

MycoReal[®] Kit *Candida* & *A. fumigatus*

Kitversion 1.1

Gebrauchsanweisung



CE

IVD

In-vitro-Diagnostikum

REF

DHUF00153

Σ

50 Reaktionen



ingenetix GmbH
Haidingergasse 1
1030 Vienna, Austria
T +43(0)1 36 198 01
office@ingenetix.com
www.ingenetix.com

Inhaltsverzeichnis

1	Zweckbestimmung	3
2	Produktbeschreibung	3
3	Erregerinformation.....	4
4	Grundprinzip der real-time PCR	4
5	Inhalt, Stabilität und Lagerung.....	5
6	Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	5
7	Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise	6
7.1	Generelle Hinweise	6
7.2	Spezifische Hinweise	6
8	Grenzen des Verfahrens	7
9	Vorbereitung der Proben	8
9.1	Probeentnahme und Lagerung.....	8
9.2	Empfohlene Extraktionsmethoden.....	8
9.2.1	Extraktion von EDTA Blut.....	8
9.3	Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition mit IPC	9
9.3.1	Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und real-time PCR	9
9.3.2	Anwendung der IPC als Qualitätskontrolle für die PCR-Reaktion	9
10	Vorbereitung der real-time PCR	9
10.1	Pipettierschema.....	10
10.2	Programmierung des Temperaturprofils.....	11
11	Interpretation der Daten.....	12
11.1	Kontrollen	13
11.2	Klinische Proben	14
12	Troubleshooting.....	15
12.1	Kein pathogenspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC	15
12.2	Erreger-Signal in der Negativkontrolle.....	15
12.3	Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion.....	15
12.4	IPC spezifisches Signal mit PCR Negativkontrolle und Positivkontrolle	15
12.5	Kein Signal mit IPC und kein pathogenspezifisches Signal in Probe	15
13	Spezifikation und Evaluierung der Testperformance	17
13.1	Testperformance auf verschiedenen real-time PCR Geräten.....	17
13.2	Nachweisgrenze, LoD95%	18
13.3	Linearität und dynamischer Range	19
13.4	Analytische Spezifität	20
13.5	Inter-Assay-Präzision	22
13.6	Klinische Validierung	22
14	Literatur	23
15	Änderungsindex	23

HINWEIS AN DEN KÄUFER: BESCHRÄNKTE LIZENZ

Die in diesem Produkt enthaltene MGB-Sonde ist Gegenstand eines oder mehrerer der nachfolgenden Patente aus den USA und den jeweils entsprechenden Patenten außerhalb der USA: 5,801,155 und 6,084,102, und wird unter einer Lizenz der ELITech Group verkauft. Der Erwerb dieses Produkts beinhaltet eine Lizenz zur ausschließlichen Verwendung dieser Produktmenge für die eigene Nutzung des Käufers im Bereich der menschlichen in-vitro-Diagnose (gemäß den anwendbaren FDA- und anderen gesetzlichen Anforderungen) und darf nicht für andere kommerzielle Zwecke, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Umverpackung und Weiterverkauf, verwendet werden.

Erklärung der Symbole



Chargenbezeichnung



Katalognummer



Ausreichend für "n" Prüfungen



Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für *in-vitro* Diagnostika



Gebrauchsanweisung beachten



Vor Sonnenlicht schützen



Verwendbar bis



Hersteller



Temperaturgrenzwerte (Aufbewahrung bei)



In-vitro-Diagnostikum



Eindeutige Produktidentifizierung



Inhalt

1 Zweckbestimmung

MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* ist ein nicht automatischer IVD real-time PCR Test zum qualitativen Nachweis der DNA (ITS2 Region) von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (= *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis*), *C. parapsilosis* group, *C. tropicalis* und *Aspergillus fumigatus*.

Geeignete Untersuchungsmaterialien sind DNA-Extrakte isoliert aus humanen Proben von EDTA-Blut, Liquor, BAL, Punktaten, Aspiraten, Gewebe oder Paraffinschnitten.

Dieser Test ist für Patienten mit Verdacht auf einer *Candida* oder *Aspergillus* Infektion geeignet und dient in Kombination mit der Krankengeschichte und zusätzlichen klinischen Informationen zur Unterstützung der Diagnose einer Infektion mit diesen Erregern.

Der Test ist für den professionellen Gebrauch bestimmt und darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.

2 Produktbeschreibung

MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* ist ein real-time PCR Test und detektiert einen Teil der ITS2 Region (Internal Transcribed Spacer 2) von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. parapsilosis* group (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*), *C. tropicalis* oder *A. fumigatus*. Die ITS2 Region ist ein multi-copy Gen und aufgrund ihrer hohen Spezies-Spezifität optimal für die Differenzierung einzelner Spezies geeignet.

Die Analyse wird in zwei parallelen PCR-Ansätzen (Module 7, Module 8) durchgeführt und erlaubt somit die Differenzierung einzelner Spezies (siehe Tabelle 1), was eine gerichtete antimykotische Therapie ermöglicht.

Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM bzw. VIC zeigt die Amplifikation der spezifischen DNA. Die interne DNA Positivkontrolle (IPC) wird im Cy5 Kanal und dient als Kontrolle der DNA Extraktion und möglicher real-time PCR Inhibition. Das Target für die DNA IPC (artifizielle Target DNA) wird während der Probenextraktion zugegeben.

Für die Analyse von Blut sollten mindestens 500 - 1000 µl Blut extrahiert werden. Der Kit ist für Probenvolumina bis zu 9 µl geeignet.

Eine Übersicht der Detektionskanäle ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht Detektion

	FAM Kanal	VIC Kanal	CY5 Kanal
Module 7 Assay Mix	<i>C. parapsilosis</i> group	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	IPC
Module 8 Assay Mix	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Fast Real-time PCR System (Fast Cycle Parameter werden nicht unterstützt, Thermo Fisher Scientific) und mit dem cobas z 480 Analyzer (Roche) validiert. Er eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren können (z.B. QuantStudio™ 5, QuantStudio™ 7 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific), qTOWER³G (Analytik Jena), Mic instrument (bio molecular systems), LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics).

Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, muss eine Evaluierung der Multiplex-PCR durchgeführt werden. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Ingenetix MycoReal®, BactoReal®, ViroReal®, PanReal und ParoReal® Kits sind darauf optimiert, mit dem gleichen Temperaturprofil den Nachweis von DNA und RNA in einem PCR Lauf zu ermöglichen.

3 Erregerinformation

Vertreter der Gattung *Candida* sind Hefepilze, die Pilzinfektionen (Candidosen) auslösen können. *Candida* kann sowohl opportunistische Infektionen der Haut und Schleimhaut als auch invasive Infektionen verursachen. Die Mehrheit der *Candida*-Infektionen wird durch *C. albicans* und *C. glabrata* verursacht. Weniger häufig sind Infektionen durch *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* und *C. kefyr*. Bei Patienten mit stark eingeschränktem Immunsystem, schwerer Grundkrankheit oder Intensivpatienten können invasive Candidosen auftreten, wobei der Erreger in Biopsien von dem betroffenen Organ oder im Blut nachgewiesen werden kann. Dabei ist jedoch zu beachten, dass *Candida* auch als Bestandteil einer Transientflora vorkommen kann, ohne dass eine Infektion vorliegen muss. Daher ist der positive Pilznachweis in Untersuchungsmaterialien, die nicht aus sterilen Körperarealen stammen, ohne Kenntnis anderer Parameter bei Risikopatienten schwierig zu interpretieren. Die invasive Candidose ist nach wie vor eine wichtige Todesursache bei gefährdeten Patienten

Aspergillen sind ubiquitär vorkommende Schimmelpilze, die neben Allergien auch Infektionen (Aspergillosen) auslösen können. Das Genus *Aspergillus* beinhaltet über 300 Spezies, wobei die Mehrheit der *Aspergillus*-Infektionen durch *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. terreus* verursacht wird. Weniger häufig sind Infektionen durch *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ustus* und andere Spezies. Studien zeigten, dass auch andere Mitglieder des *A. fumigatus* Komplexes Infektionen verursachen können. Die meisten invasiven Aspergillosen betreffen den Respirationstrakt. Pilzpneumonien hervorgerufen durch *Aspergillus* sind besonders bei stark abwehrgeschwächten Patienten, wie z.B. Leukämie-Patienten oder Patienten nach Knochenmarkstransplantation gefürchtete Infektionen, die mit einer sehr hohen Letalität verlaufen können. Bei Patienten mit invasiven Aspergillosen kann der Pilz in Biopsien von dem betroffenen Organ oder im Blut nachgewiesen werden.

Der raschen und frühzeitigen Diagnose einer Pilzinfektion kommt eine besondere Bedeutung bezüglich der Überlebens- und Heilungsraten zu. Nicht nur der Nachweis, sondern auch die genaue Identifizierung der Pilzspezies ist wichtig. Die Spezies kann Auskunft darüber geben, ob eher eine Kontamination, Besiedelung oder eine Infektion vorliegt und gibt auch Informationen über ein mögliches Resistenzverhalten. So ist *C. krusei* intrinsisch resistent gegenüber Fluconazol und in geringerem Ausmaß auch gegenüber Amphotericin B. *Candida glabrata* ist in der Regel weniger empfindlich gegenüber Fluconazol als andere *Candida* Spezies.

4 Grundprinzip der real-time PCR

Der Test basiert auf der Multiplex real-time Polymerase-Kettenreaktion mittels 5'-Nuklease-Assay Technologie. Dazu werden spezifische DNA-Bereiche amplifiziert und die generierten PCR-Produkte mit Hilfe fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-Sonden detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Während der PCR werden Primer mittels *Taq*-Polymerase verlängert und die mit dem Target hybridisierten Sonden durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase gespalten. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz der Sonde mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird im real-time PCR Gerät im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus bei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen erfasst.

Der Cq-Wert (Cq = Quantification cycle, Ct = Cycle threshold, Cp = Crossing point) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

5 Inhalt, Stabilität und Lagerung

Tabelle 2

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
Module 7 + IPC3 Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonden für Detektion von - <i>C. parapsilosis</i> group (FAM) - <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> (VIC) - DNA IPC (Cy5)	1 x 50 µl	-25 bis -15 °C
Module 8 + IPC3 Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonden für Detektion von - <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i> (FAM) - <i>A. fumigatus</i> (VIC)	1 x 50 µl	-25 bis -15 °C
IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss)	Target für DNA IPC (internes DNA Positivkontrollsystem)	1 x 200 µl	-25 bis -15 °C
Module 7-8 Positive Control (roter Verschluss)	DNA Positivkontrolle für <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>C. albicans</i> + <i>A. fumigatus</i> (à ca. 1.000 Targetkopien/µl)	1 x 500 µl	-25 bis -15 °C
DNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	PCR Reaktionsmix für DNA Amplifikation	2 x 500 µl	-25 bis -15 °C nach Anbruch 2 bis 8 °C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-25 bis -15 °C

DNA Reaction Mix

Der mitgelieferte DNA-Amplifikationsmix ist für zuverlässige, hoch-sensitive real-time PCR ausgelegt. Der Master Mix enthält eine hoch gereinigte rapid hot-start Taq DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und Uracil-N Glycosylase (UNG) um eine Amplicon Verschleppung zu verhindern, ROX™ Farbstoff als passive Referenz und Pufferkomponenten – Additive optimiert auf den Umgang mit RT-PCR Inhibitoren.

Lieferung und Haltbarkeit

Die Lieferung des Kits erfolgt mit Coolpacks oder auf Trockeneis. Bei sachgemäßer Lagerung sind die Kitkomponenten bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar. Dies gilt auch nach Anbruch. Kit vor Licht geschützt lagern.

Qualitätskontrolle Freigabetestung

In Übereinstimmung mit dem ISO 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von ingenetix wird jede Charge anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit Plasmiden, welche Teile der Erreger DNA enthalten.

6 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion, die für die Extraktion des angeführten Probenmaterials geeignet sind (siehe 9. Vorbereitung der Proben)
- Nuklease-freies Wasser
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten (einstellbar)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann (siehe 2. Produktbeschreibung)

- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit zugehörigem (optischen) Verschlussmaterial
- Optional: Laminar-Flow-Sterilbank
- Optional: PCR-Workstation

7 Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

7.1 Generelle Hinweise

- In-vitro-Diagnostikum: Dieses Produkt darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Der Transport von klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport von Biologischen Stoffen entsprechen.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie puderfreie Einweghandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Eine unsachgemäße Entnahme, Beförderung oder Lagerung der Proben kann die Fähigkeit des Assays zum Nachweis der Zielsequenzen beeinträchtigen.
- Die Qualität der DNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete DNA-Extraktionssystem mit real-time PCR Technologie kompatibel ist.
- Das real-time PCR Gerät sollte regelmäßig kalibriert, gewartet und gereinigt werden.
- Kitkomponenten sollten vor Licht geschützt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden. Beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.

7.2 Spezifische Hinweise

Es muss ein Arbeitsablauf eingehalten werden, der falsch positive Ergebnisse aufgrund von Detektion kontaminierender DNA verhindert.

Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen:

- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation nötig. Materialien und Geräte müssen den einzelnen Arbeitsplätzen zugeordnet sein, um den Arbeitsablauf von Prä- zu Post-PCR im Labor zu gewährleisten.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Probenaufbereitung sollte in einer Laminar-Flow-Sterilbank erfolgen. Laminar-Flow-Sterilbank regelmäßig in allen Bereichen reinigen.
- Die Vorbereitung der real-time PCR sollte in einer PCR-Workstation erfolgen.
- Nach Möglichkeit Verbrauchsmaterialien und Pipetten in der Laminar-Flow-Sterilbank und in der PCR-Workstation belassen.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen ist erforderlich.
- Nur DNA-freie Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Labormantel tragen.
- Nur mit puderfreien Einweghandschuhen arbeiten, beim Anziehen die Handfläche und Finger der Handschuhe außen nicht berühren. Handschuhe öfters wechseln. Um Hautkontakt zu vermeiden, Handschuhe über die Ärmel des Labormantels ziehen. Eventuell Einweg-Ärmelschoner verwenden.
- Nicht den Rand oder das Gewinde von offenen Reagenzgefäßen berühren.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Lagern Sie positives oder potenziell positives Material separat von allen anderen Reagenzien.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse muss eine Negativkontrolle während der DNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Erreger DNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Optional: In jedem PCR-Lauf kann eine PCR-Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe, NTC) mitgeführt werden.

8 Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse mit diesem Test sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport und Lagerung der Proben sowie eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens gewährleistet.
- Das Extraktionssystem muss die Extraktion von Pilzzellen gewährleisten und frei von Pilz DNA sein.
- Dieser Kit wurde für EDTA-Blut, Liquor, BAL, Punktate, Aspirate, Gewebe oder Paraffinschnitten validiert. Die Testleistung mit anderen Probenotypen wurde noch nicht bewertet.
- Dieser Test ist nur für Proben geeignet, die von normalerweise sterilen/halbsterilen Stellen entnommen wurden.
- Bei geringer Konzentration von Leukozyten im Blut kann es zu einem Verlust der Erreger-DNA bei der Extraktion kommen.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *Candida* oder *A. fumigatus* Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden können. PCR Inhibitoren können zu einem ungültigen Ergebnis führen.
- Vorhandene Sequenzvariabilitäten der Primer oder Sonden Region können zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen.
- Ergebnisse müssen mit anderen Laborwerten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

9 Vorbereitung der Proben

MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* eignet sich für die Untersuchung von DNA-Extrakten aus EDTA-Blut, Liquor, BAL, Punktaten, Aspiraten, Gewebe oder Paraffinschnitten.

Die Probenaufbereitung sollte mit den empfohlenen Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen erfolgen (siehe Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise). Es muss immer eine DNA-Extraktion Negativkontrolle (NTC) mitgeführt werden (Wasser anstelle von Probenmaterial).

Gereinigte DNA sollte bei -25 bis -15 °C gelagert werden.

9.1 Probeentnahme und Lagerung

Liquor, BAL, Punktate, Aspirate können in Mikrozentrifugenröhrchen aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, die Proben sofort nach der Entnahme zu verarbeiten. Lagern Sie die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als 48 Stunden oder frieren Sie diese bei -20/-80 °C ein.

Blut muss in EDTA-Röhrchen aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, die Proben sofort nach der Entnahme zu verarbeiten. Lagern Sie die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als 48 Stunden oder frieren Sie diese bei -20/-80 °C ein.

Gewebeproben können in Mikrozentrifugenröhrchen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (ca. 100 µl) bei 2-8 °C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. Wenn die Probenverarbeitung innerhalb von 48 Stunden nicht gewährleistet ist, muss die Probe sofort trocken und ohne Zusatzstoffe bei -20/-80 °C gelagert werden.

9.2 Empfohlene Extraktionsmethoden

Stellen Sie sicher, dass das angewendete Extraktionssystem nicht mit DNA von Erregern kontaminiert ist, welche mit MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Extrahieren Sie die Probe mit einem DNA-Extraktionssystem, das mit der real-time PCR Technologie kompatibel ist und für die Extraktion des Probenmaterials geeignet ist. Das Extraktionssystem muss die Extraktion von Pilzzellen gewährleisten. Die Effizienz der Extraktion von Pilz-DNA kann durch mechanische Lyse mit Beads oder durch 3 bis 5 "Gefrier-/Kochzyklen" unter Verwendung von Flüssigstickstoff oder -80 °C und eines Heizblocks während der Extraktion erheblich gesteigert werden.

Bei der Untersuchung von in Paraffinschnitten ist darauf zu achten, dass nur gewebehaltige Paraffinschnitte verwendet werden.

Für manuelle Extraktion empfohlen

- Modifiziertes Protokoll des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). Nach Inkubation mit Proteinase K: Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C einfrieren (flüssiger Stickstoff ist effektiver), dann für 1 Minute bei 95-100 °C kochen. Wiederholen Sie diese Schritte dreimal.

Für automatisiertes Extraktionsverfahren empfohlen

- innuPREP AniPath DNA RNA – KFFLX Kit (Analytik Jena) mit dem KingFisher FLEX Extraktionsgerät (Thermo Fisher Scientific)

9.2.1 Extraktion von EDTA Blut

Die extrahierte DNA, die untersucht wird, sollte mindestens 50 µl Blut entsprechen (z.B. 500 µl Blut eluiert in 100 µl). Es wird die Extraktion von 1 ml EDTA-Blut in Kombination mit mechanischer Lyse durch Beads empfohlen.

Für automatisierte Extraktionsverfahren für EDTA-Blut empfohlen

- Vorangegangene mechanische Lyse von 1,3 ml EDTA-Blut durch Beads (z. B. MP Biomedicals™ Lysing Matrix E, 2 ml, mpbio) am Magnalyser oder einem anderen Beadbeater (70 sec, 7000 rpm).

- Anschließende Extraktion des Überstands (ca. 800 µl) mit innuPREP AniPath DNA RNA – KFFLX Kit (Analytik Jena) mit einem modifizierten Protokoll für 800 µl Probenvolumen mit dem KingFisher FLEX Extraktionsgerät (Thermo Fisher Scientific).

Bei Verwendung von Extraktionsverfahren, die nicht von ingenetix empfohlen werden, muss eine Evaluierung der Extraktionsmethode durchgeführt werden.

9.3 Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition mit IPC

Ein DNA IPC System (internes DNA-Positivkontrollsystem) dient als Kontrolle für die DNA-Extraktion, identifiziert eine mögliche PCR-Inhibition und bestätigt die Integrität der Kit-Reagenzien.

Hierfür wird eine artifizielle Ziel-DNA (IPC-Target (DNA), ca. 6×10^5 Kopien/ μ l) während der Extraktion zugegeben.

Hinweis: Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und von der Art des Probenmaterials. Negative Proben sollten Cq-Werte der IPC zwischen 27-30 zeigen. Die verwendete Extraktionsmethode muss dementsprechend mit Probenmaterial validiert werden. Setzen Sie das IPC-Target (DNA) frisch verdünnt (1:10 mit Nuklease-freiem Wasser) in die Extraktion ein, falls bei der Validierung mit Proben Cq Werte < 27 ermittelt werden.

9.3.1 Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und real-time PCR

Das IPC-Target (DNA) wird während der Extraktion zugesetzt.

→ Pipettieren Sie pro Probe 1 μ l IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss) direkt zum entsprechenden Volumen an Lysepuffer (oder Zugabe zur Probe nachdem der Lysepuffer zur Probe pipettiert wurde) und setzen Sie dann die Extraktion fort.

Achtung: Das IPC-Target (DNA) darf nicht direkt dem Probenmaterial in Abwesenheit von Lysepuffer zugesetzt werden, da es abgebaut werden könnte. Es muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

9.3.2 Anwendung der IPC als Qualitätskontrolle für die PCR-Reaktion

Wenn das IPC-Target (DNA) nicht während der Extraktion zugegeben wurde, kann es zu einem späteren Zeitpunkt dem PCR-Mastermix zugegeben werden.

→ Verdünnen Sie das IPC-Target (DNA) 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 μ l der Verdünnung/PCR-Reaktion hinzu (ca. 6000 Targetkopien).

Achtung: Das IPC-Target (DNA) darf dem Mastermix nicht unverdünnt zugesetzt werden. unverdünnt zugesetzt werden.

10 Vorbereitung der real-time PCR

- Die Vorbereitung der real-time PCR sollte in einer PCR-Workstation erfolgen (siehe Punkt 7.2).
- Pro PCR-Lauf und Modul müssen eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion und optional eine PCR-Negativkontrolle (NTC, z.B. Nuklease-freies Wasser) mitgeführt werden.
- Generell wird empfohlen, Proben in Duplikaten zu analysieren, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern.
- DNA-Proben auf Eis auftauen.
- Kitkomponenten vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten vorsichtig gemischt und kurz mit niedriger Umdrehungszahl abzentrifugiert.
- Den DNA Reaktionsmix vorsichtig mischen, um eine homogene Lösung zu gewährleisten.
- **Positivkontrolle**
→ Setzen Sie 9 μ l Positivkontrolle ein (roter Verschluss). Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

Module 7-8 Positivkontrolle ist eine Mischung von vier DNA Target Sequenzen für *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans* und *A. fumigatus*.

10.1 Pipettierschema

Die Proben sowie die Positivkontrolle und die Negativkontrolle der Extraktion müssen sowohl mit Module 7 Assay Mix als auch mit Module 8 Assay Mix analysiert werden. Für Blut- und Liquorproben wird empfohlen, 9 µl DNA-Probe zu verwenden.

Analyse mit Module 7:

Ansetzen Master Mix Module 7 (gut durchmischen)	DNA Reaction Mix	Pro Probe 10,0 µl
	Module 7 + IPC3 Assay Mix	1,0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix 1	11,0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	11,0 µl
	DNA-Probe*	9,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl

*Von der Probe können 1-9 µl eingesetzt werden. Bei ≠ 9 µl Probe muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser angepasst werden.

Analyse mit Module 8:

Ansetzen Master Mix Module 8 (gut durchmischen)	DNA Reaction Mix	Pro Probe 10,0 µl
	Module 8 + IPC3 Assay Mix	1,0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix 2	11,0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	11,0 µl
	DNA-Probe*	9,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl

*Von der Probe können 1-9 µl eingesetzt werden. Bei ≠ 9 µl Probe muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser angepasst werden.

→ Falls das IPC-Target (DNA) nicht während der Extraktion zugegeben wurde:

Verdünnen Sie das IPC-Target (DNA) (oranger Verschluss) frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. In diesem Fall dient die IPC zur Qualitätskontrolle der real-time PCR. Es können nur 8 µl DNA-Probe analysiert werden.

Achtung: Bei Verwendung von mehr als 1 µl verdünntem IPC-Target (DNA) pro Reaktion wird die real-time PCR Reaktion möglicherweise inhibiert.

- Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Probenanzahl vor, berechnen Sie dabei ein zusätzliches Volumen von ca. 10% für den Pipettierverlust.
- Pipettieren Sie pro Probe jeweils 11 µl des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte.
- Geben Sie anschließend 9 µl der extrahierten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle zum Schluss.
- Verschließen Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Verschlussmaterial.
- Vortexen Sie die verschlossene Platte für ein 1-2 Sekunden und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

10.2 Programmierung des Temperaturprofils

Weitere Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im Benutzerhandbuch des Herstellers.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Probenvolumen: 20 µl

Ramp speed: Ohne "fast cycling" Parameter für ABI® 7500 Fast Instrument, QuantStudio™ (Thermo Fisher Scientific)

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60 °C
50 °C 2 min	95 °C 2 min	95 °C 5 sec 60 °C 30 sec

Ad Program 1: Falls im selben PCR-Lauf auch virale RNA nachgewiesen werden soll, muss im Programm 1 auf 15 min bei 50 °C verlängert werden. Dieses Temperaturprofil kann für alle ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal®, PanReal und ParoReal® Kits zum Nachweis von DNA oder RNA verwendet werden.

Ad Program 2: Das bisherige Temperaturprofil mit 20 sec in Programm 2 kann nach wie vor verwendet werden.

Ad Program 3: 1 Minute möglich in Kombination mit anderen ingenetix Kits.

Auswahl der Detektionskanäle

	Target 1 FAM-NONE	Target 2 VIC-NONE	Target 3 Cy5-NONE
Module 7 Assay Mix	<i>C. parapsilosis</i> group	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	IPC
Module 8 Assay Mix	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	IPC

Für ABI® 7500 Instrument, QuantStudio™ 5/6/7 (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent)
Passiver Referenzfarbstoff: ROX

Für cobas z 480 Analyzer / LightCycler® 480 II (Roche)

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe

FAM: Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

VIC: Anregung bei 540 / 533 nm, Emission bei 580 nm

Cy5: Anregung bei 610 / 618 nm, Emission bei 670 / 660 nm

Passiver Referenzfarbstoff: kein ROX nötig

Die Color Compensation für FAM und VIC muss nach der Analyse von Cy5 aus der Roche Datenbank ausgewählt werden.

11 Interpretation der Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM und VIC Kanal für das Erreger Target und Cy5 Kanal für die IPC.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen bei der Verwendung einer Multiplex-PCR eine Color Compensation benötigen.

Wichtig: Die Proben sollten sowohl in der logarithmischen (Roche Gerät: Abs Quant/Fit Points) als auch linearen Ansicht überprüft und mit der Negativkontrolle verglichen werden.

Überprüfen Sie neben den Cq-Werten auch die Amplifikationskurven und passen Sie gegebenenfalls den Threshold (noise band) an. Nachdem Sie die neuen Einstellungen gespeichert haben, exportieren Sie die Daten. Im Falle des cobas z 480 Analyzer exportieren Sie die Tabellen pro Farbstoff.

Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen überprüft und für valid befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die Ergebnisse der klinischen Proben nicht interpretiert werden.

Negative Proben:

Proben ohne Amplifikationskurven (keine Cq-Werte, „undetermined“) werden negativ gewertet. Bei diesen Proben wurde keine DNA nachgewiesen, da keine Infektion mit den untersuchten Erregern vorliegt oder die Erreger DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Positive Proben:

Da es sich bei *Aspergillus* und *Candida* spp. um Umweltorganismen handelt, ist eine Kontamination mit der DNA dieser Erreger während der Probenahme, Extraktion und PCR möglich. Die Cq-Werte der Proben im FAM- und VIC-Kanal müssen auch im Vergleich zu den Cq-Werten der Negativkontrolle der DNA-Extraktion interpretiert werden. Für die unten aufgelisteten Probenmaterialien gelten definierte Cut-off Cq-Werte. Bei Probenmaterialien mit Cq-Werten über dem Cut-off muss im Befund vermerkt werden, dass es sich möglicherweise um eine Kontamination handelt.

Cut-off Cq-Werte:

- Normalerweise sterile Proben wie EDTA-Blut, Liquor, Punktate, Aspirate, Gewebe: Cut-off = Cq \geq 45,0
- Semisterile Proben wie z.B. BAL, Hautstanzen: Cut-off Cq \geq 38,0
- Paraffinschnitte: Cut-off Cq \geq 34,0

Tabelle 3 zeigt die Kriterien für valide positive und negative Kontrollen. Tabelle 4 und Tabelle 5 zeigen die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

11.1 Kontrollen

Tabelle 3 zeigt die Kriterien für valide Kontrollen, wenn das IPC-Target (DNA) während der Extraktion zugegeben wurde. Kriterien gelten für die Analyse mit Assay Mix Module 7 und Assay Mix Module 8.

Tabelle 3 Kriterien für valide Kontrollen, wenn das IPC-Target (DNA) während der Extraktion zugegeben wurde. Gilt für die Analyse mit jeweils Module 7 + IPC3 Assay Mix und Module 8 + IPC3 Assay Mix.

	Cq FAM Kanal Erreger	Cq VIC Kanal Erreger	Cq Cy5 Kanal IPC ¹	Interpretation	Vorgehensweise
Positivkontrolle	< 30	< 30	Negativ	Valid	-
Positivkontrolle	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
Positivkontrolle	< 30	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
Positivkontrolle	Negativ	< 30	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
Negativkontrolle der Extraktion	Negativ	Negativ	27-30 ²	Valid	-
Negativkontrolle der Extraktion	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
Negativkontrolle der Extraktion	Positiv	Positiv	27-30 ²	Invalid	Siehe 12.3
Negativkontrolle der Extraktion	Positiv	Negativ	27-30 ²	Invalid	Siehe 12.3
Negativkontrolle der Extraktion	Negativ	Positiv	27-30 ²	Invalid	Siehe 12.3
NTC PCR (optional)	Negativ	Negativ	Negativ	Valid	-
NTC PCR (optional)	Positiv	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 12.2
NTC PCR (optional)	Negativ	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 12.2
NTC PCR (optional)	Positiv	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.2

¹ Falls das IPC-Target (DNA) direkt zum Mastermix zugegeben wurde, müssen alle Proben im Cy5 Kanal positiv sein.

² Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

³ Negativkontrolle der Extraktion

11.2 Klinische Proben

Tabelle 4 und Tabelle 5 zeigen die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

Tabelle 4 Interpretation von Daten klinischer Proben mit Module 7

	Cq FAM Kanal <i>C. parapsilosis</i> Gruppe	Cq VIC Kanal <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i>	Cq Cy5 Kanal IPC	Interpretation	Vorgehensweise
Klinische Probe	Negativ	Negativ	27-30 ¹	Negativ	-
Klinische Probe	Positiv	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für Mitglieder der <i>C. parapsilosis</i> Gruppe + <i>C. glabrata/C. krusei</i>	-
Klinische Probe	Negativ	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für <i>C. glabrata/C. krusei</i>	-
Klinische Probe	Positiv	Negativ	Positiv/Negativ ²	Positiv für Mitglieder der <i>C. parapsilosis</i> Gruppe	-
Klinische Probe	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.5

¹ Das positive Signal der IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibition aus. Die IPC Cq-Werte sollten jedoch zwischen den Proben vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten. Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

² Eine hohe Erregerkonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der IPC führen.

Hinweis:

- Eine *Candida parapsilosis* positive Probe kann zusätzlich mit Modul 8 ein schwaches Hintergrundsignal mit einem Shift des Cq-Werts von ca. 7 im FAM Kanal zeigen.
- Eine *Candida krusei* positive Probe kann ein schwaches Hintergrundsignal im FAM Kanal zeigen.
- Keine Speziesunterscheidung zwischen *Candida glabrata* und *Candida krusei*

Tabelle 5 Interpretation von Daten klinischer Proben mit Module 8

	Cq FAM Kanal <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. dubliniensis</i>	Cq VIC Kanal <i>A. fumigatus</i>	Cq Cy5 Kanal IPC	Interpretation	Vorgehensweise
Klinische Probe	Negativ	Negativ	27-30 ¹	Negativ	-
Klinische Probe	Positiv	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für <i>C. albicans/C. tropicalis/C. dubliniensis</i> und <i>A. fumigatus</i>	-
Klinische Probe	Negativ	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für <i>A. fumigatus</i>	-
Klinische Probe	Positiv	Negativ	Positiv/Negativ ²	Positiv für <i>C. albicans/C. tropicalis/C. dubliniensis</i>	-
Klinische Probe	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.5

¹ Das positive Signal der IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibition aus. Die IPC Cq-Werte sollten jedoch zwischen den Proben vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten. Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

² Eine hohe Erregerkonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der IPC führen

Hinweis:

- Eine *Candida parapsilosis* positive Probe kann zusätzlich mit Modul 8 ein schwaches Hintergrundsignal im FAM Kanal zeigen.
- Keine Speziesunterscheidung zwischen *Candida albicans*, *Candida tropicalis* und *Candida dubliniensis*.

12 Troubleshooting

12.1 Kein pathogenspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Gerät.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
→ Überprüfen Sie die Pipettierschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.
→ Die DNA ist möglicherweise abgebaut.
- Das IPC-Target (DNA) wurde unverdünnt direkt zum Mastermix gegeben und nicht frisch 1:100 verdünnt. Die PCR Reaktion ist dadurch inhibiert.
→ Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung des IPC-Targets (DNA) her und wiederholen Sie die PCR.
- Es wurde keine Positivkontrolle zugegeben.
→ Falls alle klinischen Proben negativ sind, wiederholen Sie die PCR.
- Nur für Kontrolle der real-time PCR: das IPC-Target (DNA) muss 1:100 frisch verdünnt zum Mastermix zugegeben werden. Falls die Zugabe des IPC-Targets (DNA) vergessen wurde:
→ Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung des IPC-Targets (DNA) her und wiederholen Sie die PCR.
- Für Kontrolle der DNA-Extraktion und real-time PCR: das unverdünnte IPC-Target (DNA) muss während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben werden. Falls die Zugabe des IPC-Targets (DNA) vergessen wurde:
→ Wiederholen Sie die DNA-Extraktion.

12.2 Erreger-Signal in der Negativkontrolle

- Falls Cq-Werte in der Negativkontrolle unterhalb des Cut-off liegen, der in der Gebrauchsanweisung spezifiziert ist, kam es zu einer Kontamination während der Vorbereitung der PCR.
→ Wiederholen Sie die PCR mit neuen Reagenzien in Replikaten.
→ Pipettieren Sie die Positivkontrolle immer zuletzt.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

12.3 Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion

- Falls Cq-Werte in der Negativkontrolle der Extraktion unterhalb des Cut-off liegen, der in der Gebrauchsanweisung spezifiziert ist, kam es zu einer Kontamination während der PCR oder DNA Extraktion.
→ Wiederholen Sie die PCR unter Verwendung neuer Reagenzien in Replikaten.
→ Falls wiederholt positiv: Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR unter Verwendung neuer Reagenzien.
→ Pipettieren Sie die Positivkontrolle immer zuletzt.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden und die Arbeitsplätze von Proben mit hoher Erregerkonzentration (z.B. Faeces, Speichel) getrennt sind.

12.4 IPC spezifisches Signal mit PCR Negativkontrolle und Positivkontrolle

- IPC-Target (DNA) wurde während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben, aber es gibt IPC spezifisches Signal mit der PCR-NTC und der Positivkontrolle: Kontamination mit dem IPC-Target (DNA)
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

12.5 Kein Signal mit IPC und kein pathogenspezifisches Signal in Probe

- Falsche Zuordnung der Detektionskanäle mit der Probe
→ Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
- Die DNA ist möglicherweise abgebaut.
- Falls das IPC-Target (DNA) während der Extraktion zugegeben wurde:
 - PCR Inhibierung könnte vorliegen.
 - DNA-Extraktion ist fehlgeschlagen.
 - Das IPC-Target (DNA) wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.

- Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.
- Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine empfohlene DNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die einzelnen Arbeitsschritte der DNA-Extraktion.
- Können keine Bedienungsfehler bei der Extraktion nachvollzogen werden, empfiehlt es sich, die PCR mit geringeren Mengen an DNA-Eluat (1/5 oder 1/10 des Probenvolumens + das entsprechende Volumen an Nuklease-freiem Wasser) zu wiederholen.

13 Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

13.1 Testperformance auf verschiedenen real-time PCR Geräten

Abbildungen 1-3 zeigen die Performance von MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

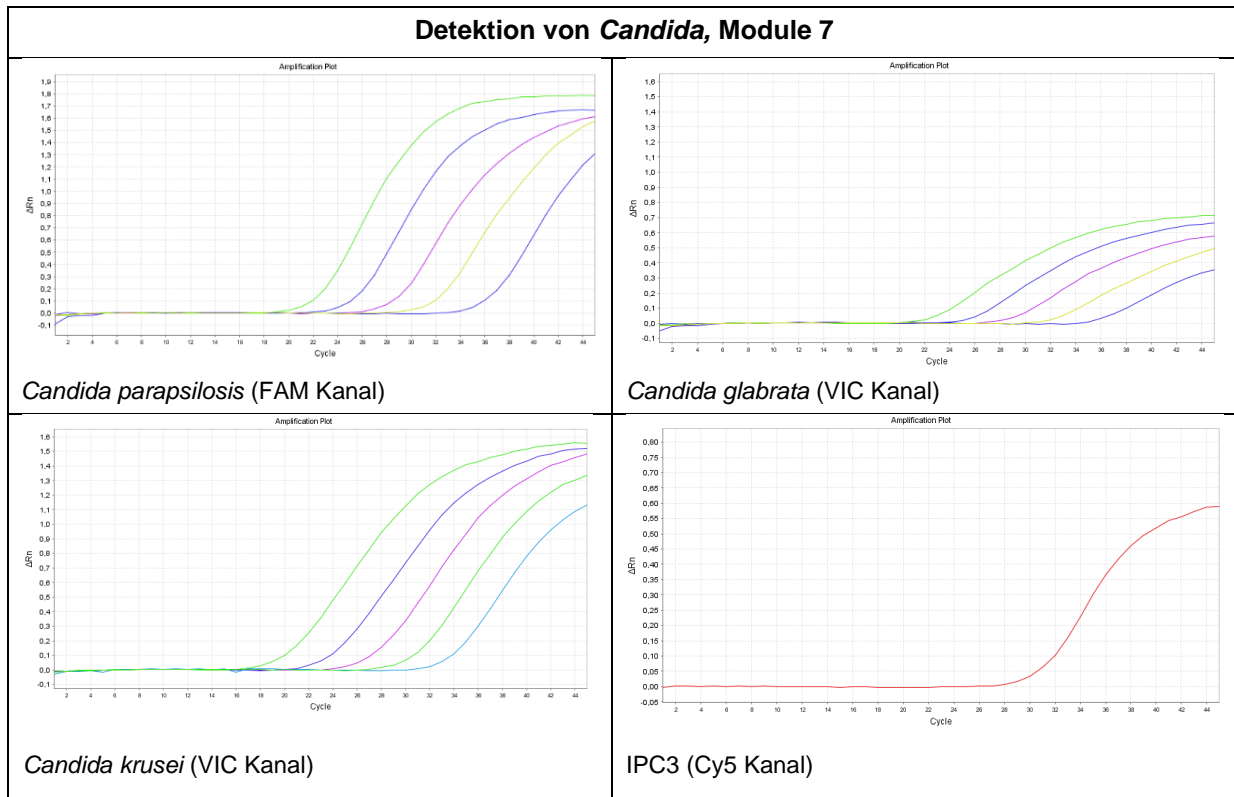


Abbildung 1 Standard Kurven von *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *C. krusei*

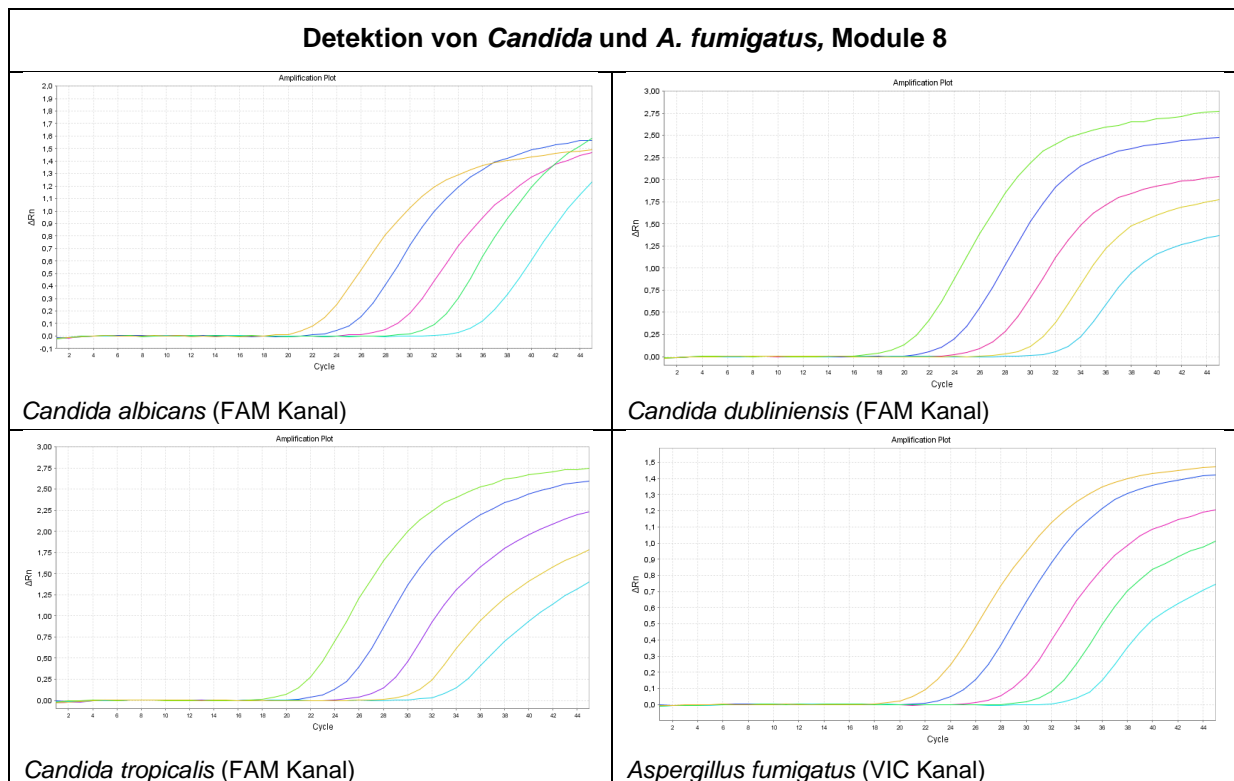


Abbildung 2 Standard Kurven von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* und *A. fumigatus*

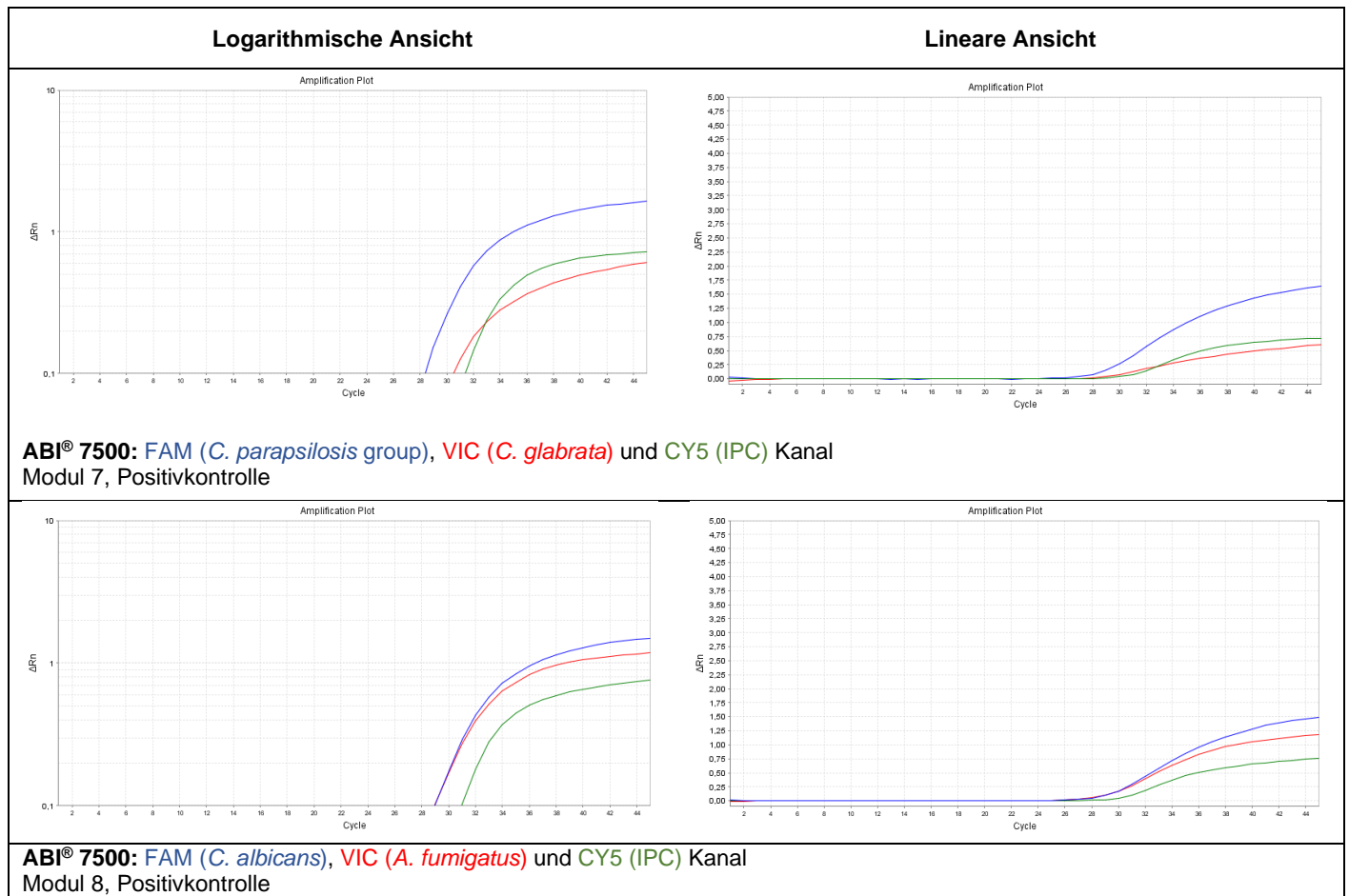


Abbildung 3 Amplifikationskurven mit Positivkontrolle

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit dem cobas z 480 Analyzer (Roche) getestet.

13.2 Nachweisgrenze, LoD95%

Methode: Die Nachweisgrenze (LoD95%: Anzahl an Kopien, welche in 95% der Fälle positiv detektiert werden) wurde mit Plasmid-DNAs, die jeweils ein Fragment der ITS 2-Region von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *A. fumigatus* enthalten, bestimmt. Getestet wurden zwölf Replikate bei sechs verschiedenen Konzentrationen um die Nachweisgrenze (1, 2, 4, 10, 20, 100 Kopien). Die LoD95% wurde mittels einer non-linearen Kurvenanpassung mit der Graph Pad Prism Software ermittelt.

Resultat: Die LoD95% beträgt je nach Spezies zwischen 3 und 32 Kopien. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die ITS2-Region ist ein Multikopie-Gen.

Hinweis: Vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Primer oder Sonden Region können zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen bei einigen *Candida* und *A. fumigatus* Stämmen führen.

Tabelle 6

	LOD95%	Linearität – Steigung	Linearität – R²
Modul 7 <i>C. parapsilosis</i> group	6	-3,33 ± 0,04	0,9928
Modul 7 <i>C. glabrata</i>	5	-3,16 ± 0,18	0,8725
Modul 7 <i>C. krusei</i>	32	-3,43 ± 0,02	0,9986
Modul 8 <i>C. albicans</i>	9	-3,25 ± 0,04	0,9931
Modul 8 <i>C. tropicalis</i>	9	-3,32 ± 0,03	0,9967
Modul 8 <i>C. dubliniensis</i>	3	-3,04 ± 0,10	0,9551
Modul 8 <i>A. fumigatus</i>	6	-3,32 ± 0,03	0,9970

13.3 Linearität und dynamischer Range

Methode: Die Linearität wurde mit 10-fachen Verdünnungsreihen (10^6 - 10^2 Zielkopien/Reaktion) der Plasmide bestimmt. Die Anzahl der Bestimmungen (n) pro Verdünnung beträgt neun.

Resultat: Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und Tabelle 6 dargestellt. Das R^2 für alle Spezies betrug zw. 0,87 und 0,99 und die Steigung lag zwischen -3,04 und -3,43, was auf eine gute Testperformance hinweist. Der Test zeigt Linearität über den Bereich von 100 bis 1.000.000 Zielkopien/Reaktion.

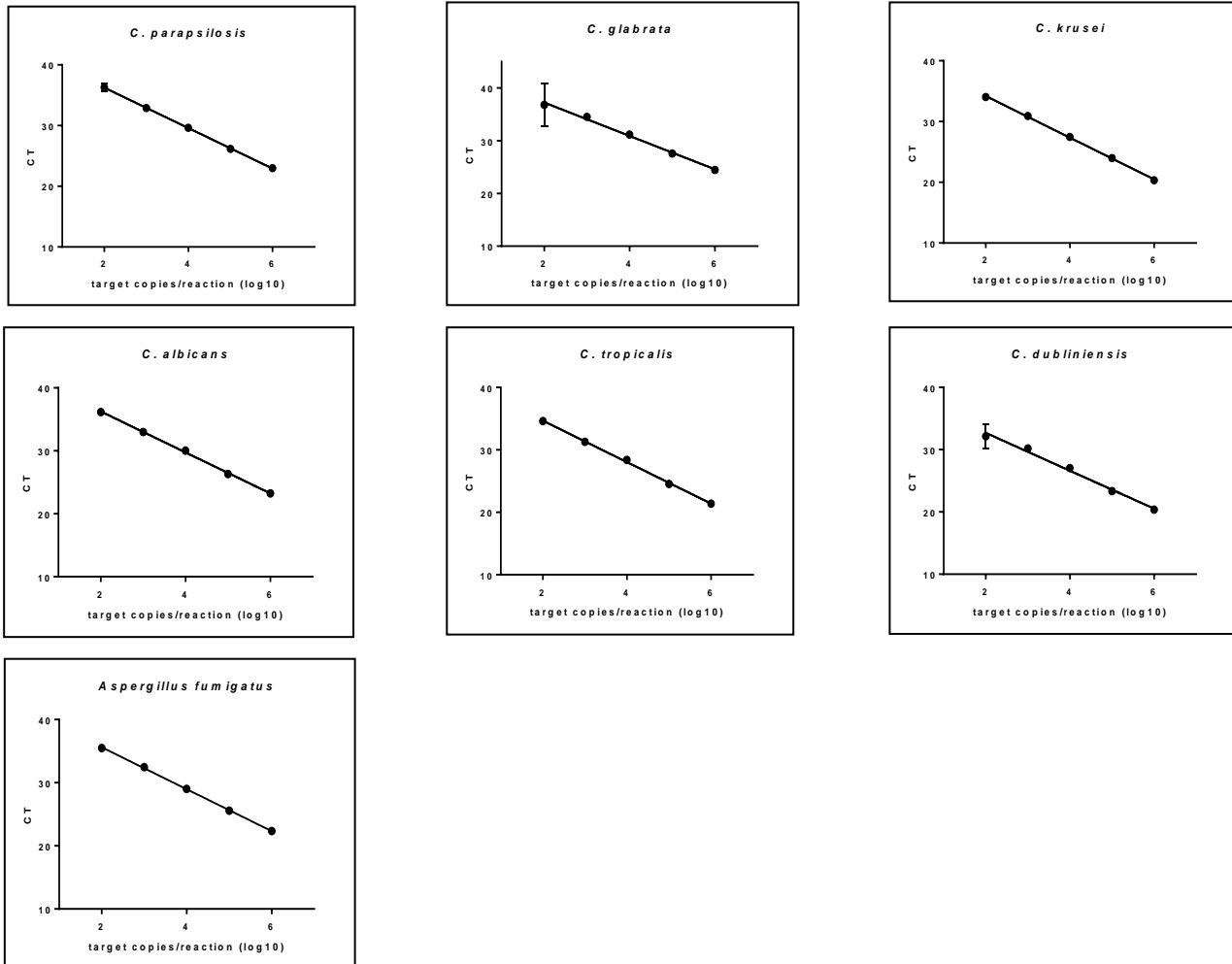


Abbildung 4 10-fache Verdünnungsreihen der DNA Standards

13.4 Analytische Spezifität

Methode: Die ITS-Region ist ein Multikopie-Gen und aufgrund ihrer hohen Spezies-Spezifität für die Differenzierung einzelner *Candida* Spezies und *Aspergillus* Gruppen geeignet. Um mögliche Kreuzreaktivitäten zu untersuchen, wurden Primer und Sonden auf mögliche Homologien zu aktuell publizierten Sequenzen analysiert. Die Spezifität der Primer und Sonden wurde *in silico* validiert, indem das Basic Local Alignment Tool (BLAST) gegen die NCBI-Datenbank durchgeführt wurde. Diese Datenbankanalyse (BLAST-Analyse) validierte den spezifischen Nachweis von acht *Candida* Spezies und *A. fumigatus*. Die analytische Spezifität wurde weiters mit genomischer DNA verschiedener Pilzspezies getestet.

Resultat: Siehe Tabelle 7, Tabelle 8. MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* detektiert *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (= *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis*), *C. parapsilosis* Gruppe, *C. tropicalis*, *A. fumigatus* und einige wenige andere *Candida* Spezies laut Tabelle 6.

2,5 % der als *C. albicans* klassifizierten Stämme und 6 % der als *C. tropicalis* klassifizierten Stämme in der NCBI-Datenbank könnten aufgrund von Mismatches nicht erkannt werden. Für einige dieser Einträge ist die korrekte phylogenetische Zuordnung der bereitgestellten ITS2-Sequenz jedoch noch nicht klar.

Die Testung von verschiedenen Pilzisolaten zeigte Amplifikation mit späten Cq-Werten mit *Syncephalastrum* sp., *Aureobasidium pullulans* und *Pichia fermentans*, was entweder auf Kontamination oder Kreuzreaktivität mit geringer Sensitivität zurückzuführen ist. BLAST Analysen mit diesen Spezies zeigten Mismatches in der Primer und Sonden Targetregion.

Tabelle 7 Resultate der BLAST Analysen

	Detektierte Spezies
Modul 7 (FAM) <i>Candida parapsilosis</i> group	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i>
Modul 7 (VIC) <i>Candida glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>
Modul 8 (FAM) <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. sojae</i> , <i>C. neerlandica</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Modul 8 (VIC) <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>Aspergillus</i> Spezies die der <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> angehören wie z.B. <i>Aspergillus lentulus</i> werden eventuell und mit geringerer Sensitivität nachgewiesen.

Tabelle 8 Getestete Pilzspezies

	Module 7	Module 8
Schimmelpilze		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Negativ	Cq=34 (VIC)
<i>Aspergillus flavus</i>	Negativ	Negativ
<i>Aspergillus nidulans</i>	Negativ	Negativ
<i>Penicillium marneffeii</i>	Negativ	Negativ
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Negativ	Negativ
<i>Rhizopus oryzae</i>	Negativ	Negativ
<i>Mucor circinelloides/racemosus</i>	Negativ	Negativ
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Negativ	Negativ
<i>Absidia corymbifera</i>	Negativ	Negativ
<i>Cunninghamella elegans</i>	Negativ	Negativ
<i>Syncephalastrum</i> sp.	Cq=40 (FAM) (Kreuzreaktion/Kontamination)	Negativ
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Negativ	Negativ
<i>Fusarium oxysporum</i>	Negativ	Negativ
<i>Fusarium solani</i>	Negativ	Negativ
<i>Beauveria bassiana</i>	Negativ	Negativ
<i>Natrassia mangiferae</i>	Negativ	Negativ
<i>Alternaria alternata</i>	Negativ	Negativ
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>lunata</i>	Negativ	Negativ
<i>Schizophyllum commune</i>	Negativ	Negativ
<i>Acremonium strictum</i>	Negativ	Negativ
<i>Paecilomyces variotii</i>	Negativ	Negativ
Dematiaceae		
<i>Bipolaris australiensis</i>	Negativ	Negativ
<i>Cladosporium herbarum</i>	Negativ	Negativ
<i>Phialophora richardsiae</i>	Negativ	Negativ
<i>Sporothrix schenkii</i>	Negativ	Negativ
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Cq=39 (FAM) (Kreuzreaktion/Kontamination)	Negativ
<i>Cladophialophora</i>	Negativ	Negativ
Dermatophyten		
<i>Microsporium canis</i>	Negativ	Negativ
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Negativ	Negativ
Sprosspilze		
<i>Candida glabrata</i>	Cq=25 (VIC)	Negativ
<i>Candida tropicalis</i>	Negativ	Cq=27 (FAM)
<i>Candida albicans</i>	Negativ	Cq=30 (FAM)
<i>Candida parapsilosis</i>	Cq=27 (FAM)	Cq=35 (FAM) (Kreuzreaktion)
<i>Candida krusei</i>	Cq=30 (VIC) + Cq=32 (FAM)	Negativ
<i>Candida dubliniensis</i>	Negativ	Cq=28 (FAM)
<i>Candida lusitanae</i>	Negativ	Negativ
<i>Candida guilliermondii</i>	Negativ	Negativ
<i>Candida kefyri</i>	Negativ	Negativ
<i>Candida valida/Pichia membranifacies</i>	Negativ	Negativ
<i>Debaromyces hansenii</i>	Negativ	Negativ
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Negativ	Negativ
<i>Rhodotorula rubra</i>	Negativ	Negativ
<i>Pichia fermentans</i>	Cq=40 (VIC) (Kreuzreaktion/Kontamination)	Negativ
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Negativ	Negativ
<i>Malassezia furfur</i>	Negativ	Negativ
<i>Malassezia pachydermatis</i>	Negativ	Negativ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Negativ	Negativ
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Negativ	Negativ

13.5 Inter-Assay-Präzision

Methode: Die Präzision innerhalb eines Laufs (Intra-Assay), zwischen mehreren Läufen (Inter-Assay) und zwischen zwei Lots (Inter-Lot) wurde bestimmt.

Resultat: Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (CV%) werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Zusammenfassung Mittelwerte der Variationskoeffizienten

	Mittelwert CV% Intra-Assay	Mittelwert CV% Inter-Assay	Mittelwert CV% Inter-Lot
<i>C. albicans</i>	0,96%	0,56%	1,03%
<i>C. dubliniensis</i>	0,72%	2,00%	0,74%
<i>C. glabrata</i>	1,82%	1,46%	1,06%
<i>C. krusei</i>	0,41%	0,29%	0,86%
<i>C. parapsilosis</i>	0,77%	1,15%	1,09%
<i>C. tropicalis</i>	0,69%	0,34%	1,16%
<i>A. fumigatus</i>	0,58%	0,45%	0,95%

13.6 Klinische Validierung

Für die klinische Validierung wurden Blutproben und andere klinische Proben analysiert.

Methode: MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* wurde von einem externen Dienstleister an 13 (Module 7) und 32 (Module 8) Vollblutproben von 39 Patienten getestet. Die Extraktion von einem ml Blut wurde mit dem SeptiFast LysKit (Roche) durchgeführt. Die Analysen wurden in Einzelreaktionen auf dem cobas z 480 Analyser (Roche) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des LightCycler® SeptiFast Tests (Roche) verglichen.

Weiters wurde MycoReal Kit *Candida* & *A. fumigatus* an 31 verschiedenen klinischen Proben von 31 Patienten getestet (9 Gewebe, 18 Aspierte/Punktate, 1 BAL, 1 Liquor, 1 Abstrich, 1 EDTA-Blut). Die Analysen wurden in Einzelreaktionen auf dem cobas z 480 Analysegerät (Roche) durchgeführt. Proben mit abweichenden Ergebnissen im Vergleich zur Referenzmethode wurden auf dem ABI® 7500 wiederholt. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Kultur und einer panfungalen in-house real-time PCR auf Basis von HybProbes verglichen. Darüber hinaus wurden einige Proben mit abweichenden Ergebnissen mit einem *Candida*-spezifischen real-time PCR Test auf Basis von HybProbes (MycoReal® *Candida*, ingenetix) erneut analysiert.

Resultat: Siehe Tabelle 10

Tabelle 10 Zusammenfassung der klinischen Leistung mit 70 klinischen Proben

	Blut + andere Proben (n=70)	Blutproben (n=39)	Andere Proben (n=31)
Sensitivität	90,91%	85,29%	100,00%
Spezifität	93,33%	100,00%	90,00%
NPV	73,68%	50,00%	100,00%
PPV	98,04%	100,00%	95,45%
Prevalenz	78,57%	87,18%	67,74%
Genauigkeit	91,43%	87,18%	96,77%

Darüber hinaus wurde MycoReal® Kit *Candida* & *A. fumigatus* mit 24 Paraffinschnitten getestet, und die Ergebnisse wurden mit der Patientenanamnese und einem In-house real-time PCR Test auf Basis spezifischer Biprobe für *Candida* und *Aspergillus* (Schabereiter-Gurtner et al., 2007) verglichen. Auf Grundlage der Ergebnisse wurde für Paraffinschnitte ein Cut-off-Wert von Cq \geq 34,0 festgelegt. Bei Proben mit Cq-Werten oberhalb des Cut-offs kann eine echte Infektion nicht von einer Kontamination unterschieden werden (Daten nicht gezeigt).

14 Literatur

- Schabereiter-Gurtner, C., B. Selitsch, M. Rotter, A. M. Hirschl, and B. Willinger. 2007. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 45:906-914.
- Zeller I, Schabereiter-Gurtner C, Mihalits V, Selitsch B, Barousch W, Hirschl AM, Makristathis A, Willinger B. 2017. Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. J Med Microbiol. 66:1383.

15 Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung
1.0	14.05.2021	Erstversion
1.1	01.05.2023	<p>Änderung der Firmenadresse</p> <p>1. Verwendungszweck Verwendungszweck näher spezifiziert</p> <p>5. Inhalt, Stabilität und Lagerung Kitversion 1.1: Geändertes Füllvolumen von IPC-Target (DNA) und Positivkontrolle Das DNA IPC Target wird nicht mehr in RNA/DNA Stabilizer aufbewahrt und wurde zu IPC-Target (DNA) umbenannt. Module 7 Assay Mix wurde zu Module 7 + IPC3 Assay Mix umbenannt. Module 8 Assay Mix wurde zu Module 8 + IPC3 Assay Mix umbenannt.</p> <p>6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte Update</p> <p>7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise Ergänzung um zusätzliche Informationen zur Probenentnahme und -lagerung, zur Verarbeitung der Proben nach der Entnahme, zu den Lagerbedingungen der Proben, zu den Transport- und Lagerbedingungen der gereinigten DNA.</p> <p>9. Vorbereitung der Proben Update Mag-Bind® Universal Pathogen DNA 96 Kit, M4029-00, Omega wurde entfernt innuPREP AniPath DNA RNA - KFFLX Kit eingefügt Hinweis, dass das IPC-Target (DNA) bei Cq Werten <27 vor der Extraktion verdünnt werden muss. Anhang mit Protokoll für Extraktion wurde entfernt. Information wurde in Punkt 9. eingearbeitet.</p> <p>10. Vorbereitung der real-time PCR Update Das Temperaturprofil hat sich geändert – der Aktivierungsschritt im Programm 2 wurde von 20 sec auf 2 min verlängert.</p> <p>11. Interpretation der PCR-Daten Update Definition der Cq-, Ct- und Cp-Werte. Aktualisierung der Tabellen für Ergebnisse mit positiven und negativen Kontrollen und klinischen Proben. Aufnahme einer Erklärung zur Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben in Bezug auf die Kontrollen.</p> <p>12. Troubleshooting Aktualisierung in Bezug auf die Verweise in den neuen Ergebnistabellen.</p> <p>13. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance</p> <p>13.8 Klinische Evaluierung Zusammenfassung der Präzision in Tabelle 9 Die Tabelle mit den aufgeführten klinischen Proben wurde entfernt. Update für Paraffinschnitte</p>

Hinweis:

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

Technischer Support:

ingenetix GmbH, Haidingergasse 1 ,1030 Wien, Österreich

Telefon: +43 (0)1 36 198 01; **E-Mail:** office@ingenetix.com