

Allplex™

Candidiasis Assay

(kat. č. SD9803X, SD10178Z)

Multiplexní PCR test v reálném čase pro detekci *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida glabrata* (CG), *Candida dubliniensis* (CD), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CTp) a *Candida lusitanae* (CL) z moči, genitálního stěru a cytologických vzorků na bázi tekutin.

Pro použití s

1. CFX96™ Detekční systém PCR v reálném čase (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)
2. Systém CFX96™ Dx (software CFX Manager™ Dx v3.1)



Pouze pro diagnostiku *in vitro*



SD9803X100



SD10178Z25



Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548



Medical technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert,

Německo

Není k dispozici v USA

OBSAH

OZNÁMENÍ	3
ÚČEL POUŽITÍ	5
PŘEHLED ZÁSAD A POSTUPŮ.....	5
ZÁKLADNÍ INFORMACE	7
REAGENCIE	8
SKLADOVÁNÍ A MANIPULACE	10
POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY	10
PROTOKOL	11
NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO PCR V REÁLNÉM ČASE A ANALÝZA VÝSLEDKŮ	21
VÝSLEDKY	41
ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	44
VÝKONNOST	46
ODKAZY	51
KLÍČ K SYMBOLŮM	52
INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ	54

OZNÁMENÍ

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Spolehlivost výsledků závisí na vhodném postupu odběru, skladování, přepravy a zpracování vzorků.
- **Tento produkt je určen pouze pro použití s Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet a Seegene STARlet 96MPH maximálně 5 samostatných běhů.**
- AIOS kombinuje Seegene STARlet prodáváný společností Seegene se zařízením pro PCR v reálném čase (CFX96 Dx, výrobce: Bio-Rad) a zařízením pro uzavírání destiček (výrobce: SAMICK THK) a vytváří tak automatizovanou strukturu propojení extrakce nukleových kyselin s PCR.
- **Tento test byl validován pro následující typy vzorků: moč, genitální stěr a cytologické vzorky na bázi tekutin.** Tento test nebyl validován pro žádné jiné typy vzorků.
- **Vzorky DNA skladujte při teplotě ≤ -20 °C až do použití a během použití je uchovávejte na ledu.**
- Citlivost testu se může snížit, pokud jsou vzorky opakovaně zmrazovány/rozmrazovány nebo skladovány po delší dobu.
- Pracovní postup v laboratoři by měl probíhat jednosměrně.
- V každém prostoru vždy používejte jednorázové rukavice a před vstupem do různých oblastí si je vyměňte. V případě kontaminace rukavice okamžitě vyměňte nebo je ošetřete dekontaminačním činidlem DNA.
- Vyhradte zásoby a vybavení pro oddělené pracovní prostory a nepřemísťujte je z jednoho prostoru do druhého.
- Nepipetujte ústy.
- V laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a činidly používejte jednorázové nepudrované rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Po manipulaci se vzorky a testovacími reagensii si důkladně umyjte ruce.
- Při odebrání alikvotů ze zkumavek s reagensii zabraňte jejich kontaminaci. Doporučuje se používat sterilní jednorázové pipetovací špičky odolné proti aerosolu.
- Nespojíte reagensie různých šarží nebo z různých zkumavek stejné šarže.
- Nepoužívejte přípravek po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte opakovaně materiál na jedno použití.
- Používejte zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zabraňte případnému rozstříku nebo křížové kontaminaci vzorků během přípravy.

- Dávejte pozor, abyste nekontaminovali reagenty s extrahovanými nukleovými kyselinami, produkty PCR a pozitivní kontrolou. Aby se zabránilo kontaminaci reagentů, doporučuje se používat filtrační špičky.
- Pro každý experiment používejte oddělené pracovní prostory.
- Abyste zabránili kontaminaci pracovních oblastí amplifikovanými produkty, otevírejte zkumavky nebo proužky s PCR reakcí po amplifikaci pouze na určených pracovních místech.
- Pozitivní materiály skladujte odděleně od reagentů soupravy.
- Při manipulaci se vzorky je třeba dodržovat laboratorní bezpečnostní postupy (viz Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories & CLSI Documents). Důkladně vyčistěte a dezinfikujte všechny pracovní plochy 0,5% chlornanem sodným (v deionizované nebo destilované vodě). Součásti produktu (zbytky produktu, obaly) lze považovat za laboratorní odpad. Nepoužité reagenty a odpad likvidujte v souladu s platnými státními a místními předpisy.
- Doba použitelnosti je 12 měsíců od data výroby při teplotě $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Informace o expiraci naleznete na štítku.
- Seegene NIMBUS a Seegene STARlet jsou stejná zařízení jako Microlab NIMBUS IVD a Microlab STARlet IVD, i když výrobce je jiný. Vzhledem k tomu, že na zařízení nedošlo k žádným hardwarovým změnám, jsou výsledky testů stejné.
- Obchodní název "CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD" se mění na "CFX96™ Dx system". Vzhledem k tomu, že u systémů nedošlo k žádným hardwarovým změnám, budou výsledky z obou systémů stejné.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" je aktualizovaná verze softwaru "CFX Manager™ Software-IVD v1.6". Aktualizovaný software obsahuje vylepšení nabídky "Spustit". Tato vylepšení nemají vliv na výsledky analýzy dat; výsledky tedy budou stejné.
- Tato souprava je určena jako pomůcka při diferenciální diagnostice infekcí cílovými patogeny; *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. glabrata* (CG), *C. dubliniensis* (CD), *C. parapsilosis* (CP), *C. tropicalis* (CTp) a *C. lusitaniae* (CL).

ÚČEL POUŽITÍ

Allplex™ Candidiasis Assay je kvalitativní *in vitro* test pro jednorázovou nebo vícenásobnou detekci *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. glabrata* (CG), *C. dubliniensis* (CD), *C. parapsilosis* (CP), *C. tropicalis* (CTp) a *C. lusitaniae* (CL) z moči, genitálního stěru a cytologických vzorků na bázi tekutin.

ZÁSADY A POSTUPY

1 Zásady

Allplex™ Candidiasis Assay využívá patentovanou technologii MuDT™ společnosti Seegene, která umožňuje poskytovat hodnoty multi-Ct (prahový cyklus) v jediném fluorescenčním kanálu bez analýzy křivky tání na přístroji PCR v reálném čase.

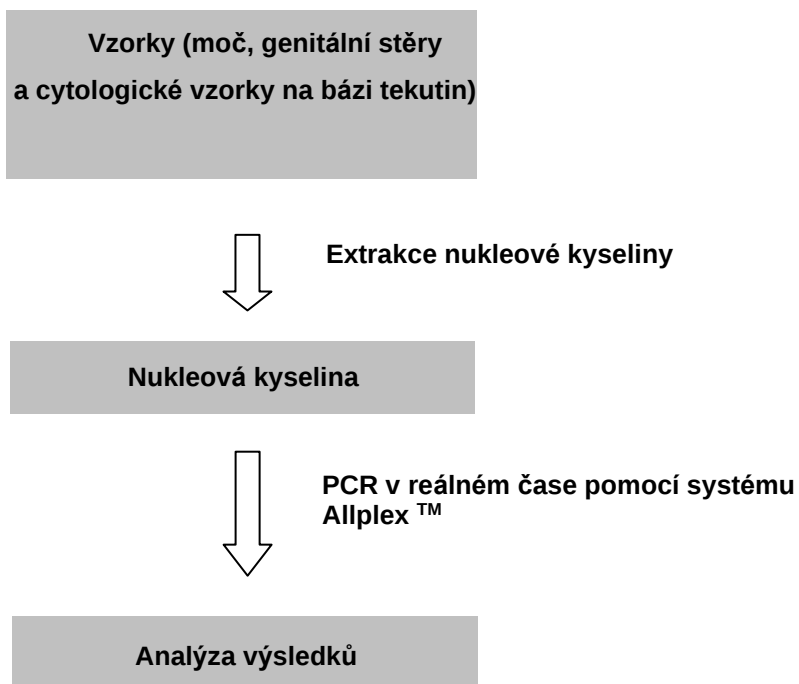
Allplex™ Candidiasis Assay je PCR test v reálném čase, který umožňuje současnou amplifikaci a detekci cílových nukleových kyselin *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. glabrata* (CG), *C. dubliniensis* (CD), *C. parapsilosis* (CP), *C. tropicalis* (CTp), *C. lusitaniae* (CL) a vnitřní kontroly (IC).

V testu Allplex™ Candidiasis Assay se endogenní lidský gen používá jako vnitřní kontrola (IC) pro monitorování celého procesu od odběru vzorku po extrakci nukleové kyseliny a také pro kontrolu případné inhibice PCR. Účinnost PCR mohou snižovat inhibitory, které mohou být přítomny v klinických vzorcích. Vzhledem k nekonzistenci množství lidských buněk obsažených v moči se však IC přidává exogenně pouze do vzorků moči a používá se jako exogenní kontrola celého procesu. IC se v klinickém vzorku koamplifikuje s cílovými nukleovými kyselinami.

Aby se zabránilo tomu, že amplifikační produkt bude působit jako potenciální kontaminant, používá se v testu Allplex™ Candidiasis Assay systém Uracil-DNA glykosylázy (UDG).

Přirozenou funkcí UDG je zabránit mutagenезi odstraněním uracilu z molekul DNA štěpením N-glykosylové vazby a spuštěním cesty oprav bází (BER). Proto se systémy UDG používají ke kontrole křížové kontaminace vzorků amplikony.

2. Postupy



ZÁKLADNÍ INFORMACE

Vulvovaginální kandidóza (VVC) je velmi časté onemocnění, které alespoň jednou za život postihne až 75 % žen. VVC nejčastěji způsobuje *Candida albicans*; objevují se však i další druhy *Candida*, jako jsou *glabrata*, *parapsilosis* a *tropicalis*.

Mezi typické příznaky VVC patří pruritus, bolestivost pochvy, dyspareunie, zevní dysurie a abnormální vaginální výtok. Žádný z těchto příznaků není pro VVC specifický. Odhaduje se, že 75 % žen bude mít alespoň jednu epizodu VVC a 40~45 % bude mít dvě nebo více epizod.

Recidivující vulvovaginální kandidóza (RVVC), obvykle definovaná jako čtyři nebo více epizod symptomatické VVC během jednoho roku, postihuje malé procento žen (<5 %). Patogeneze RVVC není dostatečně objasněna a většina žen s RVVC nemá žádné zjevné predisponující nebo základní onemocnění. *C. glabrata* a další nealbické druhy *Candida* se vyskytují u 10~20 % žen s RVVC.

VVC lze snadno a důsledně léčit standardními azolovými léky, např. klotrimazolem a flukonazolem. Některé kvasinky jiné než *Candida albicans* jsou však vůči těmto lékům rezistentní, a proto je správná identifikace nezbytným krokem při kontrole VVC. V těhotenství může být VVC prodloužená a spojená se závažnějšími příznaky a řešení příznaků obvykle vyžaduje delší léčbu. V těhotenství se doporučují pouze lokální azoly.

REAGENCIE

Reagencie obsažené v jedné sadě vystačí na 100 reakcí.

Informace k objednávce (**REF** SD9803X)

Test Allplex™ na kandidózu			
Symbol	Obsah	Objem	Popis
PRIMER	4X CA MOM	500 µl	MuDT Oligo Mix (MOM): - Amplifikační a detekční činidlo
PREMIX	EM1	500 µl	- DNA polymeráza - Uracil-DNA glykosyláza (UDG) - Pufr obsahující dNTP
CONTROL +	CA PC	50 µl	Pozitivní kontrola (PC) - Směs klonů patogenů
CONTROL IC	ASTI IC	1 000 µl	Interní kontrola (IC) vzorku moči
WATER	Voda bez RNázy	1 000 µl	Ultračistá kvalita, stupeň PCR
	Uživatelská příručka		

Příslušenství produktu - software pro analýzu
Seegene Viewer*

* Analytický software poskytuje společnost Seegene Inc. nebo místní obchodní zástupce.

Použijte prosím Seegene Viewer řady V3 a vyšší.

Reagencie obsažené v jedné sadě vystačí na 25 reakcí. Informace

k objednávce (**REF** SD10178Z)

Test Allplex™ na kandidózu			
Symbol	Obsah	Objem	Popis
PRIMER	4X CA MOM	125 µl	MuDT Oligo Mix (MOM): - Amplifikační a detekční činidlo
PREMIX	EM1	125 µl	- DNA polymeráza - Uracil-DNA glykosyláza (UDG) - Pufr obsahující dNTP
CONTROL +	CA PC	50 µl	Pozitivní kontrola (PC) - Směs klonů patogenů
CONTROL IC	ASTI IC	250 µl	Interní kontrola (IC) vzorku moči
WATER	Voda bez RNázy	1 000 µl	Ultračistá kvalita, PCR-grade
	Uživatelská příručka		

Příslušenství produktu - software pro analýzu
Seegene Viewer*

* Analytický software poskytuje společnost Seegene Inc. nebo místní obchodní zástupce.

Použijte prosím Seegene Viewer řady V3 a vyšší.

SKLADOVÁNÍ A MANIPULACE

Všechny komponenty testu Allplex™ Candidiasis Assay musí být skladovány při teplotě ≤ -20 °C. Všechny složky jsou za doporučených skladovacích podmínek stabilní až do data expirace uvedeného na etiketě. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování, protože to může snížit citlivost testu. Pokud se mají reagenty používat pouze občas, měly by se skladovat v alikvotech.

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

- Jednorázové bezpráškové rukavice (latexové nebo nitrilové)
- Pipety (nastavitelné) a sterilní pipetovací špičky
- 1,5 ml mikrokumavky pro odstředivky
- Výrobník ledu
- Stolní odstředivka
- Mini odstředivka na destičky
- Vírový mixér - vortex
- Detekční systém CFX96™ PCR v reálném čase (Bio-Rad)
- Systém CFX96™ Dx (Bio-Rad)
- Nízkoprofilové 8kumavkové proužky o objemu 0,2 ml bez uzávěru (bílá barva, kat. č. TLS0851, Bio-Rad)
- Optické ploché proužky s 8 kapslemi (kat. č. TCS0803, Bio-Rad)
- Pevné® 96jamkové PCR desky, nízký profil, tenká stěna, s lemem, bílá/bílá (kat. č. HSP9655, Bio-Rad)
- Pevné® 96jamkové PCR desky, nízký profil, tenká stěna, s lemem, bílá/bílá, s čárovým kódem (kat. č. HSP9955, Bio-Rad)
- AIOS (kat. č. SG72100, Seegene)
- Propichovací uzávěr (kat. č. 922119, SPL) (pouze pro použití v AIOS)
- Permanentní čirá tepelná pečeť (kat. č. 1814035, Bio-Rad) *
- PX1 PCR plate sealer – těsnění destiček (automatické utěsnění, kat. č. 181-4000, Bio-Rad) *
- Fyziologický roztok
- Čistá lavička

* Ujistěte se, že používáte kompatibilní tepelné těsnění a těsnění destiček.

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

Poznámka: Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními materiály. Povoleny jsou pouze ty vzorky, které jsou odebírány, přepravovány a skladovány za přísného dodržování následujících pravidel a pokynů.

Vzorek moči**Vzorek stěru z****pohlavních orgánů****Vzorek cytologie na bázi tekutiny**

Poznámka: Aby byla zajištěna vysoká kvalita vzorků, měly by být vzorky přepravovány co nejrychleji. Vzorky by měly být přepravovány při uvedených teplotách.

A.Odběr vzorků**Vzorek moči**

- Pacient by měl být poučen, že nesmí močit nejméně dvě hodiny před odběrem vzorku.
- Do čisté polypropylenové nádoby nasbírejte 10 ~ 30 ml moči z prvního odběru. Nádoby na vzorky uzavřete a označte. Přísně dodržujte pokyny uvedené pro skladování a přepravu.

Vzorek stěru z pohlavních orgánů

Pro odběr genitálních stěrů použijte následující materiály :

- Výtěry z pohlavních orgánů lze odebírat a přepravovat v 1 ~ 3 ml následujících médií :
 - ENAT PM 2ML REGULÁRNÍ APLIKÁTOR (Copan)
 - UTM se stěrkami (Copan)
 - Sada pro odběr vzorků ze stěrů (Qiagen Corporation)
- Ponechte tampon v transportním médiu. Uzavřete a označte nádobku na vzorek. Důsledně dodržujte pokyny uvedené pro skladování a přepravu.
- Při odběru buněk sloupcového a dlaždicového epitelu postupujte podle doporučeného protokolu po odstranění cervikálního hlenu.

Vzorek cytologie na bázi tekutiny

- Používejte tekutá cytologická média ThinPrep® od společnosti HOLOGIC® Inc. a SurePath™ od společnosti BD.
- Při odběru vzorků buněk děložního čípku do médií ThinPrep® a SurePath™ postupujte podle pokynů výrobce.

B. Skladování a přeprava vzorků

Skladování a přeprava			
	Teplota	Doba trvání*	
Vzorek moči	2~8°C	1 týden	- Výkonnost může být ovlivněna delším skladováním vzorků. - Při manipulaci se vzorky je nutné dodržovat místní a národní pokyny pro přepravu patogenního materiálu.
Vzorek stěru z pohlavních orgánů	2~8°C	1 týden	
Medium ThinPrep®	2~8°C	6 týdnů	
Medium SurePath™	2~8°C	2 týdny	

* Doba trvání: Doba od odběru vzorku do provedení testu, včetně skladování a přepravy vzorku před testem.

2. Extrakce nukleových kyselin

A. Předúprava vzorku

Poznámka: Proces předúpravy pro extrakci nukleových kyselin je stejný pro manuální i automatický extrakční systém.

Vzorky stěrů z pohlavních orgánů

- Vzorek stěru z genitálií se používá bez předchozího ošetření.

Vzorky moči

Volitelně: Předúpravu lze vynechat. Citlivost by však mohla být snížena ve srovnání s případem, kdy se provede předúprava.

- Nechte vzorky zahřát na pokojovou teplotu (19 ~ 25 °C).
- Odstřed'ujte 1 ml moči po dobu 15 minut při 15 000 x g (13 000 ot./min.).
- Zlikvidujte supernatant. Poté se peletu znovu rozpust'te v doporučeném objemu fyziologického roztoku (viz doporučený objem 2.C) a důkladně promíchejte.
- Postupujte podle protokolu výrobce.

Tekutý vzorek cervikální cytologie

- Nechte vzorky zahřát na pokojovou teplotu (19 ~ 25 °C).
- Odstřed'ujte 1 ml tekutého vzorku cervikální cytologie po dobu 15 minut při 15 000 x g (13 000 ot./min.).
- Zlikvidujte supernatant. Poté se peletu znovu rozpust'te v doporučeném objemu fyziologického roztoku (viz doporučený objem 2.C) a důkladně promíchejte.

Poznámka: Pokud jsou vzorky odebrány do média SurePath™ a budou extrahovány pomocí Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet nebo Seegene STARlet 96MPH, zpracujte předúpravu pomocí lyzačního pufru v extrakční sadě, nikoliv fyziologického roztoku.

Poznámka: SurePath™ nebyl validován se izolací na Ribo_spin vRD, SEEPREP32, NucliSENS® easyMAG®, Seegene STARlet 96MPH a Maelstrom™ 9600.

- Postupujte podle protokolu výrobce.

B. Vnitřní kontrola

Poznámka: U ostatních vzorků, kromě moči, se pro vnitřní kontrolu používá endogenní gen. Proto nevyžaduje další IC, který je součástí soupravy.

Poznámka: Součástí sady je integrovaný obvod ASTI. To umožňuje uživateli potvrdit nejen postup extrakce nukleových kyselin, ale také identifikovat případnou inhibici PCR.

- U vzorku moči je třeba před extrakcí nukleové kyseliny přidat ke každému vzorku 10 l ASTI IC.

C. Automatizovaný systém extrakce nukleových kyselin

Poznámka: Použijte doporučené objemy vzorku a eluce, jak je uvedeno níže. Ostatní údaje naleznete v protokolu výrobce.

C-1. Microlab NIMBUS IVD

Poznámka: Viz uživatelská příručka **Microlab NIMBUS IVD**.

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

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

C-2. Microlab STARlet IVD

Poznámka: Viz uživatelská příručka **Microlab STARlet IVD**

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

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

C-3. Seegene NIMBUS

Poznámka: Viz návod k obsluze **Seegene NIMBUS**.

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

C-4. Seegene STARlet

Poznámka: Viz návod k obsluze **Seegene STARlet**.

Automatizovaný extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
Univerzální kazeta STARMag 96 X 4 Sada	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl
STARMag™ S96H Kit*	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

*SurePath™ nebyly validovány pomocí sady STARMag™ S96H Kit.

* Sada STARMag™ S96H je navržena a validována pro použití s konfigurací Seegene STARlet s hlavicí sondy CO-RE 96 a Seegene STARlet 96 MPH.

Možnost: Automatická struktura propojení (viz návod k obsluze AIOS)

Automatizovaná struktura propojení	Výrobce	Kat. č.
AIOS	Seegene	SG72100

Poznámka: Vyměňte uzávěr pozitivní kontroly (PC) za propichovací uzávěr. Po dokončení operace vyměňte víčko pozitivní kontroly (PC) za původní víčko.

Poznámka: Propichovací uzávěr je výrobek na jedno použití a po jednom použití musí být zlikvidován.

Poznámka: Při použití s AIOS lze tento produkt použít maximálně pro 3 samostatné běhy.

C-5. Seegene STARlet 96MPH

Poznámka: Viz návod k obsluze **Seegene STARlet 96MPH**.

Automatizovaný extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Seegene STARlet 96MPH	Seegene	SG71101	-
Sada STARMag™ S96H*	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

Poznámka: SurePath™ nebyl validován s přístrojem Seegene STARlet 96MPH.

C-6. NucliSENS® easyMAG®

- Pokračujte v procesu extrakce pomocí "**obecného protokolu**".

Automatizovaný extrakční systém	Výrobce	REF	Doporučený objem
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Vzorek: Magnetický oxid křemičitý: 50 µl Eluce: 100 µl

* V případě vzorku moči resuspendujte pelety s 200 µl fyziologického roztoku a přidejte 10 µl ASTI IC.

Poznámka: SurePath™ nebyl ověřen s NucliSENS® easyMAG®.

C-7. SEEPREP32

- Pokračujte v extrakci pomocí "**Pro-Protocol A**".

Automatizovaný extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (destička Typ)	Seegene	EX00009P	Vzorek: 200 µl* Eluce: 100 µl
STARMag 96 ProPrep (zkumavka Typ)	Seegene	EX00009T	Vzorek: 200 µl* Eluce: 100 µl

*V případě vzorku moči resuspendujte pelety s 200 µl fyziologického roztoku a přidejte 10 µl ASTI IC.

Poznámka: Systém SurePath™ nebyl ověřen pomocí systému SEEPREP32.

C-8. Maelstrom™ 9600

- Pokračujte v extrakci pomocí '**STARMAGM96**'.

Automatizovaný extrakční systém	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
Maelstrom™ 9600	Tchaj-wan Advanced Nanotech Inc.	M9600	-
Sada STARMag™ M96	Seegene	EX00029P EX00030P	Vzorek: 200 µl * Eluce: 100 µl

* Přidejte 10 l ASTI IC(2) do vzorku anorektálního stěru a předem upraveného vzorku moči (tj. resuspenze pelet s 200 µl fyziologického roztoku).

Poznámka: Systém SurePath™ nebyl ověřen s produktem Maelstrom™ 9600.

D. Soupravy pro manuální extrakci nukleových kyselin

Poznámka: Použijte doporučené objemy vzorku a eluce, jak je uvedeno níže. Ostatní údaje naleznete v protokolu výrobce.

Extrakční sada	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
QIAamp® DSP DNA Mini Kit	QIAGEN	61304	Vzorek: 200 µl **** Eluce: 50 µl
QIAamp® DNA Mini Kit*	QIAGEN	51304	Vzorek: 200 µl **** Eluce: 50 µl
Ribo_spin vRD** (sada pro extrakci virové RNA/DNA)	GeneAll	302-150 SG1701***	Vzorek: 200 µl **** Eluce: 50 µl

* V případě médií SurePath™ zpracujte lyzační krok s použitím 180 l ATL pufru namísto AL pufru.

** Sada Ribo_spin vRD není kompatibilní s médii SurePath™.

*** Pokud si přejete zakoupit výše uvedené produkty společnosti Seegene Inc., použijte toto katalogové číslo.

**** V případě vzorku moči resuspendujte pelety s 190 µl fyziologického roztoku a přidejte 10 µl vody. L společnosti ASTI IC.

E. Souhrn

Metoda extrakce	Použité zařízení pro odběr vzorků
Microlab NIMBUS IVD/ STARlet IVD	ENAT, UTM, ThinPrep®, SurePath™, moč
Seegene NIMBUS / STARlet*	ENAT, UTM, ThinPrep®, SurePath™, moč
Seegene STARlet 96MPH	ENAT, UTM, ThinPrep®, moč
NucliSENS® easyMAG®	ENAT, UTM, ThinPrep®, moč
SEEPREP32	ENAT, UTM, ThinPrep®, moč
Maelstrom™ 9600	ENAT, UTM, ThinPrep®, moč
QIAamp® DNA Mini Kit QIAamp® DSP DNA Mini Kit	ENAT, UTM, Q-PAP1, ThinPrep®, SurePath™ ² , moč
Ribo_spin vRD (sada pro extrakci virové RNA/DNA)	ENAT, UTM, Q-PAP1, ThinPrep®, moč

1. Vzorkovač děložního hrdla Qiagen

2. V případě médií SurePath™ zpracujte lyzační krok s použitím 180 µl ATL pufru namísto AL pufru.

* Volitelně: AIOS lze použít se Seegene STARlet.

3. Příprava pro PCR v reálném čase

Poznámka: Je třeba použít správné zkumavky a uzávěry. (viz POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ).

Poznámka: Při přípravě reakcí PCR je třeba používat filtrační špičky odolné proti aerosolu a těsné rukavice. Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

Poznámka: Všechny reagenty zcela rozmrazte na ledu.

Poznámka: Odstředte zkumavky s reagenty, abyste odstranili kapky z vnitřní strany víčka.

Poznámka: Kroky A~C se automaticky zpracovávají na Microlab NIMBUS IVD a Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet a Seegene STARlet 96MPH. Viz návody k použití k jednotlivým přístrojům.

A. Připravte PCR Mastermix.

5 µl	4X CA MOM
5 µl	EM1
5 µl	Voda bez RNázy
15 µl	Celkový objem PCR Mastermixu

Poznámka: Vypočítejte potřebné množství každé reagenty na základě počtu reakcí (vzorky + kontroly).

B. Promíchejte pětkrát převrácením nebo rychlým vířením a odstředte.

C. Odeberte alikvot 15 µl PCR Mastermixu do zkumavek pro PCR.

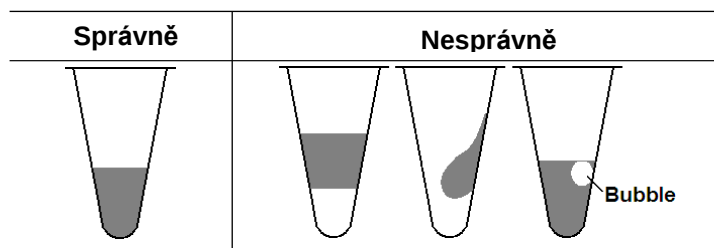
D. Přidejte 5 µl nukleových kyselin každého vzorku do zkumavky obsahující PCR Mastermix.

15 µl	PCR Mastermix
5 µl	Nukleová kyselina vzorku
20 µl	Celkový objem reakce

E. Uzavřete víčko a odstředte PCR zkumavky.

F. Zkontrolujte, zda je kapalina obsahující všechny složky PCR na dně všech PCR zkumavek. Pokud tomu tak není, odstředte znovu při vyšších otáčkách za minutu po delší dobu.

Poznámka: Před spuštěním PCR reakce je nutné zkumavky odstředit. Je třeba vytlačit kapalinu na dno a odstranit vzduchové bubliny.



Poznámka: Pro každý vzorek použijte novou sterilní pipetovací špičku.

Poznámka: Pro **negativní kontrolu (NC)** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 µl vody bez RNázy.

Poznámka: Pro **pozitivní kontrolu (PC)** použijte 5 µl CA PC.

Poznámka: **Dávejte** pozor, aby nedošlo ke křížové kontaminaci PCR Mastermixu a vzorků s pozitivní kontrolou.

Poznámka: Reakční zkumavky neoznačujte na víčku. Fluorescence se zjišťuje z horní části každé reakční zkumavky.

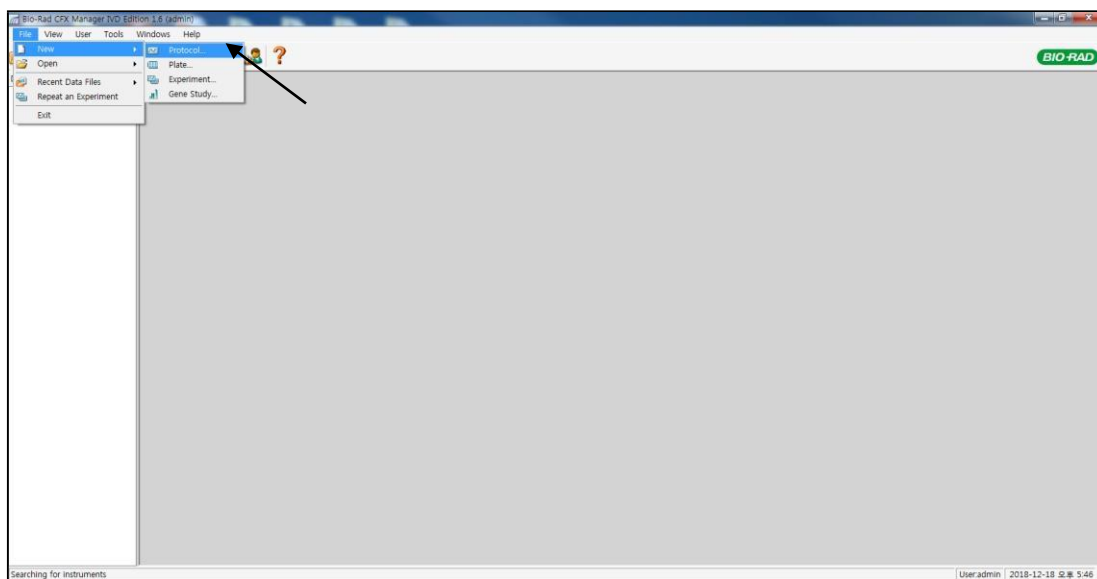
Poznámka: Při použití permanentního čírého tepelného těsnění místo víčka použijte těsnění PX1 PCR.

NASTAVENÍ PŘÍSTROJE PRO PCR V REÁLNÉM ČASE A ANALÝZA VÝSLEDKŮ**1. CFX96™ Detekční systém PCR v reálném čase (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)****1.1. Nastavení přístroje pro PCR v reálném čase**

Poznámka: Nastavení experimentu CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) lze rozdělit do tří kroků: Nastavení protokolu, Nastavení destičky a Spuštění zařízení.

A. Nastavení protokolu

- 1) Pro otevření **Editoru protokolu** zvolte v hlavní nabídce **File (Soubor)→ New (Nový)→ Protocol**.

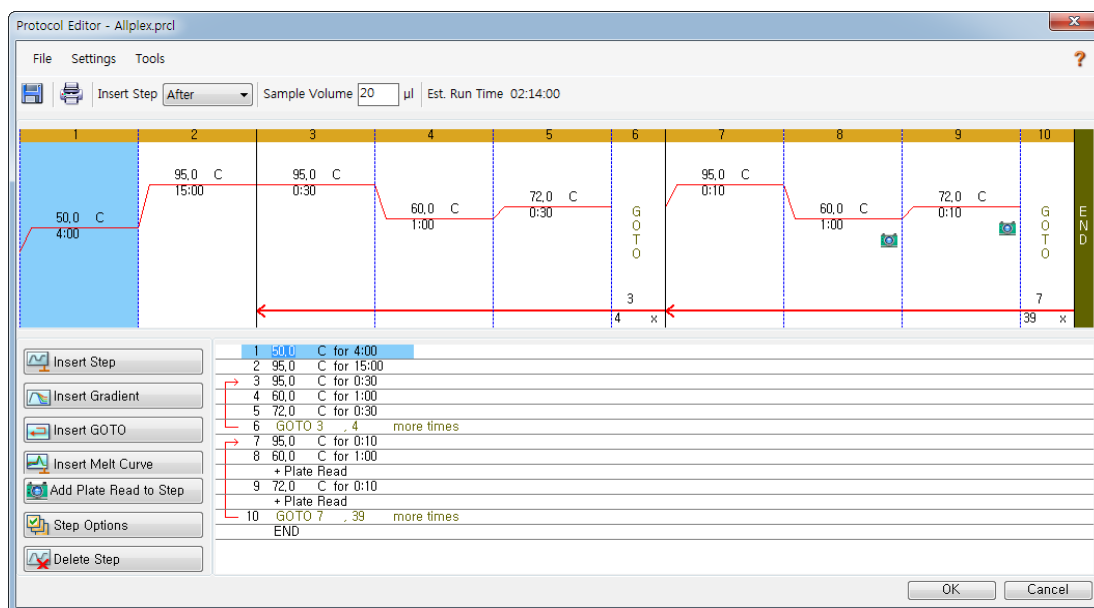


Obr. 1. Nastavení protokolu

2V **Editoru protokolu** definujte tepelný profil takto:

Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 s
4		60°C	1 min
5		72°C	30 s
6	40	Přejděte na krok 3, opakujte 4krát	
7		95°C	10 s
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 s
10		Přejděte na krok 7, opakujte 39krát	

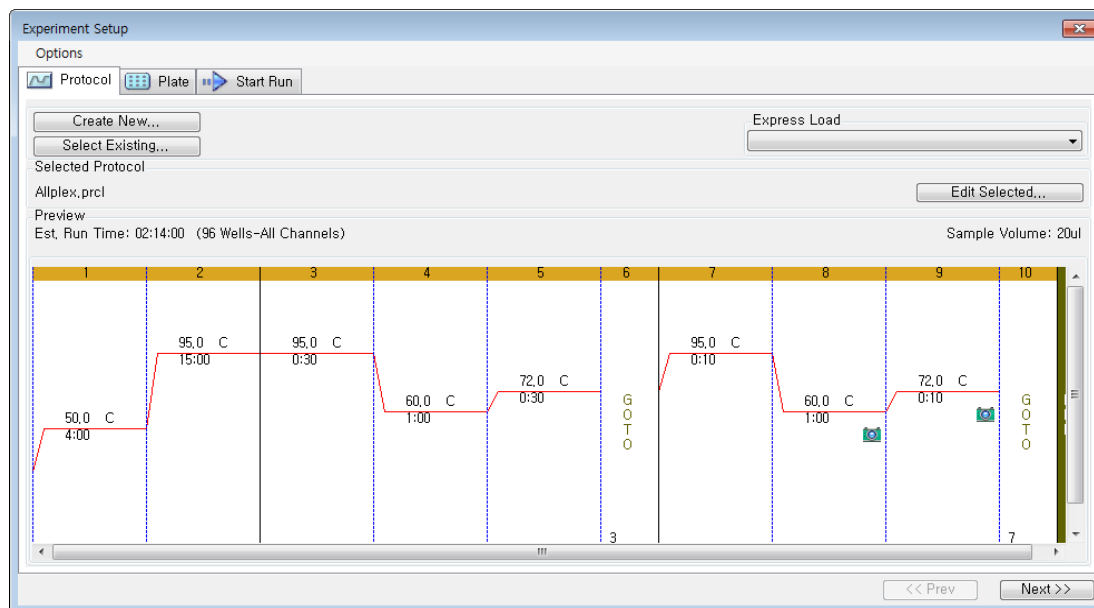
Poznámka*: V kroku 8 a 9 se odečte tabulka. Fluorescence se detekuje při 60 a 72 °C.



Obr. 2. Editor protokolu

3) Pro přímé zadání 20 µl klikněte na rámeček vedle **Sample Volume (Objem vzorku)**.

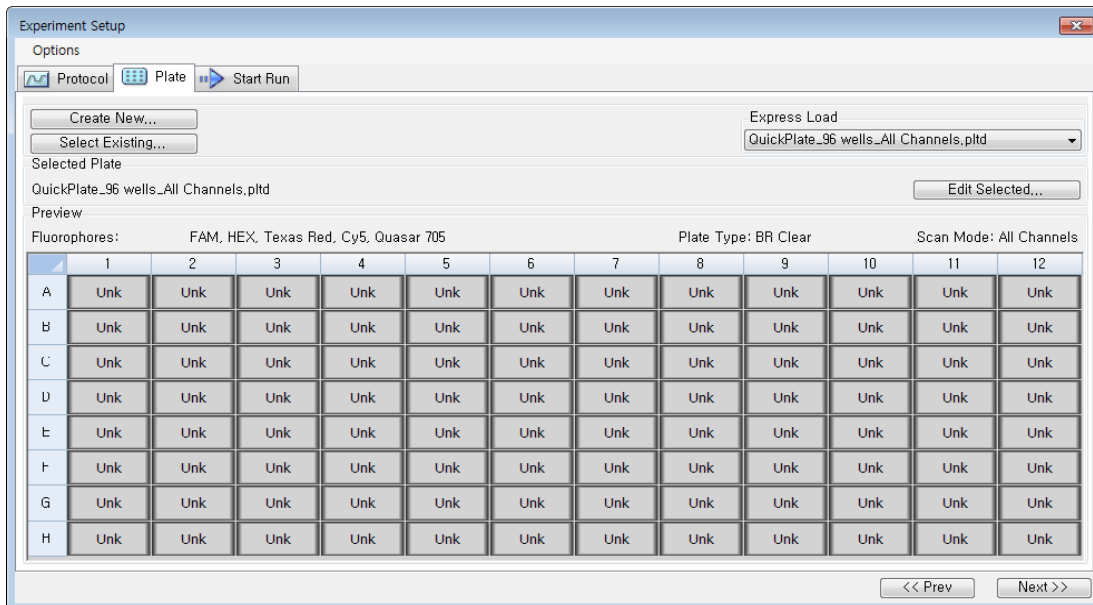
4) Klikněte na tlačítko **OK** a uložte protokol. Otevře se okno **Nastavení experimentu**.



Obr. 3. Nastavení experimentu:
Protokol

B. Nastavení destičky

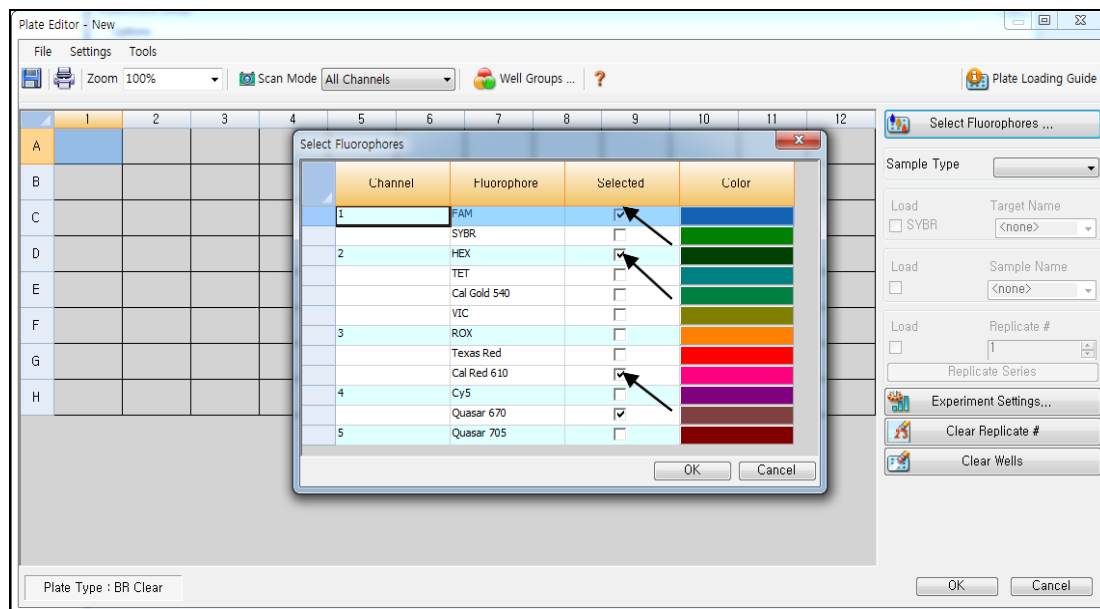
1) Pro otevření okna **Plate Editor (Editor destičky)** klikněte na **Create New (Vytvořit nový)** v nabídce **Plate (Destička)**, záložce **Experiment Setup (Nastavení experimentu)**.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

Obr. 4. Editor destičky

2) Klikněte na tlačítko **Select Fluorophores (Vybrat fluorofory)** určete fluorofory (**FAM, HEX, Cal Red 610, a Quasar 670**), které budou použity. Klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 5. Vybrané fluorofory (FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670)

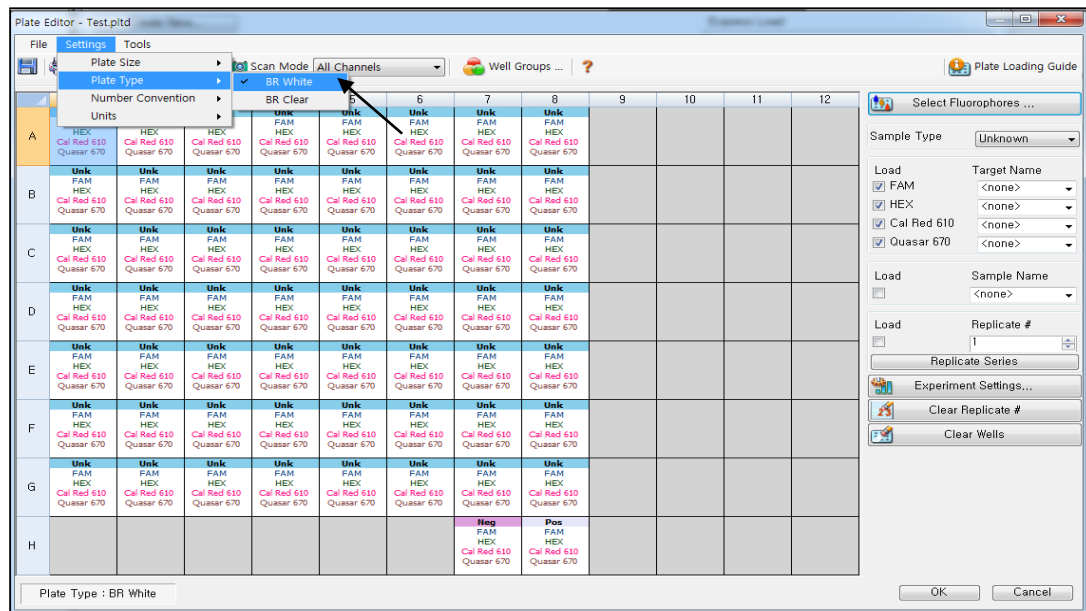
3) Zvolte jamky, do kterých bude umístěna zkumavka PCR, a vyberte typ vzorku z rozbalovací nabídky **Typ vzorku**.

- **Neznámý**: Klinické vzorky
- **Negativní kontrola**
- **Pozitivní kontrola**

4) Kliknutím na příslušné zaškrťovací rámečky (**FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670**) určete fluorofory, které mají být detekovány ve vybraných jamkách.

5) Zadejte **název vzorku** a stiskněte klávesu enter.

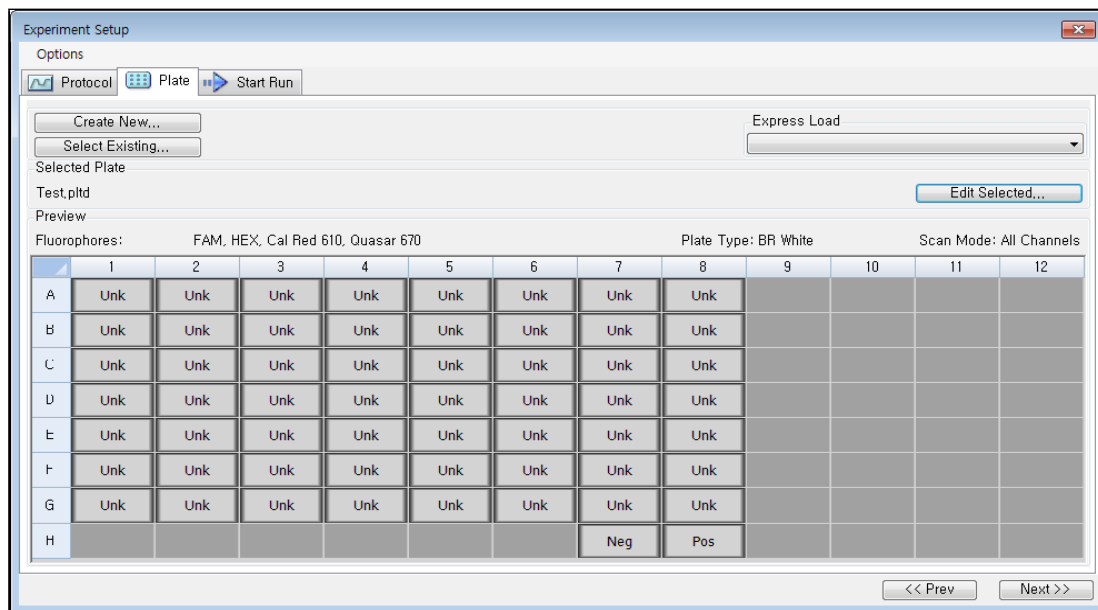
6) V nastavení hlavní nabídky **Editoru destiček** vyberte **velikost destičky (96 jamek)** a **typ destičky (BR White)**.



Obr. 6. Nastavení destičky

7) Kliknutím na tlačítko **OK** uložte novou destičku.

8) Vraťte se do okna **Nastavení experimentu**.

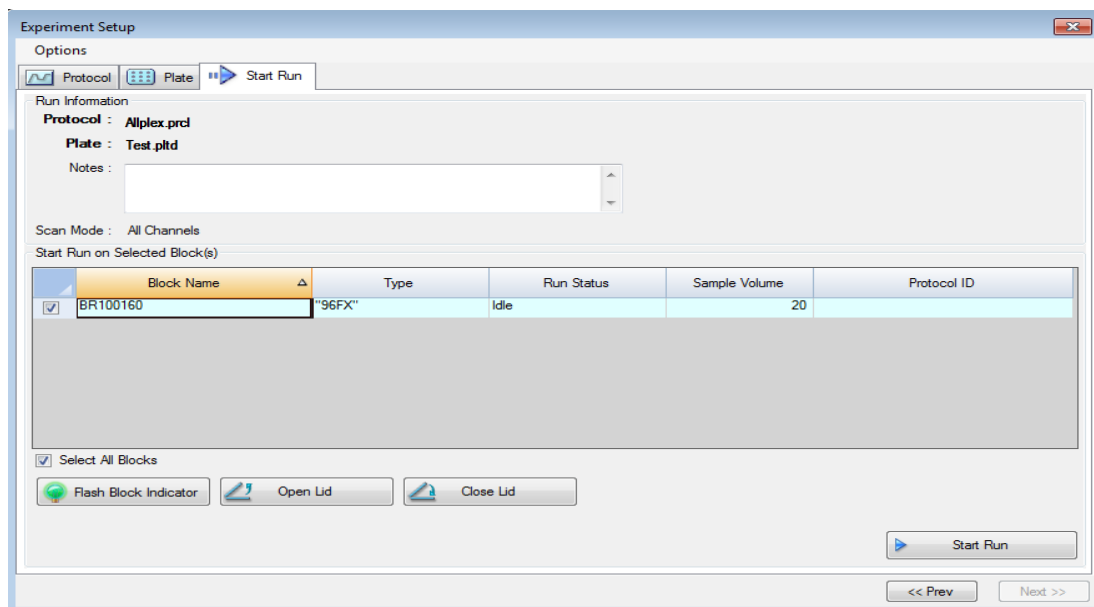


Obr. 7. Nastavení experimentu: .

9) Kliknutím na tlačítko **Další** spusťte zařízení.

C. Spuštění zařízení

- 1) V záložce **Start Run (Spustit)** v nabídce **Experiment Setup (Nastavení experimentu)** klikněte na tlačítko **Close lid (Zavřít víko)**, abyste zavřeli víko přístroje.



Obr. 8. Zavření víka.

- 2) Klikněte na tlačítko **Start run (Spustit zařízení)**.
- 3) Spuštěný soubor uložte do složky **Moje dokumenty** nebo do určené složky. Zadejte název souboru, klikněte na tlačítko **ULOŽIT** a zařízení se spustí.

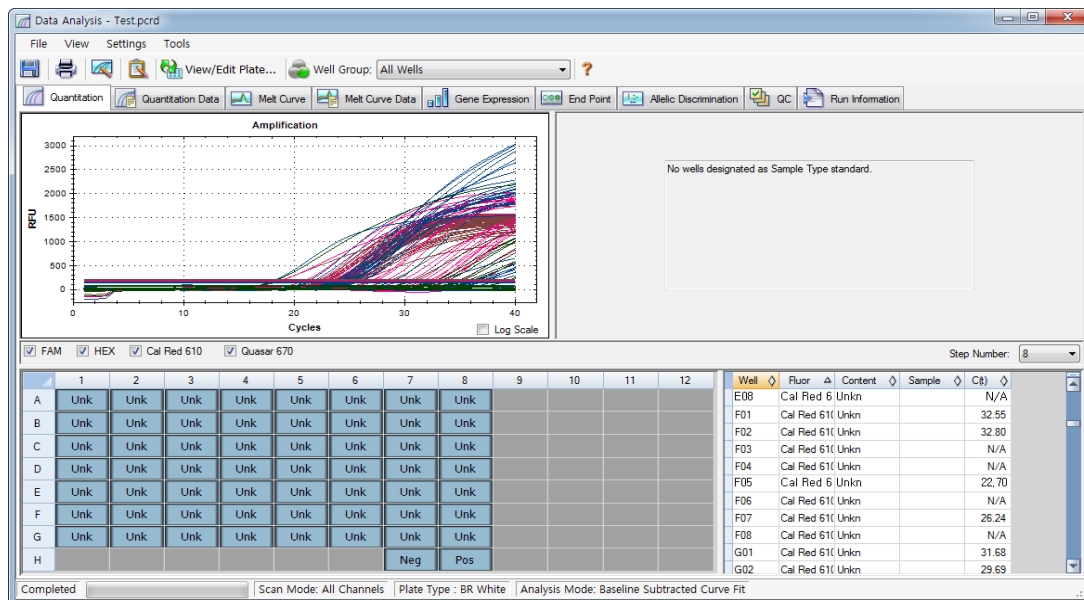
1.2. Analýza dat

A. Vytvoření složek pro export dat

- 1) Chcete-li uložit data s výsledky pro všechny kroky detekce amplifikační křivky, vytvořte jednu složku.
- 2) Název složky může být podle přání uživatele (pro funkci "Seegene Export" se automaticky vytvoří složky "QuantStep8" a "QuantStep9", do kterých se uloží data každé amplifikační křivky do složky vytvořené uživatelem).

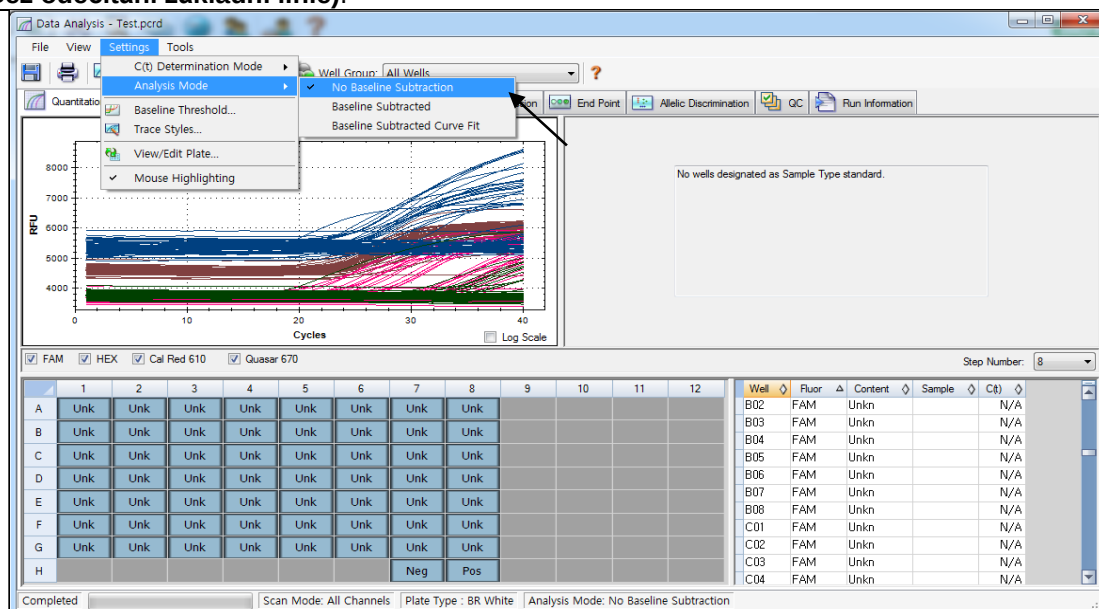
B. Přednastavení pro analýzu dat v programu CFX Manager™

1) Po testu klikněte na záložku **Quantification (Kvantifikace)** a potvrďte výsledky amplifikační křivky.



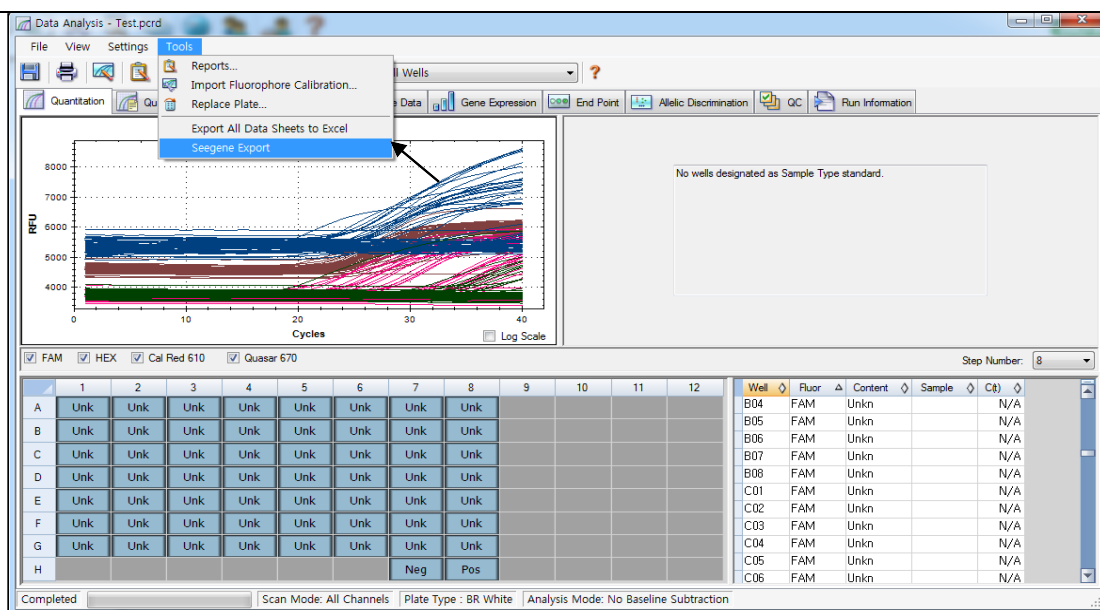
Obr. 9. Výsledky amplifikační křivky

2) V nabídce **Settings Mode (Režim nastavení)** vyberte možnost **No Baseline Subtraction (Bez odečítání základní linie)**.



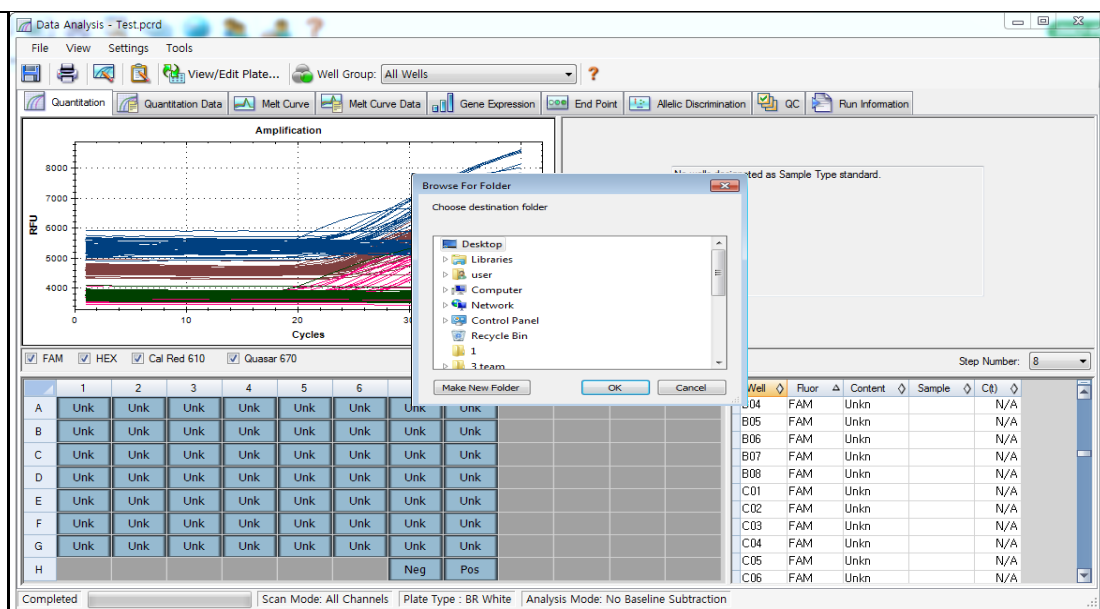
Obr. 10. Bez odečítání základní linie

3) V nabídce **Tools (Nástroje)** vyberte položku **Seegene Export**.



Obr. 11. Seegene Export

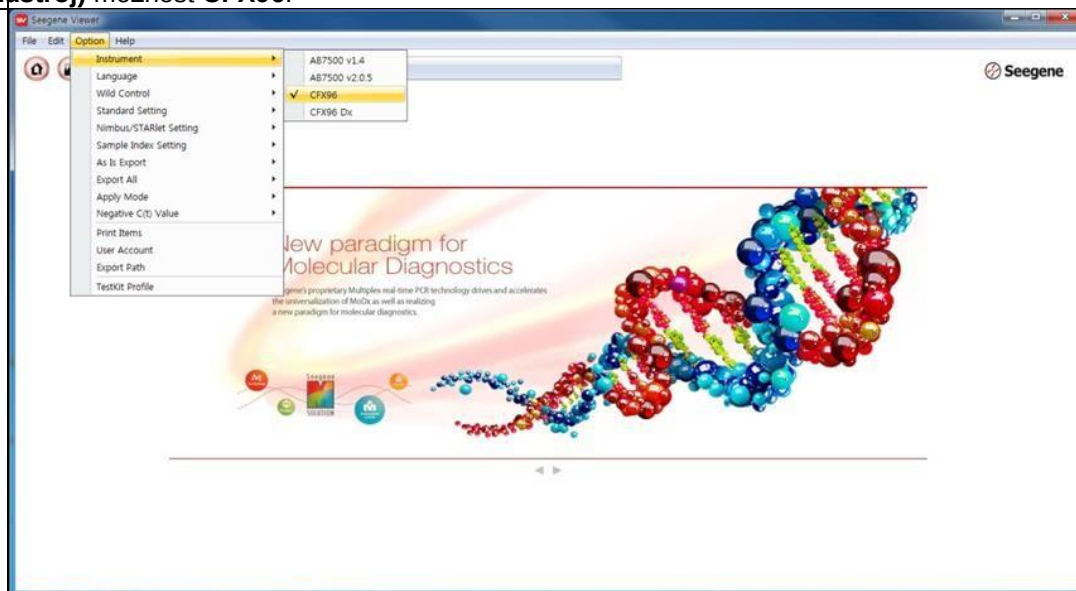
4) Vyberte umístění pro uložení dat a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 12. Seegene Export do určené složky

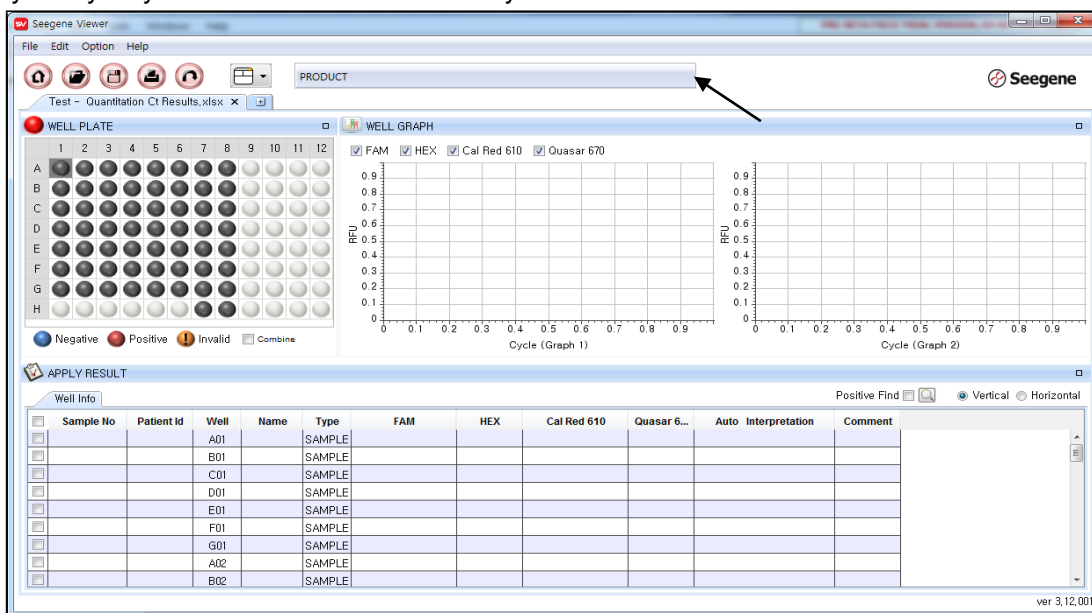
C. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

1) Otevřete program Seegene Viewer a kliknutím na **Option (Možnost)** vyberte v **Instrument (Nástroj)** možnost **CFX96**.



Obr. 13. Prohlížeč Seegene

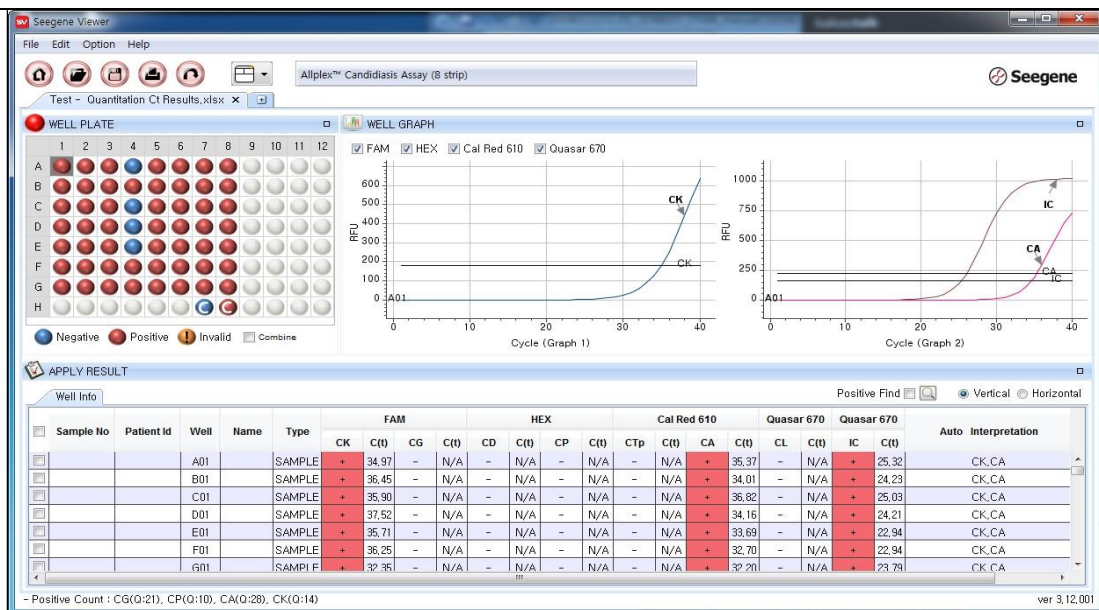
2) Kliknutím na tlačítko **Otevřít** vyhledejte soubor uložený ve složce "QuantStep8". Otevřete soubor s výsledky a vyberte testovací sadu z nabídky **PRODUKT**.



Obr. 14. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

Poznámka: Při výběru testovací sady si prosím ověřte typ zkumavky (8 proužků / 96 uzávěrů / 96 fólií).

3) Zkontrolujte výsledek pro každou jamku.



Obr. 15. Výsledek testu v prohlížeči Seegene Viewer

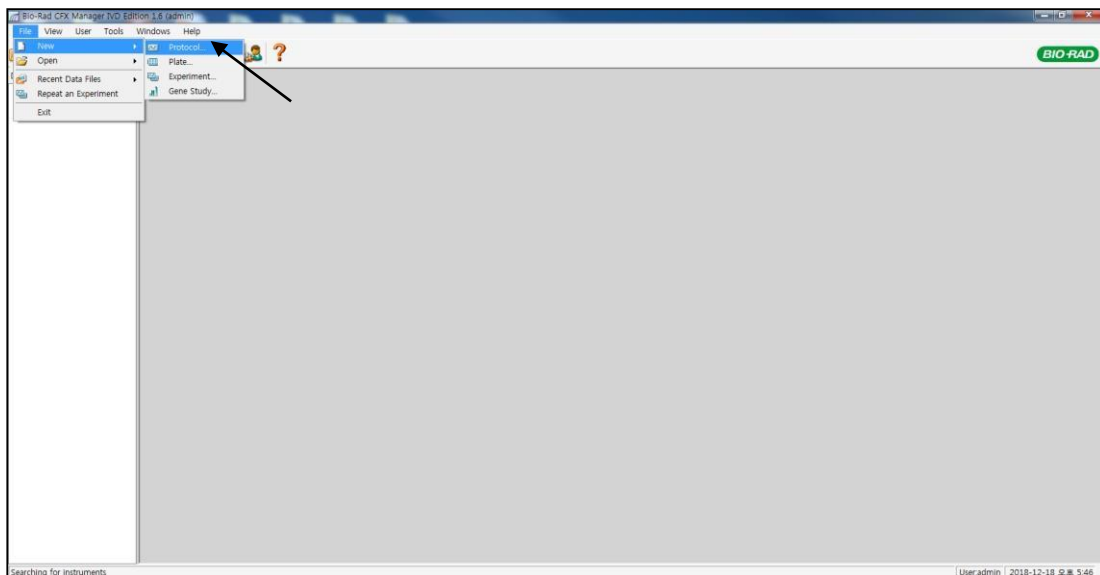
2. Systém CFX96™ Dx (software CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1. Nastavení přístroje pro PCR v reálném čase

Poznámka: Nastavení experimentu v systému CFX96™ Dx (Bio-Rad) lze rozdělit do tří kroků: Nastavení protokolu, Nastavení destiček a Spuštění zařízení.

A. Nastavení protokolu

- 1) Pro otevření **Editoru protokolu** zvolte v hlavní nabídce **File (Soubor)→ New (Nový)→ Protocol**.

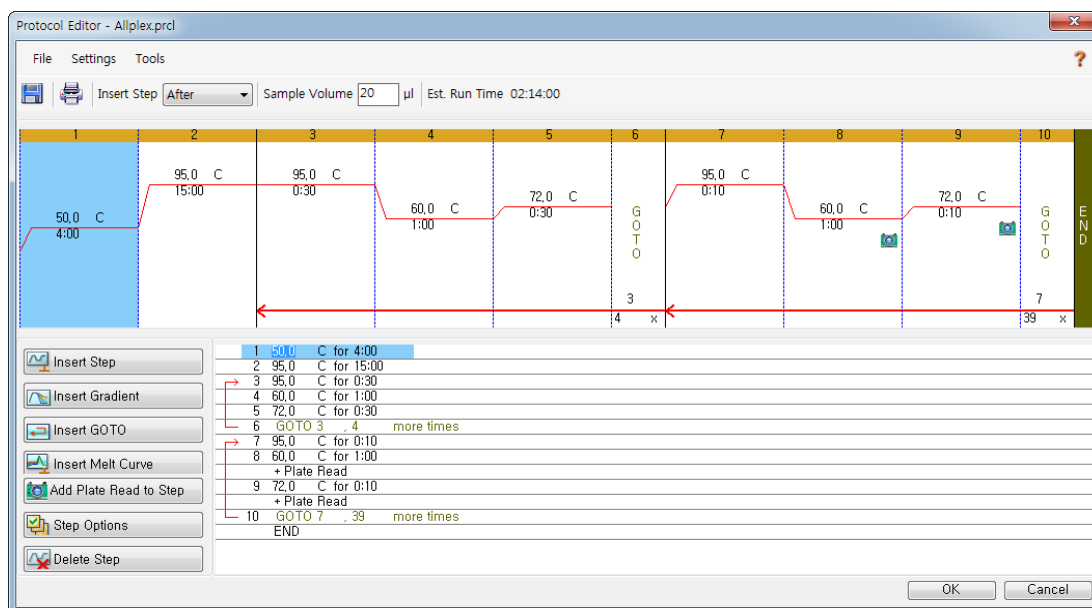


Obr. 1. Nastavení protokolu

2) V **Editoru protokolu** definujte tepelný profil takto:

Krok	Počet cyklů	Teplota	Doba trvání
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 s
4		60°C	1 min
5		72°C	30 s
6	Přejděte na krok 3, opakujte 4krát		
7	40	95°C	10 s
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 s
10	Přejděte na krok 7, opakujte 39krát		

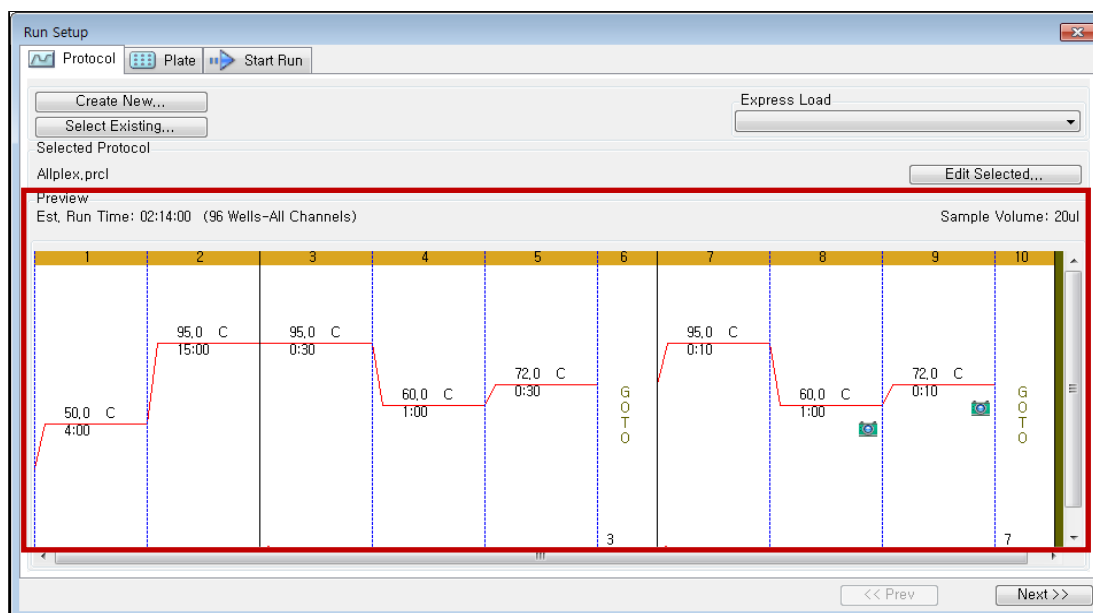
Poznámka*: V kroku 8 a 9 se odečte tabulka. Fluorescence se detekuje při 60 a 72 °C.



Obr. 2. Editor protokolu

4) 3) Pro přímé zadání 20 µl klikněte na rámeček vedle **Sample Volume (Objem vzorku)**.

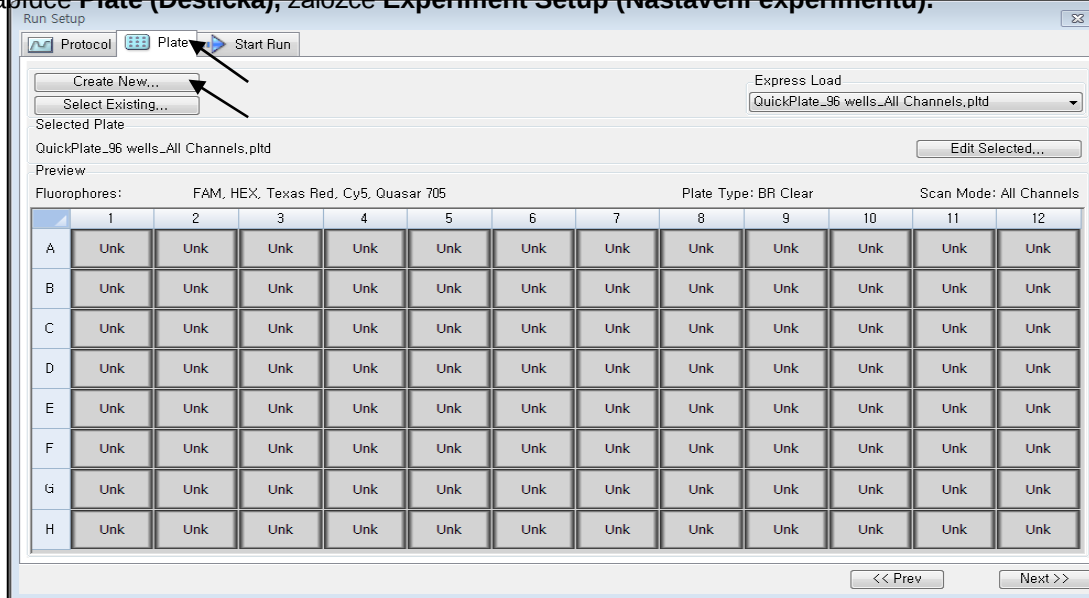
4) Klikněte na tlačítko **OK** a uložte protokol. Otevře se okno **Run Setup (Spustit nastavení)**.



Obr. 3. Spuštění nastavení:
Protokol

B. Nastavení destičky

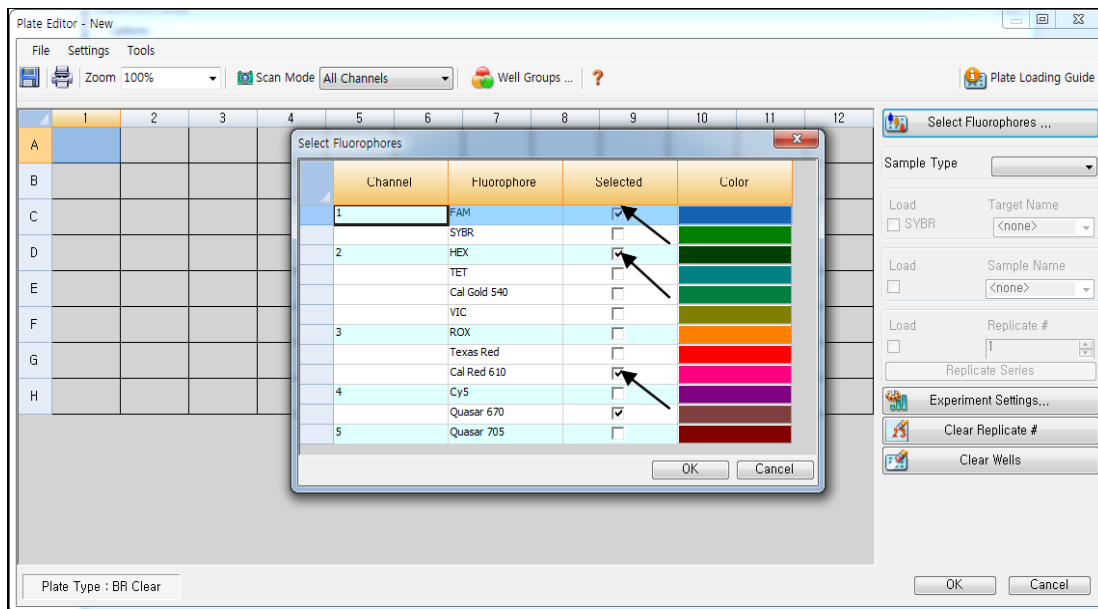
1) Pro otevření okna **Plate Editor (Editor destičky)** klikněte na **Create New (Vytvořit nový)** v nabídce **Plate (Destička)**, záložce **Experiment Setup (Nastavení experimentu)**.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

Obr. 4. Editor destičky

- 2) Kliknutím na tlačítko **Select Fluorophores (Vybrat fluorofory)** určete fluorofory (**FAM, HEX, Cal Red 610, a Quasar 670**), které budou použity, a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 5. Vybrané fluorofory (FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670)

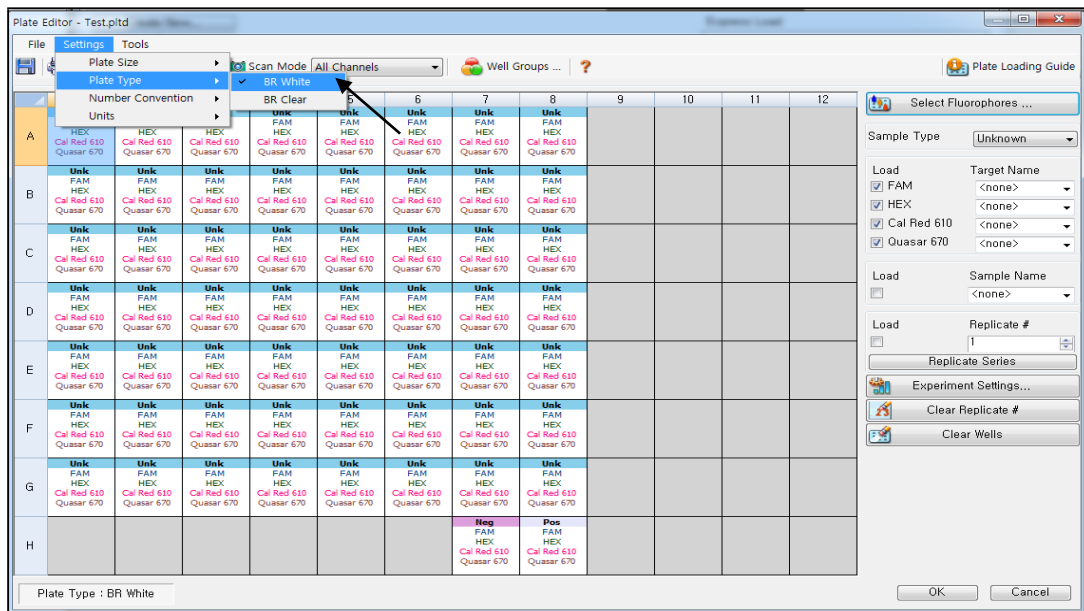
- 3) Zvolte jamky, do kterých bude umístěna zkumavka PCR, a vyberte typ vzorku z rozbalovací nabídky **Typ vzorku**.

- **Neznámý:** Klinické vzorky
- **Negativní kontrola**
- **Pozitivní kontrola**

- 4) Kliknutím na příslušná zaškrťovací políčka (**FAM, HEX, Cal Red 610 a Quasar 670**) určete fluorofory, které mají být detekovány ve vybraných jamkách.

- 5) Zadejte **název vzorku** a stiskněte klávesu enter.

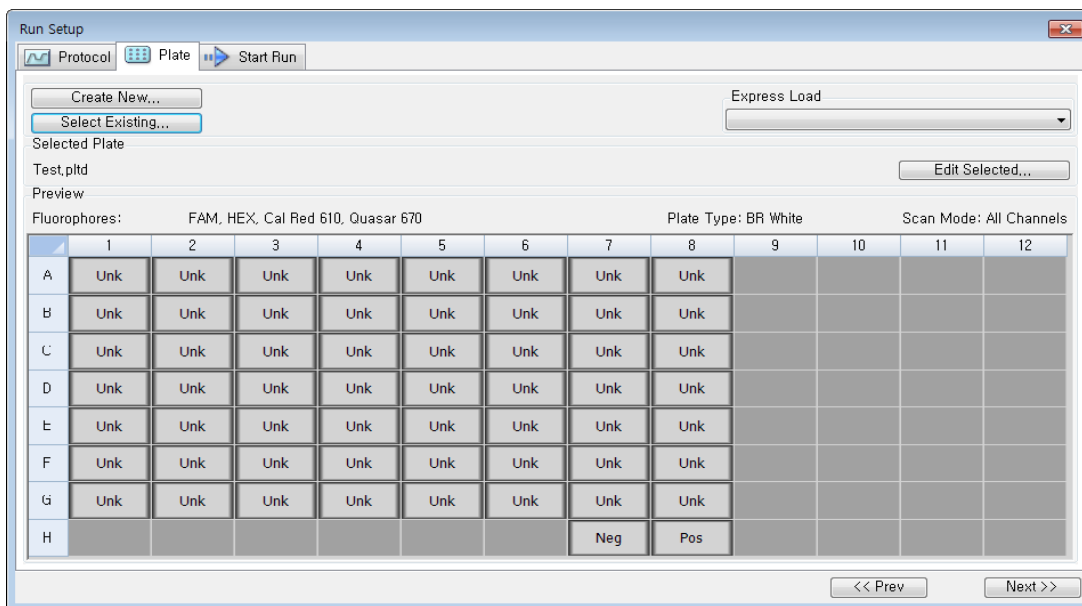
6) V nastavení hlavní nabídky **Editoru destiček** vyberte **velikost destičky (96 jamek)** a **typ destičky (BR White)**.



Obr. 6. Nastavení destičky

7) Novou destičku uložte kliknutím na tlačítko **OK**.

8) Budete vráceni do okna **Run Setup (Nastavení zařízení)**.

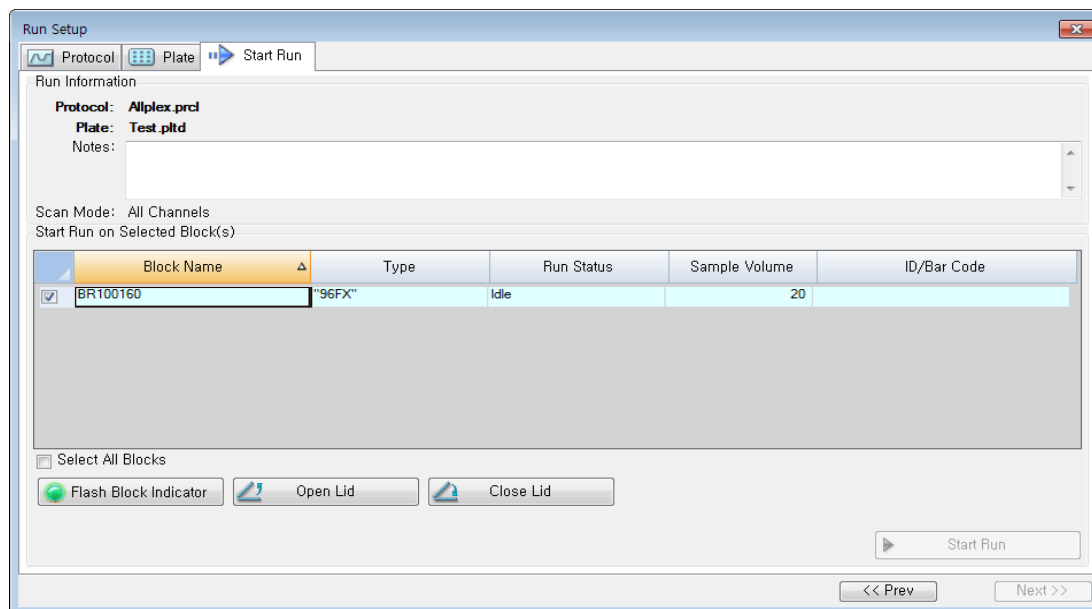


Obr. 7. Nastavení zařízení :

9) Kliknutím na tlačítko **Další** zařízení spustíte.

C. Spuštění zařízení

- 1) V záložce **Start Run (Spustit)** v nabídce **Run Setup (Nastavení zařízení)** klikněte na tlačítko **Close lid (Zavřít víko)**, abyste zavřeli víko přístroje.



Obr. 8. Zavření víka.

- 2) Klikněte na tlačítko **Start run (Spustit zařízení)**.
- 3) Spuštěný soubor uložte do složky **Moje dokumenty** nebo do určené složky. Zadejte název souboru, klikněte na tlačítko **ULOŽIT** a zařízení se spustí.

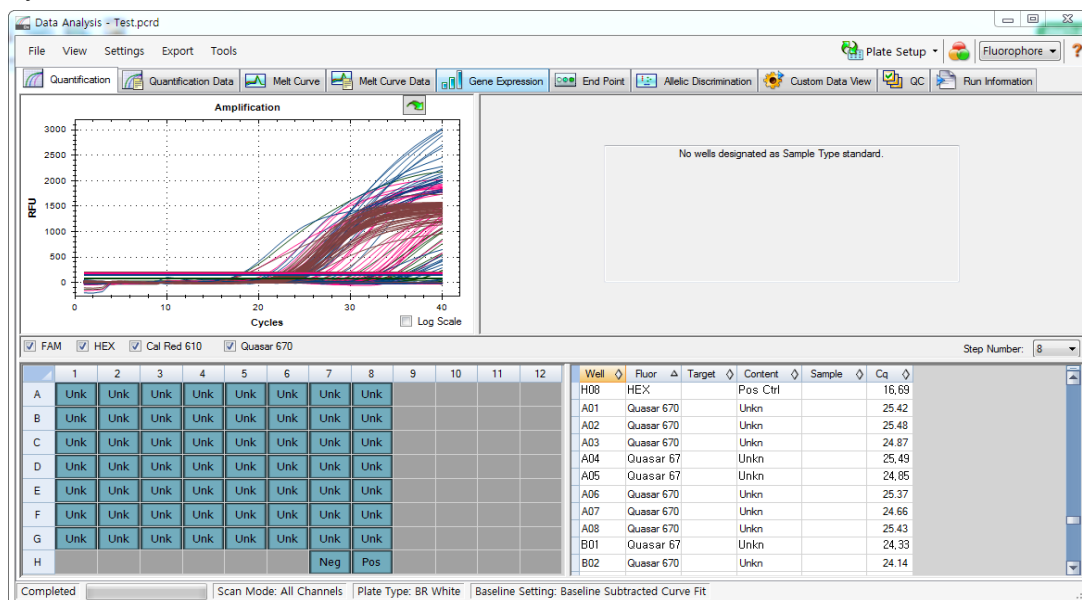
2.2. Analýza dat

A. Vytvoření složek pro export dat

- 1) Chcete-li uložit data s výsledky pro všechny kroky detekce amplifikační křivky, vytvořte jednu složku.
- 2) Název složky může být podle přání uživatele (pro funkci "Seegene Export" se automaticky vytvoří složky "QuantStep8" a "QuantStep9", do kterých se uloží data každé amplifikační křivky do složky vytvořené uživatelem).

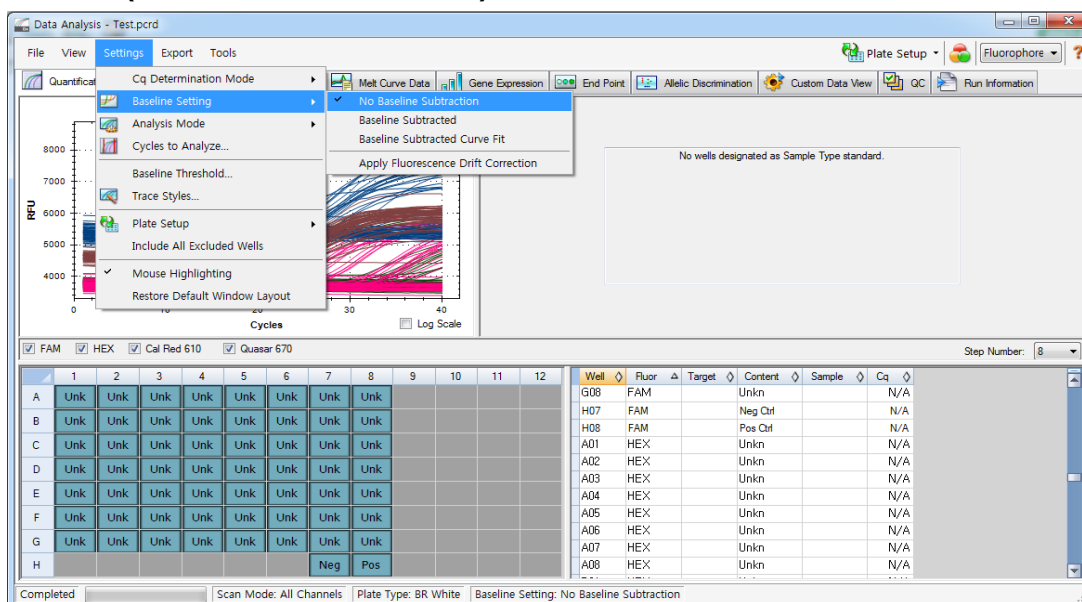
B. Přednastavení pro analýzu dat v programu CFX Manager™

1) Po testu klikněte na záložku **Quantification (Kvantifikace)** a potvrďte výsledky amplifikační křivky.



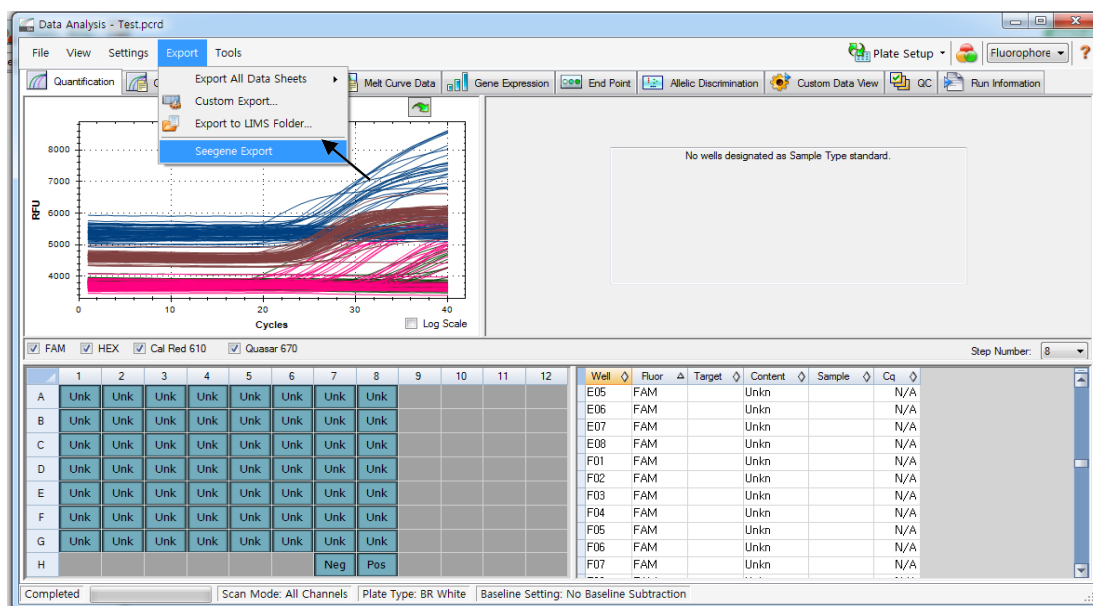
Obr. 9. Výsledky amplifikační křivky

2) V nabídce **Baseline Setting (Nastavení základní linie)** vyberte možnost **No Baseline Subtraction (Bez odečítání základní linie)**.



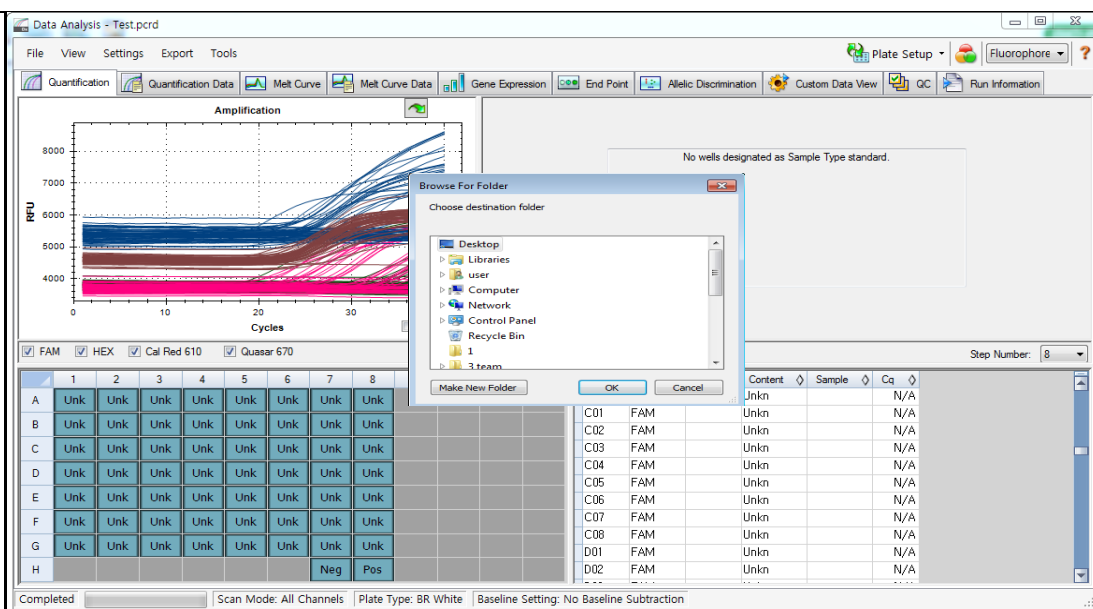
Obr. 10. Bez odečítání základní linie

3) V nabídce **Export** vyberte možnost **Seegene Export**.



Obr. 11. Seegene Export

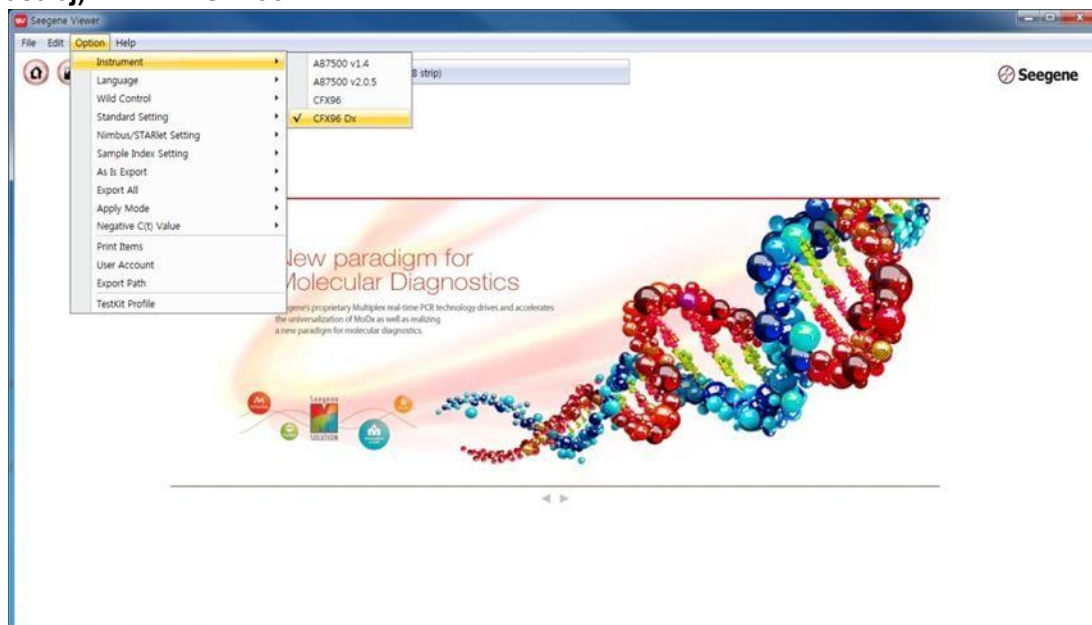
4) Vyberte umístění pro uložení dat a klikněte na tlačítko **OK**.



Obr. 12. Seegene Export do určené složky

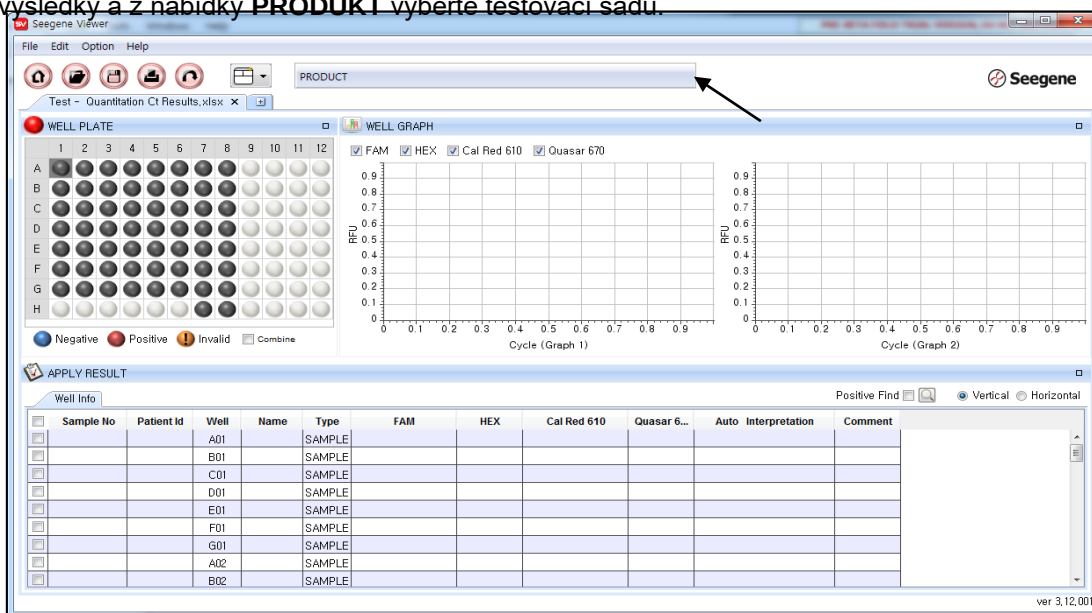
C. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

1) Otevřete program Seegene Viewer a kliknutím na **Option** vyberte v nabídce **Instrument** (**Nástroj**) možnost **CFX96 Dx**.



Obr. 13. Prohlížeč Seegene

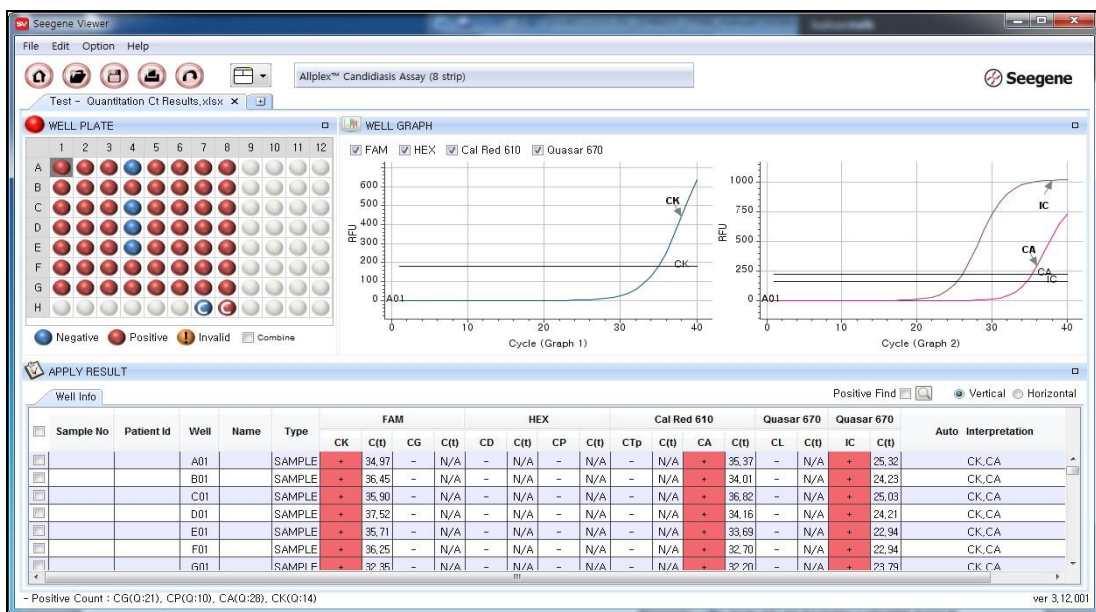
2) Kliknutím na tlačítko **Otevřít** vyhledejte soubor uložený ve složce "QuantStep8". Otevřete soubor s výsledky a z nabídky **PRODUKT** vyberte testovací sadu.



Obr. 14. Nastavení pro analýzu dat v prohlížeči Seegene Viewer

Poznámka: Při výběru testovací sady ověřte typ zkumavky (8 proužků / 96 uzávěrů / 96 fólií).

3) Zkontrolujte výsledek pro každou jamku.



Obr. 15. Výsledek testu v prohlížeči Seegene Viewer

VÝSLEDKY
1. Informace o analytech

Fluorofor	Analyt	
	Graf 1	Graf 2
FAM	<i>Candida krusei</i> (CK)	<i>Candida glabrata</i> (CG)
HEX	<i>Candida dubliniensis</i> (CD)	<i>Candida parapsilosis</i> (CP)
Cal Red 610	<i>Candida tropicalis</i> (CTp)	<i>Candida albicans</i> (CA)
Quasar 670	<i>Candida lusitanae</i> (CL)	Vnitřní kontrola (IC)

2. Interpretace výsledků

Analyt	Hodnota Ct	Výsledek
Cíle	≤ 40	Zjištěno (+)
	N/A	Nezjištěno (-)
IC	≤ 40	Zjištěno (+)
	N/A	Nezjištěno (-)

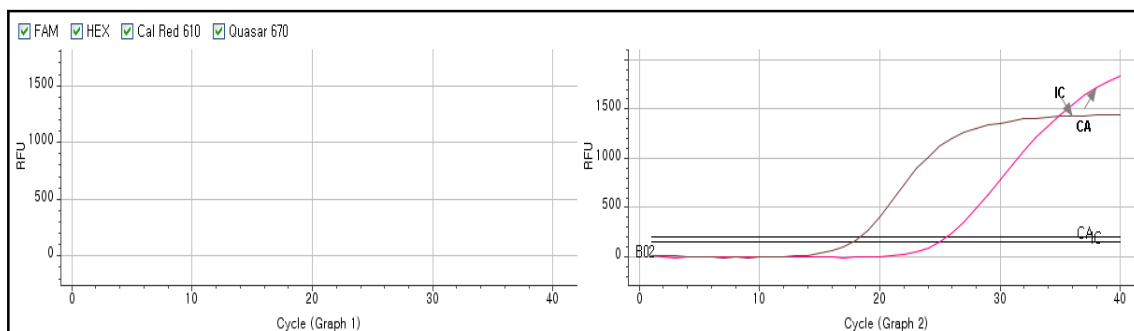
Cílový výsledek		Výsledek IC	Výklad
Graf 1	Graf 2		
+	-	+	Detekovaná cílová nukleová kyselina
-	+		
+	+		
+	-	-	Detekovaná cílová nukleová kyselina* - Mohou být přítomny další cíle pro kandidy, které nebyly zjištěny.
-	+		
+	+		
-	-	+	Cílová nukleová kyselina nedetekována
-	-	-	Neplatné** - Slabý nebo negativní signál IC naznačuje nedostatečný odběr, zpracování nebo přítomnost inhibitorů. - Zopakujte test od kroku extrakce nukleové kyseliny za použití dalšího alikvotu původního vzorku. - Pokud se u reextrahované nukleové kyseliny objeví stejný výsledek, zředte vzorek (1/3~1/10) ve fyziologickém roztoku a opakujte test od kroku extrakce.

* Detekce vnitřní kontroly v kanálu Quasar 670 není nutná pro pozitivní výsledky cílových patogenů. Vysoký titr jiného analytu může vést ke snížení nebo absenci signálu vnitřní kontroly.

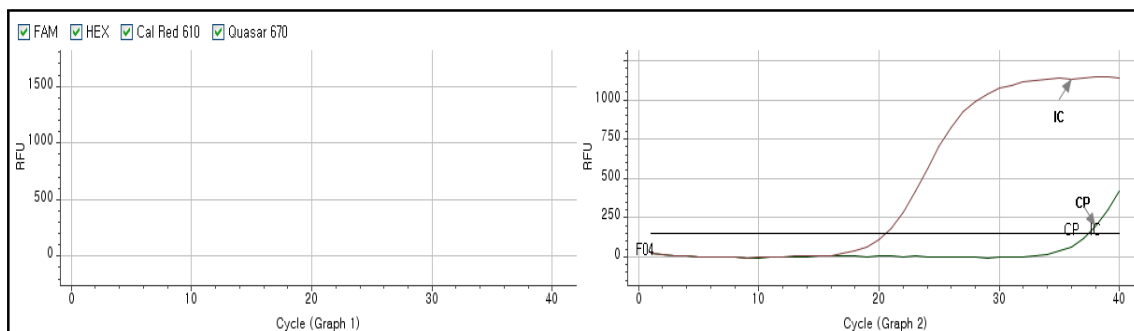
** Pokud není pozorován žádný ze signálů včetně interní kontroly, viz ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.

3. Aplikace na klinické vzorky

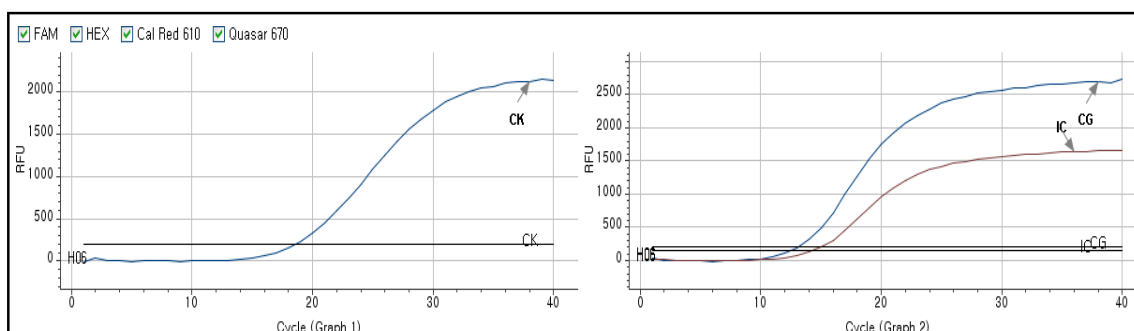
Vzorek 1



Vzorek 2



Vzorek 3



Vzorek	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670		Quasar 670		Auto interpretace
	CK	Ct	CG	Ct	CD	Ct	CP	Ct	CTp	Ct	CA	Ct	CL	Ct	IC	Ct	
1	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.59	-	N/A	+	17.80	CA
2	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	37.41	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.59	CP
3	+	18.57	+	13.13	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.35	CK, CG

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Allplex™ Test na kandidózu		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Žádný signál	Fluorofory pro data analýzy neodpovídají protokolu	Vyberte správné fluorofory pro analýzu dat.
	Nesprávné nastavení termálního cyklu v reálném čase	Zkontrolujte podmínky tepelného cyklování a zopakujte test při správném nastavení.
	Nesprávné skladování nebo prošlá doba použitelnosti testovací sady	Zkontrolujte podmínky skladování (viz strana 10) a datum spotřeby (viz štítek) testovací soupravy a v případě potřeby použijte novou sadu.
	Selhání extrakce nukleové kyseliny	Pokud byla IC přidána do vzorku před extrakcí, může nepřítomnost signálu IC znamenat ztrátu nukleové kyseliny během extrakce. Ujistěte se, že jste použili doporučenou metodu extrakce. V případě výskytu inhibitorů původní vzorek reextrahujte nebo vzorek naředte fyziologickým roztokem v poměru 1/3 ~ 1/10 a poté do naředěného vzorku přidejte ASTI IC. ASTI IC by se mělo používat pouze pro vzorek moči.
Žádný signál interní kontroly	Vysoké zatížení nukleovou kyselinou patogenu	Pokud je pozorován signál cílového patogenu, ale ne IC, pak amplifikace IC mohla být inhibována vysokým titrem cílového patogenu.
	Přítomnost inhibitoru PCR	Naředte prosím nukleovou kyselinu vzorku (1/10~1/100) ve vodě bez RNázy a opakujte test s naředěnou nukleovou kyselinou. Pokud je inhibitor stále přítomen, zředte vzorek (1/10~1/100) ve fyziologickém roztoku a test zopakujte se zředěným vzorkem.

Výkvy v libovolných cyklech amplifikační křivky	Bublina ve zkumavce PCR	Zkumavku s PCR před zahájením experimentu odstředíte.
--	----------------------------	---

Allplex™ Test na kandidózu		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Předpokládané falešně pozitivní nebo cílové signály negativní kontroly	Kontaminace	Dekontaminujte všechny povrchy a nástroje chlornanem sodným a etanolem. Po celou dobu postupu používejte pouze filtrační špičky a mezi jednotlivými zkumavkami je vyměňujte. Opakujte celý postup od extrakce nukleových kyselin s použitím nové sady činidel.
Předpokládaná falešná negativita nebo žádný signál pozitivní kontroly	Chyba při odběru vzorku	Zkontrolujte prosím metodu odběru vzorku a znovu jej odeberte.
	Nesprávné skladování vzorku	Znovu odeberte vzorek a celý postup zopakujte. Zajistěte, aby byl vzorek skladován podle doporučení.
	Chyba při extrakci nukleové kyseliny	Zkontrolujte postup extrakce nukleové kyseliny a koncentraci nukleové kyseliny a znovu ji extrahujte.
	Chyba při přidávání nukleové kyseliny do zkumavky PCR	Zkontrolujte čísla vzorků ve zkumavkách obsahujících nukleovou kyselinu a ujistěte se, že je nukleová kyselina přidána do správné PCR zkumavky a v případě potřeby test opatrně zopakujte.
	Přítomnost inhibitoru	Naředte prosím vzorek nukleové kyseliny (1/10~1/100) ve vodě bez RNázy a opakujte test s naředěnou nukleovou kyselinou. Pokud je inhibitor stále přítomen, zředte vzorek (1/10~1/100) ve fyziologickém roztoku a test zopakujte se zředěným vzorkem.
	Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda jsou do směsi PCR přidány všechny složky (citlivost je u předem připraveného premixu snížena). Všechna činidla musí být před použitím homogenizována a odstředěna.

VÝKON
1. Specificita

Vysoká specificita testu Allplex™ Candidiasis Assay je zajištěna oligonukleotidy vyvinutými speciálně pro sledované cíle a nastavenými reakčními podmínkami. Test Allplex™ Candidiasis Assay byl testován na zkříženou reaktivitu na 122 různých patogenů. Amplifikace a detekce PCR byla zjištěna pouze u specifikovaných cílů.

Č.	Organism us	Zdroj:	Izolát č.	Výsledek †
1	<i>Candida albicans</i>	ATCC	10231D-5	Zjištěno CA
2	<i>Candida dubliniensis</i>	KCTC	17427	Zjištěno CD
3	<i>Candida glabrata</i>	ATCC	36909D	Zjištěno CG
4	<i>Candida krusei</i>	KCCM	50633	Zjištěno CK
5	<i>Candida lusitanae</i>	KCCM	50541	Zjištěno CL
6	<i>Candida parapsilosis</i>	KCTC	7653	Zjištěno CP
7	<i>Candida tropicalis</i>	KCTC	7212	Zjištěno CTp
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC	15308	Nezjištěno
9	<i>Acinetobacter schindleri</i>	KCTC	12409	Nezjištěno
10	<i>Acinetobacter ursingii</i>	KCTC	12410	Nezjištěno
11	<i>Atopobium parvulum</i>	KCTC	3663	Nezjištěno
12	<i>Atopobium vaginae</i>	ATCC	BAA-55	Nezjištěno
13	<i>Bacteroides caccae</i>	KCTC	5132	Nezjištěno
14	<i>Bacteroides fragilis</i>	KCTC	3688	Nezjištěno
15	<i>Bacteroides ovatus</i>	KCTC	5827	Nezjištěno
16	<i>Bacteroides vulgatus</i>	KCCM	11423	Nezjištěno
17	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	KCTC	15192	Nezjištěno
18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	KCCM	11206	Nezjištěno
19	<i>Bifidobacterium longum</i>	KCCM	11953	Nezjištěno
20	<i>Minimum Bifidobacterium</i>	KCTC	3273	Nezjištěno
21	<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC	96139	Nezjištěno
22	<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC	96144D	Nezjištěno
23	<i>Chlamydia trachomatis</i>	ATCC	VR-1500	Nezjištěno
24	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV I)	ATCC	VR-901B	Nezjištěno

25	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV II)	Pokročilé	08-931-000	Nezjištěno
26	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV III)	ATCC	VR-903	Nezjištěno
27	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary A)	ATCC	VR-571B	Nezjištěno
28	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary B)	ATCC	VR-573	Nezjištěno
29	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary Ba)	ATCC	VR-347	Nezjištěno
30	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary C)	ATCC	VR-1477	Nezjištěno
31	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary D)	ATCC	VR-885	Nezjištěno
32	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary E)	ATCC	VR-348B	Nezjištěno
33	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary F)	ATCC	VR-346	Nezjištěno
34	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary G)	ATCC	VR-878	Nezjištěno
35	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary H)	ATCC	VR-879D	Nezjištěno
36	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary I)	ATCC	VR-880	Nezjištěno
37	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary J)	ATCC	VR-886	Nezjištěno
38	<i>Chlamydia trachomatis</i> (sérovary K)	ATCC	VR-887	Nezjištěno
39	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC	VR-1360	Nezjištěno
40	<i>Chlamydia psittaci</i>	ATCC	VR-125	Nezjištěno
41	<i>Clostridium difficile</i> (Toxin A+ / B+)	ATCC	9689	Nezjištěno
42	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC	13124	Nezjištěno
43	<i>Cytomegalovirus</i> (CMV)	ATCC	VR-807	Nezjištěno
44	<i>Enterococcus avium</i>	ATCC	49603D	Nezjištěno
45	Virus Epstein-Barr	ATCC	VR-602	Nezjištěno
46	<i>Escherichia coli</i>	ATCC	15489	Nezjištěno
47	<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC	49145D	Nezjištěno
48	<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC	700724D-5	Nezjištěno
49	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC	51907D	Nezjištěno
50	Virus hepatitidy A (HAV)	ATCC	VR-1402	Nezjištěno
51	Virus hepatitidy B (HBV)	NIBSC	10/264	Nezjištěno
52	Virus hepatitidy C (HCV)	NIBSC	06/102	Nezjištěno
53	Lidský herpesvirus 1	ATCC	VR-260	Nezjištěno
54	Lidský herpesvirus 2	ATCC	VR-734	Nezjištěno
55	Lidský herpesvirus 3	ATCC	VR-1367	Nezjištěno
56	Lidský papiloma virus 16	ATCC	45113D	Nezjištěno
57	Lidský papiloma virus 18	ATCC	45152D	Nezjištěno
58	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM	32820	Nezjištěno

59	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	KCCM	40431	Nezjištěno
60	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM	40399	Nezjištěno
61	<i>Lactobacillus casei</i>	KCCM	12452	Nezjištěno
62	<i>Lactobacillus crispatus</i>	KCTC	5054	Nezjištěno
63	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	KCCM	35468	Nezjištěno
64	<i>Lactobacillus fermentum</i>	KCCM	40401	Nezjištěno
65	<i>Lactobacillus fornicalis</i>	ATCC	700934	Nezjištěno
66	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	KCCM	40987	Nezjištěno
67	<i>Lactobacillus gasseri</i>	KCTC	3163	Nezjištěno
68	<i>Lactobacillus helveticus</i>	KCCM	41823	Nezjištěno
69	<i>Lactobacillus iners</i>	ATCC	55195	Nezjištěno
70	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	KCCM	40990	Nezjištěno
71	<i>Lactobacillus jensenii</i>	KCTC	5194	Nezjištěno
72	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	KCCM	32825	Nezjištěno
73	<i>Lactobacillus kefirifaciens</i>	KCCM	41275	Nezjištěno
74	<i>Lactobacillus oris</i>	KCCM	40993	Nezjištěno
75	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	KCTC	3503	Nezjištěno
76	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCCM	40997	Nezjištěno
77	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM	12116	Nezjištěno
78	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM	23272	Nezjištěno
79	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KCCM	32405	Nezjištěno
80	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	KCCM	40998	Nezjištěno
81	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	ATCC	27651	Nezjištěno
82	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	KCTC	5857	Nezjištěno
83	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	KCCM	49540	Nezjištěno
84	<i>Mobiluncus curtisii</i>	ATCC	35241	Nezjištěno
85	<i>Mobiluncus mulieris</i>	ATCC	35240D-5	Nezjištěno
86	<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC	23838D	Nezjištěno
87	<i>Mycoplasma felis</i> Cole et al.	ATCC	23391	Nezjištěno
88	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC	33530D	Nezjištěno
89	<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC	23114D	Nezjištěno
90	<i>Mycoplasma iowae</i> Jordan et al.	ATCC	33552	Nezjištěno
91	<i>Mycoplasma leonicaptivi</i> Hill	ATCC	49890	Nezjištěno
92	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	29342	Nezjištěno

93	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ATCC	19612	Nezjištěno
94	<i>Mycoplasma spumans</i>	ATCC	19526	Nezjištěno
95	<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC	14685	Nezjištěno
96	<i>Neisseria flavescens</i>	ATCC	13120	Nezjištěno
97	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC	700825D	Nezjištěno
98	<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC	23970	Nezjištěno
99	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC	700532D	Nezjištěno
100	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC	19696	Nezjištěno
101	<i>Neisseria perflava</i>	ATCC	14799D-5	Nezjištěno
102	<i>Neisseria sicca</i>	ATCC	5415	Nezjištěno
103	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC	19243	Nezjištěno
104	<i>Prevotella bivia</i>	KCTC	5454	Nezjištěno
105	<i>Prevotella buccalis</i>	KCTC	5496	Nezjištěno
106	<i>Prevotella disiens</i>	KCTC	5499	Nezjištěno
107	<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC	3692	Nezjištěno
108	<i>Prevotella melaninogenica</i>	KCTC	5457	Nezjištěno
109	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	47085	Nezjištěno
110	Předpokládaný BVAB2	Korejský izolát		Nezjištěno
111	Předpokládaná <i>Megasphaera</i> typ-1	Korejský izolát		Nezjištěno
112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM	50511	Nezjištěno
113	<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM	12021	Nezjištěno
114	<i>Salmonella typhimurium</i>	KCCM	40253	Nezjištěno
115	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	700699D-5	Nezjištěno
116	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC	BAA-611D	Nezjištěno
117	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC	BAA-255D	Nezjištěno
118	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC	30001D	Nezjištěno
119	<i>Treponema pallidum</i>	Vircell	MBC109	Nezjištěno
120	<i>Ureaplasma parvum</i>	ATCC	27815	Nezjištěno
121	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC	33695	Nezjištěno
122	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC	27969	Nezjištěno

† Aby se prokázala platnost výsledků, byl experiment třikrát opakován.

※ ATCC: Americká sbírka typových kultur KCTC:

Korejská sbírka typových kultur

KCCM: Korejské kulturní centrum mikroorganismů

NIBSC: Národní institut pro biologické standardy a kontrolu

Vircell: Vircell mikrobiologové

Pokročilé: Advanced Biotechnologies Inc.

2. Citlivost

Za účelem stanovení citlivosti testu Allplex™ Candidiasis Assay bylo nastaveno standardní sériové ředění od 10^4 do 10^0 klonovaných kopií cílové DNA/reakce a analyzováno pomocí testu Allplex™ Candidiasis Assay. Detekční limit pro Allplex™ Candidiasis Assay byl 100 kopií/reakci.

3. Reprodukovatelnost

Testy reprodukovatelnosti byly provedeny ve 2 různých časech v průběhu 5 dnů, 3 různými operátory, se 3 různými šaržemi výrobku a na 3 různých místech. Byly zjištěny stejné výsledky získané v každém testu, což potvrzuje reprodukovatelnost testu Allplex™ Candidiasis Assay.

REFERENCE

1. Abbas, J. *et al.* [*Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients.] *Arch. Intern. Med.* (2000) 160: 2689-2664
2. Atkinson, *et al.* [*Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome.] *Med Mycol.* (2008) 46: 541-546
3. Brinkman, N.E. *et al.* [Evaluation of a Rapid, Quantitative Real-Time PCR Method for Enumeration of Pathogenic *Candida* Cells in Water.] *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* (2003) 69(3): 1775-1782
4. Canto'n, E. *et al.* [Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species.] *Antimicrob Agents Chemother* (2004) 48: 2477-2482
5. Chai LY *et al.* [*Candida tropicalis* in human disease.] *Crit Rev Microbiol.* (2010) 36(4): 282-298
6. Falagas, M. E., G. I. Betsi, *et al.* [Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review.] *Antimicrob Agents Chemother* (2006) 58(2): 266-272
7. Fidel F, Vazquez J, Sobel J. [*Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*.] *Clin. Microbiol. Rev.* (1999) 12(1): 80-96
8. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] *Seegene Bulletin.* (2012) 1: 1-4
9. Lee DH. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] *Seegene Bulletin* (2012) 1: 5-10
10. Mona Fattouh, Asmaa Nasr El-din, Ashgan Badawy, Mohamed Nour El-din, Hydi Ahmed. [Antifungal Susceptibility Pattern and Species Distribution of *Candida* Isolates from Patients with Vulvovaginal Candidiasis] *IJAR* (2015) 3(5): 1376-1386
11. Selvarangan *et al.* [Rapid Identification of Commonly Encountered *Candida* Species Directly from Blood Culture Bottles.] *J. Clin. Microbiol.* 41(12): 5660-5664
12. Sobel, J. D., S. Faro, *et al.* [Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations.] *Am J Obstet Gynecol* (1998) 178(2): 203-211
13. van Schalkwyk J, Yudin MH, Yudin MH, Allen V, Bouchard C, Boucher M, Boucoiran I, Caddy S, Castillo E, Kennedy VL, Money DM, Murphy K, Ogilvie G, Paquet C, van Schalkwyk JK. [Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis.] *J Obstet Gynaecol Can.* (2015) 37(3):266-276
14. van Asbeck. *et al.* [*Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility.] *Crit Rev Microbiol.* (2009) 35(4): 283-309
15. Walther A, Wendland J. [PCR-based gene targeting in *Candida albicans*.] *Nature* (2008) 3(9): 1414-1421
16. Wise M.G., *et al.* [Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR] *J. Med. Microbiol.* (2007) 56:778-787
17. Y. J. Lee, D. Kim, K. Lee, and J. Y. Chun. [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR] *Scientific Reports* (2014) 4:7439

KLÍČ K SYMBOLŮM

Klíč k symbolům použitým v příručce a na štítcích.

Symbol	Vysvětlení
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Kód šarže
	Katalogové číslo
	Datum spotřeby
	Horní mez teploty
	Směs oligonukleotidů pro amplifikaci a detekci
	PCR Master Mix nebo Detection Mix
	Voda bez RNázy
	Pozitivní kontrola (PC)
	Vnitřní kontrola (IC)
	Přečtěte si návod k použití
	Výrobce
	Datum výroby
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství
	Upozornění
	Obsahuje dostatečné množství pro <x> testů

Symbol	Vysvětlení
	Jedinečný identifikátor zařízení
	Reakční čárový kód pro automatizovaný extrakční systém

INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ

Kat. č.	Produkt	Velikost
Allplex™ series		
SD10177Z	Allplex™ Test na genitální vředy	25 reakcí
SD9802Y	Allplex™ Test na genitální vředy	50 reakcí
SD9802X	Allplex™ Test na genitální vředy	100 reakcí
SD10245Z	Allplex™ STI Essential Assay	25 reakcí
SD9801Y	Allplex™ STI Essential Assay	50 reakcí
SD9801X	Allplex™ STI Essential Assay	100 reakcí
SD10318Z	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	25 reakcí
SD10201Y	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	50 reakcí
SD10202X	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	100 reakcí
SD10178Z	Allplex™ Test na kandidózu	25 reakcí
SD9803Y	Test Allplex™ na kandidózu	50 reakcí
SD9803X	Allplex™ Test na kandidózu	100 reakcí
SD9804X	Test na bakteriální vaginózu Allplex™	100 reakcí
SD10320Z	Allplex™ Bakteriální vaginóza plus test	25 reakcí
SD10159X	Allplex™ Bakteriální vaginóza <i>plus</i> test	100 reakcí
SD10317Z	Test Allplex™ CT/NG/MG/TV	25 reakcí
SD9400Y	Test Allplex™ CT/NG/MG/TV	50 reakcí
SD9400X	Test Allplex™ CT/NG/MG/TV	100 reakcí
SD10319Z	Allplex™ MG & AziR Assay	25 reakcí
SD10169Y	Allplex™ MG & AziR Assay	50 reakcí
SD10170X	Allplex™ MG & AziR Assay	100 reakcí
SD10232Z	Allplex™ MG & MoxiR Assay	25 reakcí
SD10233Y	Allplex™ MG & MoxiR Assay	50 reakcí
SD10234X	Allplex™ MG & MoxiR Assay	100 reakcí
SD10368Z	Test Allplex™ NG & DR	25 reakcí
SD10367X	Test Allplex™ NG & DR	100 reakcí
SD7700Y	Detekce Anyplex™ II STI-7 (V1.1)	50 reakcí
SD7700X	Detekce Anyplex™ II STI-7 (V1.1)	100 reakcí
SD7500Y	Detekce Anyplex™ II STI-5	50 reakcí
SD7500X	Detekce Anyplex™ II STI-5	100 reakcí

)

SD10323Z	Detekce Anyplex™ II STI-7e	25 reakcí
SD7701Y	Detekce Anyplex™ II STI-7e	50 reakcí
SD7701X	Detekce Anyplex™ II STI-7e	100 reakcí
SD7200Y	Anyplex™ CT/NG Detekce v reálném čase (V3.1)	50 reakcí

* V případě systému SmartCycler® II se celkový počet reakcí sníží z 50 na 40 reakcí.

Série Seeplex®

HS6200Y	Detekce Seeplex® HSV2 ACE	50 reakcí
SD6401Y	Seeplex® STD4D ACE Detection (V2.0)	50 reakcí
SD6600Y	Seeplex® STD6 ACE Detection (V2.0)	50 reakcí
SD6511Y	Seeplex® STI Master Panel 1 (V2.0)	50 reakcí

Příslušenství

SG1701	Ribo_spin vRD (sada pro extrakci virové RNA/DNA)	50 příprav
--------	--	------------

Automatizované extrakční systémy

65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG71101	Seegene STARlet 96MPH	EA
744300.4.UC384	Univerzální sada kazet STARMag 96 X 4	384T / 1box
EX00032P	Sada STARMag™ S96H	48T / 1box
EX00033P	Sada STARMag™ S96H	480T / 1box
EX00034P	Sada STARMag™ S96H	96T / 1box
EX00035P	Sada STARMag™ S96H	960T / 1box
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (typ destičky)	96T / 1box
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (typ zkumavky)	96T / 1box
M9600	Maelstrom™ 9600	EA
EX00029P	Sada STARMag™ M96	96T / 1box
EX00030P	Sada STARMag™ M96	960T / 1box
SG72100	AIOS	EA