



VisionArray MYCO Chip 2.0

REF VA-0005-10 Σ 10 Reaktionen

Für den spezifischen Nachweis der Gattung *Mycobacterium* und mehrerer klinisch relevanter Mykobakterien-Spezies, die mit dem VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 aufbereitet wurden



In-vitro-Diagnostikum
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

1. Verwendungszweck

Der VisionArray MYCO Chip 2.0 ist in Kombination mit der VisionArray Software für den qualitativen Nachweis und die Identifizierung von PCR-Amplifikaten der Gattungen *Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacter* und *Mycolicibacterium* sowie mehrerer darin enthaltener klinisch relevanter Mykobakterien-Spezies, welche mit dem VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 aufbereitet wurden, bestimmt.

Die Gattung *Mycobacterium* wurde kürzlich in die 5 verschiedenen Gattungen *Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacter* und *Mycolicibacterium* unterteilt, wie von Gupta et al. (2018) vorgeschlagen und gültig in der *Validation List No. 181* (Oren and Garrity 2018) publiziert. Aus Gründen der Verständlichkeit und Konsistenz wird in Teilen dieser Gebrauchsanweisung weiterhin auf die ehemals einzige Gattung *Mycobacterium* verwiesen.

Dieses Produkt wurde für den Einsatz als In-vitro-Diagnostikum (gemäß EU-Richtlinie 98/79/EC) konzipiert. Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

2. Klinische Relevanz

Die genannten Mykobakterien-Gattungen umfassen mehr als 140 Spezies, welche zum Zweck der Diagnose und Behandlung in drei Kategorien unterteilt werden: *M. tuberculosis* Komplex (MTC), *M. leprae* sowie nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM). Aufgrund ihrer Unterschiede hinsichtlich Pathogenität, Virulenz und Wirksamkeit der Therapie ist der Nachweis und die Differenzierung dieser Pathogene in klinischen Präparaten von Patienten mit klinischem Verdacht auf Tuberkulose von größter Bedeutung.

Der VisionArray MYCO Chip 2.0 wurde für den Nachweis der Mykobakterien-Spezies entwickelt, die in Kapitel 4 „Enthaltene Komponenten“ beschrieben werden.

3. Prinzip der Methode

Sequenzspezifische DNA-Fragmente in einem Pool von DNA-Fragmenten werden durch DNA/DNA-Hybridisierung mit immobilisierten DNA-Fängern auf einem Glaschip nachgewiesen. Zunächst werden die Zielsequenzen in diesem Material mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotinmolekülen markiert. Anschließend hybridisieren die amplifizierten Sequenzen mit den komplementären DNA-Fängern auf dem Glaschip. Nach der Hybridisierung werden unspezifisch gebundene DNA-Fragmente durch kurze Stringenzwasc Schritte entfernt. Die spezifisch gebundenen und biotinylierten Sequenzen werden durch eine sekundäre Bindung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und einer Färbung mit Tetramethylbenzidin (TMB) visualisiert.

4. Enthaltene Komponenten

Die folgenden Komponenten sind enthalten:

Code	Komponente	Menge
		10 Σ
VA-0005	VisionArray MYCO Chip 2.0	10
	Gebrauchsanweisung	1

Beschreibung des Chips:

Positionierung der Fängersequenzen auf dem Chip:

GD										GD
	+	1	2	3	4	5	6			
		7	8	9	10	11	12			
		13	14	15	16	17	18			
		6	5	4	3	2	1	+		
		12	11	10	9	8	7			
		18	17	16	15	14	13			
GD										

GD	Guide Dot	9	<i>M. gordonae</i>
+	PCR-Positivkontrolle	10	<i>M. haemophilum</i>
1	<i>M. tuberculosis</i> complex (ITS Region)	11	<i>M. kansasii</i>
2	<i>M. tuberculosis</i> complex (IS6110 Region)	12	<i>M. malmoense</i>
3	<i>M. abscessus</i>	13	<i>M. marinum</i> / <i>M. ulcerans</i>
4	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> complex	14	<i>M. scrofulaceum</i> / <i>M. parascrofulaceum</i>
5	<i>M. chelonae</i>	15	<i>M. simiae</i>
6	<i>M. chimaera</i>	16	<i>M. smegmatis</i>
7	<i>M. fortuitum</i>	17	<i>M. szulgai</i>
8	<i>M. genavense</i>	18	<i>M. xenopi</i>

Das Signal für den *M. tuberculosis* Komplex umfasst: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* und *M. pinnipedii*.

Das Signal für den *M. avium* / *M. intracellulare* Komplex umfasst: *M. avium*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. timonense*, *M. yongonense*, *M. lepraemurium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense*, *M. bochedurhonense*, *M. marseillense* und *M. paraintracellulare*.

Beschreibung des Chip File:

Unter folgendem Link kann die [VisionArray MYCO Chip File 2.0](#) heruntergeladen werden:

<https://www.zytovision.com/chip-file/e-4205.zip>

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- [VisionArray SingleScan Software](#) (E-4301) oder [VisionArray MultiScan Software](#) (E-4302)
- [VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0](#) (ES-0008)
- [VisionArray Detection Kit](#) (VK-0003)

Für einen erfolgreichen Scan müssen die [VisionArray Softwares](#) den [VisionArray MYCO Chip File 2.0](#) (E-4205) enthalten.

6. Lagerung und Handhabung

Die Chips müssen in der unversehrten Originalverpackung bei -16...-22°C gelagert werden. Werden die Chips unter diesen Lagerbedingungen aufbewahrt, sind die Chips ohne Leistungsverlust mindestens bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum funktionsfähig.

Nach dem Öffnen der Originalverpackung bei -16...-22°C lagern und innerhalb von zwei Monaten verwenden.

7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Chips nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Bitte prüfen Sie vor dem Gebrauch, ob die Verpackung intakt ist. Verwenden Sie das Produkt nicht, wenn die Verpackung beschädigt ist.
- Chips sollten unter staubfreien Bedingungen verwendet werden. Kontaminationen der Chip-Oberfläche mit Staub oder anderen Partikeln vermeiden!
- Direkten Kontakt mit dem Array Feld auf der Chip-Oberfläche vermeiden!
- Nur die etikettierte Seite des Objektträgers kann für die Hybridisierung verwendet werden.
- Kreuzkontamination der Proben vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.

8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.
- Der Chip ist nur für den Nachweis der Mykobakterien-Spezies, die in 2. „Klinische Relevanz“ beschrieben werden, zu verwenden.

Außerdem können folgende Faktoren das Nachweissystem beeinflussen:

- Abweichungen von dem empfohlenen Detektionsprotokoll (z.B. Temperatur oder Volumina der Reagenzien).
- Degradiertes oder gering konzentriertes DNA-Material.
- Ungeeignetes Ausgangsmaterial.
- Verwendung von nicht kalibrierter oder beschädigter Ausstattung.
- Bei starken mykobakteriellen Infektionen oder im Fall von multiplen Infektionen kann die Intensität der PCR-Positivkontrolle beeinträchtigt sein.
- Während der Durchführung nicht unter einer Laminar-Flow Werkbank arbeiten, da dies zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann.

9. Störsubstanzen

- Geringe PCR-Effizienz durch Inhibitoren aus dem DNA-Ausgangsmaterial (z.B. Blut).
- Verwendung von PCR-Additiven, welche die Hybridisierung beeinflussen können (z.B. DMSO, Betain, Urea).

10. Vorbereitung der Proben

Ausgangsmaterial für dieses Nachweissystem sind DNA-Sequenzen, die mit dem [VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0](#) amplifiziert und biotinyliert wurden.

Die Hybridisierung und Detektion der Chips muss mit dem [VisionArray Detection Kit](#) gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt werden.

11. Vorbereitung der Reagenzien

Vor Verwendung die Chips auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen.

12. Durchführung

Den Scan wie in der Gebrauchsanweisung der entsprechenden [VisionArray Software](#) beschrieben durchführen.

13. Interpretation der Ergebnisse

Mit Hilfe des [VisionArray MYCO Chip 2.0](#) ist es möglich, eine qualitative Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von einer oder mehreren der Mykobakterien-Spezies in der untersuchten Probe zu treffen.

Die Intensität des Signals wird durch die Häufigkeit der Zielsequenz in der Probe sowie durch weitere Faktoren des Nachweissystems beeinflusst. Es ist nicht möglich, die absoluten Werte der Signalintensität zur Bestimmung der DNA-Konzentration zu verwenden.

Software-basierte Auswertung

Die automatisierte Auswertung der Ergebnisse wird mit der entsprechenden [VisionArray Software](#) durchgeführt. Eine umfangreiche Gebrauchsanweisung zur Chip-Analyse liegt der Software bei.

14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Interne Kontrollen:

- Guide Dots/Hybridisierungskontrolle (GD): Diese Dots werden von der entsprechenden [VisionArray ASoftware](#) zur Positionierung des Grids verwendet. Zusätzlich ist die Färbung Beweis für eine erfolgreiche Durchführung der Hybridisierungs-, Markierungs- und Färbereaktion und wird zur Berechnung der relativen Signalintensitäten verwendet.
- Positivkontrolle/PCR-Kontrolle (+): Diese Kontrollen werden zur Bewertung der PCR-Reaktion und der Qualität des PCR-Templates verwendet.
- Alle Fängersequenzen und die Positivkontrolle sind als Duplikate und die Guide Dots sind als Triplikate auf dem Chip aufgebracht. Die Signale sind als runde Hybridisierungssignale auf dem Chip sichtbar.

Externe Kontrollen:

Um die korrekte Leistung der verarbeiteten Proben und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von extern validierten positiven und negativen Kontrollproben begleitet werden. Wenn interne und/oder externe Kontrollen keine angemessene Färbung nachweisen können, sind die Ergebnisse mit Patientenproben als ungültig anzusehen.

15. Leistungsmerkmale

15.1 Analytische Leistung

Die analytische Spezifität und Sensitivität des [VisionArray MYCO Chip 2.0](#) wurde für jede Mykobakterien-Spezies auf dem Chip einzeln bestimmt. Zu diesem Zweck wurden sequenzgeprüfte Plasmide mit einer Konzentration von 5-500.000 Genomäquivalenten (GEQ) getestet.

Spezifität und Detektionslimit für Mykobakterien-Spezies

Mykobakterium	Spezifität [%]	Detektionslimit (GEQ)
M. tuberculosis complex (ITS)	100	50
M. tuberculosis complex (IS6110)	100	5
M. abscessus	100	500
M. avium / M. intracellulare complex	100	50
M. chelonae	100	1000
M. chimaera	100	50
M. fortuitum	100	50
M. genavense	100	50
M. goodii	100	50
M. haemophilum	100	50
M. kansasii	100	50
M. malmoense	100	50
M. marinum / M. ulcerans	100	50
M. scrofulaceum / M. parascrofulaceum	100	50
M. simiae	100	50
M. smegmatis	100	50
M. szulgai	100	50
M. xenopi	100	50

Die Sensitivität ist abhängig von der Anzahl und der Effizienz der PCR-Zyklen sowie von der Affinität der Fänger.

Die ermittelte Sensitivität bezieht sich auf den Nachweis einer einzelnen Zielsequenz. Der Nachweis von multiplen Infektionen kann zur Beeinträchtigung der Sensitivität einiger Mykobakterien-Spezies führen, da es insbesondere in gemischten Proben mit starkem Konzentrationsunterschied zur Konkurrenz während der PCR-Reaktion kommen kann.

Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

15.2 Kreuzhybridisierungen

Bei einer Konzentration von bis zu 500.000 GEQ konnten keine Kreuzhybridisierungen beobachtet werden.

15.3 Cutoff

Zur Auswertung der Ergebnisse ist die Dot-Größe auf 50 gesetzt.

Der Schwellenwert (Cutoff) wurde für das Graustufenbild dieser Dot-Größe auf 25 gesetzt. Ein Signal unterhalb dieses Wertes wird von der entsprechenden VisionArray Software als Hintergrund betrachtet.

16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu einer Beeinträchtigung des Nachweises der Zielsequenz führen.

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Kein Signal	Falsche Temperatur	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Abgelaufene Reagenzien	Reagenzien prüfen
Nur Guide Dots und keine weiteren Signale	Probleme mit dem PCR-Produkt (PCR ist nicht effizient genug oder die Template-DNA ist degradiert)	Mit einer Positivkontrolle die PCR-Effizienz überprüfen; PCR-Chemikalien und Thermocycler-Programm prüfen; PCR-Produkt im Agarosegel prüfen
	Falsches Ausgangsmaterial	Ausgangsmaterial prüfen
	Falsche Kombination von Chip und Probe	Kombination aus Probe/Chip prüfen
Nur Guide Dots und PCR-Kontrolle, aber keine weiteren Signale	Keine Zielsequenz vorhanden	Positivkontrolle verwenden

Nur Guide Dots und MYCO Signale, aber keine positive Kontrolle	Starke mykobakterielle Infektion oder multiple mykobakterielle Infektionen	DNA-Proben verdünnen
	Material aus mykobakterieller Zellkultur, keine humangenomische DNA in Probe	-
	Degradierter Probe	Neue DNA-Extraktion; bei -16...-22°C lagern
Zu viel Hintergrundsignal	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Inkubationszeit und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution prüfen
	Objektträger nicht ausreichend getrocknet	Trocknungsschritt prüfen
Starke, auslaufende Signale	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Schrittweise Anpassung der Inkubationsdauer und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution
Schwache Signale	Hybridisierungstemperatur inkorrekt	Temperatur prüfen
	Hybridisierungszeit zu kurz	Hybridisierungszeit bis maximal 30 min verlängern
	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu kurz	Inkubationszeit mit Detection Solution und Blue Spot Solution verlängern
	Schwache PCR-Amplifikation/schlechte Qualität der Template-DNA	Template-DNA prüfen
Kreuzhybridisierungssignale, falsch positive Signale	Kontamination der PCR-Chemikalien oder des PCR-Produkts	Verwendete PCR-Chemikalien ersetzen
	Kontamination während der Vorbereitung der PCR oder des Hybridisierungsmix	Transfer der Probe während der Vorbereitung des Mix vermeiden
	Hybridisierungstemperatur zu gering	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Mehrere Chips zu lange im gleichen Wash Buffer inkubiert	Schnelle Durchführung der Waschschritte
Einzelne Signale statt Duplikate	Mechanische Eliminierung des zweiten Signals, z.B. durch Kontakt mit der Pipettenspitze	Direkten Kontakt mit dem Array Feld vermeiden
	Unregelmäßige Abdeckung des Array Feldes aufgrund von Luftblasen	Lösungen ohne Luftblasen auftragen
	Schwache Signale um den Schwellenwert (1 drüber und 1 drunter)	PCR und Detektion unter Berücksichtigung der in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Bedingungen wiederholen

18. Literatur

- Griffith D.E., et al (2007) Am J Respir Crit Care Med. 175(4):367-416
- Official statement of the american thoracic society (1997), Am J Respir Crit Care Med. 156(2 Pt 2):S1-25
- Roth et al (1998) J Clin Microbiol. 36(1):139-47
- Simons S., et al (2011) Emerg Infect Dis. 17(3):343-9
- Gupta R.S., et al (2018) doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
- Oren A. and Garrity G. (2018) Int J Syst Evol Microbiol 68:1411–1417

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Deutschland
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Warenzeichen:
VisionArray® ist ein Warenzeichen der
ZytoVision GmbH