

# GeneProof®

## *Mycobacterium tuberculosis*

### PCR Kit

CE

### *in vitro* Diagnostics

Souprava je určena pro profesionální použití ve specializovaných klinických a výzkumných laboratořích.

### Složení soupravy

| Cat. No.  | Interní standard je součástí MasterMixu<br>pro kontrolu inhibice |                          |                           | Obsahuje interní standard samostatně<br>pro kontrolu inhibice a izolačního procesu |                          |                           |
|---|--|--------------------------|---------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
|   | MT/ISIN/025<br>25 reakcí   | MT/ISIN/050<br>50 reakcí | MT/ISIN/100<br>100 reakcí | MT/ISEX/025<br>25 reakcí   | MT/ISEX/050<br>50 reakcí | MT/ISEX/100<br>100 reakcí |
| <b>MASTERMIX</b><br><i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                     | 1 x 750 µl   | 2 x 750 µl               | 4 x 750 µl                | 1 x 750 µl   | 2 x 750 µl               | 4 x 750 µl                |
| <b>POSITIVE CONTROL</b><br><i>Mycobacterium tuberculosis</i><br>10 <sup>2</sup> copies/µl | 1 x 200 µl   | 1 x 200 µl               | 2 x 200 µl                | 1 x 200 µl   | 1 x 200 µl               | 2 x 200 µl                |
| <b>INTERNAL STANDARD</b><br><i>Mycobacterium tuberculosis</i>                             | -  | -                        | -                         | 1 x 1000 µl  | 1 x 1000 µl              | 2 x 1000 µl               |

### Podmínky skladování a přepravy

Souprava je doporučeno přepravovat při teplotách v rozmezí -20 °C až -80 °C. Souprava je stabilní při teplotě -20°C 9 měsíců od data výroby. Opětovné zmrazování a rozmrazování MasterMixu, Interního standardu anebo Pozitivní kontroly může vést ke snížení kvality detekce. Výrobce proto doporučuje připravený MasterMix rozalíknotovat po 30 µl přímo do PCR zkumavek a takto skladovat při -20 °C. Pozitivní kontrolu a interní standard je možné skladovat při 4 °C.

## Informace o patogenu

*Mycobacterium tuberculosis* je původcem závažného respiračního onemocnění - tuberkulózy. Význam tohoto onemocnění v současnosti stoupá v souvislosti s výskytem nových multirezistentních kmenů, se vzrůstajícím počtem imunodeficientních pacientů a v souvislosti se zvýšenou migrací populace. Infekce je lokalizována převážně v plicích a mykobaktérie je možno prokázat ve vzorcích sputa, BALu nebo plicní biopsie; známé jsou i netypické lokalizace infekce (basilární meningitida, uzlinová tuberkulóza, urogenitální infekce, infekce kloubů, oční infekce). Vzácné jsou postvaccinační komplikace po aplikaci BCG vakcíny. Klasické testy pro diagnostiku tuberkulózy jsou založeny na technice acidofilního barvení mykobaktérií a mikroskopii a současně konfirmaci kultivací. Tyto tradiční metody jsou časově velmi náročné (kultivace vyžaduje 2-4 týdny) a jejich senzitivita je nízká. Proto se v diagnostice tuberkulózy stávají standardem citlivé a rychlé metody PCR, schopné zachytit i minimální množství mykobaktérií v jakémkoliv klinickém materiálu. *Mycobacterium tuberculosis* je obligátní patogen a pozitivitu PCR vyšetření je třeba posuzovat jako průkaz onemocnění tuberkulózou. Detekce metodou PCR může být negativní v případech mimoplicní lokalizace nebo latentního nosičství a v důsledku neadekvátního odběru klinického vzorku. Problematická může být interpretace dlouhodobě opakovaně pozitivního nálezu (v jakémkoliv typu vzorku) u starších asymptomatických „latentně infikovaných“ pacientů, kde mohou být mykobaktérie přítomny ve velmi nízkých množstvích a nereagují na léčbu. Při interpretaci výsledků PCR po anti-TBC terapii je třeba počítat s možným až několikátýdenním přetrváváním mrtvých mykobaktérií.

## Princip metody

Souprava je určena pro detekci specifické multikopiové inzerční sekvence ITS6110 DNA *Mycobacterium tuberculosis* metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu PCR pomocí fluorescenčně značené sondy (real-time PCR). Souprava umožňuje detekovat všechny kmény spadající do skupiny *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* a vakcinační kmen BCG). Přítomnost *M. tuberculosis* je indikována nárůstem fluorescence FAM fluoroforu. V reakční směsi je zabudován interní standard (IS), kontrolující možnou inhibici PCR reakce a účinnost DNA izolačního procesu. Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro JOE fluorofor. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu a obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty. Senzitivita PCR detekce dosahuje jednotek kopií sekvence IS6110 na reakci. Tato sekvence se vyskytuje v mykobakteriální buňce v mnoha kopiích a tudíž poskytuje velmi citlivý průkaz přítomnosti mykobaktérií ve vzorcích sputa anebo BALu (až 16x citlivější ve srovnání s jednokopiovými geny). Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

PCR soupravy firmy GeneProof jsou konstruovány tak, aby je bylo možno používat na real-time přístrojích různých výrobců. *Mycobacterium tuberculosis* PCR Kit byl validován na následujících přístrojích:

Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science)  
Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science)  
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)  
LightCycler® 2.0 (Roche)  
LightCycler® 480 System (Roche)  
SLAN Real-time Quantitative PCR Fluorescent Detection System (Shanghai Odin Scienc & Technology Co.)

Podrobné informace o použití PCR kitů na konkrétních přístrojích naleznete na [www stránkách výrobce \(www.geneproof.com\)](http://www.geneproof.com) anebo si je vyžádejte u dodavatele souprav.

Pro použití soupravy na jiných real-time přístrojích kontaktujte prosím výrobce: [support@geneproof.com](mailto:support@geneproof.com)

## Upozornění:

- Souprava je vyrobena v souladu s evropskou Směrnicí Rady 98/79/ES jako diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.
- Při manipulaci s pozitivní kontrolou nebo při práci s klinickým materiálem dbejte zvýšené opatrnosti, při nesprávné manipulaci by mohlo dojít ke kontaminaci a tím ke znehodnocení složek soupravy nebo MasterMixu! Za znehodnocení soupravy nesprávnou manipulací nebo skladováním výrobce neručí.
- Soupravu je po použití doporučeno likvidovat podle aktuální právní úpravy s ohledem na skutečnost, že souprava neobsahuje žádné nebezpečné, infekční nebo toxické látky, které by podléhaly zvláštním bezpečnostním předpisům a použité obalové materiály jsou vyrobeny z papíru a z polypropylenu.

## Návod k použití

### Odběr a uchovávání vzorků

Pro průkaz *M. tuberculosis* se odebírají většinou vzorky z respiračního traktu. Infekce zpravidla není diseminovaná, proto průkaz ve vzorcích periferní krve nebývá pro stanovení diagnózy přínosný. Vzorky sputa, bronchoalveolárních laváží, bronchiálních a tracheálních aspirátů, eventuálně biopsií plic (cca 1g), moče (střední proud, ranní moč), kožních ulcerací, hnisu, obsahu abscesů nebo synoviální tekutiny je nutno odebrat sterilně a vložit do zkumavky bez transportních médií. Uchovat nebo transportovat při 4 °C do 48 hodin. Pro delší uchovávání zamrazit na -20 až -80 °C.

### DNA izolace

Izolaci DNA je možno provádět na trhu dostupnými izolačními soupravami dle příslušných protokolů pro izolaci příslušného mikroorganismu. Výrobce doporučuje následující izolační soupravy: PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof).

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard (IS), pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

#### PCR Kit ISIN (Cat. No. MT/ISIN...)

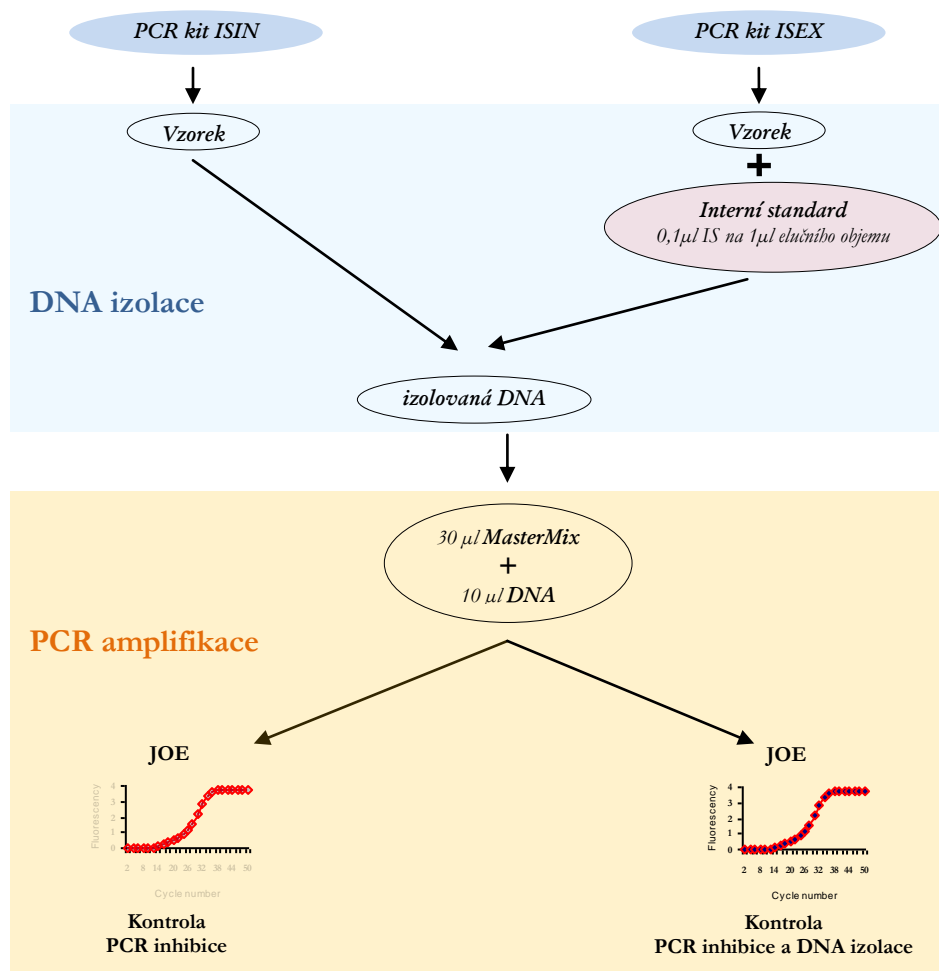
V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přímo součástí zkumavky s MasterMixem. Tato varianta kitu umožňuje účinnou kontrolu inhibice PCR reakce.

#### PCR Kit ISEX (Cat. No. MT/ISEX...)

V této variantě PCR kitu je interní standard (IS) přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít jak ke kontrole inhibice PCR reakce, tak i ke kontrole účinnosti izolace DNA.

Při použití ISEX varianty PCR kitů je IS přidáván přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu tak, aby na 1  $\mu$ l výsledného elučního objemu připadlo 0,1  $\mu$ l IS:

| Eluční objem     | 25 $\mu$ l  | 50 $\mu$ l | 100 $\mu$ l | 200 $\mu$ l |
|------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Interní standard | 2,5 $\mu$ l | 5 $\mu$ l  | 10 $\mu$ l  | 20 $\mu$ l  |



## PCR amplifikace

1. Do zkumavky přidat **30 µl MasterMixu** a **10 µl izolátu DNA** nebo **10 µl Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 40 µl.
2. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

### Amplifikační program:

|                      |   |
|----------------------|---|
| UDG dekontaminace    | 37 °C/2 min.                                  |
| počáteční denaturace | 95 °C/10 min.                                 |
| denaturace           | 95 °C/5 sec.                                  |
| annealing            | 60°C/ 40 sec. – čtení fluorescenčního signálu |
| extenze              | 72°C/ 20 sec.                                 |
| počet cyklů          | 45  |

## Kvalitativní vyhodnocení detekce

