



## EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI

**REF** 90055-UNI (pro 50 stanovení)

### Složení soupravy:

5 x 150 µl M. pneumoniae UNI Mix  
2 x 50 µl PC DNA M. pneumoniae  
5 x 200 µl IC DNA 01  
1 x 20 µl Eli Blocker  
1 x 20 µl ROX dye  
1 x Návod k použití

### Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

### Účel použití

Souprava EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI slouží k DNA diagnostice patogenních druhů *Mycoplasma pneumoniae* z izolované DNA.

### Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR a použití hybridizačních sond (Molecular Beacons hybridization probes). Pro detekci *Mycoplasma pneumoniae* a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM a HEX).

### Obecný úvod

*Mycoplasma pneumoniae*, která patří do třídy *Mollicutes* má jeden z nejmenších známých genomů. Postrádá peptidoglykanovou buněčnou stěnu, a proto je odolná proti účinkům penicilinových a jiných beta-laktamových antibiotik. U lidí způsobuje atypický zápal plic. *M. pneumoniae* infikuje horní a dolní dýchací cesty, což vede k infekcím horních cest dýchacích, bronchiolitidě, tracheobronchitidě, bronchitidě a komunitně získané pneumonii. Infekce dolních cest dýchacích se obecně projevuje kašlem, někdy dušností, adenopatií, sípáním a zřídka i respiračním selháním. I když infekce *M. pneumoniae* jsou obvykle mírné a mnoho z nich je asymptomatických, ne vždy samy odezní. *M. pneumoniae* způsobuje až 40 % případů komunitně získaných pneumonií, ale *M. pneumoniae* infekce dýchacích cest jsou také spojeny s celou řadou mimoplicních projevů, včetně neurologických, srdečních, kožních, hematologických a gastrointestinálních příznaků a problémů s pohybovým aparátem.

### Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál: Doporučená izolace DNA:  
Výtěr z krku, aspirát z nosohltanu, sputum Manuální: EliGene<sup>®</sup> Urine Isolation Kit  
Automatická: ZEPHYRUS Magneto (ELISABETH PHARMACON)

**Upozornění:** Pro zachování uvedené senzitivity testu striktně doporučujeme zachovávat preanalytické postupy uvedené v tomto návodu k použití. Zvláště pak nemějte doporučené postupy z hlediska výchozího množství vzorku, rychlosti otáček při centrifugacích atd. Pro izolaci DNA lze využít také jiné soupravy, avšak preanalytické



postupy skladování, transportu a centrifugace musejí být dodrženy.

#### Výtěr z krku:

Tyto vzorky by měly být odebrány před léčbou antibiotiky dle standardního protokolu. Vzorky v kultivačním médiu je možné skladovat při 4 °C až 7 dní.

Doporučený způsob zpracování vzorků stěrů:

1. Před zahájením izolace DNA ponořte stěr do 1 ml PBS a umístěte na 3 min na třepačku. Poté zkumavku otevřete a poté mačkáním tamponu o stěnu zkumavky vymačkejte z tamponu veškerý roztok. Tampon zneškodněte.
2. Zkumavku centrifugujte po dobu 15 minut při 6000 x g nebo 10 minut při 10000 x g.

#### Manuální izolace:

1. Supernatant odsajte. Pelet rozsuspendujte v 200 µl roztoku MI3 z kitu EliGene® Urine Isolation Kit a 180 µl vody pro molekulární biologii, přidejte 10 µl Proteinázy K a 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01). 15 vteřin vortexujte a pokračujte dle standardního protokolu ke kitu EliGene® Urine Isolation Kit.
2. Eluci provádějte do 50 µl elučního pufru. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

#### Automatická izolace:

1. Otevřete zkumavky a opatrně odsajte supernatant. Rozsuspendujte pelet vortexováním v 180 µl PBS pufru a přidejte 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01).
2. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO **BodyFluid DNA/RNA isolation kitu** podle protokolu pro vzorky plasmu s elucí do 50 µl elučního pufru.

#### Aspirát z nosohltanu (NPA), sputum:

Vzorek NPA a sputa homogenizujte přidáním stejného objemu mukolytického činidla (dithiotreitol, výsledná koncentrace 4-6 mM). Vzorek před izolací DNA centrifugujte po dobu 15 minut při 6000 x g.

#### Manuální izolace:

1. Supernatant odsajte. Pelet rozsuspendujte ve 180 µl vody pro molekulární biologii s 200 µl roztoku MI3 z kitu EliGene® Urine Isolation Kit, přidejte 10 µl Proteinázy K a 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01). Vortexujte 15 sekund. Dále pokračujte dle standardního protokolu ke kitu EliGene® Urine Isolation Kit.
2. Eluci provádějte do 50 µl elučního pufru. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

#### Automatická izolace:

1. Otevřete zkumavky a opatrně odsajte supernatant. Rozsuspendujte pelet vortexováním v 200 µl PBS pufru a přidejte 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01).
2. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO **BodyFluid DNA/RNA isolation kitu** podle protokolu pro vzorky plasmu s elucí do 50 µl elučního pufru.



### Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE)
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz
- Zařízení pro Real Time PCR – kit je optimalizován pro přístroje ABI7500 (Applied Biosystems), LightCycler 2.0, LightCycler 480, LightCycler Nano (Roche), RotorGene 6000 nebo RotorGene Q (Qiagen).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný Real Time PCR přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

### Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci *Mycoplasma pneumoniae* je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci interní kontroly O1 je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)

### LightCycler® 2.0 (Roche):

Pro reakci používejte pouze skleněné kapiláry.

**Před použitím EliGene® LC kitů je nezbytné provést spektrální kalibraci pomocí EliGene LC Spectral Calibration Kit 2 (Cat. No. 90099-SC2)! Jakmile byla spektrální kalibrace jednou provedena, je platná až do modernizace přístroje nebo pokud dojde k výměně optiky.**

#### Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C	3 min	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	--------------------	-------------------------

Step 2 - Analysis mode "Quantification", 50 Cycles

95°C	5 s	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"
55°C	20 s	Ramp rate (5°C/s)	Acquisition mode "Single"
72°C	10 s	Ramp rate (20°C/s)	Acquisition mode "None"

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "MPNEU\_UNILC2\_v00.ix0". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

### LightCycler® 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře PCR produkty.

V okně "Detection format" zvolte "Dual Color Hydrolysis probe".

**Nastavte následující teplotní profil:***Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle*

95°C	3 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

*Step 2 - Analysis mode "Quantification", 50 Cycles*

95°C	5 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
55°C	20 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "Single"
72°C	10 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"

*Step 3 - Analysis mode "None", 1 Cycle*

40°C	1 min	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "MPNEU\_UNILC480\_v00.ix0". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

**LightCycler<sup>®</sup> Nano (Roche):**

Pro reakci používejte pouze průhledné stripy.

V menu "Run Settings" vyberte možnosti "Hydrolysis Probes" a "High Quality".

**V "Profile menu" nastavte následující teplotní profil:***Step 1 - Hold*

95°C	3 min	Ramp rate (5°C/s)	
------	-------	-------------------	--

*Step 2 – 3-Step Amplification, 50 cycles*

95°C	5 s	Ramp rate (5°C/s)	
55°C	20 s	Ramp rate (4°C/s)	"Acquire" signal
72°C	10 s	Ramp rate (5°C/s)	

*Step 3 - Hold*

40°C	1 min	Ramp rate (4°C/s)	
------	-------	-------------------	--

V menu "Samples" klikněte na okno "Targets" (okno nahoře vpravo) na ikonu "+" a vyberte FAM barvu jako "Target 1". Znovu klikněte na ikonu "+" a vyberte HEX barvu jako "Target 2". V okně "Samples" (okno nahoře vlevo) klikněte na ikonu "+" a přidejte vaše vzorky. Pak přiřadte vzorkům pozice a označte FAM a HEX jako Unknown sample (Samples) nebo Standard.

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "MPNEU\_UNILCNANO\_v00.ppf". Run Template lze zkopírovat z CD přiloženého v kitu.



### **RealTime System ABI7500FAST (Applied Biosystems):**

Použijte programový modul pro absolutní kvantifikaci (Plate Type "Quantitation-Standard Curve" experiment pro ABI 7500FAST). V případě ABI7500FAST použijte "7500 (96wels)" instrument type.

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C                    3 min

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cycles*

95°C                    5 s

55°C                    20 s      Data collection ON

72°C                    10 s

*Odečet emisního signálu ve druhém kroku při 55 °C.*

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "MPNEU\_UNI\_ABI7500\_v00.edt". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### **RotorGene 6000 nebo Q (Qiagen):**

V okně "New Run" vyberte "Three Step".

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

#### **Nastavte následující teplotní profil:**

*Udržovací fáze (Holding stage)*

95°C    3 min

*Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cyklů*

95°C    5 s

55°C    20 s      Odečet signálu v kanálech "Green", "Yellow"

72°C    10 s

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "MPNEU\_UNIRG\_v00.ret". Run Template lze zkopírovat z CD přiloženého v kitu.

### **Příprava reagentů**

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagenty zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.
- V kroku izolačního protokolu, kdy se k izolovanému vzorku přidává Proteináza K, přidejte také 20 µl interní kontroly 01 (IC DNA 01). V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované DNA těsně před analýzou.

### **Příprava reakčního mixu mimo LightCycler® 2.0 a ABI přístroje**

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s M. pneumoniae UNI Mixem a po rozmrazení přidejte 15 µl Mixu do amplifikační zkumavky nebo destičky a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozukavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.



2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* UNI Mixem a po úplném rozmrazení přidejte 15 µl MasterMixu do amplifikační zkumavky nebo destičky a přidejte 5 µl PC DNA *M. pneumoniae*. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte zkumavky nebo destičky do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### **Příprava reakčního mixu pro LightCycler® 2.0**

1. Příprava MasterMixu: Připravte MasterMix smícháním roztoku Eli Blocker s *M. pneumoniae* UNI Mixem. Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* UNI Mixem a nechte rozmraznout při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce stočte a přidejte 3 µl roztoku Eli Blocker do zkumavky s *M. pneumoniae* UNI Mixem. Propipetujte a krátce stočte.
2. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* MasterMixem a přidejte 15 µl mixu do skleněné kapiláry a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozkušavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.
3. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* MasterMixem a napipetujte 15 µl MasterMixu do skleněné kapiláry a přidejte 5 µl PC DNA *M. pneumoniae*. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte skleněné kapiláry do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

### **Příprava reakčního mixu pro ABI přístroje**

1. Příprava MasterMixu: Připravte MasterMix smícháním barvy ROX s *M. pneumoniae* UNI Mixem. Vezměte zkumavku s *M. pneumoniae* UNI Mixem a nechte rozmraznout při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce stočte a přidejte 3 µl barvy ROX do zkumavky s *M. pneumoniae* UNI Mixem. Propipetujte a krátce stočte.
2. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* MasterMixem a přidejte 15 µl mixu do amplifikační zkumavky nebo destičky a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozkušavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.
3. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s *M. pneumoniae* MasterMixem a napipetujte 15 µl Mastermixu do amplifikační zkumavky nebo destičky a přidejte 5 µl PC DNA *M. pneumoniae*. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

Vložte zkumavky nebo destičky do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.





## Odečet výsledků

### LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche):

RealTime PCR výsledky analyzujte v kanálech 530 a 560 (LightCycler<sup>®</sup> Software 4.X) za použití modulu Qualitative detection (LightCycler<sup>®</sup> Analysis Software).

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma pneumoniae*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (530) u *M. pneumoniae* UNI Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola 01 je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (560) pro *M. pneumoniae* UNI Mix.

Hodnoty Cp odpovídají kvantitě pozitivního výsledku. Hodnota "Score" musí být vyšší než 4.5.

### LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche):

V nabídce "Sample Editor" zvolte možnost "Abs Quant".

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

V okně "Analysis" klikněte na ikonu "Color Comp" a zvolte Universal CC FAM (510)-VIC (580) kalibraci. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu "Calculate".

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma pneumoniae*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510) u *M. pneumoniae* UNI Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola 01 je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580) pro *M. pneumoniae* UNI Mix.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

### LightCycler<sup>®</sup> Nano (Roche):

V nabídce "Analysis" klikněte v okně "Select Analysis" na ikonu "+" a vyberte "Automatic Quantification".

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma pneumoniae*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (510-528) u *M. pneumoniae* UNI Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola 01 je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (530-548) pro *M. pneumoniae* UNI Mix.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

### RealTime systém ABI7500FAST (Applied Biosystems)

V nabídce "Analysis Settings" vyberte možnosti "Automatic Threshold" a "Automatic Baseline" a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma pneumoniae*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (518) u *M. pneumoniae* UNI Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.



Interní kontrola 01 je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (548) pro *M. pneumoniae* UNI Mix.

Hodnoty "Qty" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "result undet." znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

### **RotorGene 6000 nebo Q (Qiagen)- verze 1.7 a vyšší:**

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct".

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma pneumoniae*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green) u *M. pneumoniae* UNI Mixu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola 01 je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (Yellow) pro *M. pneumoniae* UNI Mix.

Hodnoty "Calc. conc." u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

## **Interpretace výsledků**

### **Negativní výsledek**

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM pro *M. pneumoniae* UNI Mix před 45. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně *Mycoplasma pneumoniae* negativní nebo koncentrace bakteriální DNA je pod detekčním limitem soupravy (10 genomových DNA/reakci). Signál pro interní kontrolu musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost *Mycoplasma pneumoniae* infekce, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované DNA *Mycoplasma pneumoniae*.

### **Pozitivní výsledek**

Amplifikační signál ve FAM kanálu (465-510) pro *M. pneumoniae* UNI Mix se objeví před 45. cyklem. *Mycoplasma pneumoniae* DNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je *Mycoplasma pneumoniae* DNA pozitivní.

**Upozornění:** Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Použijte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

### **Inhibovaný vzorek**

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu specifického pro DNA *Mycoplasma pneumoniae* ve FAM kanálu a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX specifického pro Interní kontrolu, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.

## **Kontrolní postup**

Souprava EliGene® *Mycoplasma pneumoniae* UNI Kit zahrnuje interní kontrolu 01 (IC DNA 01) a pozitivní kontrolu (PC DNA *M. pneumoniae*). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby v procesu izolace DNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě, že vzorek je *Mycoplasma pneumoniae* DNA negativní, Cp interní kontroly 01 musí být Cp < 35. V případě silně pozitivních vzorků není interní kontrola obvykle detekována.





Positivní kontrola sleduje správnou funkci MasterMixu. Minimalní Cp pro pozitivní kontrolu musí být 35 nebo méně. Cp vyšší než 35 nemůže být akceptováno a detekce DNA musí být provedena s novým vzorkem. V případě opakovaně vyššího Cp kontaktujte výrobce ELISABETH PHARMACON.

Používejte negativní kontrolu pro každý běh. Jako negativní kontrolu použijte vodu pro molekulární biologii používanou ve vaší laboratoři. Pro negativní kontrolu použijte pipetu pro vzorky DNA.

### Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít vzorek pozitivní na *Mycoplasma pneumoniae*. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

### Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

### Funkční charakteristiky

#### Analytické funkční charakteristiky:

Souprava EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI má vysokou senzitivitu – zachytí 10 genomových nebo plasmidových DNA přidávaných do amplifikačního mixu. Analytická senzitivita soupravy byla ověřena následovně. Byl připraven klonovaný inzert o specifické DNA koncentraci, který byl ředěn tak, aby byly získány požadované koncentrace cílové sekvence. Po přidání lidské DNA do vzorku v obvyklém množství nedošlo k ovlivnění citlivosti metodiky.

**Analytická citlivost** je 10 kopií *Mycoplasma pneumoniae* v reakční směsi.

**Analytická specifita** metody je 100%. Analytická specifita soupravy byla ověřena jednak porovnáním použitých sekvencí primerů a prób s databází všech známých sekvencí DNA (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), jednak přidáním lidské DNA do mastermixu. 50 různých vzorků lidské DNA nezpůsobilo falešně pozitivní výsledek. Falešně pozitivní výsledek nezpůsobilo ani přidání DNA následujících organismů: *B. burgdorferi sensu lato*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. cansasii*, *M. xenopii*, *M. avium*, *M. marinum*, *Mycoplasma hominis and genitalium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus faecalis*, rod *Pseudomonas*, *E. coli*, *A. niger*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Ch. trachomatis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, adenovirus, HBV, EBV, CMV, HSV1, HSV2, VZV.

**Klinická specifita** byla testována na vzorcích lidské krve a séra. 50 vzorků lidské DNA izolovaných z krve a séra neposkytlo falešně pozitivní výsledek.

#### Diagnostické funkční charakteristiky:

V rámci testování funkční charakteristiky EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI kitu bylo analyzováno celkem 50 klinických vzorků. Z těchto 50 klinických vzorků bylo 9 pozitivních. EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI kit vyhodnotil 9 vzorků jako pozitivních. Celkem 41 klinických vzorků bylo kitem EliGene<sup>®</sup> Mycoplasma pneumoniae UNI vyhodnoceno jako negativní.

Senzitivita: 100%

Specifita: 100%



### Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci  $10^1$ – $10^8$  *Mycoplasma pneumoniae* DNA molekul v reakční směsi.

### Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.

### Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Negativní výsledek nevylučuje přítomnost *Mycoplasma pneumoniae* infekce, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované DNA *Mycoplasma pneumoniae*.

### Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

### Upozornění

Po smíchání je MasterMix stabilní po dobu 2 týdnů při  $-20$  °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

### Obecná varování a bezpečnostní opatření

#### Tento kit je určen pouze pro *in vitro* použití

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při  $121$  °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započatím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!



- Nepoužívejte reagenty ze souprav jiných výrobců!

### **Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii**

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagenty musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

### **Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy**

- Mikrozkušavky obsahující mixy (M. pneumoniae UNI Mix) jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkušavky obsahující IC DNA 01 a PC DNA M. pneumoniae jsou určeny pouze pro jedno použití.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

**P280** Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

**P281** Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

### **Literatura**

Sánchez-Vargas FM, Gómez-Duarte OG. 2008. Mycoplasma pneumoniae-an emerging extra-pulmonary pathogen. Clin Microbiol Infect. 14(2):105-17.



## Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

## Výrobce

**ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.**

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: [info@elisabeth.cz](mailto:info@elisabeth.cz)