocí termobloku.
9. Do zkumavky se žlutým uzávěrem přidejte 400 µl roztoku T (zelený uzávěr) k neutralizaci.
  - Poznámka: **Vzorky plné krve by se měly změnit ze zelenavé na tmavě červenou.**



10. Purifikujte DNA pomocí běžných produktů pro extrakci DNA (v případě *GINA 500 + DNA purification*: Součástí sady jsou činidla Machery Nagel Nucleo Spin. V opačném případě postupujte podle pokynů výrobce a přeskočte kroky 11-17).
11. Pro každý vzorek umístěte jednu *kolonu* do *odběrové zkumavky* a *odběrovou zkumavku* označte ID vzorku. Přeneste celý roztok *GINA* (600 až 650 µl) do kolony. Zkumavku se žlutým uzávěrem zlikvidujte.
12. Centrifugujte 1 minutu mezi 9 000 a 11 000 g. Vyjměte *kolonu*, dekantujte proudící kapalinu a znovu vložte *kolonu*.
13. Přidejte 500 µl *promývacího pufru BW* a centrifugujte 1 minutu při 9 000 až 11 000 g. Vyjměte *kolonu*, dekantujte proudící kapalinu a znovu vložte *kolonu*.
14. Přidejte 600 µl *promývacího pufru B5* a centrifugujte 1 minutu při 9 000 až 11 000 g. Vyjměte *kolonu*, dekantujte proudící kapalinu a znovu vložte *kolonu*.
15. Centrifugujte 1 minutu při 9 000 až 11 000 g, abyste vysušili křemíkovou membránu. Zkontrolujte, zda na dně *kolony* nezůstává trochu tekutiny. Pokud ano, opakujte tento krok.
16. Umístěte *kolonu* do *eluční zkumavky* a označte ji ID vzorku. Přidejte 100 až 150 µl *elučního pufru BE*. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Centrifugujte 1 minutu při 9 000 g až 11 000 g. Zkontrolujte eluční objem. Pokud se zdá, že je objem příliš malý, zopakujte centrifugování. *Kolonu* vyhodte.
17. Otevřete *eluční zkumavku* a inkubujte ji 3 minuty při teplotě 100 °C v termobloku.
18. Odebraná kapalina obsahující DNA (eluát) může být použita pro aplikace založené na PCR nebo uložena při -20 °C pro pozdější zpracování. Před použitím eluátu *eluční zkumavku* silně vortexujte.

## LINA: Modulační proces

**Postup se zahajuje buď (pozitivní) kultivací krve, nebo odběrem vzorku BAL.**

**Všimněte si, že některé kroky postupu vyžadují přípravu vybavení nebo činidel. Protože mohou být tyto úkony spojeny s čekací dobou, přečtěte si před zahájením celou kapitolu o postupu.**

**Při zpracování vzorků je nutné nosit laboratorní plášť, latexové rukavice, chrániče rukávů, síťku na vlasy (a vousy) a chirurgickou masku, aby se zabránilo kontaminaci testovacích činidel.**

1. Přesvědčte se, že jsou vybavení a všechny součásti soupravy připraveny k použití.
2. Volitelně: Do zkumavky LINA napipetujte 20 µl IPC (jedna reakce).
3. Pipetujte vzorek do zkumavky LINA:
  - (Pozitivní) kultivace krve: 2 µl
  - BAL: 20 µl

Poznámka:

*Různá pracoviště mají různé metody odběru vzorků BAL. Proto může být nutné upravit množství použitého BAL. Příliš vysoké objemy BAL však mohou vést k inhibici. Proto se doporučuje používat IPC k indikaci inhibice.*

4. Zkumavku uzavřete a silně protřepejte nebo vortexujte.



## 2 Detekce: PCR/qPCR

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

*Upozorňujeme, že některé kroky testu vyžadují přípravu vybavení nebo rozmrazení činidel. Vzhledem k tomu, že jsou tyto úkony spojeny s čekací dobou, přečtěte si před zahájením celou kapitolu o postupu testu.*

*Při přípravě a zpracování testu je nutné nosit laboratorní plášť, latexové rukavice, chrániče rukávů, síťku na vlasy (a vousy) a chirurgickou masku, aby se zabránilo kontaminaci testovacích činidel. Příprava PCR (viz krok 2. níže, červeně) musí být provedena se stolem pro DNA.*

*Postup testu začíná roztokem, který je výsledkem obohacení patogenu GINA a purifikace DNA nebo modulačního pufru LINA (např. při pozitivní kultivaci krve).*

1. Přesvědčte se, že jsou vybavení a všechny součásti soupravy připraveny k použití.

2. (q)PCR reakce:

- Naprogramujte zařízení qPCR nebo PCR termocyklovač a uložte program jako „Patho\_1“:

|   |                                                         |
|---|---------------------------------------------------------|
| 1 | 95 °C po dobu 2:00                                      |
| 2 | 95 °C po dobu 0:10                                      |
| 3 | 56 °C po dobu 0:10                                      |
| 5 | 72 °C po dobu 0:30                                      |
|   | <b>+čtečka mikrodestiček</b>                            |
|   | <b>PŘEJÍT NA 2, 44krát</b>                              |
| 6 | 75 °C po dobu 1:00                                      |
| 7 | Křivka tání 75 °C až 95 °C v krocích po 0,3 °C pro 0:10 |
|   | <b>+čtečka mikrodestiček</b>                            |
| 8 | 25 °C pro udržení                                       |

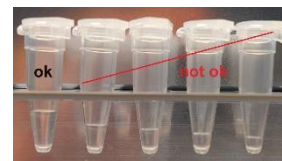
Fluorofofor / kanál: SYBR Green

Poznámka:

*Termocyklovače se mohou lišit svými tepelnými vlastnostmi, proto lze doporučit optimalizaci teplot uvedenou v protokolu (pouze u validovaných zařízení), pokud jsou výsledky nežádoucí.*



- Rozbalte a rozmrazte jednotlivé 0,2 ml zkumavky s potřebnými směsmi master mix Bacteria (červená tečka), master mixes Resistance (žlutá tečka), master mixes Fungi (zelená tečka) a master mix IPC (modrá tečka). Homogenizujte (vortexujte) a krátce roztok v každé zkumavce odstředíte.
- Zkontrolujte, zda je objem PCR směsi přibližně 20 µl (viz obrázek, levá zkumavka je naplněna 20 µl). Nepoužívejte nesprávně naplněné PCR směsi.
- Přidejte 20 µl roztoku DNA vzorku (nebo 20 µl vody bez DNA jako NTC) do PCR master mixu.
- Uzavřete zkumavky pro PCR (pokud nepoužíváte rotující termocyklovač, homogenizujte a odstředíte kapalinu před zahájením PCR).
- Spustíte program (q)PCR „Patho\_1“ (naprogramovaný předem).



***Amplifikovaná DNA se buď ihned použije pro kompaktní sekvenční reakci, nebo se může skladovat při teplotě 4 °C až 8 °C přes noc, případně se může na delší dobu uchovávat zmrazená při teplotě -15 °C až -25 °C.***



### 3 Identifikace: kompaktní sekvenování

1. Přesvědčte se, že je přístroj hyborg připraven k provozu.
2. Otevřete obal hybcell (roztrhněte těsnění v místě zářezu) a vložte hybcell do stojanu (pozice A-H).
3. Zkombinujte až 3 požadované amplikony ze stejného vzorku – například 30 µl *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Fungi* a *PCR-Box Resistance* – do jedné ze zkumavek s amplikony (např. *PCR-Box Bacteria*). Poté do zkumavky se směsí amplikonů napipetujte 30 µl PPE aditiva (najdete v boxu hybcell).

#### **Pozor!**

**Zavedení pouze 1 nebo 2 PCR amplikonů do hybcell vede k nejlepšímu výkonu, pokud jde o signál pozadí. Do hybcell lze zavést až 3 amplikony PCR. Zavedením všech 4 amplikonů se zvyšuje riziko zvýšeného signálu pozadí a může to vést ke snížení specifity a senzitivity testu.**

**Nezapomeňte, že platnost interní kontroly procesů (IPC) lze odvodit již z amplifikačních křivek PCR (viz výsledky v kapitole 9)**

#### **Různé příklady kombinací amplikonů vhodných pro načítání hybcell**

| Výsledky PCR |       |            |      | Přenesené amplikony<br>do hybcell |
|--------------|-------|------------|------|-----------------------------------|
| Bakterie     | Houby | Rezistence | IPC  |                                   |
| poz.         | poz.  | poz.       | poz. | Bakterie + houby + rezistence     |
| poz.         | poz.  | neg.       | poz. | Bakterie + houby                  |
| poz.         | neg.  | poz.       | poz. | Bakterie + rezistence             |
| neg.         | poz.  | neg.       | poz. | Houby + IPC                       |

4. Pipetujte nahoru a dolů, aby se všechny složky ve zkumavce promíchaly (**v aditivu je přítomen indikátor pH; barva roztoku se proto může po zavedení amplikonů změnit**). To nemá vliv na výkon produktu). Vyhněte se bublinám!
5. Celý objem ze zkumavky (maximálně ~ 120 µl) napipetujte najednou do hybcell (centrálním kanálem). Konečný objem závisí na přítomnosti vhodných amplikonů po qPCR nebo na použitých produktech PCR.

**Použijte 200 µl pipetu s vhodnými filtračními špičkami! Při zavádění směsi amplikonů neucpávejte centrální kanál hybcell (přívod vzorku) špičkou pipety! Špičku zasuňte do centrálního kanálu hybcell pouze tak hluboko, jak je potřeba, a dbejte na to, aby byl volný.**

6. Přikryjte hybcell dodaným krytem.





- Po zadání vzorku a ID hybcell spusťte zpracování vzorků (další podrobnosti naleznete v příručce hyborg Dx RED2). Vložte zařízení s připraveným stojanem.

***Vložte správně stojan (čárové kódy/štítky hybcell musí směřovat dovnitř zařízení)! Dbejte na to, aby byly všechny hybcells ve správné poloze.***



## 8. Výsledky

### PCR analýza

Výsledky PCR rozhodují o tom, zda je vzorek pozitivní nebo negativní na bakteriální, houbovou DNA, IPC DNA nebo geny rezistence. Pozitivní výsledek PCR nasměruje uživatele k dalšímu kroku, kterým je identifikace patogenu pomocí hybcell. Negativní výsledek znamená, že není přítomna DNA patogenu ani gen rezistence, a proto není třeba provést identifikaci pomocí hybcell.

Aby bylo možné určit, zda je výsledek pozitivní nebo negativní, je třeba analyzovat amplifikační křivku i křivku tání. Všechny PCR směsi používají stejné fluorescenční barvivo *SYBR Green*.

#### Pozor!

**Uvědomte si, že každé nastavení PCR se svými vlastnostmi mírně liší a že hodnoty Ct a vrcholy křivky tání se liší od místa k místu. Níže uvedené parametry jsou proto doporučením založeným na zkušenostech, kde nastavit prahové hodnoty pro hodnotu Ct a teplotu tání. Aby byl výsledek PCR pozitivní, musí být splněna obě kritéria.**

**Každá laboratoř musí tato doporučení ověřit a v případě potřeby upravit na své vlastní mezní hodnoty. Konečný pozitivní výsledek se stanoví pomocí testu hybcell. Zvažte tedy, zda do svých testů hybcell zahrnout všechny vzorky, u kterých by mohla existovat sebemenší pochybnost, že je PCR negativní. Zejména při nastavování testu v laboratoři a v počáteční fázi jeho používání buďte velkorysejší při zařazování vzorků do testování s hybcell.**

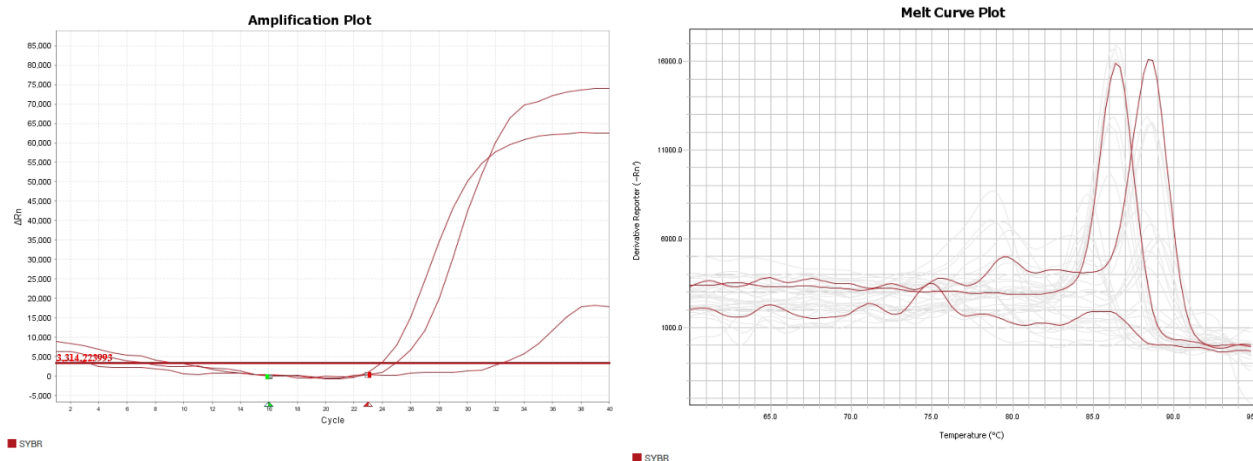
|                   | Hodnota Ct | Teplota tání |
|-------------------|------------|--------------|
| <b>Bakterie</b>   | < 34       | 80°C až 90°C |
| <b>Houby</b>      | < 40       | 80°C až 94°C |
| <b>Rezistence</b> | < 34       | 80°C až 90°C |
| <b>IPC</b>        | < 34       | 86°C ± 1°C   |

Všimněte si, že teplota tání závisí na druhu nebo genu rezistence, který je amplifikován, a proto se liší pro panbakteriální, panhoubovou a multiplexní PCR genů rezistence.

Níže je uveden příklad vzorku krve s příměsí *Candida albicans* v rámci externí kontroly procesu (EPC) a interní kontroly procesu (IPC).

|                 | Hodnota Ct | Teplota tání | Odvozený výsledek |
|-----------------|------------|--------------|-------------------|
| <b>Bakterie</b> | 32,8       | 74,92 °C     | <b>Negativní</b>  |
| <b>Houby</b>    | 25         | 88,54 °C     | <b>Pozitivní</b>  |
| <b>IPC</b>      | 24         | 86,51 °C     | <b>Pozitivní</b>  |





### Některé příčiny rozdílů v hodnotách Ct a teplotách tání:

- Mezní hodnotu pro výpočet hodnoty Ct nastavuje uživatel
- Různá zařízení PCR nabízejí různý software s různými vlastnostmi. Například automatické měřítka, nastavení mezních hodnot atd., které ovlivňují hodnoty Ct a vizuální prezentaci křivek.
- PCR-Box Resistances obsahuje několik primerů (genů rezistence). Proto je pravděpodobnější, že dojde ke vzniku dimerů primerů, jako je tomu u jednoplexní PCR pro bakterie nebo houby.
- Bakteriální nebo houbové kontaminace získané během odběru vzorku nebo procesu testu snižují hodnotu Ct. Možné příčiny kontaminace jsou popsány v našem stručném návodu „Pathogens xB\_brief instructions Contamination Prevention Guide\_24\_10\_2023“. Zde získáte informace o odběru vzorků, jejich zpracování, potřebných ochranných pomůckách, dezinfekci povrchů atd.
- Koncentrace solí a další podmínky eluátů se mohou lišit v důsledku rozdílů ve složení vzorků a použití různých produktů pro odběr vzorků.
- V neposlední řadě může hodnotu Ct (a ještě více teplotu tání) ovlivnit samotný amplifikovaný mikroorganismus.



## Interní kontrola procesu (IPC)

Interní kontrola procesu (IPC) potvrzuje platnost negativních výsledků. Jedná se o pozitivní kontrolu procesu, která umožňuje uživateli rozlišit mezi negativními výsledky a neplatnými výsledky – výsledky, které byly s největší pravděpodobností narušeny chybami v procesu.

Platnost IPC se potvrdí buď výsledkem PCR (při použití přístrojů Realtime PCR, viz výše), nebo testem hybcell (viz níže).

IPC a test je platný, pokud jsou splněna níže uvedená kritéria pro IPC-PCR. V takovém případě není přidání amplikonu do testu hybcell nutné (viz výše, omezení PCR amplikonů).

|     | Hodnota Ct | Teplota tání |
|-----|------------|--------------|
| IPC | < 34       | 86°C ± 1°C   |

### Pozor!

**Interní kontrola procesu (IPC) je určena k potvrzení negativních výsledků. V případě pozitivní amplifikace PCR směsi pro bakterie nebo PCR směsi pro houby lze výsledky amplifikace pro IPC ignorovat a je třeba provést test hybcell. Obdobně lze výsledek IPC ignorovat v případě identifikace bakterií nebo hub s hybcell, pokud je výsledek testu IPC „NOT DETECTED“ (nedetekováno) tam, kde se očekává „DETECTED“ (detekováno).**

## hybcell Control

testy hybcell zahrnují několik interních kontrol, které zajišťují správné výsledky. Pokud všechny interní kontroly proběhly úspěšně, je výsledek pro „Controls“ (kontroly) označen jako „PASSED“ (zdařila se) (a jako takový se zobrazí ve zprávě). Pokud jedna nebo více kontrol selže, jsou kontroly ve zprávě označeny jako „FAILED“ (nezdařila se). Pokud některá kontrola selže, jsou výsledky neplatné a test je třeba opakovat.

- **Kontrola procesu:** Kontroluje zpracování hybcell.
- **Vnější kontrola:** Kontroluje typ hybcell, dostatečnou fluorescenci a proces skenování.
- **Kontrola intenzity nespecifických signálů pozadí:** Kontroluje nespecifické požadavky a základní funkce softwaru hyborg.

## Kontrola PCR směsí

Jakmile se uživatel rozhodne použít všechny nebo jen vybrané PCR směsi, je použití PCR směsí indikováno sondami na povrchu hybcell. Pokud je směs PCR přidána, je výsledek ve zprávě pro tuto směs „ADDED“ (přidáno); v opačném případě je „MISSING“ (chybí).

- **Bacteria PCR mix:** Zkontroluje, zda byl použit *PCR-Box Bacteria*.
- **Fungi PCR mix:** Zkontroluje, zda byl použit *PCR box Fungi*.

## Specifické kontroly testů

Testy obsahují kontrolu specifickou pro daný test. Pokud je kontrola úspěšná, výsledkem je „PASSED“ (zdařila se). V opačném případě je výsledkem „FAILED“ (nezdařilo se). I v případě neúspěchu je test analyzován a jsou předloženy výsledky. Tyto kontroly pomáhají posoudit věrohodnost výsledků.

- **Kontrola specificity:** Kontroluje, zda proces kompaktního sekvencování nevykazuje závažné nedostatky.



### ▪ Interní kontrola procesu (IPC)

Interní kontrola procesu je kontrola specifická pro daný test, která se zkoumá při každém testu hybcell. Pouze v případě, že je do hybcell přidán (pozitivní) PCR amplikon IPC a odpovídající sondy v hybcell dosáhnou mezní hodnoty signálu, je výsledek „DETECTED“ (detekováno). V opačném případě – pokud není přidán žádný pozitivní amplikon nebo není překročena mezní hodnota signálu – je výsledkem „NOT DETECTED“ (nedetekováno).

### Obecné názvosloví

- **Bacteria species** jsou pozitivní, pokud byla amplifikována 16S rDNA daného druhu a došlo k odpovídajícímu prodloužení primeru (např. *Staphylococcus aureus*).
- **Bacteria genus** je pozitivní, pokud byl amplifikován druh 16S rDNA a pokud vzor prodloužení primeru odpovídá rodu (např. *Staphylococcus*), ale ne nutně konkrétnímu druhu testovaného panelu.
- **Bacteria pan** je pozitivní, pokud je přítomna amplifikovaná bakteriální DNA.
- **Fungal species** je pozitivní, pokud byla amplifikována 28S rDNA druhu a došlo k odpovídajícímu prodloužení primeru (např. *Candida albicans*).
- **Rod hub** je pozitivní, pokud byl amplifikován druh 28S rDNA a pokud vzor prodloužení primeru odpovídá rodu (např. *Candida*), ale ne nutně konkrétnímu druhu testovaného panelu.
- **Fungi pan** je pozitivní, pokud je přítomna amplifikovaná houbová 28S rDNA.



## Zprávy hyborg

CubeDx GmbH  
Westbahnstr. 55  
4300 St. Valentin  
Austria



**Sample #** 633248 BR  
**Date** 06.10.2023 21:42  
**Remark**  
**Liquids**

**Test** hybcell Pathogen DNA xB (7)   
**Profile** -  
**hybcell** 2509A510038

| Controls         |         |  |
|------------------|---------|--|
| Controls         | PASSED  |  |
| Bacteria PCR Mix | ADDED   |  |
| Fungi PCR Mix    | MISSING |  |

| Parameters               | Result   | Representation |
|--------------------------|----------|----------------|
| Specificity Control      | PASSED   |                |
| Internal Process Control | DETECTED |                |
| <b>BACTERIA</b>          |          |                |
| Bacteria Pan             | Positive | 50  100000     |
| Gram pos                 | Positive | 50  100000     |
| Staphylococcus sp.       | Positive | 50  100000     |
| Staphylococcus aureus    | Positive | 50  100000     |
| <b>RESISTANCES</b>       |          |                |
| Methicillin              | Positive | 50  100000     |
| Methicillin Type A       | Positive | 50  100000     |

## Negative Parameters

Abiotrophia defectiva, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus complex, Actinobacillus pleuropneumoniae, Anaerococcus sp., Aspergillus clavatus, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Aspergillus terreus, Bacteroides fragilis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Borrelia sp., Burkholderia cepacia complex, Burkholderia pseudomallei, Campylobacter sp., Candida albicans, Candida auris, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida sp., Candida tropicalis, Carbapenemases, Citrobacter freundii complex, Citrobacter koseri, Cladosporium, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium sp., Corynebacterium ulcerans, Cryptococcus gattii, Cryptococcus neoformans, CTX-m1/m3, Enterobacter cloacae, Enterobacter cloacae complex, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Extended Spectrum beta Lactamases, Finegoldia magna, Fungi Pan, Fusarium oxysporum species complex, Fusarium solani species complex, Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium sp., Gram neg, Granulicatella adiacens, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, IMP, Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, KPC, Legionella pneumophila, Listeria sp., Methicillin Type C, Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, NDM, Neisseria meningitidis, OXA-48, Pasteurella multocida, Pichia kudriavzevii, Pneumocystis jirovecii, Pneumocystis murina, Prevotella buccae, Prevotella intermedia, Propionibacterium acnes, Propionibacterium sp., Proteus mirabilis, Proteus sp., Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas non-aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces sp., Salmonella enterica, Scedosporium, Serratia marcescens, Staphylococcus non-aureus, Stenotrophomonas maltophilia group, Streptococcus agalactiae, Streptococcus anginosus group, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus gordonii, Streptococcus mitis group, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius group, Streptococcus sp., Vancomycin, Vancomycin Type A, Vancomycin Type B, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis complex

**Příklad zprávy PDF pro vzorek pozitivní na bakterie a jeho příslušnou rezistenci.**



CubeDx GmbH  
Westbahnstr. 55  
4300 St. Valentin  
Austria



|                 |                  |                |                             |
|-----------------|------------------|----------------|-----------------------------|
| <b>Sample #</b> | 65181 F          | <b>Test</b>    | hybcell Pathogen DNA xB (7) |
| <b>Date</b>     | 06.10.2023 21:39 | <b>Profile</b> | -                           |
| <b>Remark</b>   |                  | <b>hybcell</b> | 2509A510038                 |
| <b>Liquids</b>  |                  |                |                             |

| Controls         |        |  |
|------------------|--------|--|
| Controls         | PASSED |  |
| Bacteria PCR Mix | ADDED  |  |
| Fungi PCR Mix    | ADDED  |  |

| Parameters               | Result   | Representation |
|--------------------------|----------|----------------|
| Specificity Control      | PASSED   |                |
| Internal Process Control | DETECTED |                |
| <b>BACTERIA</b>          |          |                |
| Negative                 |          |                |
| <b>RESISTANCES</b>       |          |                |
| Negative                 |          |                |
| <b>FUNGI</b>             |          |                |
| Fungi Pan                | Positive | 50  100000     |
| Pichia kudriavzevii      | Positive | 50  100000     |

### Negative Parameters

Abiotrophia defectiva, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus complex, Actinobacillus pleuropneumoniae, Anaerococcus sp., Aspergillus clavatus, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Aspergillus terreus, Bacteria Pan, Bacteroides fragilis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Borrelia sp., Brucella sp., Burkholderia cepacia complex, Burkholderia pseudomallei, Campylobacter sp., Candida albicans, Candida auris, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida sp., Candida tropicalis, Carbapenemases, Citrobacter freundii complex, Citrobacter koseri, Cladosporium, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium sp., Corynebacterium ulcerans, Cryptococcus gattii, Cryptococcus neoformans, CTX-m1/m3, Enterobacter cloacae, Enterobacter cloacae complex, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Extended Spectrum beta Lactamases, Finegoldia magna, Fusarium oxysporum species complex, Fusarium solani species complex, Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium sp., Gram neg., Gram pos., Granulicatella adiacens, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, IMP, Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, KPC, Legionella pneumophila, Listeria sp., Methicillin, Methicillin Type A, Methicillin Type C, Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, NDM, Neisseria meningitidis, OXA-48, Pasteurella multocida, Pneumocystis jirovecii, Pneumocystis murina, Prevotella intermedia, Propionibacterium acnes, Propionibacterium sp., Proteus mirabilis, Proteus sp., Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas non-aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces sp., Salmonella enterica, Scodosporium, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Staphylococcus non-aureus, Staphylococcus sp., Stenotrophomonas maltophilia group, Streptococcus agalactiae, Streptococcus anginosus group, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus gordonii, Streptococcus mitis group, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius group, Streptococcus sp., Vancomycin, Vancomycin Type A, Vancomycin Type B, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis complex

**Příklad zprávy PDF pro vzorek pozitivní na houby.**

## Protokol (.hyb)

Kalibrační křivky a rozpoznávání vzorů byly provedeny pro všechny mikroorganismy a geny (identifikovaná bakteriální 16S rDNA / identifikovaná houbová 28S rDNA / identifikovaná DNA markerů rezistence) a jsou součástí protokolu hyborg (soubor XML s příponou .hyb). Kalibrace je nezávislá na zařízení hyborg (použití jednotky).



Předpokladem však je, že hyborg pracuje v určených podmínkách prostředí (např. podání kapaliny, ohřev, výkon laseru atd.).

Před prvním použitím nové šarže se do softwaru hyborg importují specifické protokoly. Aktuální protokoly jsou k dispozici na domovské stránce Cube Dx (<https://www.cubedx.com/support/protocols>) nebo u místního distributora. Protokoly mohou být aktualizovány také automaticky.

## Parametry mimo profil

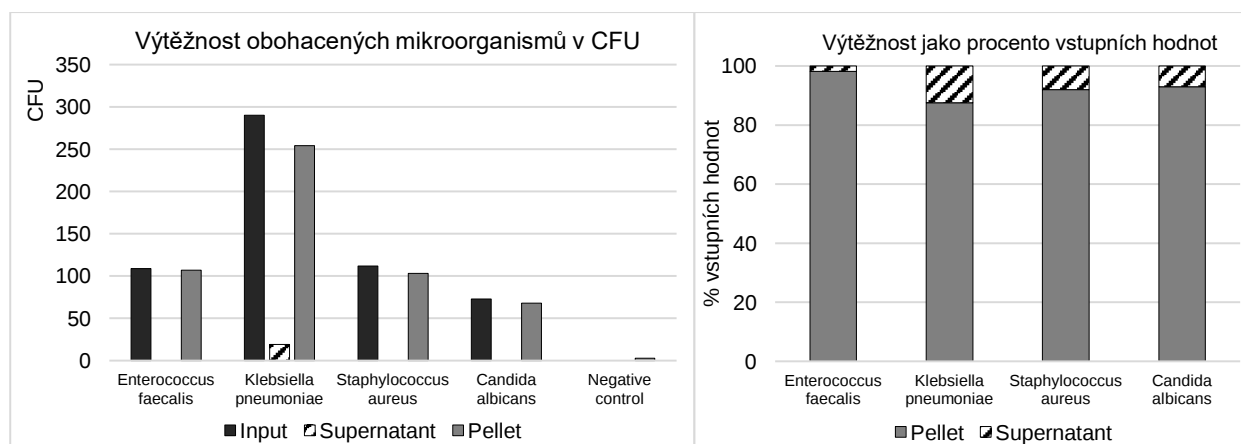
Podle zamýšleného účelu jsou uvedeny klinicky relevantní výsledky. Protokol pro šarži (stanovený pro testovací soupravy CE-IVD) definuje klinicky relevantní bakterie, markery genů rezistence a houby. Výsledky mimo tento rozsah jsou označeny jako „mimoprofilové parametry“. Tyto výsledky mohou být interpretovány specialisty na infekční choroby.



## 9. Analytická výkonnost

### IPC, GINA 500, GINA 500 + purifikace DNA

**Výtěžnost patogenů:** Živé mikroorganismy (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*) byly vpraveny do vzorků plné krve EDTA zdravých probandů. Tyto vzorky byly homogenizovány (vortexovány). Jako negativní kontrola bylo použito prázdné růstové médium. Byl proveden první krok protokolu *GINA 500* (roztok LE + centrifugace). Vzniklé pelety byly resuspendovány ve 100 µl plné krve EDTA a rozetřeny na LB agar. Po centrifugování bylo 100 µl supernatantu rovněž rozpuštěno, aby se stanovil počet živých mikroorganismů, které nebyly vázány v peletu (= úbytek). Kolonie byly spočítány a zdokumentovány po 24 až 48 hodinách inkubace.



Výtěžnost se pohybuje mezi 88 % (*Klebsiella pneumoniae*) a 98 % (*Enterococcus faecalis*).

### Bakterie

**Mez detekce (LOD)** byla stanovena zředěním kultur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* a jejich zpracováním pomocí produktu a protokolu *GINA 500 + DNA purification*. Pro stanovení odpovídajících CFU byly alikvoty roztoků naneseny na plata a kolonie byly spočítány po 24/48 hodinách inkubace.

Pro všechny tři cíle byla LOD stanovena v rozmezí 10 až 20 CFU/ml.

**Selektivita** byla testována s referenčními vzorky DNA z ATCC (American Type Culture Collection) a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

|                                    |                |                                      |          |
|------------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------|
| <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> kompl. | 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> kompl. | 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       |

Pro každý experiment byla smíchána a testována DNA dvou různých druhů.

Každá testovaná bakteriální DNA vykazovala ve zprávě hybcell **očekávaný výsledek**.

**Nebly pozorovány žádné nespecifické výsledky ani zkřížené reakce.**

**Opakovatelnost** byla stanovena několikanásobným amplifikováním různých ředění DNA *Staphylococcus aureus*.

- **PCR-Box Bacteria**, vypočtené CV při průměrné hodnotě Cq 23,4: CV = 1,3 %.

## Houby

**Mez detekce** (LOD) byla stanovena zředěním kultur *Candida albicans* a jejich zpracováním pomocí produktu a protokolu *GINA 500 + DNA purification*. Pro stanovení odpovídajících CFU byly alikvoty roztoků nanášeny na plata a kolonie byly spočítány po 24/48 hodinách inkubace.

**LOD je ~ 2 CFU / ml.**

**Selektivita** byla testována především s referenčními vzorky DNA z ATCC (American Type Culture Collection) a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen):

|                                 |                  |                             |               |
|---------------------------------|------------------|-----------------------------|---------------|
| <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> | Molzym P1        |                             |               |

Pro každý experiment byla smíchána a testována DNA jednoho druhu bakterií a jednoho druhu hub.

Každá testovaná houbová DNA vykazovala ve zprávě hybcell **očekávaný výsledek**.

Byly zjištěny následující nespecifické výsledky:

Testování ***Aspergillus clavatus*** ukázal pozitivní výsledky pro *Aspergillus clavatus* + *Aspergillus fumigatus*.

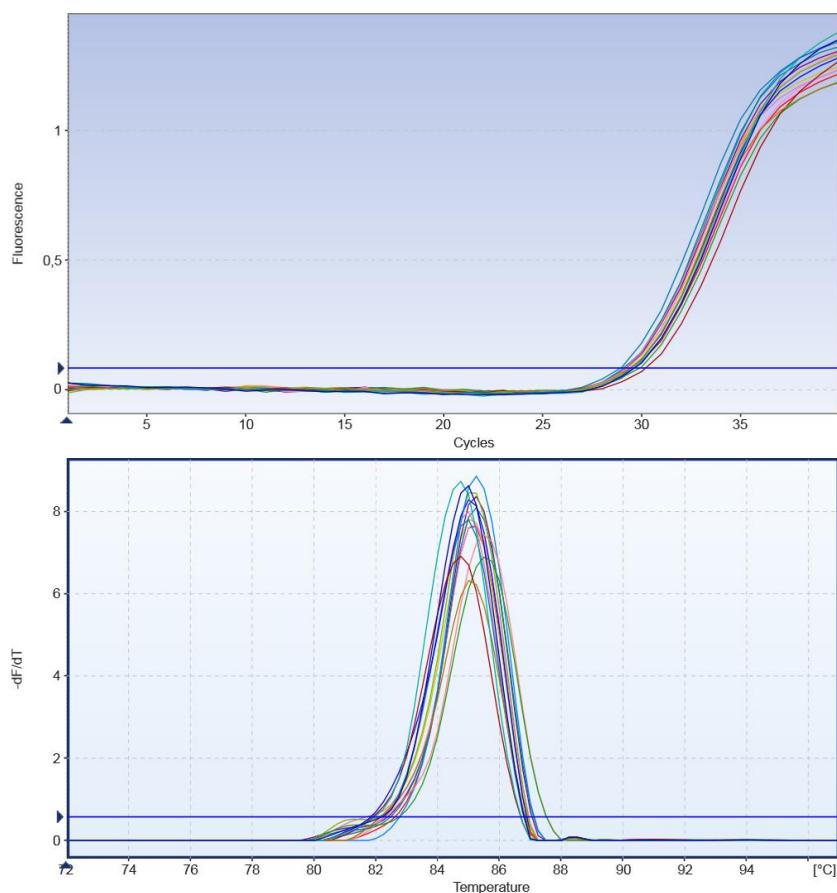
**Opakovatelnost** byla stanovena několikanásobným amplifikováním různých ředění DNA *Candida albicans*.

- **PCR-Box Fungi**, vypočtené CV při průměrné hodnotě Cq 35,4: CV = 2,4 %.

## IPC

**Opakovatelnost** byla testována na 16 různých vzorcích plné krve EDTA: Byla přidána IPC (20 µl) a vzorky byly zpracovány podle protokolu *GINA 500* (včetně purifikace DNA). Byla provedena IPC-PCR (viz grafy níže) a výsledky byly ověřeny pomocí *hybcell Pathogens DNA xB* a sekvenováním (Sanger) produktů PCR.





Výsledkem analýzy kvantifikačních cyklů (Cq) jsou (všechny hodnoty zaokrouhleny):

Průměr: Cq 29,6  
 Směrodatná odchylka: +/- 0,3  
 Variační koeficient (CV): 1,1 %

**Mezní hodnota pro Cq IPC** je nastavena na **30 +/- 2** (28 až 32). Tato mezní hodnota se může u různých PCR strojů mírně lišit.



## 10. Klinická výkonnost

### GINA – plná krev

Hodnocení výkonnosti prezentované během ECCMID 2021 (01833 SMARTDIAGNOS – next-generation molecular sepsis diagnosis):

#### Výsledky / závěry

Celkem 352 vzorků bylo testováno pomocí *GINA a kompaktního sekvenování* a porovnáno s kultivací krve s identifikací MALDI-TOF nebo klinickým hodnocením. Senzitivita byla 74 % a specifita 98 %. 96 % vzorků bylo správně klasifikováno pomocí systému *GINA a kompaktního sekvenování*. Systém dobře detekuje patogeny přímo v krvi a pokrývá nejméně 80-85 % mikroorganismů způsobujících závažné infekce v Evropě. Systém se snadno používá a doba odezvy pro jeden vzorek je 3-4 hodiny.

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

### LINA - (pozitivní) kultivace krve

Hodnocení výkonnosti prezentované během ECCMID 2020 (Abstract 6917 – Molecular pathogen identification and resistance gene detection from positive blood culture):

#### Výsledky / závěr

Celkem 277 vzorků bylo testováno pomocí *LINA a kompaktního sekvenování* a porovnáno s kultivací krve s identifikací MALDI-TOF nebo klinickým hodnocením. Výsledky pozitivních vzorků BC s *kompaktním sekvenováním LINA* byly získány během 2-3 hodin. *LINA* detekovala téměř všechny pozitivní krevní kultury shodně se současnými zavedenými metodami, což vedlo k 98% citlivosti. Kromě toho bylo identifikováno několik smíšených infekcí a pomalu rostoucích bakterií, které byly přehlédnuty kultivací a identifikací MALDI-TOF, včetně druhů *Acinetobacter*, které jsou velmi významnými nositeli genů rezistence vůči antibiotikům.



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

## LINA – BAL

Hodnocení výkonnosti provedené ve spolupráci s německou univerzitní nemocnicí (nepublikováno):

### Výsledky / závěr

Vzorky BAL od 79 pacientů (Ústav lékařské mikrobiologie, Univerzitní nemocnice Essen / Německo) byly analyzovány pomocí nejmodernější metody kultivace krve systémem Unyvero a *technologií LINA a kompaktního sekvenování* společnosti Cube Dx. Za „spolehlivé“ byly považovány výsledky shody alespoň dvou referenčních metod. Jeden vzorek byl z další analýzy vyloučen, protože referenční metody nedokázaly stanovit konzistentní výsledek. Celkový počet vzorků byl proto snížen na 78. U 31 vzorků byl výsledek správně klasifikován jako pozitivní, u 32 vzorků byl výsledek správně klasifikován jako negativní. Z 9 falešně pozitivních výsledků jich 5 prokázalo *Haemophilus influenzae*. Ze 6 falešně negativních výsledků 3 neindikovaly *Staphylococcus aureus*.

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



## 11. Změny v analytické výkonnosti a likvidace

### Změny v analytické výkonnosti

Pro ověření funkčnosti testu a implementace se doporučuje týdenní zkouška s referenčním standardem (např. externí kontroly procesu Cube Dx (EPC)). Test funkčnosti je povinný každý měsíc.

Chcete-li ověřit funkčnost EPC, proveďte několik testů a zkontrolujte výsledek. Pokud výsledek neodpovídá očekávání, použijte EPC z jiné šarže a testy opakujte.

Kromě toho jednou za měsíc spusťte kontrolní hybcell pro kontrolu základní funkčnosti hyborg Dx RED2. Tyto funkce zahrnují přenos kapaliny, optiku a skenování, ovládání teploty a manipulaci s hybcell.

Pokud máte pochybnosti o analytické výkonnosti, proveďte několik dalších testů s kontrolním materiálem (= dobře popsany materiál, například EPC Cube Dx), abyste potvrdili analytickou výkonnost.

V případě změny analytické výkonnosti se podívejte do části *Odstraňování problémů* (níže) této příručky.

V případě, že se nedostatky nepodaří vyřešit, obraťte se na společnost Cube Dx nebo na příslušné distribuční partnery.

### Likvidace

Veškerý materiál na jedno použití (zkumavky PCR, hybcell, pipetové špičky atd.) lze likvidovat bez zvláštních postupů. Je třeba dodržovat obvyklá bezpečnostní opatření pro potenciálně infekční materiál.

Nádoby na vzorky pacientů (např. zkumavky EDTA) a zkumavky s LE roztokem (sada GINA 500, žlutý uzávěr) mohou obsahovat infekční materiál a musí být zlikvidovány v souladu s pravidly vaší organizace pro likvidaci infekčního materiálu.



## 12. Řešení problémů

### Příprava vzorku

| Problém       | Možné příčiny                                                                           | Opatření / Bezpečnostní opatření                                                                                                                        |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Úbytek pelety | <ul style="list-style-type: none"> <li>Odpipetováno</li> </ul>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Začněte dekantací supernatantu a poté odpipetujte zbývající roztok</li> <li>Opakujte krok extrakce</li> </ul>    |
| Kontaminace   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kontaminace v průběhu přípravy vzorku</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Používejte doporučenou bezpečnostní výbavu</li> <li>Povrchy čistěte 1% chlornanem a následně 80% EtOH</li> </ul> |

### Detekce pomocí PCR

| Problém                       | Možné příčiny                                                                                                                                                                      | Opatření / Bezpečnostní opatření                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Neobvyklé amplifikační křivky | <ul style="list-style-type: none"> <li>Rozetření eluátu ve zkumavce PCR</li> <li>Nerovnoměrné rozložení roztoku směsi vzorku PCR</li> <li>Bublinky na dně zkumavky PCR</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Před vložením zkumavek PCR do zařízení je odstředíte</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                 |
| Inhibice PCR                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ředění PCR směsi</li> <li>Používání příliš velkých objemů vzorků, zejména u vzorků BAL</li> <li>Zbytky etanolu přítomné v eluátu</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Použijte doporučené množství eluátu pro reakci PCR</li> <li>Použijte ředicí řadu, pokud si nejste jisti, jaký objem BAL je vhodný</li> <li>Před elucí zkontrolujte, zda na koloně nejsou zbytky EtOH, a po eluci dodržujte 3minutový krok zahřívání podle protokolu.</li> </ul> |



## Identifikace pomocí hybcell

| Problém                      | Možné příčiny                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Opatření / Bezpečnostní opatření                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nespecifické signály hybcell | <ul style="list-style-type: none"> <li>nezpracované hybcells (obsahující amplikony) se nezpracovávají příliš dlouho (1-2 dny)</li> <li>expirace otevřených pufrů</li> <li>násilné zavedení špičky pipety do hybcell</li> <li>Kapaliny jsou prázdné nebo je manipulace s kapalinou v přístroji chybná.</li> <li>Nedostatečný proces mytí.</li> <li>Použití prošlých/znehodnocených hybcell</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Amplikony přeneste do hybcell, pouze pokud je lze okamžitě zpracovat; POKUD NE, uložte je podle pokynů v příručce.</li> <li>Kontrola životnosti pufrů po otevření lahví</li> <li>Opatrně zaveďte špičku pipety do hybcell, aniž byste ucpali její centrální kanál</li> <li>Zkontrolujte stav naplnění všech kapalin. V případě potřeby doplňte kapaliny.</li> </ul> |
| Mřížka                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Použití nesprávného prostředku hybcell</li> <li>Použití „chybného“ protokolu.</li> <li>Použití prošlých/znehodnocených produktů (např. kvůli poškozenému obalu apod.)</li> <li>Chyba softwaru.</li> <li>Chyba zařízení.</li> </ul>                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Zkontrolujte typ hybcell a použitý protokol.</li> <li>Zkontrolujte data použitelnosti produktů.</li> <li>Zkontrolujte funkčnost hyborgu pomocí <i>hybcell Control xC</i>. Test zopakujte.</li> </ul>                                                                                                                                                                |
| Kontrola specifity           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Používání prošlých produktů.</li> <li>Nedostatečné množství / žádný produkt PCR napipetovaný do hybcell.</li> <li>Neplatný PCR.</li> <li>Nepoužívá se žádný nebo nedostatečný PE pufr.</li> </ul>                                                                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Zkontrolujte funkčnost hyborg.</li> <li>Test zopakujte.</li> <li>Zkontrolujte stav naplnění všech kapalin. V případě potřeby doplňte kapaliny.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                           |

## Řešení problémů



V případě problémů se zařízením nebo testem se obraťte na:



Cube Dx GmbH  
Westbahnstraße 55, 4300 St. Valentin, Rakousko  
Kontaktní informace: [www.cubedx.com](http://www.cubedx.com)

Další informace o používání zařízení a softwaru naleznete v příručce hyborg Dx RED2.

## **Závažné příhody / vigilance**

Závažné události související s používáním přístroje neprodleně nahlase společnosti Cube Dx nebo příslušným distribučním partnerům a příslušnému národnímu úřadu. Věnujte prosím pozornost vnitrostátním právním předpisům o hlášení závažných událostí!

