



REF

EliGene® STD GAR/URE/MYC RT**90089-RT (pro 50 stanovení)****Složení soupravy:**

5 x 150 µl **STD 1 Mix**
2 x 50 µl **PC DNA STD 1**
5 x 200 µl **IAC DNA**
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® STD GAR/URE/MYC RT** slouží k DNA diagnostice patogenních druhů *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Gardnerella vaginalis* z izolované DNA.

Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci DNA jsou použity specifické primery a duálně značené fluorescenční sondy.

Kanál	FAM	HEX	Texas Red	Cy5
DNA cíl	Ureaplasma	IAC	Mycoplasma	Gardnerella

Obecný úvod

Mycoplasmy jsou bakterie patřící do rodiny *Mycoplasmataceae*, která je tvořena skupinou mikroorganismů, které mohou být zodpovědné za onemocnění respiračního a genitálního traktu. Tyto bakterie jsou nalézány přibližně u 70 % sexuálně aktivních jedinců.

Mycoplasma hominis je asociována se zánětlivými onemocněními v rámci pánve, bakteriální vaginózou, poporodními horečkami, sepsemi a infekcemi centrálního nervového systému vedoucích k vážným následkům.

Mycoplasma genitalium jsou silné důkazy o její roli u nechlamydiových a negonokokálních uretritid (NCNGU) v případě mužů a cervicitid v případě žen.

Ureaplasmy jsou součástí rodiny *Mycoplasmataceae*. Mají kulovitý tvar, jedná se fakultativní anaerobní mikroorganismus, který charakteristicky postrádá buněčnou stěnu. Charakteristickým rysem tohoto mikroorganismu je syntéza ureázy. **Ureaplasmy** kolonizují spodní část urogenitálního traktu u mnoha zdravých osob bez příznaků, na druhou stranu mohou způsobovat uretritidy, endometritidy, chorioamnionitidy, spontánní potraty, artritidy, močové kameny, bakteriémie a meningitidy a také nízkou porodní váhu. Klinické studie potvrdily, že děti narozené infikovaným matkám bývají touto bakterií také infikovány a mívají kolonizován dýchací trakt, což je posléze asociováno s pneumoniemi, problémy s dýcháním a meningitidami. *Ureaplasma sp.* je u mužů hlavním původcem negonokokových a nechlamydiálních uretritid, akutních prostatitid a získaných artritid.

Gardnerella vaginalis jsou gramvariabilní pleomorfní tyčky rostoucí v atmosféře obohacené oxidem uhličitým



(5–10 %) nebo v mikroaerofilní atmosféře nebo u některých kmenů pouze v anaerobních podmínkách. Kultivační vyšetření z důvodu nesnadné kultivace často vede k falešně negativním výsledkům, a proto je PCR vyšetření nejvhodnější metodou pro primární záchyt infekce. U žen se infekce bakterií *Gardnerella vaginalis* projevuje nepříjemným zápachem poševního sekretu, vaginálními záněty, jsou časté záněty močové trubice s bolestmi či nepříjemnými pocity při močení. Výtok může nebo nemusí být přítomen. U mužů se infekce bakterií *Gardnerella vaginalis* projevují jako záněty močové trubice (uretritidy), bolesti při močení, uretrální bolesti nebo nepříjemné pocity v močové trubici. Neléčená infekce může vyústit v zánět prostaty.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Doporučená izolace DNA:

Moč, stěr

Manuální: EliGene® 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 neměňte 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.

Cervikální stěr, výtěr z uretry:

Uvedené vzorky odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek s přepravním médiem (remel MicroTest M4RT Transport nebo remel MicroTest M4 Transport). Vzorky v uvedených kultivačních médiích je nutné přepravovat do laboratoře při 4 °C. Vzorky je možné při 4 °C uchovávat až 7 dní.

Doporučený způsob zpracování vzorků stěrů:

1. Před zahájením izolace DNA vortexujte odběrovou zkumavku po dobu alespoň 10 sekund. Zkumavku otevřete a poté mačkáním tamponu o stěnu zkumavky vymačkejte z tamponu veškerý roztok. Tampon zneškodněte.
2. Odběrovou zkumavku centrifugujte po dobu 15 minut při 6000 x g. Pokud není k dispozici vhodná centrifuga pro odběrové zkumavky, rozpipetujte médium do dvou mikrozkušavek po 1,5 ml a použijte centrifugu pro mikrozkušavky. Mikrozkušavky lze centrifugovat pouze 10 minut při 10000 x g.

Manuální izolace:

1. Supernatant odsajte. K peletu přidejte 200 µl roztoku MI3 z kitu EliGene® Urine Isolation Kit a 180 µl vody pro molekulární biologii a pelet rozsuspendujte důkladným propipetováním (v případě použití dvou mikrozkušavek pro centrifugaci, rozsuspendujte pelet nejdříve v první mikrozkušavce celým objemem pufru s vodou a následně ve druhé). Přidejte 10 µl Proteinázy K a 20 µl interní kontroly (IAC DNA) 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 (IAC DNA).
2. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu podle protokolu pro vzorky plazmy s elucí do 50 µl elučního pufru.



Moč:

Vzorek odebírejte dle standardního protokolu do sterilních zkumavek. Používejte čisté sterilní zkumavky bez konzervačních přísad. Vzorky moči je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Vzorky je možné při 4 °C uchovávat až 7 dní.

Před izolací DNA je nutné vzorek centrifugovat po dobu 15 minut při 6000 x g. Použijte 8–15 ml vzorku moče. **V žádném případě nesnižujte počet otáček ani nezkracujte dobu centrifugace!** V případě, že laboratoř nedisponuje potřebnou centrifugou, je možné vzorek moče rozpipetovat na menší objemy o celkovém objemu minimálně 8 ml.

Manuální izolace:

1. Supernatant odsajte. Zabezpečte, aby před rozsuspendováním sedimentu byla ze zkumavky odsáta veškerá moč! 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 (IAC DNA). Vortexujte 15 sekund. Dále pokračujte dle standardního protokolu ke kitu EliGene® Urine Isolation Kit.
2. Eluci provádějte do 100 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 (IAC DNA).

UPOZORNĚNÍ: Zbytek moči ve zkumavce může ovlivnit čistotu izolované DNA.

2. Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO BodyFluid DNA/RNA isolation kitu podle protokolu pro vzorky plazmy 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 QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný Real Time PCR přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

Konfigurace RealTime PCR přístroje

Při použití soupravy se řiďte manuálem výrobce daného cycleru. Níže je uveden seznam cyclerů, které byly použity při testování EliGene® STD GAR/URE/MYC RT kitu.

- Pro detekci *Ureaplasma (urealyticum, parvum)* je použita sonda značená FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci *Mycoplasma (hominis, genitalium)* je použita sonda značená TexasRed (exc. 589 nm – em. 615 nm)
- Pro detekci *Gardnerella vaginalis* je použita sonda značená Cy5 (exc. 650 nm – em. 670 nm)
- Pro detekci interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)



QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako reportér vyberte barvy FAM (Ureaplasma) a VIC/HEX (IAC DNA), ROX (Mycoplasma), Cy5 (Gardnerella) a jako pasivní referenční barvivo zvolte NONE.

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 10 s Ramp rate (1.6°C/s)

55°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 30 s Ramp rate (1.6°C/s)

Post-Read Stage

40°C 1 min Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene_STD1_QS5_v00.edt". Run Template může být importován do softwaru z CD přiloženého v kitu.

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V úvodní možnosti "Startup Wizard" založte "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 95°C 2 min

Step 2 95°C 10 s

Step 3 55°C 20 s + Plate Read

Step 4 67°C 30 s

Step 5 GOTO Step 2 44x

Step 6 40°C 60 s

Doplňte "Sample Volume" na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 3 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX, TxRed, Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene STD1_CFX96_v00.pcr1" anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

MIC qPCR (Bio Molecular Systems Pty Ltd):

V Run Setup vytvořte nový Run Profile pro daný přístroj MIC. Zadejte objem vzorku 20 µl a Temperature Control "Fast TAQ (v3)".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cycles



95°C 10 s

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

67°C 30 s

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 60 s

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene_STD1_MIC_v00.mictemplate". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Příprava reagensií

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie 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 (IAC DNA). V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované DNA těsně před analýzou.
- Pokud nespoteřebujete celý objem MasterMixu, skladujte zkumavku v temnu při teplotě 4°C až 14 dní. Pro dlouhodobé skladování použijte mrazák (-20 °C, tma). MasterMix by neměl projít více než pěti cykly zmrazení-rozmrazení.

Příprava reakčního mixu pro přístroje QuantStudio 5, CFX96 a MIC qPCR

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s STD 1 Mixem a po rozmrazení napipetujte 15 µl Mixu do každé amplifikační zkumavky nebo jamky a přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků.
2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s STD 1 Mixem a po úplném rozmrazení napipetujte 15 µl MasterMixu do amplifikační zkumavky nebo jamky a přidejte 5 µl PC DNA STD 1. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol!

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

Odečet výsledků

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analyse Settings" edituje původní parametry pro Ct u jednotlivých kanálů (FAM, VIC, ROX, Cy5) zadejte hladinu Threshold u jednotlivých kanálů na hodnotu rovnající se **1/3 maximální intenzity pozitivní kontroly**, zvolte možnost "Automatic Baseline" a analyzujte výsledky kliknutím na možnost "Apply".

Pozitivní výsledek pro *Ureaplasma urealyticum/parvum*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma hominis/genitalium*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v ROX kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro *Gardnerella vaginalis*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve Cy5 kanálu. V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde

Interní kontrola (IAC DNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve VIC (HEX) kanálu.



CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Setting“ a vyberte „Baseline Subtracted Curve Fit“ a možnost „Apply Fluorescence Drift Correction“.

Poté v okně "Data Analysis" vyberte jednotlivé fluorofory (FAM, HEX, TxRed, Cy5) kliknutím na box s jejich označením pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek pro *Ureaplasma urealyticum/parvum*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (em. 518 nm). V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma hom/gen*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve TexasRed kanálu (em. 615 nm). V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde.

Pozitivní výsledek pro *Gardnerella vaginalis*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve Cy5 kanálu (em. 670 nm). V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde

Interní kontrola (IAC DNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (em. 548 nm).

MIC qPCR (Bio Molecular Systems):

Pro zobrazení a analýzu naměřených dat, klikněte na malý křížek vedle Cyklování v modulu Analýza a poté vyberte cíl – Non-Assay Green (FAM), Non-Assay Yellow (HEX), Non-Assay Orange (TxRed) a Non-Assay Red (Cy5). V pravém dolním rohu zvýšte „Fluorescence Cut-off Level“ na 20 %. Pro každou pozitivní jamku se zobrazí hodnota kvantifikačního cyklu (Cq). Toto je číslo cyklu, při kterém fluorescence vzorku stoupne nad prahovou hodnotu (červená vodorovná čára v dolní části grafu amplifikační křivky). V panelu „Samples“ na pravé straně klikněte na názvy vzorků, chcete-li skrýt nebo zobrazit související amplifikační křivky a výsledky.

Pozitivní výsledek pro *Ureaplasma urealyticum/parvum*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v „Green channel“. V případě negativních výsledků k amplifikaci nedojde.

Pozitivní výsledek pro *Mycoplasma hom/gen*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v „Orange channel“. V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde.

Pozitivní výsledek pro *Gardnerella vaginalis*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v „Red channel“. V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde

Interní kontrola musí být amplifikována v každém vzorku. Amplifikace Interní kontroly je charakterizována růstem fluorescenčního signálu v „Yellow channel“.

Interpretace výsledků

Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM, TxRed, nebo Cy5 před 40. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní na přítomnost DNA *Mycoplasma (hom/gen)*, *Ureaplasma (urealyticum/parvum)* a *Gardnerella vaginalis*, nebo je jejich koncentrace pod detekčním limitem soupravy (10 genomových DNA/reakci). Signál pro interní kontrolu musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost výše zmíněných patogenů a případné infekce, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované DNA.



Pozitivní výsledek

Amplifikační signál ve FAM kanálu (494- 518 nm) pro STD 1 Mix se objeví před 40. cyklem. *Ureaplasma urealyticum/parvum* byla detekována ve vzorku. Vzorek je *Ureaplasma urea/parvum* DNA pozitivní.

Amplifikační signál ve TexasRed kanálu (589 - 615 nm) pro STD 1 Mix se objeví před 40. cyklem. *Mycoplasma hominis/genitalium* DNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je *Mycoplasma hom/gen* DNA pozitivní.

Amplifikační signál ve Cy5 kanálu (650 - 670 nm)) pro STD 1 Mix se objeví před 40. cyklem. *Gardnerella vaginalis* DNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je *Gardnerella vaginalis* DNA pozitivní.

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte 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 amplifikačních signálů specifických pro DNA výše zmíněných patogenů 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® STD GAR/URE/MYC RT** zahrnuje interní kontrolu (IAC DNA) a pozitivní kontrolu (PC DNA STD 1).

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 negativní, Cp interní kontroly musí být Cp < 35.

Pozitivní 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 hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Gardnerella vaginalis* DNA. 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® STD GAR/URE/MYC RT má vysokou senzitivitu – zachytí 10 genomových nebo plasmidových DNA přidaných 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. Souběžná analýza více patogenů v jedné reakční směsi neovlivnila výsledek stanovení.

Analytická citlivost je 10 kopií *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Gardnerella vaginalis* DNA v reakční směsi.

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*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *A. niger*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Ch. trachomatis*, adenovirus, HBV, EBV, CMV, HSV1, HSV2, VZV.

Klinická specifita soupravy byla testována na klinických vzorcích moče a stěrů z urogenitálního ústrojí mužů a žen. Celkem 40 klinických vzorků (moče a stěry z močopohlavního ústrojí mužů a žen) bylo odebráno v Laboratorním diagnostickém centru ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o., Rokycanova 4437/5, Brno. Jednalo se o vybrané vzorky smíšených infekcí uvedených patogenů. Z nich bylo 29 pozitivních na *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum*, 13 pozitivních na *Mycoplasma genitalium* / *Mycoplasma hominis* a 31 pozitivních na *Gardnerella vaginalis*. Ve srovnání s referenčními metodami bylo dosaženo 100% shody ve výsledcích.

Diagnostické funkční charakteristiky:

Klinická senzitivita a specifita soupravy EliGene® STD GAR/URE/MYC RT je 100 %.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci 10^1 – 10^8 DNA molekul bakterií *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* a *Gardnerella vaginalis* v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola (IAC DNA) 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.

Citlivost detekce DNA závisí na odběru vzorku, způsobu skladování (skladujte při 4 °C) a způsobu zpracování (DNA izolace, den přijetí vzorku, detekce ihned po izolaci).



Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Po smíchání je MasterMix stabilní při -20 °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem více než 5x. Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- 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 započetím 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 reagensy 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 reagensy 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 jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkušavky obsahující IAC DNA a PC DNA STD 1 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.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Literatura

Edberg A, Jurstrand M, Johansson E, Wikander E, Höög A, Ahlqvist T, Falk L, Skov J, Fredlund H. 2008. A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens from men and women. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 304–309

Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. 2004. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiology*, 4:35

Simpson T, Oh MK. 2004. Urethritis and cervicitis in adolescents. *Adolesc Med Clin*. 15(2):253-71

Le PT, Hamasuna R, Matsumoto M, Furubayashi K, Hatanaka M, Kawai S, Yamaguchi T, Uehara K, Murakami N, Yoshioka M, Nakayama K, Shiono Y, Muraoka K, Suzuki M, Fujimoto N, Matsumoto T. The detection of microorganisms related to urethritis from the oral cavity of male patients with urethritis. *J Infect Chemother*. 2017;23(10):668-673.

Allam AB, Alvarez S, Brown MB, Reyes L. 2011. *Ureaplasma parvum* infection alters filamin A dynamics in host cells. *BMC Infect Dis*. 11:101.

Pinna GS, Skevaki CL, Kafetzis DA. 2006. The significance of *Ureaplasma urealyticum* as a pathogenic agent in the paediatric population. *Curr Opin Infect Dis*. 19(3):283-9

Povlsen K, Jensen JS, Lind I. 1998. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and Biovar Determination by Liquid Hybridization. *J Clin Microbiol*. 36(11):3211–3216

Simpson T, Oh MK. 2004. Urethritis and cervicitis in adolescents. *Adolesc Med Clin*. 15(2):253-71



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